



*Caracterización funcional de microRNAs
específicos de melón (C. melo L.)
relacionados con la respuesta a estrés*

Rafael García López



Directora: María Carmen Marqués Romero

Director: Antonio Javier Bustamante Gonzalez

Tutor UPV: José Miguel Mulet Salort



Enero del 2018

Máster en biotecnología molecular y celular de plantas

Instituto de biología molecular y celular de plantas

Índice

Resumen	1
Abstract	2
Introducción	3
<i>Estrés y biogénesis de microRNAs</i>	3
<i>El melón</i>	5
<i>Antecedentes del grupo de investigación</i>	6
<i>miRBase</i>	8
<i>Predicción de posibles nuevos microRNAs de melón</i>	9
<i>miRCat2</i>	9
<i>miRDeep*</i>	10
<i>Predicción de las dianas</i>	10
<i>psRNATarget</i>	11
Materiales y Métodos	12
1. Validación de microRNAs.....	12
1.1. Validación de su existencia.....	12
1.1.1. Purificación de sRNAs a partir de RNA total.....	12
1.1.2. Aislamiento y secuenciación de microRNAs.....	12
I) Diseño del stem loop específico de RT-PCR.....	13
II) RT-PCR pulsada.....	13
III) PCR.....	14
IV) Ligación del producto de PCR de miRNAs.....	14
V) Transformación y PCR de colonia.....	15
VI) Tratamiento con ExoSAP y secuenciación.....	16
1.2. Validación de la actividad funcional. Predicción, análisis y validación de dianas.....	16
1.2.1. 5' RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends).....	16
1.2.2. PCR semi-cuantitativa.....	17
1.2.3. PCR cuantitativa (qPCR), acumulación diferencial de la diana.....	18
<i>Síntesis de cDNA</i>	18
<i>qPCR y análisis de los datos</i>	18
Objetivos	19
Resultados	20
I. CRITERIOS DE PREDICCIÓN DE NUEVOS MIRNAS.....	20
A. Predicción de miRNAs por miRDeep*.....	20
B. Predicción de miRNAs por miRCat2.....	20
C. Selección de los mejores candidatos.....	22
II. VALIDACIÓN DE LA EXISTENCIA DE LOS NUEVOS MICRORNAS PREDICHOS.....	23
<i>Identificación de los posibles miRNAs por stem loop RT-PCR,</i>	23
III. VALIDACIÓN FUNCIONAL DE LOS POSIBLES MICRORNAS EN BASE AL ANÁLISIS DE SUS DIANAS PREDICHAS.....	24
A. Predicción y selección de dianas.....	24
B. Validación funcional, identificación del corte en las dianas por 5'RLM-RACE.....	26
C. Validación funcional por qRT-PCR de las dianas predichas.....	27
IV. MIRNAS NUEVOS DE MELÓN RELACIONADOS CON LA RESPUESTA A ESTRÉS.....	28
Discusión	31
Conclusiones	37
Bibliografía	38
Anexos	43
I. Anexo introducción.....	43
II. Anexo materiales y métodos.....	45
III. Anexo resultados.....	46

Resumen

El presente trabajo se basa en resultados previos obtenidos a partir del análisis de las poblaciones de sRNAs determinadas por secuenciación masiva (*Next Generation Sequencing*) provenientes de plantas de melón (*Cucumis melo* L. cv. Piel de Sapo) expuestas a diferentes condiciones adversas, con el fin de llevar a cabo un estudio sistemático de la respuesta a estrés, en el cual se observó una acumulación predominante de secuencias de 24 nucleótidos, seguida de secuencias de 21 nucleótidos de longitud (la habitual en la mayoría de los miRNAs descritos).

Con el fin de determinar la posible actividad biológica de estas secuencias, así como identificar y describir nuevos miRNAs de melón (diferentes a los miRNAs depositados en el repositorio miRBase), se emplearon una serie de métodos de predicción bioinformáticos respaldados por diferentes ensayos biológicos.

En este trabajo se muestra cómo ambas “especies” de miRNAs pueden ser aisladas de muestras de sRNAs de melón por *stem loop* RT-PCR y verificadas por secuenciación. Una posterior predicción de dianas para dichos posibles miRNAs seguida del estudio de las mismas por 5'RLM-RACE permitió determinar que efectivamente algunas de las dianas predichas estaban siendo degradadas, aislando en ciertas ocasiones el punto de corte canónico para la actividad como miRNA del correspondiente sRNA. Mediante una qRT-PCR se comprobó la correlación entre los estudios previos de acumulación diferencial de los diferentes sRNAs en las muestras de melón de los diferentes estreses, y la hipotética respuesta esperada en los niveles de mRNA diana de dichos sRNAs actuando como miRNAs. De las dianas predichas para los miRNAs analizados principalmente fueron detectables los cortes esperados y acumulaciones diferenciales del transcrito en aquellas dianas que lo eran para posibles miRNAs de 21 nt, mientras que solo dos pudieron ser validadas para sRNAs de 24 nt a pesar de ser la especie predominante (más del 50 % de los sRNAs analizados). En base a los resultados obtenidos en este trabajo 8 de los 26 sRNAs analizados presentan un nivel de evidencia lo suficientemente elevado que permitiría anotarlos como verdaderos miRNAs nuevos de melón de respuesta a estrés. Del mismo modo, estos resultados parecen indicar que los miRNAs de 24 nt específicos de melón podrían haber evolucionado, por un mecanismo de adaptación específico, hacia otro tipo de regulación de la expresión génica alternativa a la actividad de corte del transcrito; como la inhibición de la traducción o la metilación de secuencias reguladoras; aunque harían falta otros ensayos biológicos para determinarlo con precisión.

Abstract

The present work is based on previous results obtained from the analysis of sRNA populations determined by deep sequencing (Next Generation Sequencing) from melon plants (*Cucumis melo* L. cv. Piel de Sapo) exposed to different adverse conditions in order to carry out a systematic study of the response to stress, in which a predominant accumulation of sequences of 24 nucleotides was observed, followed by sequences of 21 nucleotides in length (the usual in most of the miRNAs described).

To determine the possible biological activity of these sequences, as well as to identify and describe new melon miRNAs (different to the miRNAs deposited in the miRBase repository), a series of bioinformatic prediction methods supported by different biological assays were used.

This work shows how both "species" of miRNAs can be isolated from samples of melon sRNAs by stem loop RT-PCR and verified by sequencing. A subsequent prediction of targets for said possible miRNAs followed by the study of them by 5'RLM-RACE allowed to determine that indeed some of the predicted targets were being degraded, isolating in certain occasions the canonical cut-off for the miRNA activity of the corresponding sRNA. Using a qRT-PCR the correlation between the previous studies of differential accumulation of the different sRNAs in the melon samples of the different stresses and the hypothetical response expected in the target mRNA levels of said sRNAs acting as miRNAs was confirmed. Of the predicted targets for the miRNAs analysed, the expected cuts and differential accumulations of the transcript were detectable in those targets that were possible for 21 nt miRNAs, while only two could be validated for sRNAs of 24 nt despite being the species predominant (more than 50% of the sRNAs analysed). Based on the results obtained in this work, 8 of the 26 analysed sRNAs present a sufficiently high level of evidence that would allow them to be annotated as true new melon stress responsive miRNAs. In the same way, these results seem to indicate that the miRNAs of 24 nt specific of melon could have evolved, by a specific adaptation mechanism, towards another type of regulation of gene expression alternative to the activity of cutting the transcript; such as inhibition of translation or methylation of regulatory sequences; although other biological tests would be necessary to determine it with precision.

Introducción

Estrés y biogénesis de microRNAs

Cuando el crecimiento y/o el desarrollo de las plantas se ve afectado negativamente en algún modo por cualquier factor externo dicho factor pasa a ser considerado como un inductor de estrés. Dada su naturaleza sésil, las plantas han evolucionado hasta desarrollar unos mecanismos extremadamente sofisticados y a su vez robustos que les permiten hacer frente al estrés con el principal objetivo de limitar el impacto de las alteraciones del ambiente en su fisiología (Zhang, 2015). Las plantas responden con una reprogramación de su actividad transcripcional, en general específica y bien definida, que el auge y expansión del uso de las tecnologías ómicas ha permitido estudiar; dicho estudio ha llevado a la identificación y caracterización funcional de cientos de genes implicados en el mantenimiento de la tolerancia a estrés que están transcripcionalmente coordinados (Baxter *et al.*, 2014; Gollack *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2014). Además, dicho estudio y análisis de las alteraciones transcripcionales que se desencadenan a raíz de los estímulos ambientales han revelado a su vez una compleja red de regulación subyacente que participa en las respuestas frente al entorno (Carrera *et al.*, 2009). A pesar de todos los conocimientos adquiridos, aún están por descubrir ciertos aspectos de la regulación tan fina que tiene lugar durante la respuesta al estrés. Una respuesta que se da tanto a nivel cuantitativo, implicando a los genes relacionados con el estrés, como a nivel de los mecanismos que forman parte de la red de regulación y que juntos permiten la recuperación de la homeostasis en las plantas (Shriram *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016).

Adicionalmente, en los últimos años se han ido acumulando crecientes evidencias de la importancia que diferentes especies de pequeños RNAs (*small RNAs*, sRNAs) tienen sobre la respuesta al estrés. En concreto, múltiples análisis llevados a cabo en diferentes especies vegetales (*Arabidopsis*, arroz, maíz, sorgo, girasol, etc.) expuestas a distintas situaciones de estrés han puesto de manifiesto que una clase particular de sRNAs, los micro RNAs (miRNAs) tienen un papel fundamental en la regulación de la respuesta de las plantas a estrés (Sunkar *et al.*, 2007; Kumar, 2014; Zhang, 2015).

Los miRNAs se encuentran ampliamente distribuidos entre los organismos eucariotas. Fueron descritos por primera vez en *Caenorhabditis elegans* en 1993 (Lee *et al.*, 1993) y posteriormente en plantas, en concreto *Arabidopsis*, por Reinhart *et al.* (2002). Los miRNAs presentan normalmente una longitud de 20 a 24 nucleótidos y actúan como componentes de la maquinaria de silenciamiento jugando un papel fundamental en el control de la expresión génica.

En el caso de las plantas, los miRNAs controlan diversos procesos biológicos como son el desarrollo, el metabolismo, la senescencia o las diferentes respuestas a estreses (Borges and Martienssen, 2015; Xie *et al.*, 2015; Shriram *et al.*, 2016). Estos pequeños RNAs son generados a partir de un transcrito primario (o pri-miRNA) proveniente de un gen endógeno (gen MIR) que es procesado por la RNA polimerasa II (figura 1). Este transcrito presenta una estructura secundaria característica, plegada sobre sí misma con un bucle o *stem loop* generando una horquilla (o *hairpin*), en uno de cuyos brazos se encuentra el futuro miRNA (Bologna *et al.*, 2013). El procesamiento del miRNA es llevado a cabo por la RNAsa nuclear DICER-LIKE 1 (DCL1) que corta el tallo de la horquilla dando lugar a un RNA de doble cadena formado por un miRNA maduro o funcional y su complementario, el miRNA* (*star*), que en principio carece de función en el sistema de silenciamiento génico, pero que se mantiene unido al miRNA maduro hasta que éste es “cargado” por la proteína

ARGONAUTA 1 (AGO1) en el complejo RISC RNA (RNA Induced Silencing Complex, RISC) (Bartel, 2004; Reis *et al.*, 2015), del que forma parte. DCL1 está asistida por sus proteínas accesorias SERRATE (SE) e HYPONASTIC LEAVES (HYL1) como se puede apreciar en la figura 1, las cuales se encargan de mejorar la eficiencia y precisión del corte realizado por DCL1 sobre el precursor (Dong *et al.*, 2008; Achkar *et al.*, 2016), determinando así la secuencia definitiva del dúplex miRNA/miRNA* y consecuentemente la especificidad por su diana (Bologna *et al.*, 2013). El dúplex miRNA/miRNA* presenta una 2' O-metilación en ambos extremos 3' realizada por HUA-1 enhancer (HEN1), una metiltransferasa de pequeños RNAs que interactúa con el complejo de DCL1 (Baranauske *et al.*, 2015), tras lo cual el miRNA es exportado al citoplasma. Tras este paso el miRNA es cargado en el complejo RISC el cual, como se exponía, contiene un miembro de la familia ARGONAUTA (normalmente AGO1) como componente principal. Los miRNAs se aparean con sus RNA mensajeros (mRNA) diana por complementariedad modulando la expresión génica a nivel post-transcripcional mediante el corte y/o la inhibición de la traducción del mensajero (Bartel, 2004; Zhang, 2015; Achkar *et al.*, 2016). La idea generalmente más aceptada es que los miRNAs son componentes clave de la red regulatoria de la expresión génica, asimismo se ha observado que su acumulación en las plantas está estrictamente controlada de forma predominante por la acumulación y procesado de los pri-miRNAs (Zhang *et al.*, 2015). Mientras que los niveles de pri-miRNA dependen de su estabilidad (el equilibrio entre su transcripción y su degradación), su procesamiento se puede ver afectado por la estructura del bucle (o *stem loop*), su longitud (Bologna *et al.*, 2013) y/o la acción de proteínas accesorias (Ren and Yu, 2012). Una biogénesis tan finamente regulada de los miRNAs es crucial para el desarrollo y adaptación de la planta a los cambios ambientales (Zhang *et al.*, 2015).

Durante la evolución de las plantas únicamente unas pocas familias de miRNAs se han conservado desde los musgos hasta las plantas superiores actuales; la mayoría de los miRNAs anotados por tanto forman parte de grupos específicos de cada especie o familia, lo cual sugiere que la mayoría de los miRNAs conocidos son relativamente recientes en términos evolutivos (Axtell, 2005; Cuperus *et al.*, 2011; Borges and Martienssen, 2015; Cui *et al.*, 2017). Actualmente se piensa que tanto los miRNAs específicos como los comunes estarían contribuyendo a la regulación coordinada de la respuesta frente al estrés en plantas (Shriram *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016; Cui *et al.*, 2017).

Los miRNAs específicos de respuesta a estrés han sido

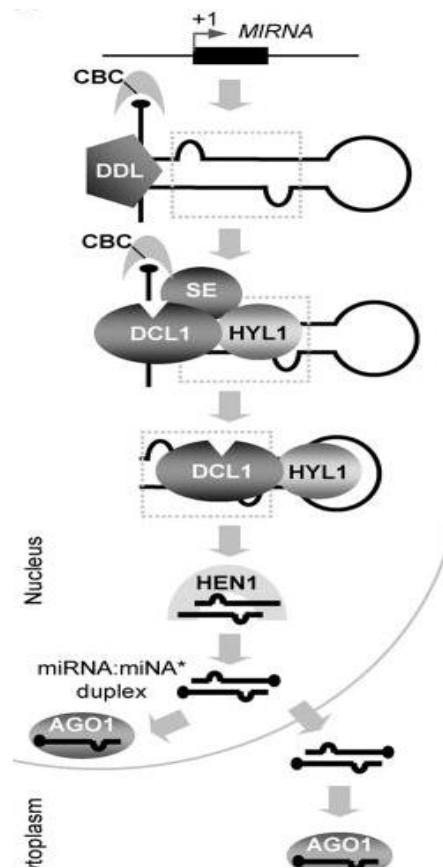


Figura 1. Pasos del procesamiento de un pri-miRNA y maduración del miRNA en una célula vegetal. La expresión de los miRNAs en las plantas comienza con la transcripción realizada por la pol II de los locus MIRNA que típicamente se encuentran en regiones del genoma que no están ocupadas por genes codificantes de proteínas, antes conocidas como regiones intergénicas. Los transcritos primarios de un miRNA (pri-miRNA) poseen una caperuza en 5' y una cola poli(A) en 3', así como la capacidad de adquirir una estructura secundaria de forma similar a una horquilla. DCL1 y otros dos factores, HYL1, una proteína de unión a ADN de doble cadena, y SE, una proteína con un dominio dedos de zinc tipo C2H2 interactúan físicamente entre ellas para formar un complejo de procesamiento (complejo DCL1) en cuerpos subnucleares. Los pasos llevados a cabo por DCL1 sobre el pri-miRNA culminan dando lugar a un dúplex miRNA:miRNA* que es posteriormente reconocido y metilado en sus extremos por HEN1. Cargar la cadena guía de miRNA en la proteína AGO para formar un complejo miRISC funcional marca el final de la biogénesis del miRNA. Imagen tomada de (Xie *et al.*, 2010)

descritos tanto en plantas sometidas a estreses bióticos: v.g. bacterias, hongos o patógenos virales (Niu *et al.*, 2015; Chaloner *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2016) como abióticos: v.g. sequía, salinidad, falta de nutrientes, frío, alta temperatura, etc. (Shriram *et al.*, 2016; Zhu, 2016). Estos estudios han aportado evidencias de que los miRNAs responden a las alteraciones del ambiente en una manera dependiente de estrés, genoma e incluso tejido (Moxon *et al.*, 2008a); ejemplificando la idea emergente de que los miRNAs podrían rivalizar con las proteínas en lo que a importancia regulatoria se refiere (Mishra *et al.*, 2015). Sin embargo, investigadores como Zhang (2015) destacan la falta de estudios en los cuales se lleve a cabo un análisis sistemático de miRNAs de respuesta al estrés en plantas en los mismos estadios de desarrollo y expuestas a diferentes condiciones adversas.

Este tipo de estudios se plantean actualmente como un pilar fundamental en la ampliación de los conocimientos sobre los procesos de regulación y respuesta frente a las condiciones adversas de un medio en constante cambio debido al cambio climático y a la aparición y dispersión de patógenos en regiones antes aisladas de su influencia. Estos conocimientos permitirán el desarrollo de nuevas herramientas biotecnológicas, así como de nuevas estrategias para hacer frente a los problemas que se plantean actualmente a la agricultura. Además, realizar estos análisis empleando modelos que sean actualmente cultivos rentables y de importancia económica permitiría una aplicación más rápida, directa, y fina de los posibles descubrimientos que se puedan realizar a la hora de internar atajar o paliar los problemas o necesidades actuales a los que se enfrenta la agricultura.

Por todos estos motivos, y otros que se describen a continuación, nuestro grupo de investigación se ha centrado en el cultivo del melón (*Cucumis melo* L.) para llevar a cabo una serie de experimentos que permitan abordar el estudio del papel de los miRNAs en la respuesta a estrés,

El melón

El melón es una especie eudicotiledónea ($2n=2x=24$) de interés tanto por sus propiedades biológicas específicas como por su importancia económica (García-Mas *et al.*, 2012). A pesar de ser uno de los miembros de la familia *Cucurbitaceae* más extensamente cultivado en regiones semiáridas (Wei *et al.*, 2013), existen una serie de factores ambientales que afectan seriamente a la producción de los cultivos de melón (Nuñez-Palenius *et al.*, 2008). Las condiciones cambiantes de clima como las largas sequías seguidas de lluvias torrenciales están provocando pérdidas millonarias en el cultivo de melón de todo el mundo; así como periodos anormalmente cálidos que alteran las fechas de siembra y recolección generando una inestabilidad en los mercados desincronizando la demanda con la producción (europapres.es y freshplaza.com). En el caso concreto de España según el Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente (Mapama) se cultivaron en el año 2016 (a falta de los datos actualizados de 2017) 21.500 Ha, alcanzando una producción de 685.200 Tm (valecniainfruits.com). La exportación española de melón en 2016 alcanzó un volumen de 444.370 Tm suponiendo un valor final en el mercado de 303,4 millones de euros. Según los datos de exportación de aduanas, El primer receptor de melones de origen español fue Francia que recibió el 27 % (120.083tm) de las exportaciones totales de este cultivo. Alemania en segundo lugar con un 23,5% (104.675tm), seguida de Reino Unido que adquiere el 13% (57.652Tm) como tercer gran receptor de las exportaciones españolas de melón. Estas exportaciones representan un valor de 97, 65,3 y 35,8 millones de euros respectivamente (proexport.es). Por lo tanto, es clave proteger la producción de melón frente a las condiciones adversas del medio

derivadas del calentamiento global, así como desarrollar nuevas herramientas que permitan mantener la producción y competitividad del mercado español.

En esta línea existen diferentes estudios que han contribuido a la identificación de múltiples miRNAs en plantas de melón sometidas a estrés que parecen estar involucrados en la respuesta a dichas condiciones (Gonzalez-Ibeas *et al.*, 2007; Sattar *et al.*, 2012; Herranz *et al.*, 2015). Sin embargo, se sigue teniendo un conocimiento escaso sobre cómo la biogénesis, acumulación y distribución de los miRNAs podría verse afectada por condiciones ambientales adversas en este cultivo de tanta importancia económica en nuestro país. Además, en los últimos años se han desarrollado diversas herramientas moleculares en melón como son las colecciones de EST (Clepet *et al.*, 2011), plataformas de TILLING (González *et al.*, 2011) y la secuenciación del genoma (García-Mas *et al.*, 2012) haciendo del melón un modelo experimental “accesible” además de interesante para la investigación vegetal.

Antecedentes del grupo de investigación

El presente trabajo se basa en resultados previos obtenidos a partir del análisis de las poblaciones de sRNAs determinadas por secuenciación masiva provenientes de plantas de melón (*Cucumis melo* L. cv. Piel de Sapo) sometidas a diferentes estreses, a saber: frío (C), sequía (D), salinidad (SA), día corto (SD) y las infecciones con el hongo *Monosporascus cannonballus* (MON), el viroide *Hop Stunt Viroid* (HSVd) y la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (AGRO). Los detalles de las condiciones de desarrollo de las plantas en cada uno de los casos se muestran en la tabla 1, así como en el anexo I apdo. material vegetal.

Tabla 1. Condiciones en las que se desarrollaron las plantas de melón *Cucumis melo* L. cv. Piel de Sapo. Condiciones de estrés: frío (C), sequía (D), salinidad (SA), día corto (SD) y las infecciones con el hongo *Monosporascus cannonballus* (MON), el viroide *Hop Stunt Viroid* (HSVd) y la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (AGRO).

