

## LA RUTA DE miR394 REGULA EL TIEMPO DE FLORACIÓN DE *ARABIDOPSIS THALIANA*.

**Bernardi, Yanel**

Laboratorio de Biología Evolutiva y Molecular de Plantas (BEMP, FCA-UNL)

Director/a: Dotto, Marcela

Codirector/a: Apellido y Nombre

Área: Ciencias Biológicas

### INTRODUCCIÓN

El microARN miR394 regula a nivel post-transcripcional la acumulación del transcripto que codifica para la proteína LCR de la familia F-BOX (Jones-Rhoades y col., 2004), las cuales forman parte de complejos SCF que agregan residuos de ubiquitina a una proteína blanco, para que sea degradada por el proteosoma. En la actualidad existe evidencia de que la ruta regulada por miR394 participa en la regulación de la morfología de las hojas (Song y col., 2012), el desarrollo del meristema apical del tallo (Knauer y col., 2013) y en la respuesta a algunos tipos de estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana* (Song y col., 2013).

En el laboratorio se generaron plantas mutantes dobles en los genes que codifican para los precursores de miR394 (*mir394a/mir394b*) y se observó que presentan una floración temprana, siendo este un aspecto desconocido de la regulación génica mediada por este miARN. En el presente trabajo aportamos las primeras evidencias de la participación de miR394 en la regulación del tiempo de floración de *Arabidopsis thaliana*, constituyendo un aspecto novedoso en el control mediado por miARNs de este proceso.

### OBJETIVOS

- 1- Caracterizar las mutaciones en las plantas *mir394a/mir394b* a través del análisis de la expresión de los genes *MIR394A* y *MIR394B*.
- 2- Caracterizar fenotípicamente el tiempo de floración de plantas *mir394a/mir394b*,
- 3- Analizar la expresión de genes clásicos de floración *FCL*, *FT*, *SOC1*, *LFY* en *mir394a/mir394b*.
- 4- Caracterizar la expresión de *LCR* en las inflorescencias, usando una línea reportera para este gen.

Título del proyecto: Resistencia a sequía mediada por microARNs en plantas de maíz

Instrumento: PICT 2015-0198

Año convocatoria: 2015

Organismo financiador: ANPCyT-FONCyT

Director/a: **Dra. Marcela Dotto**

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* salvajes y mutantes dobles *mir394a/mir394b* de ecotipo Columbia-0 (Col-0). La línea *mir394a/mir394b* fue obtenida por cruzamiento entre una línea mutante insercional de la colección GABI kat (Universidad de Bielefeld, Alemania) para *MIR394A* y otra de la colección Gene Trap (CSHL, NY, USA) para *MIR394B*. Se realizó inicialmente una introgresión en Col-0 para esta última línea a través

de 3 retrocruzas con plantas salvajes Col-0, luego se hicieron cruzamientos con la línea mutante *mir394a* y posterior autofecundación hasta obtener líneas mutantes dobles homocigotas para ambas inserciones.

Semillas de los distintos genotipos en estudio fueron sembradas en tierra y luego de estratificar a 4°C durante 5 días, fueron transferidas a cámaras de crecimiento, en condiciones de día largo (16 h luz/8 h oscuridad) o de día corto (8 h luz/16 h oscuridad) a temperatura controlada entre 21 y 24 °C.

La determinación del tiempo de floración se realizó contando el número de hojas de roseta al momento de floración y el número de días hasta floración.

Para los análisis de expresión génica se realizó la extracción de ARN total a partir de tejido aéreo de plantas a los 14 y a los 21 días de crecimiento, a partir de 100 mg de tejido de 3 individuos de cada genotipo, usando el reactivo Trizol de acuerdo a las indicaciones del fabricante. Luego de realizar tratamiento con ADNasa I (Promega), se preparó ADNc a partir de 3 µg de ARN total usando la retrotranscriptasa ImProm II (Promega) y oligo(dT). Luego de evaluar la zona de linealidad de las reacciones de PCR para cada gen de interés y para el gen de referencia, se realizaron reacciones de RT-PCR semicuantitativa para comparar la expresión de los genes en estudio en las muestras de interés.

