

## INDICE

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

<b>5.2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>64</b>
<b>5.3</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>65</b>
5.3.1	Material vegetal, condiciones de crecimiento y tratamientos de estrés. ....	65
5.3.2	Extracción de RNA y purificación de sRNA.....	65
5.3.3	Secuenciación de sRNA .....	65
5.3.4	Análisis bioinformático de la expresión de los miRNAs.....	66
5.3.5	Ensayos qRT-PCR.....	66
<b>5.4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>68</b>
5.4.1	Análisis de la población de RNAs.....	68
5.4.2	Los miRNAs están generalmente regulados negativamente en respuesta a estrés por frío. 71	
5.4.3	Los miRNA y su función biológica mediada por la regulación de sus genes dianas. .73	
<b>5.5</b>	<b>Discusión del capítulo 2.....</b>	<b>80</b>
<b>6</b>	<b>Capitulo 3.- El procesamiento alternativo de su precursor regula la acumulación de miR319 en plantas de melón expuestas al frío. ....</b>	<b>82</b>
<b>6.1</b>	<b>Introducción .....</b>	<b>82</b>
<b>6.2</b>	<b>Objetivos.....</b>	<b>84</b>
<b>6.3</b>	<b>Materiales y métodos.....</b>	<b>85</b>
6.3.1	Análisis bioinformático de la expresión de miR319 .....	85
6.3.2	Alineación de sRNAs.....	85
6.3.3	Ensayos de PCR cuantitativa en tiempo real (qRT-PCR).....	85
6.3.4	5'-RLM-RACE.....	86
<b>6.4</b>	<b>Resultados.....</b>	<b>87</b>
6.4.1	La expresión de todos los miembros de la familia miR319 se alteran significativamente en respuesta a frío.....	87
6.4.2	Un miRNA alternativo es procesado diferencialmente a partir del precursor pri-miR319c en plantas de melón expuestas a frío.....	89
6.4.3	La acumulación diferencial de #miR319c esta inversamente relacionada con los niveles de expresión de miR319c maduro. ....	92
6.4.4	El miRNA alternativo (#miR319c) no posee actividad biológica convencional demostrable.....	94
6.4.5	La escisión parcial y el procesamiento alterado de su precursor modulan la acumulación de miR319c en plantas de melón expuestas a frío. ....	96
6.4.6	La disminución de miR319c inducida por frío se correlaciona con una mayor acumulación de miembros bien establecidos de la vía de señalización de baja temperatura. ....	99
<b>6.5</b>	<b>Discusión del capítulo 3 .....</b>	<b>104</b>
<b>7</b>	<b>DISCUSIÓN .....</b>	<b>109</b>
<b>8</b>	<b>CONCLUSIONES .....</b>	<b>114</b>
<b>9</b>	<b>BIBLIOGRAFÍA.....</b>	<b>116</b>