Pregerminación	Germinación	Crecimiento	Estrés	Fotoperiodo (Luz/oscuridad)	Temperatura (Luz/Oscuridad)	Características
48 h a 37 °C Oscuridad	24 h a 25 °C 16 h luz / 8 h oscuridad	10 días 16 h de luz a 28 °C / 8 h de oscuridad a 20 °C	C	16 h / 8 h	20 °C / 14 °C	Alteración de la temperatura
			D	16 h / 8 h	28 °C / 20 °C	Privación de la irrigación
			SD	8 h / 16 h	28 °C / 20 °C	Alteración del fotoperiodo
			SA	16 h / 8 h	28 °C / 20 °C	Riego inicial con 50 mL de una solución 200 mM de LiCl
			MON	16 h / 8 h	28 °C / 20 °C	Infección: 50 mL de solución con 1000 UFC de micelio de <i>M. cannonballus</i>
			HSVd	16 h / 8 h	28 °C / 20 °C	Inoculación en ambos cotiledones con el RNA viroidal
			AGRO	16 h / 8 h	28 °C / 20 °C	Agroinfiltración en ambos cotiledones a una DO de 0,8
			CONTROL	16h / 8h	28 °C / 20 °C	-

Los experimentos se realizaron por triplicado y se recolectaron muestras a distintos tiempos tras la aplicación del estrés: a los 11 días post-trasplante se aplicó sobre las distintas réplicas los diferentes tratamientos, siendo este el tiempo 0 (T0). Posteriormente se tomaron muestras a los 13, 15, 18 y 22 días post-trasplante siendo los tiempos T1, T2, T3 y T4 respectivamente. Para el muestreo se tomó en cada caso la primera hoja bajo el meristemo apical de tres plantas diferentes. El RNA total proveniente de éstas fue enriquecido en RNAs de cadena corta (menos de 200 nt) y llevado a secuenciar.

Tanto la construcción como la secuenciación de las librerías fueron realizadas por la empresa SISTEMAS GENÓMICOS. Las librerías de cDNA se construyeron en base a las recomendaciones de ILLUMINA; para ello se añadieron adaptadores al RNA ligados tanto en 5' como en 3' con el propósito de permitir la transcripción reversa de dicho RNA y su paso a cDNA. Los cDNAs resultantes fueron enriquecidos por PCR para así generar una librería de cDNAs de cadena doble indexados. Se realizó una selección de tamaño mediante un gel de poliacrilamida al 6 %, seguido de la cuantificación de las librerías que fue realizada mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR). Se realizó una mezcla equimolar de las librerías (provenientes de sRNAs de hojas de melón de la condición control y de los 7 tratamientos) que fue secuenciada por extremos pareados (*pair-ends*). Tanto las secuencias de los adaptadores empleados en los pasos de obtención del cDNA como las lecturas de baja calidad obtenidas tras el proceso de secuenciación fueron eliminados empleando la herramienta Cutadapt (v. 1.10) en Python (Martin, 2011). Secuencias menores de 20 o mayores de 25 nucleótidos de longitud fueron posteriormente filtradas y eliminadas recuperándose un total de 88.710.455 lecturas limpias del conjunto de las plantas control y sometidas a estrés (Sanz *et al.*, 2018, datos sin publicar).

Al analizar los grupos de datos de pequeños RNAs se observó un enriquecimiento en las lecturas de secuencias con una longitud de 24 nt (42 % del total de las lecturas, 54% de las lecturas únicas), seguido por una acumulación comparable de secuencias con longitudes de 21, 22 y 23 nt, sin apreciarse diferencias de perfil obvias entre las muestras control y las correspondientes a los tratamientos de estrés (figura 2). Esta observación es consistente con los perfiles de sRNAs previamente descritos en hojas de *C. melo* por Sattar *et al.* (2012) y Herranz *et al.* (2015); y para mezclas de tejidos foliares y de frutos de cuatro miembros de la familia *Cucurbitaceae*, según los cuales las secuencias de 24 nt son la “especie” de sRNAs más representada (Jagadeeswaran *et al.*, 2012), aunque hasta el momento se desconocen tanto el origen como las posibles funciones de esta población de sRNAs .

Para evaluar los efectos del estrés en las poblaciones de sRNAs y determinar aquellos potencialmente implicados en la respuesta al estrés, se analizaron las muestras control y las tratadas mediante tres métodos de pruebas estadísticas diferentes con el fin de evaluar si algunos de los sRNAs encontrados presentaba una acumulación diferencial; edgeR (Robinson *et al.*, 2010), DESeq2 (Love *et al.*, 2014) y NOISeq (Tarazona *et al.*, 2015). Las lecturas de sRNAs se consideraron con expresión diferencial cuando estas cumplían dos criterios: un $\log_2 \text{fold change}$ ($\log_2\text{FC}$) $>1,0$ o $<-1,0$ y P valor $< 0,05$ (Robinson and Oshlack, 2010). Únicamente aquellas secuencias predichas como diferencialmente acumuladas por las tres herramientas de análisis, un total de 51.693 secuencias únicas, fueron consideradas como verdaderos sRNAs de respuesta a estrés. Estos sRNAs diferenciales fueron alineados frente a la base de datos de miRBase (repositorio de secuencias de miRNAs identificados en un gran número de especies tanto animales como vegetales) empleando *blastall* (v. 2.2.17) (Griffiths-Jones, 2010), resultando ser algunas de ellas, en concreto 153, idénticas a algunos miRNAs previamente descritos en melón o en alguna de

las especies de plantas de la familia *Viridiplantae*, clasificándose así como verdaderos miRNAs. El resto de las secuencias no se pudieron adscribir fehacientemente a ningún tipo de ribonucleótido regulador previamente descrito y constituyen el punto de partida del presente trabajo.

En los siguientes apartados se describe brevemente el funcionamiento de algunos métodos de predicción de miRNAs empleados en nuestro análisis.

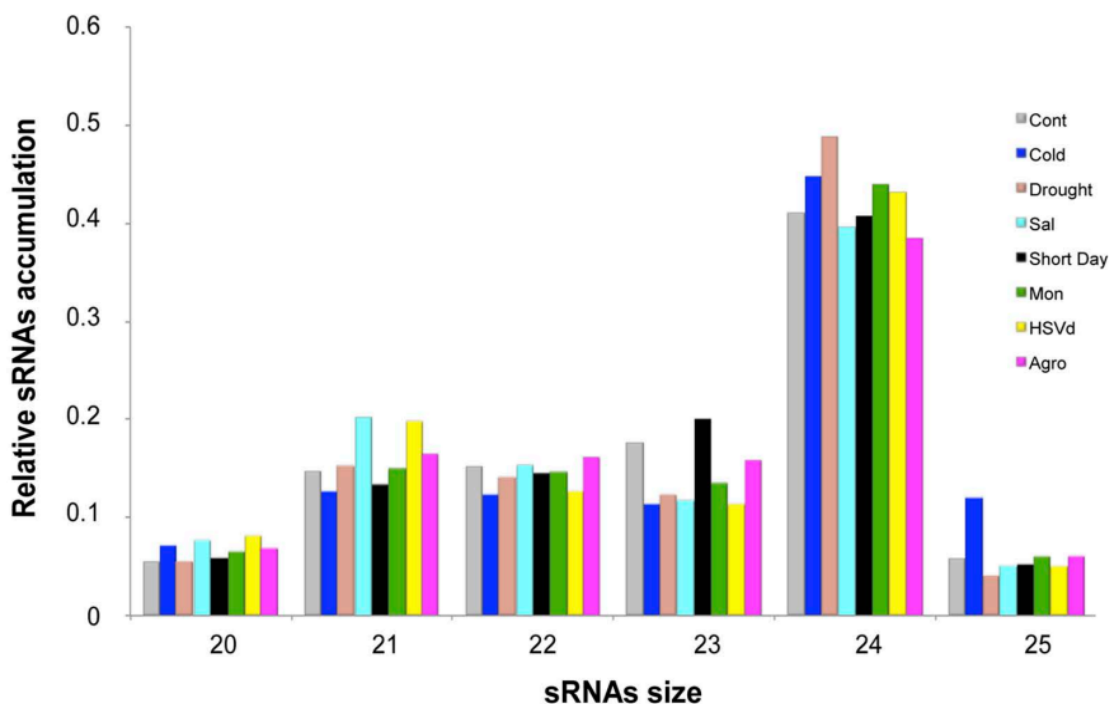


Figura 2. Perfiles de acumulación de los sRNAs de melón por longitudes en las muestras control y las correspondientes a los tratamientos de estrés: C, D, SA, SD, MON, HSVd y AGRO. Imagen tomada de Sanz *et al.* (2018), datos sin publicar.

miRBase

miRBase es un repositorio público para todas las secuencias de miRNAs y su anotación asociada. Establecido en 2002 como *MicroRNA Registry* (Griffiths-Jones, 2004) con el propósito principal de asignar nombre de manera estable y consistente a los miRNA recién descubiertos. Los nuevos miRNAs que son propuestos para ser incluidos en miRBase deben haber sido identificados y descritos en un artículo publicado en una revista con revisión por pares. Los precursores de miRNAs depositados en miRBase se nombran con la forma “ath-mir-100”. El prefijo se refiere al organismo en el cual fue descrito, que en este caso se trataría de *Arabidopsis thaliana*. Los números se asignan secuencialmente; para los homólogos descritos en diferentes especies se mantiene el número modificando el identificador, en el caso de los miRNAs parálogos se les asignan nombres con sufijos numerados y alfabetizados, dependiendo de si el microRNA maduro es idéntico en secuencia, o contiene diferencias respecto al descrito en primer lugar. miRBase ofrece todas las secuencias publicadas de miRNAs para su consulta y búsqueda por secuencia o a través de palabras clave, mediante la interfaz web (<http://www.miRBase.org/>) y la versión descargable por FTP (<ftp://miRBase.org/>). La primera versión del miRBase en el 2002 contenía 218 loci de microRNAs pertenecientes a 5 especies. Desde entonces el campo de estudio de los miRNAs ha sufrido una gran expansión alcanzando las miles de

entradas (actualmente 28645) de miRNAs que están presentes en los genomas tanto de animales como de plantas. El número de miRNAs publicados no deja de crecer, principalmente por el incremento de la capacidad de análisis que supusieron los experimentos de secuenciación masiva de pequeños RNAs. Actualmente para cada entrada de una secuencia perteneciente a un miRNA miRBase ofrece las referencias principales que describen el descubrimiento, enlaces a las principales fuentes de evidencia que avalan la anotación de dicho miRNA, así como enlaces a las bases de datos de las dianas tanto predichas como validadas para dichos miRNAs.

Predicción de posibles nuevos microRNAs de melón

Dada la cantidad de lecturas generadas por la secuenciación de sRNAs (de entre 20 y 25 nucleótidos) se hace patente la imposibilidad de analizar cada una de ellas experimentalmente en profundidad, al mismo tiempo que nace la necesidad de establecer un filtro que ayude a determinar cuáles de dichas secuencias presentan más probabilidades de ser verdaderos nuevos miRNAs. Para ello existen varias herramientas computacionales dedicadas a la detección de miRNAs a partir de los datos generados por la secuenciación masiva. Muchas de ellas, como miRCat (Moxon *et al.*, 2008b), miRDeep2 (Friedländer *et al.*, 2012), miRPlant (An *et al.*, 2014) y miReap (<http://mireap.sourceforge.net/>), fueron introducidas cuando la profundidad de lectura de las NGS era en general varios órdenes de magnitud inferior a las actuales. Puesto que este factor influye enormemente en la función de agrupamiento de muchas de estas herramientas (Tucker *et al.*, 2009; Baker, 2010), resultando en algunos casos en los altos ratios de falsos positivos y falsos negativos (Mohorianu *et al.*, 2013), en los últimos años se han ido generando versiones mejoradas capaces manejar los datos generados por las últimas tecnologías de secuenciación.

miRCat2

miRCat2 es una herramienta que forma parte del “*UEA small RNA Workbench*” (Stocks *et al.*, 2012). Está basado en elementos de su predecesor miRCat (Moxon *et al.*, 2008b) y en características discriminatorias de miRDeep2 (Friedländer *et al.*, 2012). Este nuevo algoritmo incorpora una nueva aproximación basada en la entropía para detectar los loci de miRNAs y está diseñado para soportar el volumen de datos generados con la profundidad de secuenciación de las últimas técnicas. Entre sus funciones es capaz de generar representaciones gráficas de la estructura de la horquilla y representar sobre ella los alineamientos de las secuencias sobre la estructura secundaria.

Paicu *et al.* (2017) ensayaron el nuevo algoritmo del miRCat2 junto a otras herramientas de predicción escogidas por ser los métodos más avanzados en base a su popularidad y en los resultados de *benchmarking* (Li *et al.*, 2012; Williamson *et al.*, 2013; Kang and Friedländer, 2015), empleando datos provenientes tanto de animales como de plantas, así como de mutantes en la ruta de biogénesis de miRNAs. Observaron que miRCat2 veía incrementada su precisión frente a otros métodos además de ser capaz de predecir nuevos miRNAs diferencialmente expresados en el *wild-type* frente a los mutantes de la ruta de biogénesis.

El algoritmo empleado por miRCat2 agrupa las lecturas por proximidad sobre el genoma de referencia. Selecciona entonces a un candidato de cada locus y computa todas las características discriminatorias de su estructura secundaria, clasificando aquellos que

resulten satisfactorios como miRNAs. Es capaz de diferenciar candidatos de miRNAs de las secuencias de fondo (o ruido) aplicando secuencialmente los nuevos filtros sobre los alineamientos de secuencias candidatos y su estructura secundaria.

miRDeep*

miRDeep* (An *et al.*, 2013), que como en el caso anterior presenta una serie de avances frente a su predecesor miRDeep2 (Friedländer *et al.*, 2008), cuenta con una sustancial mejora de la precisión en la detección de nuevos miRNAs introduciendo nuevas estrategias para la identificación de los precursores, también es capaz de determinar los niveles de expresión en base al número de lecturas tanto de nuevos miRNAs como de otros ya descritos (Friedländer *et al.*, 2012), así como generar sus pre-miRNAs y sus correspondientes horquillas (o *hairpins*). Se añaden además la estructura secundaria del pre-miRNA y la localización de las lecturas para cada miRNA predicho en forma de representación gráfica.

En la mayoría de los protocolos de secuenciación masiva las librerías de pequeños RNAs son amplificadas mediante PCR como paso previo a la secuenciación (An *et al.*, 2013). Esto implica que una única molécula de sRNA puede dar lugar a múltiples lecturas en la secuenciación con lo cual no puede constituir una evidencia de su frecuencia (prevalencia). Sin embargo, cuando un sRNA es detectado consistentemente en distintas muestras constituye una serie de evidencias independientes de dicha prevalencia y por tanto que dicho sRNA sea el resultado de una biogénesis específica. En cada análisis del miRDeep* cada lectura está marcada de manera que se pueda trazar la muestra de la que proviene. Durante la identificación de miRNAs nuevos y conocidos (ya descritos) las lecturas de todas las muestras se agrupan para realizar una predicción más precisa. En el resultado final las lecturas son desagrupadas lo cual permite identificar el origen de cada una de ellas (An *et al.*, 2013).

Además, miRDeep* (An *et al.*, 2013) ofrece una gran robustez a la hora de identificar miRNAs no canónicos que son prevalentes en algunas especies, como es el caso del melón. miRDeep* realiza una búsqueda de agrupaciones de lecturas que encajan exactamente en sus posiciones 5' y 3' en el genoma, una vez identificados, el agrupamiento local más grande es clasificado como miRNA maduro. La secuencia cubierta por el agrupamiento es aislada junto a una secuencia adyacente que permita la formación de la horquilla (Martens-Uzunova *et al.*, 2012) y el resultado es devuelto como un nuevo miRNA predicho.

Predicción de las dianas

La función de regulación que ejercen los pequeños RNAs sobre diversas dianas, como pueden ser diferentes factores de transcripción y genes relacionados con el desarrollo, implica que éstos están jugando un papel clave en la red de regulación de la expresión génica que controla el desarrollo y el crecimiento (Li and Zhang, 2005). Surgió entonces la necesidad de llevar a cabo análisis masivos tanto de los pequeños RNAs como de sus funciones, por ejemplo, identificando aquellos genes que son diana de su regulación en plantas.

En este contexto, se desarrollaron un gran número de programas y algoritmos que permitieran identificar estas dianas de los microRNAs (Chaudhuri and Chatterjee, 2007; Li *et al.*, 2010; Dai *et al.*, 2011). Sin embargo, la mayoría de estas herramientas fueron diseñadas para trabajar con miRNAs animales los cuales difieren mucho de los de plantas

en el proceso de reconocimiento de la diana (Lim *et al.*, 2003; Li *et al.*, 2010). Por ejemplo, los miRNAs de animales son capaces de llevar a cabo su función aún sin tener una gran complementariedad en sus ocho primeros nucleótidos mientras que en el caso de las plantas se requiere que la complementariedad entre el miRNA maduro y la secuencia de su diana sea casi perfecta. Además, los miRNAs de animales tienden a inhibir la expresión de su gen diana mediante la supresión de la traducción, mientras que en las plantas el miRNA directamente provoca el corte del transcrito. Del mismo modo, así como los miRNAs animales tienden a reconocer las regiones 3' UTR de los miRNAs diana, los de plantas no parecen presentar preferencias en términos de posición (Dai and Zhao, 2011). Los resultados más recientes parecen indicar que los miRNAs de plantas también podrían inhibir la expresión génica al nivel traduccional (Brodersen *et al.*, 2008), aunque parecen emplear un patrón de reconocimiento diferente comparado con el modo de acción de un miRNA animal típico. Estas diferencias hicieron patente la necesidad de desarrollar herramientas para el análisis de dianas de miRNAs de manera específica y separada para plantas.

psRNATarget

De dicha necesidad nació psRNATarget, desarrollado por Dai and Zhao (2011), una herramienta en la cual se incluyeron dos funciones analíticas muy importantes: i) emparejamiento complementario reverso entre el sRNA y el transcrito diana empleando un esquema de puntuación probado y ii) la evaluación de la accesibilidad del sitio específico de unión mediante el cálculo de la energía de desapareamiento (*unpaired energy*, UPE) necesaria para “abrir” la estructura secundaria del mRNA alrededor del sitio de reconocimiento del pequeño RNA (empleando para ello el *RNAup*, *Vienna Package*, [Mückstein *et al.*, 2006]). Mientras que muchas herramientas de análisis se han centrado en la complementariedad entre el miRNA y su diana, no han tenido en cuenta la accesibilidad de este sitio de reconocimiento, la cual está determinada por la estructura secundaria del transcrito, un factor que ha demostrado ser muy importante a la hora del reconocimiento de la diana por el sRNA (Kertesz *et al.*, 2007; Brodersen and Voinnet, 2009; Hausser *et al.*, 2009; Marin and Vaniceek, 2011). A menor energía mayor posibilidad de ser una diana efectiva, ya que la estructura secundaria podría evitar el contacto entre el sRNA y el sitio de reconocimiento. Para determinar y evaluar la accesibilidad del sitio diana se tienen en cuenta las secuencias que lo flanquean tanto en 5' como en 3' (Kertesz *et al.*, 2007). Esta herramienta además incluye la capacidad de distinguir en el análisis entre la inhibición traduccional y la post-transcripcional (Brodersen *et al.*, 2008), generando una serie de parejas de miRNA/sRNA en aquellos casos en los que asocia una actividad de reconocimiento de un pequeño RNA con un transcrito diana. Se ha observado que en plantas los errores de complementariedad cerca del centro de la región de apareamiento entre el miRNA y el mRNA suelen provocar la pérdida de la capacidad de corte de RISC, sin embargo, la unión de RISC al mRNA aún es capaz de bloquear la expresión del gen al nivel de traducción (Brodersen *et al.*, 2008). psRNATarget está diseñado para el análisis de datos masivos generados por las técnicas NGS así como para trabajar tanto sobre librerías depositadas como propias del usuario (Dai and Zhao, 2011).

Materiales y Métodos

1. Validación de microRNAs

1.1. Validación de su existencia

1.1.1. Purificación de sRNAs a partir de RNA total

Partiendo de una mezcla de RNA total de plantas control y sometidas a estrés (ver introducción: Material vegetal) se llevó a cabo la purificación de los sRNAs empleando el kit "REALTOTAL miRNA kit" (Durviz SL, Paterna, Valencia) con ligeras modificaciones.

Se siguió el protocolo proporcionado por la casa comercial para la extracción y purificación de sRNAs a partir de sangre ya que al tratarse de una mezcla de RNA total previamente purificado no se requería un tratamiento tan agresivo de la muestra como en los casos de purificación desde tejido vegetal.

Se añadió a la muestra (100 µl) 300 µl del tampón de lisis que proporciona las sales necesarias para facilitar una posterior precipitación de los ácidos nucleicos con etanol. A continuación, se añadieron 200 µl de etanol a una concentración final del 35 %. Esto provoca la precipitación de los RNAs de mayor tamaño, los cuales quedaron retenidos en una columna selectivamente ("LargeRNA renoval Spin Column"). Al eluido se le añadieron 700 µl de etanol a una concentración final del 70 % y se pasó por una columna "microRNA" en la cual quedan retenidos los pequeños RNAs. Mediante un tampón de lavado se eliminaron las sales residuales, y finalmente, con un tampón de elución de RNA los pequeños RNAs fueron eluidos y recogidos en un tubo Eppendorf.

Los sRNAs purificados fueron cuantificados en un espectrofotómetro NanoDrop® ND-1000 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EEUU).

1.1.2 Aislamiento y secuenciación de microRNAs

Según Ambros *et al.* (2004) uno de los criterios para poder anotar un nuevo miRNA es poder identificarlo dentro de una muestra enriquecida en secuencias de pequeños RNAs (aproximadamente de 22 nt de longitud), sin embargo la falta de sensibilidad en las diferentes técnicas que se empleaban para el estudio de los miRNAs como son el clonaje, el *northern blot* o el *primer extension* resultó ser un problema a la hora de alcanzar una detección y cuantificación fiables dada la dificultad para amplificar los miRNAs. A esto se sumaba que la baja especificidad podía provocar la aparición de múltiples falsos positivos debido a miRNAs cercanos entre sí, los precursores o incluso las secuencias genómicas. La introducción de la técnica del *stem loop* RT-PCR permitió incrementar enormemente la especificidad y la sensibilidad de la detección y reduciendo de manera muy significativa la detección tanto de los precursores como del DNA genómico en favor de las secuencias de miRNAs maduros (Chen *et al.*, 2005). Las observaciones indican que la alta sensibilidad y especificidad de los cebadores *stem loop* de RT vienen dadas por el alto grado de apilamiento de las bases, que mejora la estabilidad térmica y la huella efectiva del dúplex cebador de RT/RNA requeridas para una RT efectiva, y la restricción espacial de la estructura del *stem loop* que previene la unión a moléculas de doble cadena como el DNA genómico (Chen *et al.*, 2005). Por los motivos expuestos anteriormente la *stem loop* RT-PCR fue la técnica escogida en para la identificación de miRNAs en este trabajo.

I) Diseño del *stem loop* específico de RT-PCR

El *stem loop* es el cebador diseñado específicamente para amplificar un determinado miRNA a partir de una mezcla heterogénea de sRNAs. Este cebador está diseñado para adquirir una forma de horquilla a la vez que deja expuestos 6 nucleótidos en su extremo 3' como se puede apreciar en la figura 3b. Esta pequeña secuencia es complementaria al miRNA, permitiendo así su amplificación mediante una RT-PCR pulsada (*Pulsated Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction*). Estos cebadores son sometidos a un paso de desnaturalización (10 min a 95°C) seguido de una lenta renaturalización previo a su uso con el fin de asegurar un plegamiento óptimo de la horquilla.

La lista con los cebadores específicos empleados para la identificación de los 26 sRNAs analizados en este trabajo se encuentra en el anexo II tabla S1.

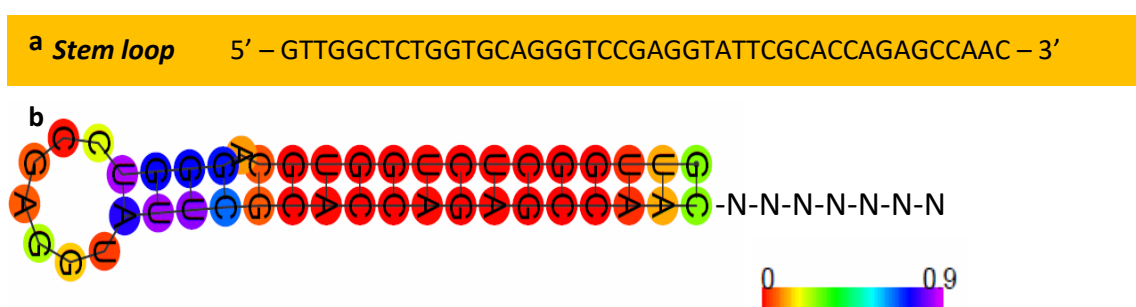


Figura 3. a) Secuencia del *stem loop* empleado como base para el diseño de cebadores de RT-PCR para la amplificación de miRNAs. **b)** Secuencia plegada mediante la herramienta *RNAfold WebServer* (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>), la escala de colores muestra la entropía posicional dentro de la estructura de mínima energía libre (*minimum free energy, MFE*) predicha para la secuencia. Añadidos los seis nucleótidos (N) que se diseñan específicamente para la amplificación de cada miRNA.

II) RT-PCR pulsada

La RT se realizó empleando el kit "RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit" (Thermo Fisher Scientific). Previa a la reacción de RT-PCR se realizó una mezcla de 4 µl de una purificación de sRNAs (50 ng/µl) y 1 µl de dNTPs Mix (10 µM), dicha mezcla se sometió a una temperatura de 65 °C durante 5 min con el fin de romper las estructuras secundarias que se hubieran podido formar en los sRNAs y que pudieran afectar negativamente a la reacción de RT-PCR.

La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un volumen final de 10 µl: 5 µl de la mezcla anteriormente mencionada, 1 µl de cebador de RT específico *stem loop*, concentración final 0,1 µM, 2 µl de tampón de reacción, 1X concentración final, 0,2 µl de RiboLock RNase Inhibitor (200 U/µl), 0,2 µl de RevertAid M-MuV RT (20 U/µl), completando hasta el volumen final con 2 µl de agua MiliQ. La reacción de RT-PCR se llevó a cabo en un termociclador LifeECO TC-96/G/H(b)C (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Binjiang, Zhejiang, China).

III) PCR

La PCR se realizó sobre una dilución 1:2 del cDNA generado en la RT-PCR pulsada (apdo. II). La reacción de PCR se llevó a cabo en un volumen final de 20 μ l, los componentes están expresados en concentración final: 6 μ l de cDNA, 5 μ l de cebador directo de PCR específico de miRNA (concentración 0,25 μ M), 0,5 μ l de cebador reverso de PCR específico del *stem loop* (común a todos los miRNAs, 0,25 μ M), 2 μ l de tampón (1X), 0,5 μ l de polimerasa Netzyme (1 U/ μ l), 0,5 μ l de dNTPs Mix (0,25 μ M), completando hasta el volumen final con 5,5 μ l de agua MiliQ. La reacción de PCR se llevó a cabo en un termociclador LifeECO TC-96/G/H(b)C (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Binjiang, Zhejiang, China).

La lista con los cebadores específicos empleados en los pasos anteriores para la identificación de los 26 sRNAs analizados se encuentra en el anexo II tabla S1. A continuación se muestra en la figura la amplificación de los miRNAs en dos pasos a modo de esquema representativo del proceso.

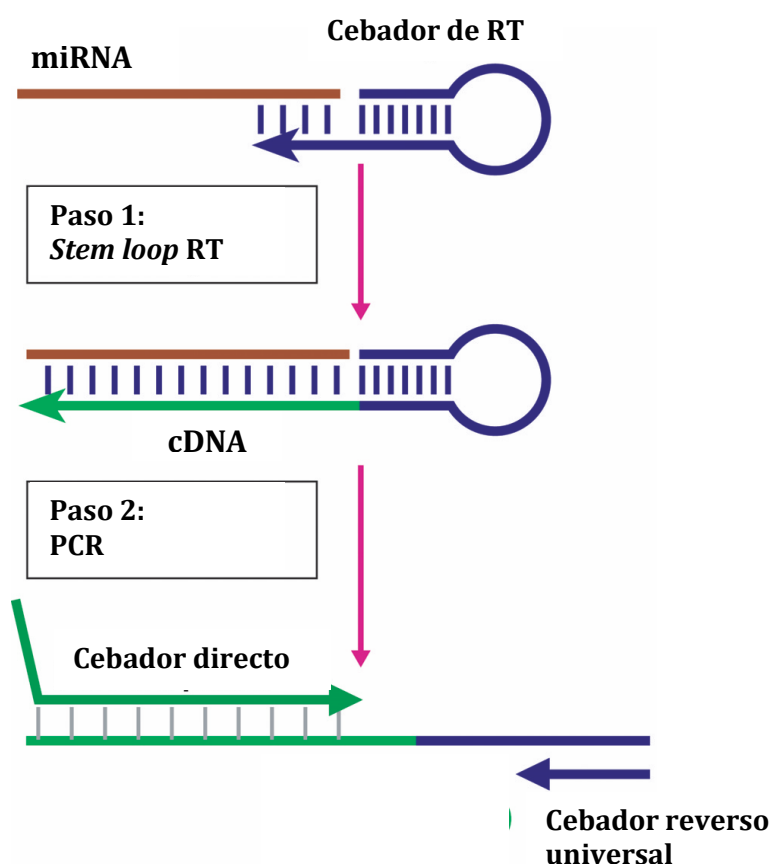


Figura 4. Descripción esquemática de la identificación de miRNAs en dos pasos basada en la *stem loop* RT seguida de una PCR. Los cebadores *stem loop* se unen al extremo 3' de las moléculas de miRNA permitiendo su transcripción reversa. El producto de la RT se emplea para el segundo paso de PCR utilizando para ello el cebador reverso universal que amplifica desde la secuencia del *stem loop* y un cebador directo específico de cada miRNA. El propósito de la cola del cebador directo en 5' es incrementar la temperatura de *melting* dependiendo de la composición de la secuencia de las moléculas de miRNA. Imagen tomada y modificada de Chen *et al.* (2005).

IV) Ligación del producto de PCR de miRNAs

Se empleó como vector para la ligación 1 μ l del plásmido Ptz (PT257R-T) cuyo mapa se representa en la figura 3. Para llevar a cabo la reacción se añadió 1 μ l de T4 DNA ligasa

(Thermo Fisher Scientific, 5 U/μl), 2 μl de tampón de ligación (concentración final 1X, valor aproximado), 2 μl del producto de PCR y 3 μl de agua miliQ. La reacción se dejó toda la noche (*overnight, o/n*) a 4 °C antes de continuar con pasos posteriores.

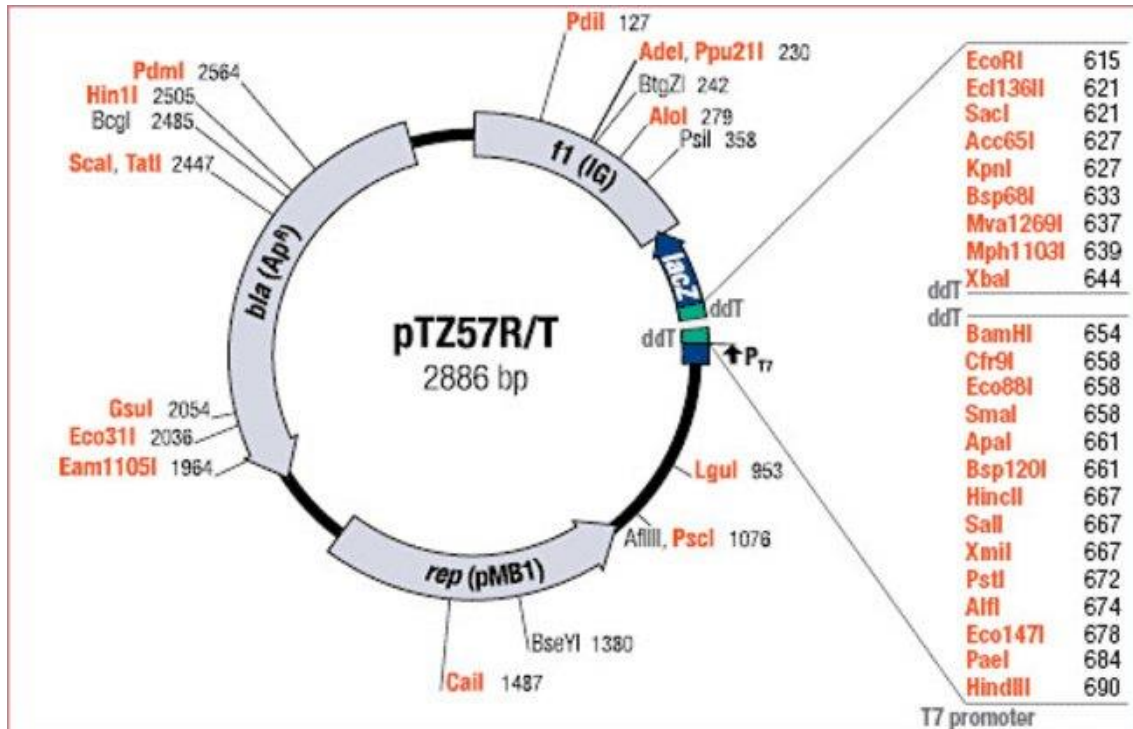


Figura 5: Mapa del vector PT257R-T en el que se muestran la región del *polylinker* dentro de la subunidad omega del gen de la galactosidasa (*lacZ*) precedido por el promotor de T7, la región intergénica del fago f1 (IG), el origen de replicación para *E. coli* (pMB1) y el gen de resistencia para la selección por el antibiótico ampicilina (*bla*). Imagen tomada de <http://www.thermofisher.com/order/catalog/product/K1213>

V) Transformación y PCR de colonia

La transformación de bacterias competentes de *Escherichia coli* se llevó a cabo por electroporación. Se emplearon 50 μl de competentes DH5α y 3 μl de ligación del producto de la PCR de los miRNAs. La electroporación se realizó en un electroporador Biowave II (Biochrom Ltd., Cambridge, Inglaterra) y una exposición de entre 2 y 3 ms a 1700V. Se resuspendieron las bacterias en 600 μl de medio LB sin ampicilina y se mantuvieron en una cámara de cultivo a 37 °C durante 45 min (hasta 1h) para permitir que el gen de resistencia contenido en el vector de clonaje del miRNA se expresara. Dicha transformación fue plaqueada en medio LB con ampicilina (50 μg/ml) al que se le añadieron 10 μl de X-Gal (20 μg/ml) para permitir la selección por color por actividad del gen de la β-galactosidasa incluido en el plásmido. Se seleccionaron aquellas colonias que presentaban un color blanco pues son aquellas en las cuales el *polylinker* ha sido interrumpido por la inserción del miRNA, quedando interrumpida del mismo modo la subunidad omega de la galactosidasa impidiendo a dichas colonias liberar el componente azul en la degradación del X-Gal.

La PCR de colonia se basa en el lisado y amplificación de la secuencia contenida en el vector de clonaje con el cual se ha transformado a las células competentes. La región que contiene el inserto se amplifica empleando los cebadores para el M13 directo y reverso.

La reacción de la PCR de colonia se realizó empleando: 0,5 μl de dNTPs Mix (0,25 μM), 2 μl de tampón (1X), 0,3 μl de polimerasa Netzyme (1 U/μl), 0,5 μl del cebador directo y 0,5 μl

del cebador reverso del M13 (0,25 μ M), completando con 16,2 μ l de agua miliQ hasta el volumen final de 20 μ l.

VI) Tratamiento con ExoSAP y secuenciación

Antes de llevar a secuenciar los amplicones de los miRNAs los productos de PCR se limpiaron con ExoSAP (Thermo Fisher Scientific), que contiene una mezcla de exonucleasa y desfosforilasa, dejando únicamente cadenas de doble hebra disponibles para la reacción de secuenciación. Se emplearon 3 μ l del producto de la PCR de colonia seleccionada, 1 μ l de ExoSAP y 1,5 μ l de agua miliQ. Dicha mezcla se incubó a 37 °C durante 15 min, tras este paso se prosiguió la incubación durante otros 15 min a 80°C para la inactivación de las enzimas presentes en el mix. Una vez finalizado el tratamiento se diluyeron las muestras con 20 μ l de agua. Las muestras fueron cuantificadas y ajustadas en función de su concentración para cumplir los requerimientos del Servicio de Secuenciación del IBMCP. Las muestras fueron secuenciadas empleando el cebador directo del M13.

1.2. Validación de la actividad funcional. Predicción, análisis y validación de dianas de miRNAs

1.2.1. 5' RLM-RACE (RNA Ligase Mediated Rapid Amplification of cDNA Ends)

Los mensajeros predichos como dianas de los miRNAs estarán hipotéticamente cortados en el punto de unión predicho entre ambos. Para localizar dichos mensajeros se procedió a ligar unos adaptadores de RNA a los extremos 5' que han quedado expuestos tras dicho corte. Tras este paso se procedió a realizar una reacción de retrotranscripción empleando un cebador dT con una cola de secuencia conocida. A continuación, se efectuó una amplificación inespecífica (PCR universal) de todos los mensajeros cortados con un cebador específico de la secuencia del adaptador y un cebador correspondiente a la secuencia presente en el cebador dT del paso anterior, que amplificará desde la cola *polyA* de los mensajeros.

Para identificar las dianas seleccionadas para su validación se diseñaron un par de cebadores específicos para cada diana a analizar. Un primer cebador reverso (R1), que se encuentra más alejado del punto de corte hipotético del miRNA; y un cebador R2 más cercano. La idea es realizar dos amplificaciones empleando estos cebadores secuencialmente (PCR anidada), siempre junto al específico del adaptador 5' (*GeneRacer* 5'), para así aumentar la especificidad de la reacción e incrementar lo máximo posible la abundancia de la diana que se quiere estudiar como se muestra a continuación en la figura 6.

La primera reacción de RACE se realizó en un volumen final de 20 μ l: 2 μ l de PCR universal, 0,5 μ l de dNTPs Mix (concentración final 0,25 μ M), 0,5 μ l de cebador *GeneRacer* 5' (0,25 μ M), 5 μ l del cebador R1 (0,25 μ M), 2 μ l de tampón (1X), 0,5 μ l de polimerasa Netzyme (1 U/ μ l), y 9,5 μ l de agua miliQ.

La segunda reacción de RACE se realizó en un volumen final de 20 μ l. Las condiciones son idénticas a las de la primera reacción salvo que se emplearon 2 μ l de una dilución 1:10 del producto de la PCR anterior y el cebador empleado en este caso fue el R2, 5 μ l a una concentración final de 0,25 μ M.

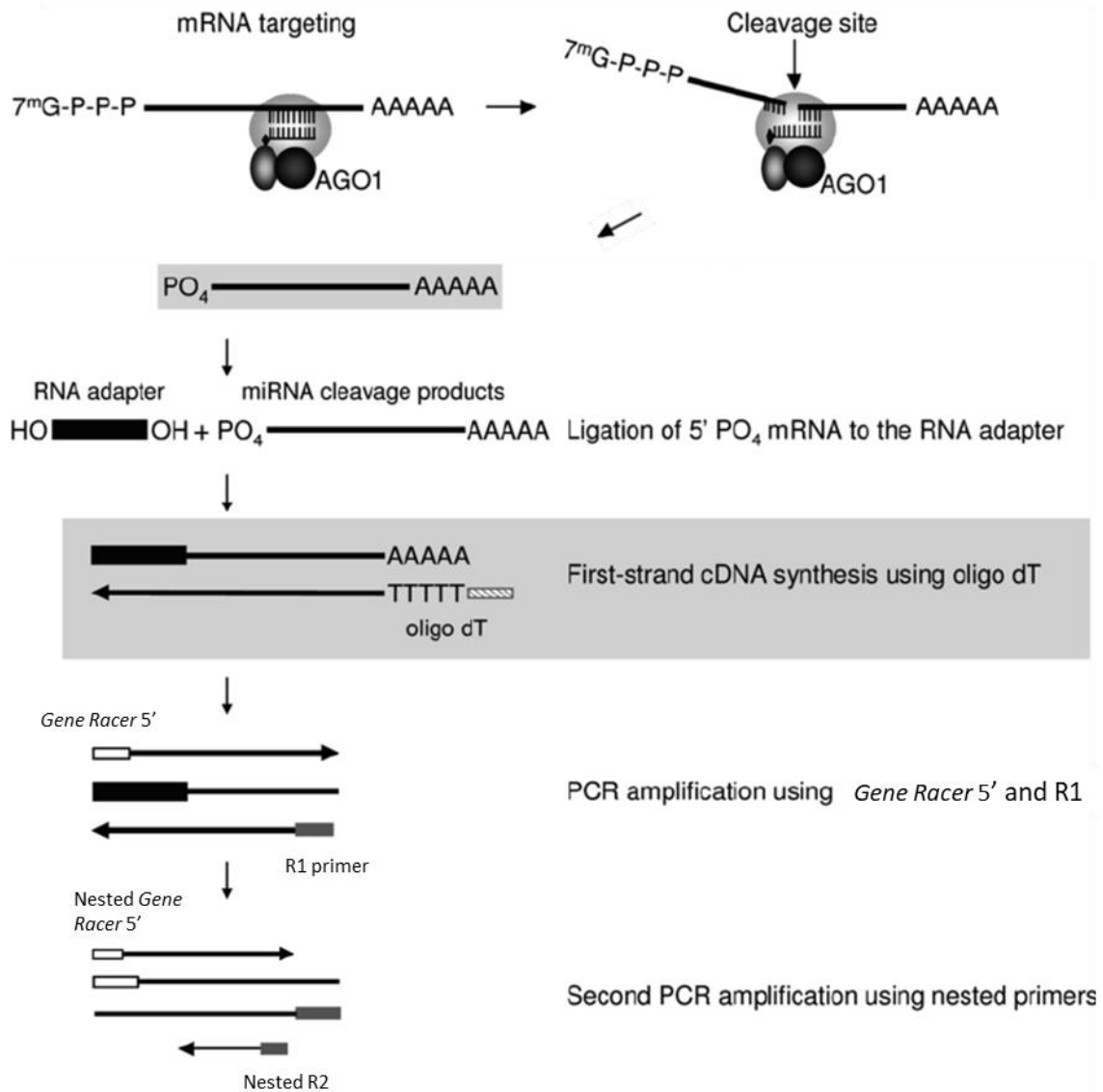


Figura 6. Descripción esquemática del proceso de amplificación específica y anidada del sitio de corte de un miRNA mediante 5'RLM-RACE; empleando una ligación de un adaptador en el extremo 5' fosfato libre dejado por la acción de AGO1, seguido de una retrotranscripción con un cebador dT (RT universal). Posteriormente se emplearon los cebadores específicos (R1 y R2) junto al cebador del adaptador (*Gene Racer 5'*) para llevar a cabo la PCR anidada con el fin de aislar para su posterior secuenciación el punto de corte de un posible miRNA estudiado. Imagen tomada y modificada de Llave *et al.* (2011).

La ligación del producto de PCR, transformación y PCR de colonia, y tratamiento con ExoSAP y secuenciación se realizaron exactamente igual a como se describió en el apartado anterior 1.1.2. pasos IV, V y VI.

1.2.2. PCR semi-cuantitativa

La PCR semi-cuantitativa se realizó para comprobar que la reacción de amplificación con los cebadores diseñados era específica y, a ser posible, determinar si existía una diferencia fácilmente detectable en la acumulación de los genes diana de los nuevos miRNAs predichos estudiados entre las muestras que presentaban acumulación diferencial de los sRNAs y el control a modo de comprobación previa a la realización de la PCR cuantitativa. La reacción de PCR semi-cuantitativa se llevó a cabo por triplicado y se retiró cada una de

las tres réplicas a los 27, 30 y 33 ciclos respectivamente. La reacción se realizó en un volumen final de 20 µl: 5 µl de cDNA (dilución 1:20 de la PCR universal, ver apdo. 1.2.1.), 1 µl de cebador directo y 1 µl de cebador reverso (concentración final para ambos de 0,25 µM), 2 µl de Buffer (1X), 0,5 µl de polimerasa Netzyme (1 U/µl), 0,5 µl de dNTPs Mix (0,25 µM), completando hasta el volumen final con 10 µl de agua MiliQ. La reacción de PCR semi-cuantitativa se llevó a cabo en un termociclador LifeECO TC-96/G/H(b)C (Hangzhou Bioer Technology Co. Ltd., Binjiang, Zhejiang, China).

1.2.3. PCR cuantitativa (qPCR), acumulación diferencial de la diana

Síntesis de cDNA

Se emplearon 1.5 µg de RNA total de plantas control o tratadas (condiciones de estrés) que fueron sometidos a un tratamiento con DNasa (EN0525, Thermo Scientific™), tras dicho paso se llevó a cabo la transcripción reversa empleando para ello el *RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit* (Thermo Scientific™) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Se realizó este proceso tanto para las muestras control (NT) como para las tratadas (C, D, SD, SA, MON, AGRO y Hsvd) para cada uno de los tiempos (T1, 2, 3 y 4).

qPCR y análisis de los datos

Los ensayos se realizaron empleando el reactivo PyroTaq EvaGreen mix Plus (ROX) (Cultek Molecular Bioline). Las muestras empleadas en cada ensayo fueron aquellas en las cuales el sRNA (posible miRNA) estaba diferencialmente acumulado, esperando observar en consecuencia una acumulación diferencial (y opuesta al posible miRNA) de su diana. El volumen final por pocillo fue de 10 µl: 2 µl del PyroTaq mix, 2 µl de la muestra correspondiente, 0,5 µl de cebador directo y 0,5 µl de cebador reverso específicos de la diana a ensayar (a una concentración final de 0,5 µM) completando con 4,8 µl de agua miliQ hasta el volumen final. Todos los análisis se realizaron por triplicado en un ABI 7500 Fast-Real Time qPCR (Applied Biosystems) empleando un protocolo estándar excepto una modificación del paso inicial, modificando el tiempo de exposición a 95 °C aumentándolo de 10 a 15 minutos ya que la enzima empleada es una *hot start*, y modificando el volumen por pocillo predeterminado de 20 microlitros a 10 microlitros. Se emplearon tres genes considerados de expresión constitutiva para la normalización de las muestras: Profilina (NM_001297545.1), Actina 7 (XM_008442791.2) y un factor de ribosilación del ADP (XM_008463181.2). La eficiencia de amplificación de la qPCR se derivó de una curva estándar generada con una serie de cuatro diluciones seriadas 1:10 de una mezcla de cDNAs de las muestras que serían empleadas posteriormente para ensayar cada uno de los genes de interés. La expresión génica relativa fue determinada con el método comparativo de $\Delta\Delta C_t$ y normalizado frente a la media geométrica de expresión. La significancia estadística de las diferencias observadas fue evaluada mediante un T-test no pareado (Livak and Schmittgen, 2001).

Objetivos

El objetivo general del presente trabajo consiste en llevar a cabo un análisis sistemático (bioinformático y bioquímico) de sRNAs acumulados en plantas de melón (*Cucumis melo* L. cv. Piel de Sapo) en los mismos estadios de desarrollo y expuestas a diferentes condiciones adversas con el fin de identificar nuevos miRNAs específicos de dicha especie potencialmente relacionados con la respuesta a estrés mediante la validación de su existencia y funcionalidad y así poder inferir en las robustas redes regulatorias subyacentes a la respuesta global modulada por los miRNAs frente al estrés; con el fin último de ampliar los conocimientos disponibles en este campo para poder aplicarlos, junto a otras herramientas biotecnológicas, en el desarrollo del cultivo de un melón más resistente a las condiciones ambientales y por ende más productivo o con un valor añadido.

Este proceso de identificación de nuevos miRNAs y de análisis de su potencial función se hace especialmente importante en el caso de *C. melo*, especie en la que se ha observado una acumulación predominante de sRNAs de 24 nucleótidos.

Para poder materializar, al menos en parte, este objetivo general, en el presente trabajo se pretenden desarrollar los siguientes objetivos específicos:

- 1) Identificación de posibles miRNAs nuevos de melón (sRNAs que no se han descrito previamente como miRNAs en esta especie), mediante la aplicación de herramientas bioinformáticas de predicción de miRNAs
- 2) Validación de la secuencia del potencial miRNA empleando la técnica de *stem loop* RT-PCR.
- 3) Validación funcional del potencial miRNA por:
 - a. Identificación del corte de las dianas predichas por 5' RLM-RACE.
 - b. Correlación negativa entre la acumulación del nuevo miRNA y de su transcrito diana.

Resultados

I. CRITERIOS DE PREDICCIÓN DE NUEVOS MIRNAS.

A. Predicción de miRNAs por miRDeep*

La predicción informática de los miRNAs a través de miRDeep* (ver intr. apdo. miRDeep*) se realizó empleando el archivo FASTA en el cual estaban contenidas las secuencias de sRNAs de todas las librerías, incluyendo todas las réplicas de cada tiempo y de cada uno de los estreses, así como las correspondientes al control. Los parámetros empleados para esta predicción fueron los determinados por defecto por el programa. En el análisis de dichas secuencias miRDeep* es capaz de discernir entre miRNAs ya descritos y posibles nuevos miRNAs de melón, estos últimos pasarían a ser considerados candidatos y por lo tanto susceptibles de validación. Finalmente, se generó una lista de 22 candidatos clasificados como posibles nuevos miRNAs de melón, que se nombraron mediante un código identificador (código SNCMel de la secuencia del sRNA de las librerías) y por un número asignado en base a la familia de miRNAs de la familia *Viridiplantae* depositados en miRBase con los que presentaron mayor homología, pasando a ser objeto de estudio en este trabajo. Dichos candidatos están recogidos en el anexo III tabla S2.

B. Predicción de miRNAs por miRCat2

Al igual que en el caso anterior, la predicción informática de los miRNAs a través de miRCat2 se realizó a partir de todas las secuencias de sRNAs representadas en todas las librerías (incluyendo todas las réplicas en todos los estreses y tiempos). Como ya se ha expuesto en la introducción (apdo. miRCat2), miRCat2 establece agrupaciones o puntos calientes de secuencias de las cuales genera una secuencia consenso la cual es plegada junto a las secuencias de horquillado (anexas a la consenso) por la función *RANDFold*.

Para generar una horquilla en primer lugar el programa debe ser capaz de establecer una secuencia consenso (agrupamiento local de muchas lecturas) frente al genoma que se anotará como el miRNA maduro. Como segundo requisito debe ser capaz de encontrar en las librerías una secuencia que encaje como miRNA *star* (o miRNA*) frente al maduro. Como tercer requisito, una vez plegada la horquilla, los miRNAs maduro y *star* deben presentar la disposición clásica de +/-2 nt además de que ambas secuencias deben tener la misma longitud como se aprecia en la figura 5a. La complementariedad entre las hebras madura y *star* se establece posteriormente a la generación del *hairpin* mediante un *blastall*. miRCat2 es capaz de generar representaciones gráficas de las horquillas, así como marcar la posición y extensión que ocupan tanto la hebra madura como la *star* dentro de la estructura secundaria. Los parámetros que la persona encargada de la predicción bioinformática empleó para ejecutar el programa son los que se detallan en el anexo apdo. II: algoritmo de miRCat2.

Una vez generado el *hairpin* (u horquilla) tanto la hebra madura como la *star* se enfrentaron a la base de datos de miRBase para determinar su homología con secuencias de miRNAs ya descritos en las especies de la familia *Viridiplantae* de plantas. Se estableció que aquellos miRNAs predichos cuya homología fuera mayor del 90 % para un número de nucleótidos mayor o igual a su longitud total -2 nt (tanto para la secuencia madura como la *star*) a miRNAs ya descritos en miRBase serían auténticos miRNAs, considerando las

variaciones encontradas como fruto del proceso de especiación y variabilidad natural. Todas aquellas secuencias que no cumplían dichos requisitos de homología fueron tomadas como posibles nuevos miRNAs de melón, e igual que con el sistema de predicción anterior, se identificaron según el código SNCMel de secuencia de la librería, así como un número (asignado en base al miembro de la familia de miRNAs de miRBase con los que presentaba mayor homología), y pasaron a ser objeto de estudio en este trabajo

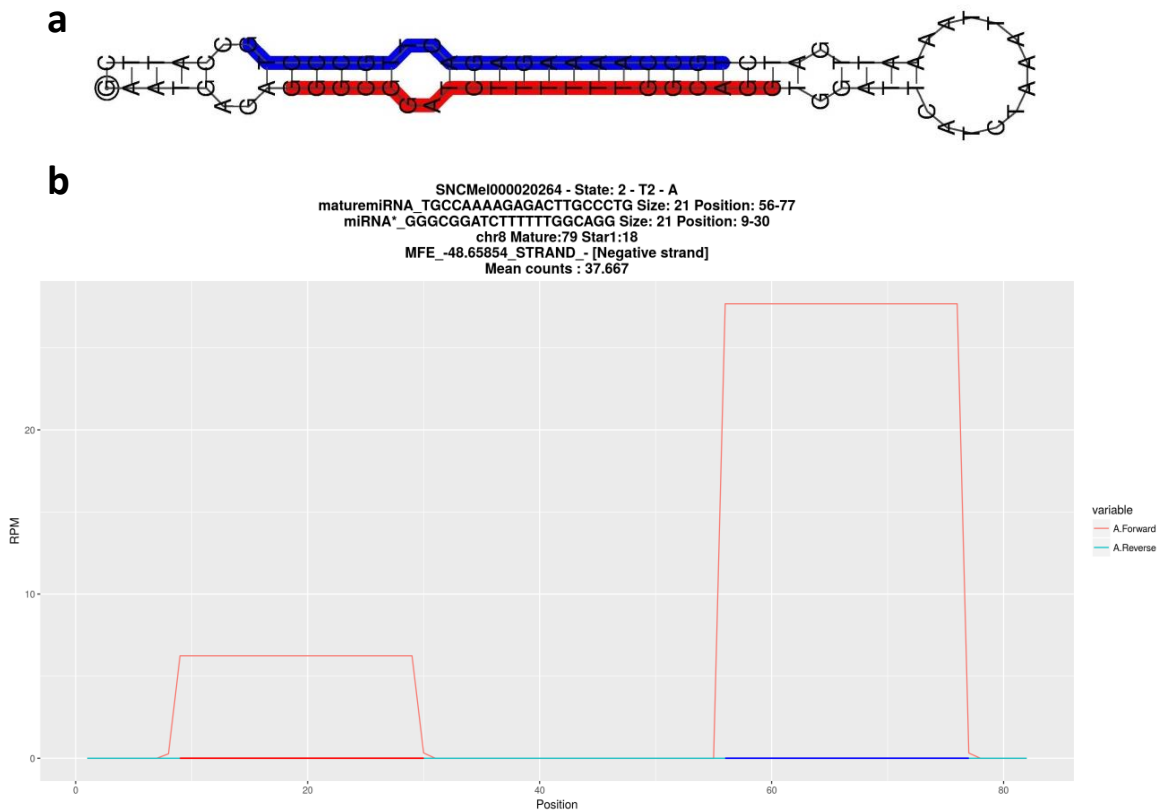


Figura 7. Estructura secundaria y distribución de secuencias del *hairpin* predicho para la secuencia SNCMel000020264, a modo de ejemplo de cómo tiene que ser un buen candidato de miRNA. **a)** horquilla generada por miRCat2 para la secuencia, **b)** representación gráfica de la distribución de las secuencias de las librerías 100% homólogas a la secuencia del *hairpin* predicho por miRCat2. El eje X representa la longitud de la secuencia del *hairpin*. Para ambas imágenes se representa en azul la secuencia madura, y en rojo, la secuencia *star*.

La aplicación de miRCat2 generó una lista con un total de 49 posibles miRNAs, de los cuales 32 fueron clasificados como posibles nuevos miRNAs de melón (recogidos en el anexo III tabla S2). Para determinar aquellos más interesantes para su validación biológica se abordó su selección de manera diferente a aquellos predichos por miRDeep*, estableciéndose dos criterios obligatorios (debiendo cumplir como mínimo uno de ellos) y uno accesorio: las representaciones gráficas de los miRNAs (Fig. 7a) debían presentar una estructura secundaria predicha satisfactoria (secuencias madura y *star* complementarias, bucles que no den lugar a estructuras poco verosímiles...) y/o la distribución de las lecturas sobre el genoma (para ambas secuencias, *star* y madura) debían presentar un perfil adecuado (Fig. 7b), es decir, una acumulación mayor de la hebra madura frente a la *star* como se esperaría de un verdadero miRNA en el cual dicha hebra es rápidamente degradada por carecer de función biológica. Como criterio accesorio se dio prioridad a aquellos miRNAs que presentaban dianas predichas por el programa psRNATarget con

una expectativa menor o igual a 3 (valor máximo establecido por defecto en el programa para determinar la idoneidad de una diana, ver intr. apdo. psRNATarget).

C. Selección de los mejores candidatos

Por lo tanto, se predijeron mediante ambos procedimientos un total de 52 posibles nuevos miRNAs de melón (ver fig. 8), habiendo sido dos de ellos predichos por ambas técnicas (SNCMel000020264 y SNCMel000042761). De entre todos ellos, se seleccionaron 26 (un 50%) como mejores candidatos a ser auténticos miRNAs (atendiendo a los criterios estructurales y funcionales descritos en los apartados anteriores) y fueron validados experimentalmente. La tabla en la cual están recogidos los 52 sRNAs predichos como posibles nuevos miRNAs de melón se encuentra en el anexo III tabla S2.

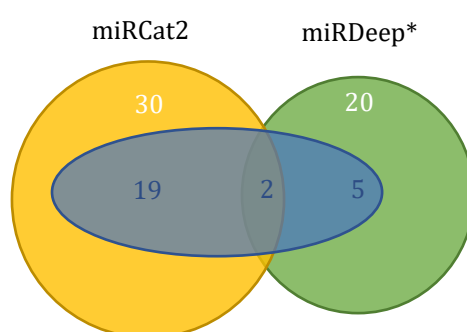


Figura 8. Representación gráfica de los posibles nuevos miRNAs predichos por miRCat2 (amarillo), miRDeep* (verde). En la intersección dos secuencias: SNCMel000020264 y SNCMel000042761. En azul secuencias seleccionadas como mejores candidatos a ser auténticos miRNAs nuevos de melón según criterios descritos en el texto y validados experimentalmente en este trabajo.

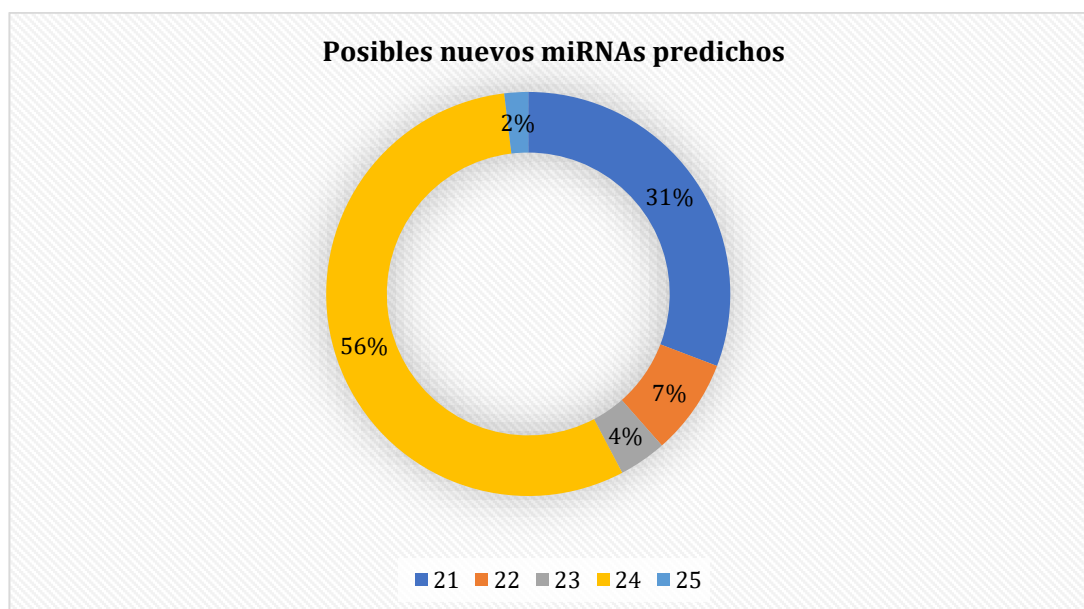


Figura 9. Perfil en porcentaje de los tamaños de las 52 secuencias predichas por miRCat2 y miRDeep* como posibles nuevos miRNAs de melón.

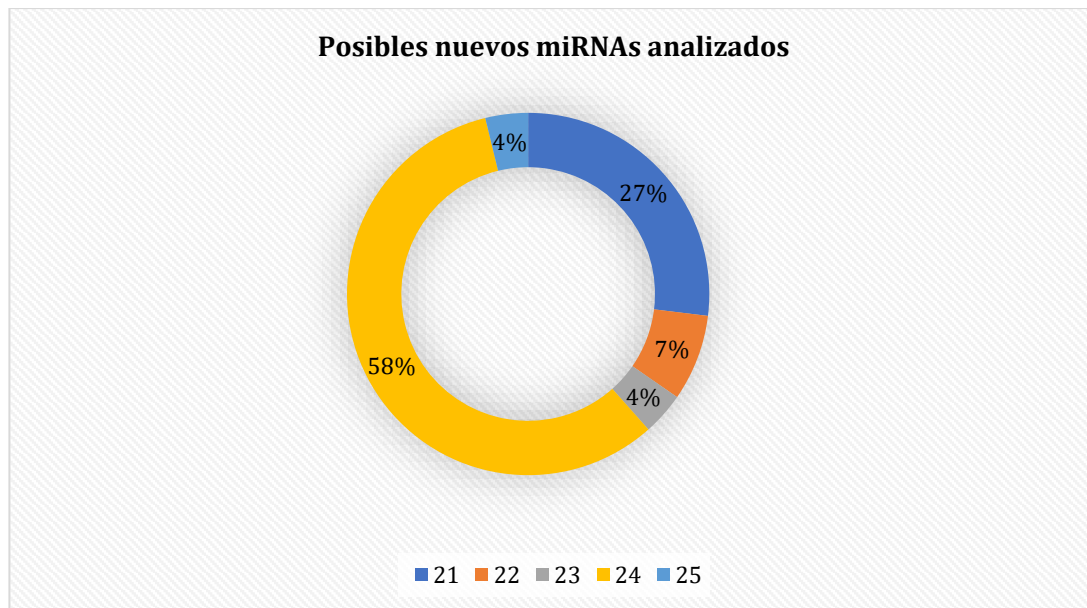


Figura 10. Perfil en porcentaje de los tamaños de las 26 secuencias seleccionadas como mejores candidatos a ser auténticos nuevos miRNAs de melón y analizadas en el presente trabajo.

Como se puede observar en la figura 9 el perfil de los tamaños de las secuencias predichas como posibles nuevos miRNAs coincide con el observado para la población original de sRNAs provenientes de las librerías (ver introducción fig. 2), siendo la fracción de secuencias de 24 nucleótidos la mayoritaria (56%), seguida por las secuencias con 21 nucleótidos de longitud (31%). El resto de secuencias de 22, 23 y 25 nucleótidos de longitud son minoritarias (13%). La gran abundancia de secuencias de 21 nucleótidos (la longitud que poseen la mayoría de los miRNAs funcionalmente descritos en plantas y animales), y de 24 nucleótidos, entre las secuencias predichas como nuevos miRNAs hace pensar que éstas podrían ser activas funcionalmente.

Por otra parte, como se puede observar en la figura 10, la aplicación de los criterios estructurales y funcionales empleados para seleccionar los mejores candidatos para su posterior validación no ha producido sesgos en lo que a distribución de longitud de las secuencias se refiere. Las secuencias de los 26 sRNAs escogidos mediante los criterios expuestos en los apartados anteriores se encuentran recogidas en el anexo II tabla S1.

II. VALIDACIÓN DE LA EXISTENCIA DE LOS NUEVOS MICRORNAs PREDICHOS

Identificación de los posibles miRNAs por *stem loop* RT-PCR,

Con el fin de realizar una nueva verificación empírica de la secuencia real de los sRNAs provenientes de la secuenciación masiva e identificados por los programas de predicción como posibles nuevos miRNAs, se procedió a amplificar las secuencias de los sRNAs escogidos por la técnica de *stem loop* RT-PCR, en la que al emplear un oligonucleótido en forma de horquilla para la retrotranscripción se consigue amplificar de forma específica dichas secuencias cortas (ver apdo. 1.1.2. de MyM figs. 3b y 4).

De 26 posibles miRNAs seleccionados 11 fueron validados mediante la técnica de amplificación por *stem loop* y posterior secuenciación como se describe en el apartado de 1.1.2 de MyM. El perfil de los tamaños de las secuencias detectadas y predichas como posibles nuevos miRNAs se representan en la figura siguiente:

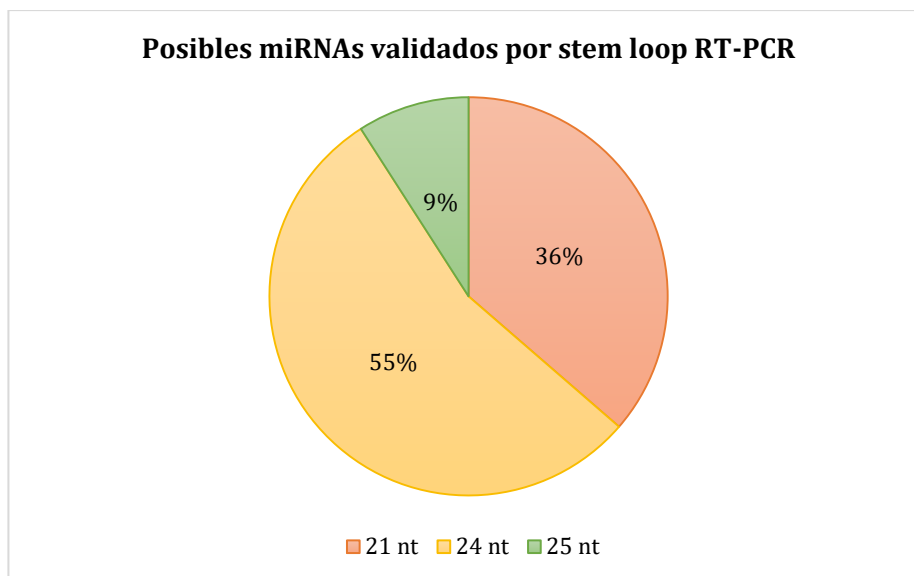


Figura 11. Perfil en porcentaje de los tamaños de las 11 secuencias validadas por la técnica de *stem loop* RT-PCR: en naranja aquellos de 21 nucleótidos de longitud (4), en amarillo los de 24 (6) y en verde los de 25 (1).

Del mismo modo a como ocurría en la secuenciación masiva, se puede apreciar en la validación individual que sigue existiendo en melón un enriquecimiento poblacional de las secuencias de 24 y 25 nt de longitud no canónica (mayores de 23 nt) respecto a la mayoría de los miRNAs descritos, suponiendo éstas un 63,6 % del total de los posibles miRNAs que se han podido identificar mediante la técnica del *stem loop* RT-PCR.

Esta técnica supone un grado más de evidencia y validación biológica respecto a la secuenciación masiva evidenciando que ambas especies de sRNAs, tanto las que poseen la longitud esperada para un auténtico miRNA (21 nt) como las mayores de 23 nt, pueden ser perfectamente aisladas de muestras de sRNAs de melón, demostrándose así que las variaciones en la longitud observadas no se deben a errores en el procesamiento bioinformático de los datos obtenidos de la secuenciación masiva (eliminación de la secuencia de los adaptadores defectuosa, etc.). No obstante, este análisis no se consideró crítico para demostrar la validez de un posible miRNA, pues al tratarse de secuencias poco frecuentes en las librerías (media inferior a 65 cuentas por millón), esta técnica puede no tener la sensibilidad necesaria para poderlas detectar todas.

III. VALIDACIÓN FUNCIONAL DE LOS POSIBLES MICRORNAS EN BASE AL ANÁLISIS DE SUS DIANAS PREDICHAS

A. Predicción y selección de dianas

Todas las secuencias escogidas para su validación como posibles miRNAs (26 secuencias recogidas en la tabla S1 del anexo II) fueron analizadas por el programa de predicción de dianas psRNATarget (<http://plantgrn.noble.org/psRNATarget/>) (ver intr. psRNATarget) empleando la versión Schema V1 (2011) sobre las colecciones de transcritos de melón depositadas por los consorcios ICuGI (International Cucurbit Genomics Initiative) y MELONOMICS Project, con el fin de encontrar posibles transcritos que pudieran ser diana de la actividad de dichas secuencias actuando como auténticos miRNAs. Se seleccionaron para su validación funcional aquellas dianas que presentaran expectativas en sus parejas miRNA/diana de un valor menor o igual a 3 (valor máximo por defecto estipulado por el

programa para que un transcrito sea considerado diana de un miRNA dado). Las dianas correspondientes a cada posible miRNA seleccionadas para su análisis están recogidas en la tabla 2 que se muestra a continuación.

Tabla 2. Posibles nuevos miRNAs de *Cucumis melo* L. cv. Piel de sapo predichos por miRDeep* y miRca2 identificados mediante su código SNCMeI, seguidos por su secuencia consenso y la longitud de la misma. Todos los sRNAs presentan las dianas predichas para la actividad de cada uno de ellos como verdaderos miRNAs acompañados por la expectativa de dicha predicción, el tipo de inhibición que ejercería el posible miRNA, así como un código identificativo de cada una de las dianas (todas ellas son PREDICTED: *Cucumis melo*). Además, se muestran también los valores de Log2FC de la acumulación diferencial y el estrés y el tiempo en el cual fueron determinados dichos valores para aquellos sRNAs los tuvieran.

Identificador	Secuencia consenso	Longitud	Estrés	Log2FC	Expectativa	Inhibición	Blastncl	Descripción
SNCMeI00004019	TGAATGAGGAACATTGATGATT	23	C T4 HSV4 T4	-4,41 -4,5	2,5	Corte	XM_008453025.2	Protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5 (LOC103492594), mRNA
SNCMeI00004698	TCGAGATCAGTAGACATGAACAATT	25	C T4 HSV4 T4	-1,9 -2,66	3	Corte	XM_008461848	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha
SNCMeI000011573	GATCCCTTGAGACTTACCGCT	22	AGRO T2 HSV4 T2	-2,79 -2,59	3	Corte	XM_008441472.2	Transcripción factor CTB8 (LOC103494412), transcript variant X1, mRNA
SNCMeI000015070	ACGAAATGCTGCTATCATTTGAT	24	C T4 HSV4 T4	-2,6 -2,52	2,5	Corte	XM_008455821	Transcription factor bHLH113-like (LOC103494587), transcript variant X1, mRNA
SNCMeI000015111	TCTATTTCTTCAATTTTGAT	21	MON T1	1,79	3	Corte	XM_008453304.2	Chaperone protein DnaJ-like (LOC103492786), mRNA
SNCMeI000019875	AGTCAATTCGACATAGCTCAGTG	24	AGRO T2	1,04	3	Traducción	XM_008464065.2	Magnesium transporter MRS2-11, chloroplast (LOC10350679), mRNA
SNCMeI000020264	TCGCAAAAAGACCTTCCCTG	21	C T4	-3,97	3	Corte x 2	XM_008441632.2	Probable ubiquitin-conjugating enzyme E2 24 (LOC103494521), transcript variant X1, mRNA
SNCMeI000032737	CATGTGCTCTTCTTCTCCAAC	21	D T4 HSV4 T1	-1,22 -2,37	2,5 3	Corte	XM_008462841.1	Root phototropism protein 3 (LOC103499766), mRNA
SNCMeI000034342	TTCTATTTGCTTTCATTTTGCA	21	x	x	0,5	Corte	XM_017044457.1	Protein NRT1_PTR FAMILY 1.2-like (LOC103488191), mRNA
SNCMeI000042761	TTTGTTCGATTGAAGAAATT	21	x	x	1,5	Corte	AB297386.1	Cucumis melo var. cantalupensis ERS1 gene for ethylene receptor, complete cds.
SNCMeI000049332	TTCTGATCTTGTATTCTTCTGCT	24	x	x	3	Corte	XM_008464956.2	Dolichol kinase EVAN (LOC103501385), transcript variant X1, mRNA
SNCMeI000051551	ACAATGATCATACACCTCTAT	24	C T4	1,48	3	Corte	XM_008465511.2	TPP repeat-containing thioredoxin TTL1 (LOC103501809), mRNA
SNCMeI000108829	CTCTCTGCGTCTTCTAAATC	21	x	x	3	Traducción	XR_537127.2	Uncharacterized LOC103486771 (LOC103486771), ncRNA
SNCMeI000148412	CGATGATATGCTAGAAAGAAAT	22	C T1 MON T1	1,88 1,82	3	Corte	XM_008440270.2	Phosphate transporter PH01 (LOC103483572), mRNA

B. Validación funcional, identificación del corte en las dianas por 5'RLM-RACE

Determinar la existencia del punto de corte predicho en un transcrito diana permite establecer una evidencia de funcionalidad de la secuencia de sRNA asociada a dicha diana lo que permitiría catalogarla como un auténtico miRNA.

En este orden se pasó a abordar dicha cuestión seleccionando para ello aquellas parejas de sRNAs y diana o dianas predichas que presentaban una expectativa en la predicción con un valor menor o igual a 3 (como se exponía al comienzo de este apartado, III A). Se llevó a cabo el análisis de un total de 21 transcritos candidatos a ser dianas de 14 posibles miRNAs (del total de los 26 analizados) mediante la técnica de 5'RLM-RACE (ver apdo. 1.2.1 MyM) que quedan recogidos en la tabla 3.

Tabla 3. Clasificación en categorías de las dianas predichas para la actividad de posibles nuevos miRNAs de melón en base a los resultados obtenidos mediante 5'RLM -RACE acompañados por la expectativa de dicha predicción, el tipo de inhibición que ejercería el posible miRNA, así como un código identificativo de cada una de las dianas (todas ellas son PREDICTED: *Cucumis melo* y fueron ensayadas en muestra no tratada).

Categoría	Descripción	Identificador	Expectativa	Inhibición	Blastnucl
Cat. 1	Transcription factor GTE8, mRNA	SNCMeI000011573	3	Corte	XM_008441472.2
Cat. 1	Probable ubiquitin-conjugating enzyme E2 24, mRNA (626-646/840-860)	SNCMeI000020264	3	Corte x 2	XM_008441632.2
Cat. 2	Protein FAR1-RELATED SEQUENCE 5, mRNA	SNCMeI000004019	2,5	Corte	XM_008453025.2
Cat. 2	Chaperone protein DnaJ-like, mRNA.	SNCMeI000015111	3	Corte	XM_008453304.2
Cat. 2	Zinc finger CCCH domain-containing protein 62-like, mRNA		3	Corte	XM_008459644.1
Cat. 2	Magnesium transporter MRS2-11, chloroplastic, mRNA	SNCMeI000019875	3	Traducción	XM_008464065.2
Cat. 2	Cryptochrome DASH, chloroplastic/ mitochondrial, mRNA		3	Corte	XM_008468110.2
Cat. 2	Root phototropism protein 3, mRNA	SNCMeI000032737	2,5	Corte	XM_008462841.1
Cat. 2	Putative glucose-6-phosphate 1-epimerase, mRNA		3	Corte	XM_008453265.2
Cat. 2	Protein NRT1/ PTR FAMILY 1.2-like, mRNA	SNCMeI000034342	0,5	Corte	XM_017044457.1
Cat. 2	Agamous-like MADS-box protein AGL19, mRNA		2	Corte	XM_008438969.2
Cat. 2	Dolichol kinase EVAN, mRNA.	SNCMeI000049332	3	Corte	XM_008464956.2
Cat. 2	Uncharacterized LOC103498240, mRNA		3	Corte	XM_008460766.2
Cat. 2	TPR repeat-containing thioredoxin TTL1, mRNA.	SNCMeI000051551	3	Corte	XM_008465511.2
Cat. 2	Mitochondrial inner membrane protease ATP23, mRNA.		3	Corte	XM_008460625.2
Cat. 3	NADH dehydrogenase [ubiquinone] 1 alpha	SNCMeI000004698	3	Corte	XM_008461848
Cat. 3	Transcription factor bHLH113-like, mRNA	SNCMeI000015070	2,5	Corte	XM_008455821
Cat. 3	<i>Cucumis melo</i> var. <i>cantalupensis</i> ERS1 gene for ethylene receptor, complete cds	SNCMeI000042761	1,5	Corte	AB297386.1
Cat. 3	Uncharacterized LOC103486771, ncRNA	SNCMeI000108829	3	Traducción	XR_537127.2
Cat. 3	NAC domain-containing protein 2, mRNA		2,5	Corte	XM_008468514.2
Cat. 3	Phosphate transporter PHO1, mRNA	SNCMeI000148412	3	Corte	XM_008440270.2

Los resultados de la validación de estos mensajeros predichos como dianas de diferentes miRNAs se clasificaron en tres categorías (ver tabla 3) en base a la “idoneidad” de los mismos, es decir, según cuanto se ajustan al patrón de corte esperado. La categoría 1 corresponde a aquellas dianas que presentan el corte esperado por la acción de AGO1 sobre el transcrito en la región de homología con el miRNA estudiado (corte canónico); la categoría 2 incluye aquellas dianas en las cuales se han encontrado únicamente cortes posteriores al lugar de corte canónico, y por lo tanto podrían ser productos de degradación de una diana correctamente cortada por el miRNA en cuestión pero cuyo corte canónico no ha sido detectado (quizás debido a haberse analizado un número reducido de secuencias); y por último la categoría 3 es aquella en la cual se han hallado cortes anteriores y posteriores al lugar predicho, lo cual indicaría que la degradación de dicha diana no depende del miRNA estudiado (también se incluyen en esta categoría los resultados de la técnica que no son concluyentes). Como se puede apreciar en la tabla 3, de los 21 transcritos analizados 15 (el 71,4 %) fueron auténticas dianas de 9 nuevos miRNAs (categorías 1 y 2), mientras que en el 28,6 % de los casos no se pudo validar la funcionalidad de los sRNAs analizados (categoría 3). Si bien únicamente en dos de ellas se ha podido detectar el corte canónico, no quiere decir que el resto de dianas positivas sean menos importantes, sino que constituyen un grado menor de evidencia respecto a las primeras en cuanto a la hipotética funcionalidad de los sRNAs que tienen asociados.

C. Validación funcional por qRT-PCR de las dianas predichas

Establecer una correlación entre los niveles de acumulación de los posibles miRNAs y de los transcritos diana asociados a éstos mediante las predicciones podría proporcionar indicios de una función asociada a las secuencias de sRNAs analizadas que las catalogarían como auténticos miRNAs. Se empleó para comprobar dicha correlación la técnica qRT-PCR (ver apdo. 1.2.3. MyM) permitiendo medir la acumulación de los transcritos asociados a los posibles miRNAs que presentaban a su vez una acumulación diferencial en algún estrés o estreses (valores recogidos en la tabla 2 del apdo. III A).

Se seleccionaron aquellas secuencias que presentaban valores de acumulación diferencial que hipotéticamente darían lugar a una alteración detectable por qPCR de su diana (o dianas): es decir, aquellas que presentan un valor de $\text{Log}_2\text{FC} > 1,5$ o $< -1,5$ y un *P valor* $< 0,05$ para como mínimo un tiempo de un estrés. Por lo tanto, se analizaron las 14 dianas correspondientes a 10 posibles miRNAs con acumulación diferencial.

Se comprobó que 10 de dichas dianas presentaban diferencias significativas en sus niveles de expresión entre el control y aquel estrés en el cual estaba identificado su posible miRNA como diferencialmente expresado o acumulado. Al representar el valor de Log_2FC de los posibles miRNAs frente al valor de expresión relativa $\text{Log}_2\Delta\text{Ct}$ de los valores obtenidos para cada una de sus correspondientes dianas (figura 9) se obtuvo que dichos pares secuencia/diana presentaban una correlación negativa con un valor de $R = -0,7937$ y un *P valor* $= 1,4285 \times 10^{-4}$. Como se puede apreciar en la figura 9 y por los datos estadísticos (*R* y *P valor*) todas ellas, excepto la diana con código XM_008460625.2 (tabla 2, segunda diana del SNCMel000051551), se comportan de la manera esperada para un verdadero miRNA, es decir, presentan la clásica correlación negativa entre los niveles de expresión del transcrito que es diana de un determinado miRNA y los niveles de expresión de dicho miRNA: por lo tanto, como se puede observar en la figura 12, si el posible miRNA está sobreexpresado respecto al control (valores de Log_2FC mayores que 1) su diana

deberá estar reprimida respecto al control (valores de $\text{Log}_2\Delta\text{Ct}$ menores que 0) y viceversa. Todas las dianas fueron comprobadas en al menos un tiempo de un estrés para el cual su posible miRNA fuera diferencial en base a los criterios ya expuestos. Los valores obtenidos del análisis de los resultados de la qPCR (ΔCt) así como los valores de Log_2FC de los posibles miRNAs correspondientes están recogidos en el anexo III apdo. 1.3 tabla S3.

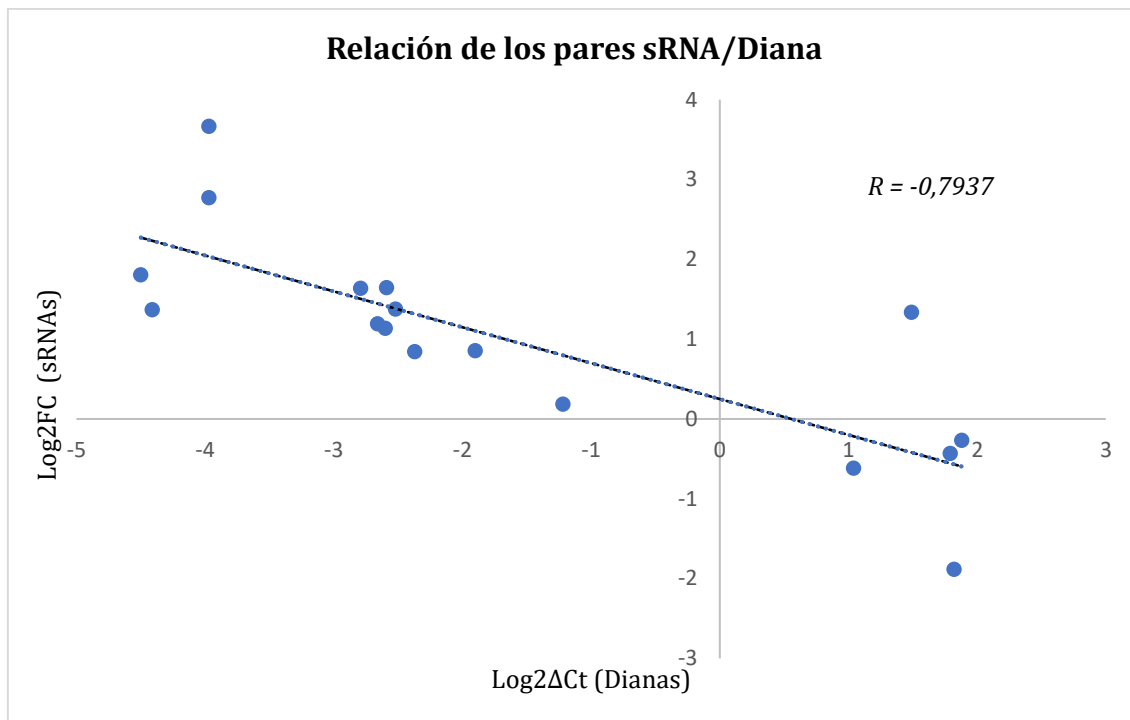


Figura 12. Distribución de los pares de valores de Log_2FC (eje Y) de cada uno de los sRNAs analizados frente al $\text{Log}_2\Delta\text{Ct}$ (eje X) del valor obtenido por qPCR para cada una de sus dianas predichas en cada uno de los estreses en los que fueron ensayadas. Cada punto representa una pareja posible microRNA-diana (estrés y tiempo correspondiente). Todos los pares excepto aquel perteneciente al par SNCMel000051551/XM_008460625.2 (C T4) presentan la esperada correlación negativa entre la diana y un verdadero microRNA.

IV. MIRNAS NUEVOS DE MELÓN RELACIONADOS CON LA RESPUESTA A ESTRÉS

La validación experimental de los nuevos miRNAs candidatos es el pilar sobre el que se sostiene la anotación de verdaderos nuevos miRNAs. Los tres ensayos llevados a cabo (*stem loop* RT-PCR, 5' RLM-RACE y qRT-PCR) suponen cada uno por sí solo un grado aditivo de evidencia independientes entre sí que permiten determinar cuáles de los miRNAs candidatos poseen la suficiente robustez experimental para ser anotados como verdaderos miRNAs nuevos de melón. En base a esta idea y los resultados obtenidos para cada una de las técnicas recogidas en los apartados anteriores, se clasificaron las 26 secuencias analizadas en 4 categorías según su grado de evidencia para ser verdaderos nuevos miRNAs (tabla 4).

Como se puede apreciar en la tabla anterior, de entre las 26 secuencias seleccionadas inicialmente como potenciales candidatos a ser auténticos miRNAs, 5 de ellas han acumulado suficientes evidencias directas (detección de corte en la diana predicha) e indirectas (amplificación por *stem loop* o correlación negativa entre la acumulación del sRNA y de su transcrito diana) como para considerarlas auténticos miRNAs nuevos de melón de respuesta a estrés (Cat. I). Además, otros 3 sRNAs se consideran muy probables

miRNAs auténticos, ya que aunque acumulan menos evidencias indirectas, sí presentan un buen perfil de corte de la diana asociada (Cat. II). Dentro de la categoría III se encuadran sRNAs que podrían tener alguna función biológica, bien sea porque se han detectado por *stem loop* RT-PCR o porque sus dianas asociadas sufren variaciones en los estreses en los que son diferenciales; sin embargo, su actividad reguladora no puede adscribirse a la de corte del transcrito predicho como diana, sino que podrían *estar* relacionadas con mecanismos como los de inhibición de la traducción o de metilación del DNA. Interesantemente, este grupo de secuencias (Cat. III) se halla enriquecido en secuencias de 24 nucleótidos, para los que la bibliografía asigna funciones de ese tipo (Henderson *et al.*, 2006).

Tabla 4. 26 secuencias analizadas distribuidas en 4 categorías según la evidencia obtenida en los tres ensayos de validación para determinar los posibles verdaderos nuevos miRNAs de melón. La columna referente a la *stem loop* RT-PCR tiene marcadas con un (+) resaltado en verde aquellas secuencias aisladas por dicha técnica. La columna de la qRT-PCR tiene marcadas con un (+) resaltado en verde aquellas secuencias cuyas dianas mantenían una correlación negativa respecto a la acumulación de su sRNA correspondiente, resaltado en rojo con un (-) aquella diana que no mostró dicho comportamiento. Por último, las categorías de 5'RLM-RACE son las estipuladas en el apartado de resultados III B, mostrando en el caso de que existieran dos dianas probadas para un mismo sRNA la de mejor resultado.

	SNCMel	Longitud	<i>stem loop</i> RT-PCR	qRT-PCR	5'RLM-RACE
Categoría I	SNCMeI000020264	21	+	+	categoría 1
	SNCMeI000011573	22		+	categoría 1
	SNCMeI000015111	21	+	+	categoría 2
	SNCMeI000019875	24	+	+	categoría 2
	SNCMeI000032737	21	+	+	categoría 2
Categoría II	SNCMeI000034342	21	+		categoría 2
	SNCMeI000004019	23		+	categoría 2
	SNCMeI000051551	24	+	-	categoría 2
Categoría III	SNCMeI000004698	25	+	+	categoría 3
	SNCMeI000015070	24		+	categoría 3
	SNCMeI000148412	22		+	categoría 3
	SNCMeI000049332	24			categoría 2
	SNCMeI000031046	24	+		
	SNCMeI000037367	24	+		
	SNCMeI000032956	24	+		
	SNCMeI000045463	24	+		
Categoría IV	SNCMeI000042761	21			categoría 3
	SNCMeI000108829	21			categoría 3
	SNCMeI000005508	24			
	SNCMeI000093128	24			
	SNCMeI000018078	24			
	SNCMeI000077356	24			
	SNCMeI000018562	24			
	SNCMeI000032193	24			
	SNCMeI000066180	21			
	SNCMeI000014163	24			

Cabe destacar que entre las secuencias de las categorías I y II (consideradas como auténticos o muy probables miRNAs) se encuentran un par de secuencias (SNCMeI000019875 y SNCMeI000051551) con una longitud de 24 nucleótidos y otras dos, SNCMeI000011573 y SNCMeI000004019, de 22 y 23 nucleótidos respectivamente. Así, se habrían aportado evidencias sólidas que apuntan a que en melón podrían existir miRNAs de una longitud diferente a la habitual (21 nt) con actividad de corte de transcrito. En este

caso quedaría por determinar qué proteína está mediando en el procesamiento de los precursores para dar lugar a dichas secuencias, es decir, si se trata de DCL1 o de alguna otra proteína tipo DICER como DCL3 (Henderson et al., 2006). Asimismo, sería interesante averiguar si es, como ocurre convencionalmente, AGO1 la encargada de cargar dichas secuencias para mediar el corte o está interviniendo alguna otra proteína de la familia Argonauta.

Por último, en la categoría IV se han incluido aquellos sRNAs que, a pesar de tener una buena predicción como miRNAs a nivel estructural, no hay ninguna prueba experimental que demuestre que poseen alguna función biológica, demostrándose así que las predicciones bioinformáticas no son suficientes para describir nuevos miRNAs.

Así, si bien se partió de una estructura poblacional en la cual las secuencias de 24 nucleótidos eran las predominantes (resultados apdo. I fig. 9 y fig. 13b), al final del estudio se puede concluir que la mayoría de las secuencias para las cuales hay importantes evidencias de actividad funcional (Cat. I y II, figura 13a), al menos de corte, son menores de 23 nt. Por lo tanto, todavía queda por determinar la función biológica de muchas de las secuencias de 24 nucleótidos, tan predominantes en melón, algunas de las cuales parecen ser importantes en la respuesta a estrés ya que algunos de ellos sí son capaces de alterar los niveles de expresión de su diana (Cat. III, ver fig. 13b).

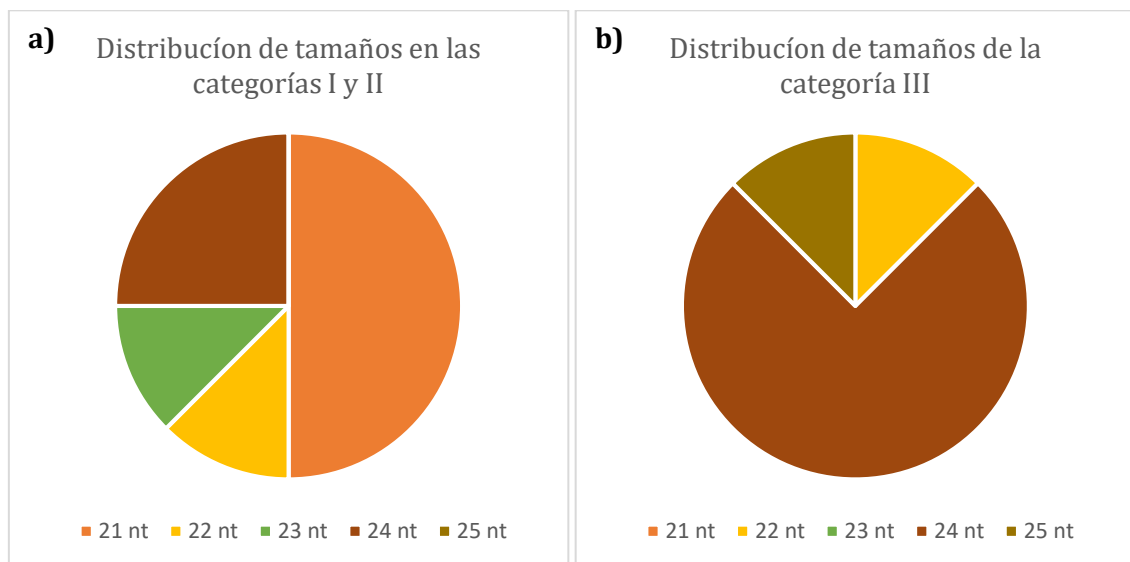


Figura 13. Perfil en porcentaje de los tamaños de las secuencias analizadas incluidas en **a)** las categorías I y II, como conjunto de probables miRNAs, y **b)** la categoría III como sRNAs no clasificables como miRNAs en base a la evidencia aportada por los ensayos realizados.

Discusión

Como se ha comentado anteriormente el objetivo principal de este trabajo consiste en identificar posibles miRNAs nuevos de melón específicos de la respuesta a estrés, empleando para ello una serie de predicciones bioinformáticas y su posterior validación experimental. Este segundo punto es crucial, ya que por un lado permite comprobar la validez de las predicciones informáticas, y, por otro lado, en base a las técnicas empleadas y el enfoque de este trabajo, permite que la identificación de miRNAs nuevos de melón cuente con una gran evidencia que respalde su anotación respecto a los criterios clásicos para la anotación de nuevos miRNAs.

Según los criterios establecidos por Ambros *et al.* (2004) para anotar un nuevo miRNA se debe poder detectar mediante alguna técnica dicho miRNA candidato dentro de una muestra enriquecida en sRNAs (de aproximadamente 22 nt de longitud) o que dicha secuencia pueda ser localizada dentro del genoma y detectada en una librería de cDNAs generados a partir de una muestra de RNA fraccionado (criterios de expresión). En cuanto a la biogénesis se establecen diferentes criterios referentes a los precursores que incluyen la filogenia, la acumulación del precursor en mutantes para DICER y predicciones de la energía libre de la estructura que contendría el miRNA candidato. Todos estos criterios, a excepción del primero, son satisfechos por las predicciones actuales ya que estas se basan en las librerías de secuencias filtradas (para presentar los tamaños adecuados) provenientes de la secuenciación masiva que son enfrentadas al genoma de la especie en cuestión, y únicamente aquellas secuencias que satisfagan lo criterios para la formación de un precursor válido son propuestas como candidatos a nuevos miRNAs (ver resultados apdo. I A y B). Por lo tanto, los criterios establecidos para la anotación de nuevos miRNAs se ven satisfechos por los candidatos generados por los últimos métodos de predicción y sin embargo muchos de ellos no superan la validación experimental (ver resultados apdo. IV tabla 4). Este hecho resalta la necesidad de un nuevo nivel de evidencia que apoye la anotación de candidatos como verdaderos nuevos miRNAs, y una forma de alcanzar ese nivel de evidencia es a través de la validación experimental mediante técnicas como el 5'RLM-RACE o la qPCR, ya que de este modo se corrobora una característica inherente y definitoria de los miRNAs, la funcionalidad.

Sin embargo, como ya se apuntaba en la introducción y se ha ido remarcando en el desarrollo de los diferentes apartados, los mecanismos que se pretende estudiar son extremadamente específicos, complejos y participan en una regulación muy fina de la respuesta y la recuperación de la homeostasis en situaciones de estrés para las plantas. Por lo cual se está tratando de inferir sobre mecanismos moleculares que ocurren en momentos muy concretos frente a estímulos muy específicos y que suponen una muy baja proporción respecto al total de los procesos celulares, en este caso de transcripción y procesamiento post-transcripcional. En consecuencia, las moléculas que participan en ellos son extremadamente difíciles de aislar para su estudio o su simple detección, lo cual hace que la dificultad metodológica se incremente enormemente. Tanto es así que los posibles miRNAs (sRNAs) estudiados en este trabajo se encuentran en las librerías en una proporción inferior a 65 cuentas por millón de lecturas. No obstante, dada la crucial importancia de dichos procesos, merece la pena caracterizarlos, estudiarlos y tratar de comprenderlos, pues este conocimiento podría ser empleado para el desarrollo de herramientas biotecnológicas de gran valor para la mejora de especies cultivadas, como se trata del caso que atañe a este trabajo, el melón.

Debido a que el miRNA maduro es cargado en RISC mientras que su miRNA* se degrada rápidamente, o solo se acumula a niveles muy bajos (Sunkar, 2010), es posible detectar dichas secuencias mediante la técnica *stem loop* RT-PCR. Como se apuntaba en el apartado II de resultados, 11 de los 26 posibles miRNAs predichos por diferentes programas (miRDeep* y miRCat2) y seleccionados como mejores candidatos a ser auténticos miRNAs (en base a criterios descritos en resultados apdo. I) pudieron ser aislados mediante esta técnica (ver resultados apdo. II figura 11). Entre las secuencias validadas por este método se encontraba también una proporción de secuencias de 23 y 24 nucleótidos similar a la observada en las librerías secuenciadas, indicando que estas secuencias existen en realidad y no son fruto de errores en la manipulación bioinformática de los resultados de la secuenciación masiva, pudiendo tener relevancia biológica en el contexto de la respuesta a estrés. No obstante, un resultado negativo en este análisis no se consideró concluyente para descartar un posible miRNA nuevo, pues al tratarse de secuencias muy poco abundantes, este método puede no ser lo suficientemente sensible como para detectarlas de forma efectiva. A ello se suma el hecho de que, con el fin de economizar en el valioso material biológico procedente de los experimentos de estrés, se empleó RNA de plantas control como material de partida para aislar los sRNAs, muestras en las que en la mayoría de los casos su acumulación no es la óptima.

Así, la validación de una secuencia de sRNA como posible miRNA nuevo debía hacerse según criterios funcionales, es decir, mostrando evidencias de su actividad como verdadero miRNA sobre sus posibles dianas.

La predicción de las dianas por psRNATarget y la posterior aplicación de los criterios de selección de las mismas (ver resultados apdo. III A) dio como resultado un total de 21 transcritos seleccionados candidatos a ser dianas de la posible actividad de 14 (de los 26 analizados) sRNAs como verdaderos miRNAs. Todas estas dianas fueron analizadas mediante la técnica de 5'RLM-RACE con el fin de localizar el corte esperado en el transcrito fruto de la actividad de un verdadero miRNA para así validar los sRNAs en base a una funcionalidad probada. Como se exponía en el apartado correspondiente a dicha técnica en el apartado III B de los resultados, el 71,4 % de las dianas probadas mostraban un perfil de cortes esperado según la actividad directa del miRNA predicho sobre su secuencia, si bien, dada la escasa cantidad de secuencias analizadas sólo fue posible detectar el corte canónico en dos casos (ver tabla 3, resultados apdo. III B). Se trata de un excelente resultado, habida cuenta del alcance y de las limitaciones que presenta este enfoque de validación, pues por una parte hay que considerar que, aunque la predicción bioinformática de la diana según la homología a la secuencia del posible miRNA sea favorable, para que se dé el corte de esta mediado por el miRNA en cuestión han de coexistir ambos factores en el mismo contexto espaciotemporal. Por otra parte, hay que tener en cuenta que el éxito en la detección del corte depende de la abundancia del transcrito en las librerías de 5' RLM-RACE, así, transcritos poco abundantes, como podrían ser algunos factores de transcripción, pueden no ser amplificados de forma efectiva. A ello hay que sumar el hecho de que, con el fin de economizar en valioso material vegetal, el análisis se realizó empleando muestra no tratada en las que la acumulación del posible miRNA no es la más favorable para la detección de la diana cortada (cabría esperar una mayor acumulación de transcrito cortado activamente en aquellas muestras donde la acumulación del miRNA es mayor), así, la proporción de miRNAs candidatos validados funcionalmente por esta técnica podría ser incluso superior a la observada.

Son muy pocos los estudios en los que se comprueban las dianas de los miRNAs de manera experimental ya que en la mayoría de los casos se estudian miembros muy homólogos de la misma familia que teóricamente comparten diana. Únicamente en tres de las dianas

analizadas en el presente trabajo se ha encontrado validación empírica del corte estudiado por 5' RLM-RACE en la bibliografía (ver tabla 5), y en todos los casos el miRNA que está regulando dicho corte pertenece a una familia muy bien caracterizada de 21 nucleótidos de longitud. Cabe destacar que, según los resultados obtenidos, el transcrito correspondiente a la enzima E2 conjugadora de ubiquitina presenta el corte esperado en la región de reconocimiento del sRNA SNCMeI000020264, el cual presenta una homología mayor del 90% con el miR399 de *A. thaliana* identificado por Allen y colaboradores (2005) como responsable del corte de ese mismo gen en dicha especie; así, dicho pequeño sRNA podría ser un miembro de la familia miR399 no descrito hasta el momento en melón.

Tabla 5. Dianas ensayadas por 5' RLM-RACE corroboradas por la bibliografía, acompañadas de los autores que comprobaron experimentalmente dichas dianas (u otras lo más similares posibles) y el miRNA que fue asociado a cada una de las mismas, así como la especie vegetal, en la cual fue descrita dicha asociación.

Diana	Autores	miRNA
NAC domain-containing protein 2	(Addo-Quaye <i>et al.</i> , 2008)	miR164 (<i>A. thaliana</i>)
Transcription factor bHLH113-like	(Allen <i>et al.</i> , 2005)	miR393 (<i>A. thaliana</i>)
Ubiquitin-conjugating enzyme E2 24	(Allen <i>et al.</i> , 2005)	miR399 (<i>A. thaliana</i>)

Aunque la identificación del sitio de corte esperado en la diana predicha supone la evidencia más robusta a la hora de determinar la funcionalidad de una secuencia para adscribirla como un auténtico miRNA, no siempre es posible determinarlo con exactitud, se procedió entonces a analizar la acumulación de los transcritos diana por qRT-PCR en aquellos estreses en los que la acumulación del sRNA fuera diferencial, con el fin de evaluar la correlación existente entre ellos y aportar una nueva evidencia indirecta de su funcionalidad. Como se expone en el apartado III C de resultados figura 12, la correlación observada entre los pares diana/posible miRNA en 9 de las 10 dianas analizadas es negativa y altamente significativa ($R = -0,7937$ y $P \text{ valor} = 1,4285 \times 10^{-4}$), según cabría esperar para auténticos miRNAs con actividad de corte.

Asimismo, también sería de esperar que las dianas que están siendo reguladas por estos miRNAs relacionados con el estrés estuvieran a su vez implicadas en la regulación de la respuesta frente a dichos estreses (o con el estrés en general). De ser así, ello constituiría una nueva evidencia indirecta de la funcionalidad del sRNA actuando como auténtico miRNA.

A este respecto existen varios estudios que describen un incremento en la expresión de FAR1 (*Far Red Impaired Response 1 related sequence*), posible diana de la secuencia SNCMeI000004019, con la respuesta a frío en plantas de grama (*Cynodon dactylon* L. Pers.) (Shi *et al.*, 2014), fenómeno que también se observa en las plantas de melón sometidas a bajas temperaturas (C) o infectadas por HSVd (*Hop Stunt Viroid*), asociado a una caída en la acumulación del citado miRNA. Esta misma respuesta presentan en nuestro experimento con melón el par formado por la secuencia SNCMeI000015070 (que se reprime) y el factor de transcripción bHLH (*basic Helix-Loop-Helix*), que junto con FAR1, también se activa por efecto de algunos estreses tanto bióticos como abióticos en la especie de algodón *Gossypium barbadense* L. (Zhou *et al.*, 2016). Un factor de transcripción

de la familia bHLH se encuentra entre las dianas que han sido descritas, concretamente como diana del miR393 en *A. thaliana* (Allen *et al.*, 2005).

La diana predicha para la secuencia SNCMel000020264, una E2 conjugadora de ubiquitina (o Ubc, *ubiquitin-conjugating enzyme*), está implicada en el marcaje de proteínas con ubiquitina para su posterior degradación en el proteasoma 26S, que normalmente se asocia a procesos de desarrollo en plantas (Zhou *et al.*, 2010). En 2010 Zhou y colaboradores identificaron en soja un gen (GmUBC2) que codificaba para una E2 cuya expresión se inducía por el estrés generado en condiciones de salinidad o sequía con el fin de regular la homeostasis iónica, la síntesis de osmolitos y la respuesta al estrés oxidativo. Estos mismos autores demostraron que la sobreexpresión de GmUBC2 en *Arabidopsis* confería una mejora en la tolerancia tanto a sequía como a salinidad, regulando la expresión de un conjunto importante de genes de respuesta al estrés abiótico. Según los resultados presentados en este manuscrito, en el experimento llevado a cabo en melón el transcrito de este gen se acumula fuertemente en frío y es diana de la secuencia SNCMel000020264 según 5' RLM-RACE. Este sRNA, cuya acumulación se reduce drásticamente en el estrés por frío y que además se pudo amplificar por *stem loop* RT-PCR se presenta como un firme candidato a ser un verdadero miRNA nuevo de melón específico de la respuesta a estrés.

Asimismo, el factor de transcripción GTE8, predicho como posible diana del SNCMel000011573, el cual es diferencial en los experimentos de melón en respuesta a la infección por HSVd y por *Agrobacterium* (AGRO), se induce también en plantas *Nicotiana benthamiana* frente al estrés biótico en este caso de manera dependiente del fitness viral durante las infecciones por el *Tobacco Etch Potyvirus* (TEV) (Cervera *et al.*, 2017) y frente al estrés biótico simulado por la exposición a OA (ácido oxálico) (Bahieldin *et al.*, 2016). La correlación negativa existente entre la acumulación de GTE8 y de su posible secuencia reguladora (SNCMel000011573) y la secuenciación del corte canónico esperado sobre el transcrito obtenido por 5'RLM-RACE (ver resultados apdo. III B tabla 3) hacen de este sRNA un buen candidato a ser un verdadero nuevo miRNA de melón de respuesta a estrés.

También existe una correlación negativa entre la acumulación de las secuencias de los pequeños RNAs SNCMel000148412 y SNCMel000015111 y de sus respectivas dianas, el transportador de fosfato PHO1 y una chaperona similar a DNAJ. La disminución de los niveles de expresión de PHO1 observada en respuesta a frío o a la infección por el hongo *M. cannonballus* podría ser debida al efecto regulador de la secuencia SNCMel000148412 que se está sobreacumulando en dichos estreses, con el objetivo de reducir la toma de fósforo, quizá como mecanismo de respuesta a la síntesis de osmolitos que se produce por el estrés hídrico que genera el frío, o bien con el objetivo de empobrecer en nutrientes las células para ralentizar el avance de una posible infección. Asimismo, la chaperona DNAJ, que aparece asociada al desarrollo de fruto (Roig *et al.*, 2012; Saladié *et al.*, 2015) y que se reprime en plantas infectadas con *Monosporascus*, podría estar regulada por la acción de la secuencia SNCMel000015111, en un intento de frenar el desarrollo en condiciones de estrés y permitiendo derivar la energía la respuesta frente a la infección.

Sin embargo, cabe destacar una característica común entre aquellos miRNAs descritos en la bibliografía, y más importante aún, aquellos confirmados funcionalmente a nivel experimental, y es que casi todos ellos presentan longitudes consideradas canónicas, concretamente de 21 nucleótidos (ver tabla 4). Este hecho no suscitaba ningún tipo de cuestión, pues las poblaciones predominantes de sRNAs aisladas en las especies estudiadas se correspondían con aquellas que parecían ser las encargadas de la

regulación, es decir que poseían funcionalidad propia como miRNAs y no como sRNAs que participan en el fenómeno de interferencia mediado por dichos elementos. Dicha máxima se mantuvo así hasta la aparición de estudios como los realizados en melón y otras especies que incidieron en que en los estudios poblacionales de sRNAs de dichas especies se encontraban enriquecimientos “anormalmente” elevados de sRNAs entre los cuales podrían encontrarse múltiples miRNAs considerados de longitudes no canónicas, como es el caso del melón. Como se exponía en la introducción (fig. 2) y en el apartado de resultados (apdo. I figura 9) las observaciones realizadas por el grupo, en consistencia con las de otros autores como Sattar *et al.* (2012) y Herranz *et al.* (2015) demostraron la existencia en melón una población consistente de sRNAs de 24 nucleótidos que supone aproximadamente un 50 % del total. Dicho enriquecimiento en esta especie de secuencias cortas se mantiene tanto previa como posteriormente a la predicción de posibles nuevos miRNAs (resultados apdo. I figura 9). Sin embargo, tras la validación funcional de los mismos aquellos con longitudes canónicas (menores de 23 nt) ofrecen más resultados positivos que aquellos de longitudes no canónicas (resultados apdo. IV tabla 4), refiriéndose principalmente a aquellos de 24 nt por ser la población mayoritaria y de la cual cabría esperar mayor actividad y por lo tanto más resultados positivos debido a su abundancia. Estos resultados parecen indicar que los miRNAs de 24 nt específicos de melón parecen haber evolucionado hacia otro tipo de regulación de la expresión génica, como es el caso de la inhibición de la traducción o la metilación de secuencias reguladoras (Henderson *et al.*, 2006), dado que su gran acumulación y abundancia respecto a otras plantas parece significar que se trata de un mecanismo de adaptación específico.

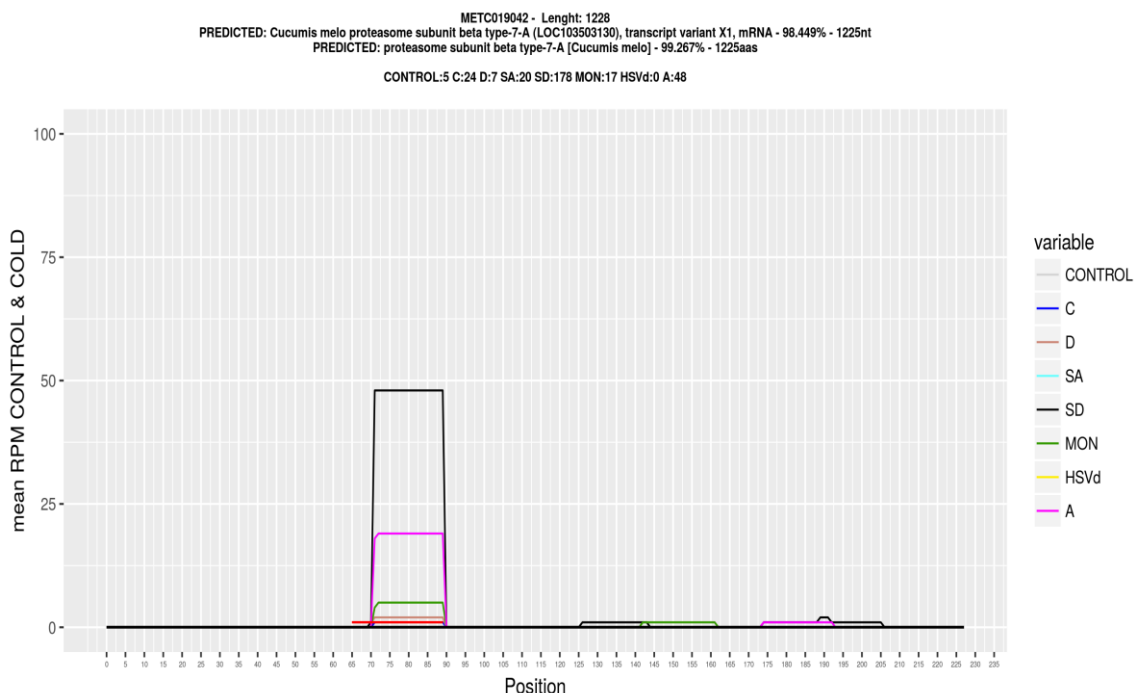


Figura 30. Representación del degradoma de una diana (*Proteasome subunit beta type-7-A*) predicha con una expectativa de 3,5 para el SNCMel000004019 (representado por una línea roja horizontal). En el eje X se representa toda la longitud del transcrito, así como la posición relativa de las secuencias en él. En el eje Y se representa el número de cuentas por millón con el que aparecen dichas secuencias.

De manera paralela al desarrollo de este trabajo en el grupo se llevó a cabo la secuenciación masiva del degradoma de melón. En un análisis preliminar de los resultados

obtenidos se pudo apreciar que, en algunos casos, dianas que los sistemas de predicción descartaban por ser poco probables (expectativa superior a 3) presentan perfiles de abundancia de secuencias que parecen indicar que existe una frecuencia de corte elevada en el sitio de reconocimiento del posible miRNA, aportando una evidencia de actividad funcional para ese miRNA que de otra manera no se habría detectado.

Así, podemos afirmar que los métodos de predicción, en los cuales se basan muchos autores para describir nuevos miRNAs o dianas, no tienen la precisión necesaria para establecer conclusiones fidedignas. En la mayoría de los casos, principalmente si se trata de sRNAs de longitud superior a 21 nt, hacen falta estudios exhaustivos para poder determinar la actividad biológica del pequeño RNA antes de asignarlo como un miRNA auténtico. Por otra parte, la predicción de dianas basada exclusivamente en la homología de la secuencia puede inducir a error al asignar dianas que pueden no ser reales o pueden no tener relevancia biológica, quizás porque no coexistan en el mismo contexto espaciotemporal; y del mismo modo pueden descartarse posibles dianas, que a pesar de que no cumplir los requerimientos establecidos por los programas de predicción, pueden estar biológicamente reguladas por un determinado miRNA.

No obstante, a pesar de las limitaciones que supone buscar nuevos miRNAs (ya que aquellos que aún no han sido descritos se trata con gran frecuencia de que o bien dichos miRNAs o bien sus dianas son poco frecuentes y difíciles de estudiar), hemos sido capaces de identificar 8 pequeños RNAs que acumulan evidencias suficientes como para ser auténticos miRNAs con actividad funcional de corte, entre los cuales hay dos secuencias de 24 nt de longitud. Asimismo, cabe destacar que hemos detectado otros muchos sRNAs de 24 nt que podrían tener actividad biológica diferente de la de corte (inhibición de la traducción, metilación de DNA, etc.), aunque para poder describirlos con precisión se requieren nuevos enfoques y ensayos.

Conclusiones

1.- En el presente trabajo se han identificado empleando diferentes métodos de predicción bioinformática 52 secuencias de sRNAs que, atendiendo a su abundancia y a la estructura de la horquilla generada frente al genoma, podrían ser auténticos miRNAs nuevos de melón; 26 secuencias presentaban unas características estructurales muy semejantes a las de los miRNAs de melón anotados hasta el momento y fueron consideradas las mejores candidatas para posteriores análisis. Entre ellas se observa un enriquecimiento en secuencias de 24 nucleótidos semejante al observado en la distribución poblacional de las librerías de melón secuenciadas por NGS.

2.- Once de estas secuencias fueron amplificadas por *stem loop* RT-PCR, incluyendo algunas de 23 y 24 nucleótidos de longitud, indicando que estas especies existen en las muestras en una proporción detectable y no son fruto de errores en la manipulación informática de los datos.

3.- Se ha adscrito actividad funcional de corte característica de los miRNAs a 9 de las secuencias predichas para actuar como tales, siendo detectado en dos casos el corte canónico esperado según la acción de AGO1 sobre el mensajero diana. Asimismo, se ha observado una correlación negativa muy significativa entre la acumulación de los sRNAs, allí donde son diferenciales, y sus dianas predichas, según cabría esperar de auténticos miRNAs.

4.- En base a estos resultados se han podido identificar 8 pequeños RNAs que acumulan evidencias suficientes para ser anotados como miRNAs nuevos de melón de respuesta a estrés. La mayoría de ellos tienen 21 nucleótidos de longitud y sólo dos de estos nuevos miRNAs son de 24 nucleótidos, presentando todos ellos actividad funcional de corte como cabría esperar de un miRNA canónico.

5.- No se puede descartar que algunos de los sRNAs de 24 nucleótidos descritos en el presente trabajo puedan tener alguna actividad biológica, aunque serían necesarios otros ensayos para determinarlo con exactitud.

6.- Asimismo, los resultados mostrados en este trabajo han puesto de manifiesto que las predicciones bioinformáticas, a pesar de las importantes mejoras acumuladas a lo largo de los años, siguen requiriendo de confirmación experimental, ya que como se ha destacado a lo largo de este manuscrito generan tanto falsos positivos como falsos negativos, por ello deben ser tomadas con cautela y nunca como evidencias de la validez biológica de los datos.

Bibliografía

- Achkar NP, Cambiagno DA, Manavella PA** (2016) miRNA Biogenesis: A Dynamic Pathway. *Trends Plant Sci* **21**: 1034–1044
- Addo-Quaye C, Eshoo TW, Bartel DP, Axtell MJ** (2008) Endogenous siRNA and miRNA Targets Identified by Sequencing of the *Arabidopsis* Degradome. *Curr Biol* **18**: 758–762
- Allen E, Xie Z, Gustafson AM, Carrington JC** (2005) microRNA-directed phasing during trans-acting siRNA biogenesis in plants. *Cell* **121**: 207–221
- Ambros, Victor; Bartel, Bonnie; Bartel, David P.; Burge, Christopher B.; Carrington, James C.; Chen, Xuemei; Dreyfuss, Gideon; Eddy, Sean R.; Griffiths-Jones, Sam; Marshall, Mhairi; Matzke, Marjori; Ruvkun, Gary; Tuschl T** (2004) A uniform system for microRNA annotation. *RNA* **9**: 277–279
- An J, Lai J, Lehman ML, Nelson CC** (2013) MiRDeep*: An integrated application tool for miRNA identification from RNA sequencing data. *Nucleic Acids Res* **41**: 727–737
- An J, Lai J, Sajjanhar A, Lehman ML, Nelson CC** (2014) miRPlant: an integrated tool for identification of plant miRNA from RNA sequencing data. *BMC Bioinformatics* **15**: 275
- Axtell MJ** (2005) Antiquity of MicroRNAs and Their Targets in Land Plants. *PLANT CELL ONLINE* **17**: 1658–1673
- Bahieldin A, Atef A, Edris S, Gadalla NO, Ali HM, Hassan SM, Al-Kordy MA, Ramadan AM, Makki RM, Al-Hajar ASM, et al** (2016) Ethylene responsive transcription factor ERF109 retards PCD and improves salt tolerance in plant. *BMC Plant Biol* **16**: 1–9
- Baker M** (2010) Next-generation sequencing: Adjusting to data overload. *Nat Methods* **7**: 495–499
- Baranauske S, Mickute M, Plotnikova A, Finke A, Venclovas Ceslovas, Klimasauskas S, Vilkaitis G** (2015) Functional mapping of the plant small RNA methyltransferase: HEN1 physically interacts with HYL1 and DICER-LIKE 1 proteins. *Nucleic Acids Res* **43**: 2802–2812
- Bartel DP** (2004) MicroRNAs: Genomics, Biogenesis, Mechanism, and Function. *Cell* **116**: 281–297
- Baxter A, Mittler R, Suzuki N** (2014) ROS as key players in plant stress signalling. *J Exp Bot* **65**: 1229–1240
- Bologna NG, Schapire AL, Palatnik JF** (2013) Processing of plant microRNA precursors. *Brief Funct Genomics* **12**: 37–45
- Borges F, Martienssen RA** (2015) The expanding world of small RNAs in plants. *Nat Rev Mol Cell Biol* **16**: 727–741
- Brodersen P, Sakvarelidze-Achard L, Bruun-Rasmussen M, Dunoyer P, Yamamoto YY, Sieburth L, Voinnet O** (2008) Widespread Translational Inhibition by Plant miRNAs and siRNAs. *Science (80-)* **320**: 1185–1190
- Brodersen P, Voinnet O** (2009) Revisiting the principles of microRNA target recognition and mode of action. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**: 141–148
- Carrera J, Rodrigo G, Jaramillo A, Elena SF** (2009) Reverse-engineering the *Arabidopsis thaliana* transcriptional network under changing environmental conditions. *Genome Biol* **10**: R96
- Cervera H, Ambrós S, Bernet GP, Rodrigo G, Santiago F** (2017) Viral fitness predicts the magnitude and direction of perturbations in the infected host transcriptome. 1–39
- Clepet C, Joobeur T, Zheng Y, Jublot D, Huang M, Truniger V, Boualem A, Hernandez-Gonzalez ME, Dolcet-Sanjuan R, Portnoy V, et al** (2011) Analysis of expressed sequence tags generated from full-length enriched cDNA libraries of melon. *BMC Genomics* **12**: 252
- Cui J, You C, Chen X** (2017) The evolution of microRNAs in plants. *Curr Opin Plant Biol* **35**: 61–67
- Cuperus JT, Fahlgren N, Carrington JC** (2011) Evolution and Functional Diversification of *MIRNA* Genes. *Plant Cell* **23**: 431–442
- Chaloner T, van Kan JAL, Grant-Downton RT** (2016) RNA “Information Warfare” in Pathogenic and Mutualistic Interactions. *Trends Plant Sci* **21**: 738–748
- Chaudhuri K, Chatterjee R** (2007) MicroRNA Detection and Target Prediction: Integration of Computational and Experimental Approaches. *DNA Cell Biol* **26**: 321–337

- Chen C, Ridzon DA, Broomer AJ, Zhou Z, Lee DH, Nguyen JT, Barbisin M, Xu NL, Mahuvakar VR, Andersen MR, et al** (2005) Real-time quantification of microRNAs by stem-loop RT-PCR. *Nucleic Acids Res*. doi: 10.1093/nar/gni178
- Dai X, Zhao PX** (2011) PsRNATarget: A plant small RNA target analysis server. *Nucleic Acids Res* **39**: 155–159
- Dai X, Zhuang Z, Zhao PX** (2011) Computational analysis of miRNA targets in plants: Current status and challenges. *Brief Bioinform* **12**: 115–121
- Dong Z, Han M-H, Fedoroff N** (2008) The RNA-binding proteins HYL1 and SE promote accurate in vitro processing of pri-miRNA by DCL1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **105**: 9970–5
- Friedländer MR, Chen W, Adamidi C, Maaskola J, Einspanier R, Knespel S, Rajewsky N** (2008) Discovering microRNAs from deep sequencing data using miRDeep. *Nat Biotechnol* **26**: 407–415
- Friedländer MR, MacKowiak SD, Li N, Chen W, Rajewsky N** (2012) MiRDeep2 accurately identifies known and hundreds of novel microRNA genes in seven animal clades. *Nucleic Acids Res* **40**: 37–52
- Garcia-Mas J, Benjak A, Sanseverino W, Bourgeois M, Mir G, Gonzalez VM, Henaff E, Camara F, Cozzuto L, Lowy E, et al** (2012) The genome of melon (*Cucumis melo* L.). *Proc Natl Acad Sci* **109**: 11872–11877
- Gollack D, Li C, Mohan H, Probst N** (2014) Tolerance to drought and salt stress in plants: Unraveling the signaling networks. *Front Plant Sci*. doi: 10.3389/fpls.2014.00151
- Gonzalez-Ibeas D, Blanca J, Roig C, González-To M, Picó B, Truniger V, Gómez P, Deleu W, Caño-Delgado A, Arús P, et al** (2007) MELOGEN: an EST database for melon functional genomics. *BMC Genomics* **8**: 306
- González M, Xu M, Esteras C, Roig C, Monforte AJ, Troadec C, Pujol M, Nuez F, Bendahmane A, Garcia-Mas J, et al** (2011) Towards a TILLING platform for functional genomics in Piel de Sapo melons. *BMC Res Notes* **4**: 289
- Goossens A, de La Fuente N, Forment J, Serrano R, Portillo F** (2000) Regulation of yeast H(+)-ATPase by protein kinases belonging to a family dedicated to activation of plasma membrane transporters. *Mol Cell Biol* **20**: 7654–61
- Griffiths-Jones S** (2004) The microRNA Registry. *Nucleic Acids Res* **32**: 109D–111
- Griffiths-Jones S** (2010) MiRBase: MicroRNA sequences and annotation. *Curr Protoc Bioinforma* 1291–12910
- Hausser J, Landthaler M, Jaskiewicz L, Gaidatzis D, Zavolan M** (2009) Relative contribution of sequence and structure features to the mRNA binding of Argonaute/EIF2C-miRNA complexes and the degradation of miRNA targets. *Genome Res* **19**: 2009–2020
- Henderson IR, Zhang X, Lu C, Johnson L, Meyers BC, Green PJ, Jacobsen SE** (2006) Dissecting *Arabidopsis thaliana* DICER function in small RNA processing, gene silencing and DNA methylation patterning. *Nat Genet* **38**: 721–725
- Herranz MC, Navarro JA, Sommen E, Pallas V** (2015) Comparative analysis among the small RNA populations of source, sink and conductive tissues in two different plant-virus pathosystems. *BMC Genomics* **16**: 117
- Jagadeeswaran G, Nimmakayala P, Zheng Y, Gowdu K, Reddy UK, Sunkar R** (2012) Characterization of the small RNA component of leaves and fruits from four different cucurbit species. *BMC Genomics* **13**: 329
- Kang W, Friedländer MR** (2015) Computational Prediction of miRNA Genes from Small RNA Sequencing Data. *Front Bioeng Biotechnol*. doi: 10.3389/fbioe.2015.00007
- Kertesz M, Iovino N, Unnerstall U, Gaul U, Segal E** (2007) The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nat Genet* **39**: 1278–1284
- Kumar R** (2014) Role of microRNAs in biotic and abiotic stress responses in crop plants. *Appl Biochem Biotechnol* **174**: 93–115
- Lee RC, Feinbaum RL, Ambros V** (1993) The *C. elegans* heterochronic gene lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell* **75**: 843–854
- Lee SH, Li CW, Koh KW, Chuang HY, Chen YR, Lin CS, Chan MT** (2014) MSRB7 reverses oxidation of GSTF2/3 to confer tolerance of *Arabidopsis thaliana* to oxidative stress. *J Exp Bot* **65**: 5049–5062
- Li L, Xu J, Yang D, Tan X, Wang H** (2010) Computational approaches for microRNA studies: A review. *Mamm*

Genome **21**: 1–12

- Li X, Zhang YZ** (2005) Computational detection of microRNAs targeting transcription factor genes in *Arabidopsis thaliana*. *Comput Biol Chem* **29**: 360–367
- Li Y, Zhang Z, Liu F, Vongsangnak W, Jing Q, Shen B** (2012) Performance comparison and evaluation of software tools for microRNA deep-sequencing data analysis. *Nucleic Acids Res* **40**: 4298–4305
- Lim LP, Lim LP, Lau NC, Lau NC, Weinstein EG, Weinstein EG, Abdelhakim A, Abdelhakim A, Yekta S, Yekta S, et al** (2003) The microRNAs of *Caenorhabditis elegans*. *Genes Dev* 991–1008
- Livak KJ, Schmittgen TD** (2001) Analysis of Relative Gene Expression Data Using Real-Time Quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C_T}$ Method. *Gene Expr* **408**: 402–408
- Love MI, Huber W, Anders S** (2014) Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**: 550
- Llave C, Franco-Zorrilla JM, Solano R, Barajas D** (2011) Target validation of plant microRNAs. *Methods Mol Biol* **732**: 187–208
- Marin RM, Vaniceek J** (2011) Efficient use of accessibility in microRNA target prediction. *Nucleic Acids Res* **39**: 19–29
- Martens-Uzunova ES, Jalava SE, Dits NF, Van Leenders GJLH, Møller S, Trapman J, Bangma CH, Litman T, Visakorpi T, Jenster G** (2012) Diagnostic and prognostic signatures from the small non-coding RNA transcriptome in prostate cancer. *Oncogene* **31**: 978–991
- Martin M** (2011) Cutadapt removes adapter sequences from high-throughput sequencing reads. *EMBnet.journal* **17**: 10
- Mishra AK, Duraisamy GS, Matoušek J** (2015) Discovering MicroRNAs and Their Targets in Plants. *CRC Crit Rev Plant Sci* **34**: 553–571
- Mohorianu I, Stocks MB, Wood J, Dalmay T, Moulton V** (2013) CoLide: a bioinformatics tool for CO-expression-based small RNA Loci Identification using high-throughput sequencing data. *RNA Biol* **10**: 1221–1230
- Moxon S, Jing R, Szittyá G, Schwach F, Rusholme Pilcher RL, Moulton V, Dalmay T** (2008a) Deep sequencing of tomato short RNAs identifies microRNAs targeting genes involved in fruit ripening. *Genome Res* **18**: 1602–1609
- Moxon S, Schwach F, Dalmay T, MacLean D, Studholme DJ, Moulton V** (2008b) A toolkit for analysing large-scale plant small RNA datasets. *Bioinformatics* **24**: 2252–2253
- Mückstein U, Tafer H, Hackermüller J, Bernhart SH, Stadler PF, Hofacker IL** (2006) Thermodynamics of RNA-RNA binding. *Bioinformatics* **22**: 1177–1182
- Niu D, Wang Z, Wang S, Qiao L, Zhao H** (2015) Profiling of small RNAs involved in plant-pathogen interactions. *Plant Gene Silenc. Methods Protoc.* pp 61–79
- Núñez-Palenius HG, Gomez-Lim M, Ochoa-Alejo N, Grumet R, Lester G, Cantliffe DJ** (2008) Melon fruits: Genetic diversity, physiology, and biotechnology features. *Crit Rev Biotechnol* **28**: 13–55
- Paicu C, Mohorianu I, Stocks M, Xu P, Coince A, Billmeier M, Dalmay T, Moulton V, Moxon S** (2017) miRCat2: accurate prediction of plant and animal microRNAs from next-generation sequencing datasets. *Bioinformatics* **33**: 2446–2454
- Reinhart BJ, Weinstein EG, Rhoades MW, Bartel B, Bartel DP** (2002) MicroRNAs in plants. *Genes Dev* **16**: 1616–1626
- Reis RS, Eamens AL, Waterhouse PM** (2015) Missing Pieces in the Puzzle of Plant MicroRNAs. *Trends Plant Sci* **20**: 721–728
- Ren G, Yu B** (2012) Critical roles of RNA-binding proteins in miRNA biogenesis in *Arabidopsis*. *RNA Biol* **9**: 1424–1428
- Robinson MD, McCarthy DJ, Smyth GK** (2010) edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **26**: 139–40
- Robinson MD, Oshlack A** (2010) A scaling normalization method for differential expression analysis of RNA-seq data. *Genome Biol* **11**: R25

- Roig C, Fita A, Ríos G, Hammond JP, Nuez F, Picó B** (2012) Root transcriptional responses of two melon genotypes with contrasting resistance to *Monosporascus cannonballus* (Pollack et Uecker) infection. *BMC Genomics* **13**: 601
- Saladié M, Cañizares J, Phillips MA, Rodriguez-Concepcion M, Larrigaudière C, Gibon Y, Stitt M, Lunn JE, Garcia-Mas J** (2015) Comparative transcriptional profiling analysis of developing melon (*Cucumis melo* L.) fruit from climacteric and non-climacteric varieties. *BMC Genomics* **16**: 440
- 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. *Mol Plant Microbe Interact* **25**: 839–48
- Shi H, Ye T, Zhong B, Liu X, Chan Z** (2014) Comparative proteomic and metabolomic analyses reveal mechanisms of improved cold stress tolerance in bermudagrass (*Cynodon dactylon* (L.) Pers.) by exogenous calcium. *J Integr Plant Biol* **56**: 1064–1079
- Shriram V, Kumar V, Devarumath RM, Khare TS, Wani SH** (2016) MicroRNAs As Potential Targets for Abiotic Stress Tolerance in Plants. *Front Plant Sci* **7**: 1–18
- Stocks MB, Moxon S, Mapleson D, Woolfenden HC, Mohorianu I, Folkes L, Schwach F, Dalmay T, Moulton V** (2012) The UEA sRNA workbench: A suite of tools for analysing and visualizing next generation sequencing microRNA and small RNA datasets. *Bioinformatics* **28**: 2059–2061
- Sunkar R** (2010) MicroRNAs with macro-effects on plant stress responses. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 805–811
- Sunkar R, Chinnusamy V, Zhu J, Zhu JK** (2007) Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci* **12**: 301–309
- Tarazona S, Furió-Tarí P, Turrà D, Di Pietro A, Nueda MJ, Ferrer A, Conesa A** (2015) Data quality aware analysis of differential expression in RNA-seq with NOISeq R/Bioc package. *Nucleic Acids Res.* doi: 10.1093/nar/gkv711
- Tucker T, Marra M, Friedman JM** (2009) Massively Parallel Sequencing: The Next Big Thing in Genetic Medicine. *Am J Hum Genet* **85**: 142–154
- Wei S, Wang L, Zhang Y, Huang D** (2013) Identification of early response genes to salt stress in roots of melon (*Cucumis melo* L.) seedlings. *Mol Biol Rep* **40**: 2915–2926
- Williamson V, Kim A, Xie B, Omari McMichael G, Gao Y, Vladimirov V** (2013) Detecting miRNAs in deep-sequencing data: A software performance comparison and evaluation. *Brief Bioinform* **14**: 36–45
- Xie F, Wang Q, Zhang B** (2015) Global microRNA modification in cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Plant Biotechnol J* **13**: 492–500
- Xie Z, Khanna K, Ruan S** (2010) Expression of microRNAs and its regulation in plants. *Semin Cell Dev Biol* **21**: 790–797
- Zhang B** (2015) MicroRNA: A new target for improving plant tolerance to abiotic stress. *J Exp Bot* **66**: 1749–1761
- Zhang S, Liu Y, Yu B** (2015) New insights into pri-miRNA processing and accumulation in plants. *Wiley Interdiscip Rev RNA* **6**: 533–545
- Zhang T, Zhao YL, Zhao JH, Wang S, Jin Y, Chen ZQ, Fang YY, Hua CL, Ding SW, Guo HS** (2016) Cotton plants export microRNAs to inhibit virulence gene expression in a fungal pathogen. *Nat Plants.* doi: 10.1038/nplants.2016.153
- Zhou B, Zhang L, Ullah A, Jin X, Yang X, Zhang X** (2016) Identification of multiple stress responsive genes by sequencing a normalized cDNA library from sea-land cotton (*Gossypium barbadense* L.). *PLoS One* **11**: 1–22
- Zhou GA, Chang RZ, Qiu LJ** (2010) Overexpression of soybean ubiquitin-conjugating enzyme gene GmUBC2 confers enhanced drought and salt tolerance through modulating abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol* **72**: 357–367
- Zhu J-K** (2016) Abiotic Stress Signaling and Responses in Plants. *Cell* **167**: 313–324

Webs:

<http://www.freshplaza.com/article/171429/OVERVIEW-GLOBAL-MELON-AND-WATERMELON-MARKET>

<http://www.europapress.es/murcia/noticia-campana-melon-sandia-cierra-perdidas-sequia-calor-excesivo-20140817102948.html>

<http://asamblea2017.proexport.es/agro-cifras/melon/>

<http://valenciafruits.com/mas-sandia-menos-melon-bajos-precios/>

Anexos

I. Anexo introducción

A. Material vegetal

Se germinaron semillas de melón cv. *Piel de Sapo* en placas Petri en condiciones de oscuridad (durante 48h) a 37 °C seguido de un periodo de 24h a 25 °C (16/8 h de luz/oscuridad respectivamente). Las plántulas de melón fueron entonces transferidas a macetas y mantenidas durante 10 días bajo condiciones controladas (16h de luz a una temperatura de 28 °C, y 8h de oscuridad a 20 °C) en una cámara de cultivo. De dichas plantas únicamente aquellas que presentaban un desarrollo sincrónico y homogéneo fueron seleccionadas para los tratamientos de estrés. Al 11er día de cultivo las plantas seleccionadas fueron sometidas a los tratamientos de estrés. Frío (C): las plantas fueron mantenidas a 20°C/ 16 h de luz y a 14 °C/ 8 h de oscuridad, además fueron regadas con 50 mL de solución Hodglan. Sequía (D): las plantas fueron regadas con 50 mL de solución Hodglan y posteriormente privadas de irrigación. Día corto (SD): las plantas se regaron con 50 mL de solución Hodglan y se mantuvieron con 8 h de luz a 28 °C y 16 h de oscuridad a 20 °C. Salinidad (SA): se regaron las plantas con 50 mL de una solución 200 mM de LiCl, se empleó esta sal en vez de NaCl con el fin de reducir el efecto osmótico (Goossens *et al.*, 2000). Ascomiceto (MON): las plantas fueron regadas con 50 mL de solución Hodglan conteniendo 1000 UFC de micelio de *Monosporascus cannonballus* crecido en PDA (*potato dextrose agar*) (Roig *et al.*, 2012). *Hop Stunt Viroid* (HSVd): se inocularon las plantas en ambos cotiledones con el RNA viroidal, además se regaron las plantas con 50mL de solución Hodglan. *Agrobacterium tumefaciens* (AGRO): plantas regadas con 50 mL de solución Hodglan fueron agroinfiltradas en ambos cotiledones a una DO de 0,8.

B. Extracción de RNA

El RNA total se extrajo de mezclas de hojas (0,1 g) tanto de los tratamientos como del control empleando para ello el reactivo TRI (SIGMA) de acuerdo con las instrucciones del fabricante. Posteriormente se enriqueció la muestra en la fracción de RNA de menor peso molecular (es decir inferior a 200 nt) empleando el TOTAL-miRNA (*miRNA isolation kit, REAL*) siguiendo las instrucciones del fabricante.

Tanto la construcción como la secuenciación de las librerías fueron realizadas por SISTEMAS GENÓMICOS. Las librerías de cDNA se construyeron en base a las recomendaciones de ILLUMINA. Se añadieron adaptadores al RNA ligados tanto en 5' como en 3' con el propósito de permitir la transcripción reversa de dicho RNA y su paso a cDNA. Los cDNAs resultantes fueron enriquecidos por PCR para así generar una librería de cDNAs de cadena doble indexados. La selección de tamaño se realizó mediante un gel de poliacrilamida al 6 %. La cuantificación de las librerías fue realizada mediante PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR) en un LightCycler 480 (ROCHE). Previamente a la generación de los clusters por Cbot (ILLUMINA) se realizó una mezcla equimolar de dichas librerías.

Una vez obtenida la mezcla de las librerías de cDNA (provenientes de sRNAs de hojas de melón control y de los 7 tratamientos) esta fue secuenciada mediante secuenciación de

extremos pareados (*pair-ends*) (100x1) en un HiSeq 2000 (ILLUMINA). Tanto las secuencias de los adaptadores empleados en los pasos de obtención del cDNA como las lecturas de baja calidad obtenidas tras el proceso de secuenciación fueron eliminados empleando la herramienta Cutadapt (v. 1.10) en Python (Martin, 2011). Secuencias menores de 20 o mayores de 25 nucleótidos de longitud fueron filtradas y eliminadas recuperando un total de 88.710.455 lecturas limpias de las plantas control y estresadas (P1).

La correlación entre los perfiles de expresión de los sRNAs (considerando los diferentes tratamientos y sus réplicas biológicas) fueron estimados mediante un análisis de componente principal (PCA). Se realizó el PCA con la función "*prcomp*" en los "*stats*" del paquete de R v.3.3.1. El *plot* mostró que el PCA era capaz de separar y agrupar las réplicas biológicas para una misma condición permitiendo distinguirlas claramente de otros tratamientos, aportando robustez a la reproducibilidad de los ensayos realizados (Sanz *et al.*, 2018, datos sin publicar).

II. Anexo materiales y métodos

Tabla S1. Cebador reverso universal (SL_UNIV_R) para la amplificación por PCR del *stem loop*. Secuencias consenso de los 26 posibles miRNAs analizados junto a los cebadores *stem loop* específicos de cada uno (apdo. 1.1.2 MyM), y el cebador directo empleado para su amplificación por PCR junto al cebador reverso universal. Aquellos cuyo identificar se encuentra resaltado en verde son aquellos que han podido ser identificados mediante la técnica del *stem loop* RT-PCR.

SL_UNIV_R(b) GTGCAGGGTCCGAGGTattc

Identificador	Familia miRNA	Sec. Consenso	
SNCMeI000020264	399	RT-mir399 mir399-F	TGCCAAAAGAGACTTGCCCTG GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACcagggc gccgcTGCCAAAAGAGACTT
SNCMeI000032737	164	RT-mir164 mir164-F	CATGTGCTCTTCTTCTCCAAC GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACgttgga gccgcCATGTGCTCTTCTTC
SNCMeI000049332	6288C	RT-mir6288C mir6288C-F	TTCTCGATCTGTTATTTCTGCT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACcagcaga gccgcTTCTCGATCTTGTATTT
SNCMeI000034342	158B	RT-mir158B mir158B-F	TTCTATTGTCTTCATTTGTGA GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACtcacaa gccgcTTCTATTGTCTTCAT
SNCMeI000042761	6138	RT-mir6138n mir6138n-F	TTTGTTTGGATTGAAGAAATT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACaatttc gccgcTTTGTTTGGATTGAA
SNCMeI000066180	834	RT-mir834n mir834n-F	TGGACCACCAATTCTGATACC GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACggtatc gccgaTGGACCACCAATTCT
SNCMeI000108829	5544	RT-mir5544n mir5544n-F	CTCTTCTGCGTGTCTAAATC GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACgattta ccatgcCTCTTCTGCGTGTTC
SNCMeI000015111	158	RT-mir158n mir158n-F	TCTATTGTCTTCATTTGTGAT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACcatcaca cgccgcgTCTATTGTCTTCAT
SNCMeI000018562	4411	RT-mir4411n mir4411n-F	AAAAGACAAACTATTGACAAAAAT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACattttt cgccgcgAAAAGACAAACTATTGAC
SNCMeI000032193	6112	RT-mir6112n mir6112n-F	AATAGTATCTGTTTGAAGTGAAC GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACgttaca ggccgcgAATAGTATCTGTTTGAAG
SNCMeI000051551	5537	RT-mir5537n mir5537n-F	ACAAATGATCTATACAACCTCTAT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACatagag ggccgcgACAAATGATCTATACAAC
SNCMeI000019875	5789	RT-mir5789n mir5789n-F	AGTCAATTGCAACATAGCTCAGTG GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACcactga gcccgAGTCAATTGCAACATAGC
SNCMeI000037367	7129	RT-mir7129nA mir7129n-F	AAACGATCGTGTAGGTAATCTAA GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACttagat cggcAAACGATCGTGTAGGTAA
SNCMeI000014163	NA	RT-mirNAn mirNA-F	AATCTATCGCGATAGGCTTCTAT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCGACCAGAGCCAACatagaa ggcAATCTATCGCGATAGGC

SNCMeI000018078	1861	Sec. Consenso RT-mir1861n mir1861n-F	ACGATCGTGTAGCTAAATCTAAAT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACatttag tccggACGATCGTGTAGCTAAAT
SNCMeI000032956	9473	Sec. Consenso RT-mir9473n mir9473n-F	ACGATCGTGTAGGTAATCTAAAC GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACgtttag cgtaACGATCGTGTAGGTAAT
SNCMeI000045463	1048	Sec. Consenso RT-mir1048n mir1048n-F	ATGGATACTCATATTCTTGACGGT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACaccgctc tgccgcATGGATACTCATATTCTT
SNCMeI000077356	2923	Sec. Consenso RT-mir2923n mir2923n-F	ATGGATACTTATATTCTTGACGGT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACaccgctc tggcgccATGGATACTTATATTCTT
SNCMeI000005508	7504	Sec. Consenso RT-mir7504n mir7504n-F	ATGGTCTCTCAGTAATAAACTTGT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACacaagt tgccgcATGGTCTCTCAGTAATAA
SNCMeI000093128	7772	Sec. Consenso RT-mir7772n mir7772n-F	TTTACGGTCCGTGTAACAAAGCAC GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACgtgctt gtcgTTTACGGTCCGTGTAACA
SNCMeI000031046	7129B	Sec. Consenso RT-mir7129bn mir7129bn-F	ATACGATCGTTTAGATTAGCTAC GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACgtagct cggcgATACGATCGTTTAGATTT
SNCMeI000004019	miR5227	Sec. Consenso RT-mir4019 mir4019-F	TGAAATGAGGAACATTGATGATT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACaatcat gccgccTGAAATGAGGAACATTG
SNCMeI000004698	6476a/novel	Sec. Consenso RT-mir4698 mir4698-F	TGCAGATCAGTAGAGATGAAACATT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACaatggt gcccTGCAGATCAGTAGAGATGA
SNCMeI000011573	novel	Sec. Consenso RT-mir11573 mir11573-F	GATCCTGTTGAGTTCTTACGCT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACagcgta gccGATCCTGTTGAGTTCT
SNCMeI000015070	394a- 3p/miR2112	Sec. Consenso RT-mir15070 mir15070-F	AGCAAATGTTGGTCTATCATTGAT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACatcaat gccaccgAGCAAATGTTGGTCTATC
SNCMeI000148412	8051/novel	Sec. Consenso RT-mir148412 mir148412-F	CGATAGTATGGTAGAAAGAAAT GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCACCAGAGCCAAACattca ggccaggCGATAGTATGGTAGAA

III. Anexo resultados

1.1 Algoritmo de miRCat2

UEA sRNA Tools v4.0, versión java por comando

```
java -Xms1g -Xmx13g -jar ~/app/srna-workbenchV4.0Alpha/Workbench.jar --tool mircat \  
-srna_file fichero-secuencias.fasta \  
-genome CM3.5.1_pseudomol.fa \  
-output_directory directorio/salida/estres \  
-params params.cfg
```

```
##### params.cfg
```

```
#extend=100.0  
#min_energy=-15.0  
#min_paired=17  
#max_gaps=3  
#max_genome_hits=16  
#min_length=20  
#max_length=24  
#min_gc=20  
#max_unpaired=60  
#max_overlap_percentage=80  
#min_locus_size=1  
#orientation=80  
#min_hairpin_len=75  
#complex_loops=true  
#pval=0.1  
#min_abundance=2  
#cluster_sentinel=200  
#Thread_Count=18
```

1.2 52 posibles miRNAs nuevos de melón predichos

Tabla S2. 52 sRNAs predichos como posibles nuevos miRNAs de melón por el miRDeep* y el miRCat2, acompañados de su longitud, y la longitud y porcentaje de homología que presentan con familias de miRNAs ya descritos dentro de *Viridiplantae*.

Identificador	Secuencia consenso	Long.	Origen	% Homo.	Long. Homo.	Familia de miRNA
SNCMel000004019	TGAAATGAGGAACATTGATGATT	23	miRDeep*	69	21	miR5227
SNCMel000004698	TGCAGATCAGTAGAGATGAAACATT	25	miRDeep*	81	18	6476a/novel
SNCMel000011572	ATCCTGTTGAGTTCTTACGCT	21	miRDeep*			novel
SNCMel000011573	GATCCTGTTGAGTTCTTACGCT	22	miRDeep*			novel
SNCMel000012253	GGAAGTCCTCGTGTTCACCCCT	23	miRDeep*			novel
SNCMel000012418	CGCGAGAAGTCCACTGAACCT	21	miRDeep*			novel
SNCMel000015070	AGCAAATGTTGGTCTATCATTGAT	24	miRDeep*	62	16	394a-3p/miR2112
SNCMel000015154	TTTGCTACATGGTCTATCGGTGAT	24	miRDeep*			novel
SNCMel000015557	TTTGCTACATGGTCTATCGATGAT	24	miRDeep*			novel
SNCMel000020264	TGCCAAAAGAGACTTGCCCTG	21	miRDeep*	87	21	399/novel
SNCMel000023068	CAATTTTGCTCGGGATGAACCG	22	miRDeep*			novel/miR5174
SNCMel000023455	ACGATCTTGTACCAAATCTAAACG	24	miRDeep*	64	20	1882e/novel
SNCMel000035619	GAACCTATTAGATACCACAGA	21	miRDeep*			novel
SNCMel000042761	TTTGTTTGATTGAAGAAATT	21	miRDeep*	76	17	miR1535/6138
SNCMel000054360	ATTTGGGACGTAGACTATTATAAT	24	miRDeep*	69	21	3981/miR4241
SNCMel000055510	AGAGTTGGGTTGAGTTGGTAAAAT	24	miRDeep*	76	17	5653/miR2275
SNCMel000127239	TGACTATCGTTGTCTATCACTGAT	24	miRDeep*			novel
SNCMel000135036	TTTGACCAACAAATTCATTG	21	miRDeep*			novel/miR1520
SNCMel000145306	AGATAGTATGGTAGAAGGATT	21	miRDeep*	81	18	8051/novel
SNCMel000146265	ATCGATGATAGACACTGATATGCT	24	miRDeep*			novel/miR9478
SNCMel000148412	CGATAGTATGGTAGAAAAGAAAT	22	miRDeep*	80	16	8051novel
SNCMel000169705	ACAGATATGGTATAGGGGTGC	21	miRDeep*			novel
SNCMel000005508	ATGGTCTCTCAGTAATAAACTTGT	24	miRCat2	92,31	13	7504
SNCMel000012519	AGACACTGATAGACTTTTATTACT	24	miRCat2	86,67	15	9561
SNCMel000014163	AATCTATCGGCGATAGGCTTCTAT	24	miRCat2			novel
SNCMel000015111	TCTATTGTCTTCATTTGTGAT	21	miRCat2	87,5	16	158
SNCMel000015605	AAAATGTCACTGTCTATTAATGAT	24	miRCat2	76,19	21	4387
SNCMel000018078	ACGATCGGTAGCTAAATCTAAAT	24	miRCat2	76,19	21	1861
SNCMel000018562	AAAAGACAAACTATTGACAAAAT	24	miRCat2	78,95	19	4411
SNCMel000019875	AGTCAATTCGAACATAGCTCAGTG	24	miRCat2	86,67	15	5789
SNCMel000026523	TGATTGAGCCGTGCCAATATC	21	miRCat2	100	21	171
SNCMel000030148	TCCGACCAGGCTTCATTCGCC	21	miRCat2	100	21	166
SNCMel000031046	ATACGATCGTTTAGATTTAGCTAC	24	miRCat2	86,36	22	7129
SNCMel000032193	AATAGTATCTGTTGAAGTGTAAC	24	miRCat2	92,31	13	6112
SNCMel000032737	CATGTGCTCTTCTTCTCCAAC	21	miRCat2	90,48	21	164
SNCMel000032956	ACGATCGGTAGGTAAATCTAAAC	24	miRCat2	100	12	9473
SNCMel000034342	TTCTATTGTCTTCATTTGTGA	21	miRCat2	87,5	16	158
SNCMel000037367	AAACGATCGGTAGGTAAATCTAA	24	miRCat2	100	13	7129
SNCMel000040586	TCTCGATCTTGTCAATTTCTGCTT	24	miRCat2	100	12	6288
SNCMel000045463	ATGGATACTCATATTTCTTGACGGT	24	miRCat2	81,25	16	1048
SNCMel000049332	TTCTCGATCTTGTATTTCTGCT	24	miRCat2	100	13	6288
SNCMel000051551	ACAAATGATCTATACAACCTCTAT	24	miRCat2	84,21	19	5537
SNCMel000060712	ACGATAGAACTCTATFACTGATAG	24	miRCat2	85,71	14	8686
SNCMel000066180	TGGACCACCAATTCTGATACC	21	miRCat2	77,78	18	834
SNCMel000077356	ATGGATACTTATATTTCTTGACGGT	24	miRCat2	75	20	2923
SNCMel000093128	TTTACGGTCCGTGTAACAAAGCAC	24	miRCat2	86,67	15	7772
SNCMel000107957	ACGATAGAACTCTATCACCGATAG	24	miRCat2	77,78	18	6159
SNCMel000108829	CTCTTCTGCGTGTCTAAATC	21	miRCat2	86,67	15	5544
SNCMel000114948	ACGATCGTTTAACTTTGATAGA	22	miRCat2	88,89	18	7129
SNCMel000122837	TATTTACGGTCTGTATAACAAAAT	24	miRCat2	82,35	17	7737
SNCMel000164624	AGGGATAAGATCGAGTGAATAGCT	24	miRCat2	77,78	18	169
SNCMel000167577	GGGCGGATCTTTTTTGGCAGG	21	miRCat2	80,95	21	399

1.3 qRT-PCR

Tabla S3. Dianas analizadas y los valores obtenidos para las mismas mediante el método comparativo de $\Delta\Delta Ct$ y normalizado frente a la media geométrica de expresión; y sus sRNAs correspondientes junto a sus valores de log2FC en aquellos estreses en los cuales se encontraban diferencialmente acumulados. En el caso de las dianas los valores mayores que uno indican expresión mayor que en el control, mientras que aquellos menores de uno indican una menor expresión; en el caso de los sRNAs los valores mayores que 0 indican mayor acumulación respecto al control, y los menores que 0 acumulación inferior.

Identificador	Diana	Estrés	Identificador	Diana	Estrés
SNCMeI000004019	FAR1		SNCMeI000148412	PHO1	
-4,41	2,578	C T4	1,88	0,831	C T1
-4,50	3,489	HSVd	1,82	0,271	MON
SNCMeI000004698	NADH		SNCMeI000051551	ATP23	
-1,90	1,807	C T4	1,49	2,527	C T4
-2,66	2,286	HSVd			
SNCMeI000011573	GTE8		SNCMeI000019875	MT	
-2,79	3,107	AGRO	1,04	0,651	AGRO
-2,59	3,125	HSVd			
SNCMeI000015070	bHLH		SNCMeI000015111	DNAJ	
-2,60	2,195	C T4	1,79	0,741	MON
-2,52	2,594	HSVd			
SNCMeI000020264	E2 (1 ^{er} corte)		SNCMeI000032737	EPIMERASA	
-3,97	6,821	C T4	-2,37	1,793	HSVd
	E2 (2 ^o corte)		-1,22	1,135	D T4
-3,97	12,700	C T4			