Se analizó la expresión del gen *LCR* durante el desarrollo de las inflorescencias y en los órganos florales a través de ensayos de tinción histoquímica de GUS, utilizando la línea reportera *GT-lcr* de la colección Gene Trap, de ecotipo Landsberg erecta (Ler). Se incubaron las inflorescencias en acetona fría y se prefijaron durante 20 m, luego de lavar con solución de tinción conteniendo X-gluc, se infiltró con vacío e incubó a 37 °C durante 3 días. Posteriormente se llevó a cabo la deshidratación con series crecientes de etanol (25%, 35% y 50% v/v), luego con solución fijadora (formaldehído 5%, ácido acético 10%, etanol 50% v/v) y finalmente se fotografió en etanol 70% v/v.

## RESULTADOS/CONCLUSIONES

### Análisis de la expresión de los precursores de *miR394a* y *miR394b*.

Para determinar el tipo de mutaciones que producen las inserciones en las plantas *mir394a/mir394b*, se usó la técnica de RT-PCR semicuantitativa. En la Figura 1A se muestra un esquema de la posición de las inserciones en cada una de las líneas mutantes utilizadas. Para las reacciones de RT-PCR se usaron cebadores específicos para cada uno de los precursores de *miR394* y para el gen de referencia *UBQ* (*AtUBQ10*). En la Figura 1B se muestra que la expresión de ambos genes es indetectable en las plantas mutantes, por lo que se trata de mutaciones del tipo *knock-out*. En base a estos resultados, se deduce que la acumulación de *miR394* maduro también es nula en estos mutantes.

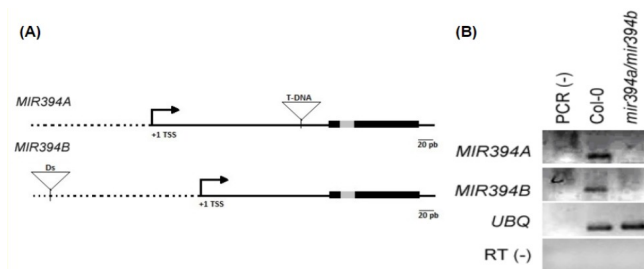


Figura 1. (A) Esquema representativo de las inserciones en los genes *MIR394A* y *MIR394B*. (B) Expresión de los genes *MIR394A* y *MIR394B* determinada por RT-PCR semicuantitativa en plántulas de *Arabidopsis* a los 14 días de crecimiento.

### Caracterización fenotípica del tiempo de floración de *mir394a/mir394b*.

Con el fin de caracterizar la respuesta en el tiempo de floración de las plantas mutantes *mir394a/mir394b*, se midió el tiempo de floración tanto en condiciones de día largo como de día corto, usando plantas salvajes Col-0 como control (Figura 2). En condiciones de crecimiento de día largo, las plantas mutantes florecen luego de 27 días de crecimiento, mientras que las plantas Col-0 lo hacen seis días más tarde (Figura 2A). Además, las primeras generan en promedio 8,55 hojas de roseta y las segundas producen 13,90 hojas en la fase vegetativa (Figura 2B). De manera similar, en condiciones de crecimiento de día corto, las plantas *mir394a/mir394b* florecen aproximadamente 10 días antes (Figura 2C) y producen 6 hojas de roseta menos que las plantas salvajes (Figura 2D). Se puede ver que cuando las plantas mutantes florecieron, las plantas salvajes aún no lo han hecho. Además, se aprecia el menor contenido de hojas de roseta en las plantas mutantes, producto de una fase reproductiva adelantada con respecto a las plantas Col-0.

Estos resultados indican que miR394 está involucrado en la regulación del tiempo de floración en *Arabidopsis* y que la ruta regulada por este miARN participa en el control de la expresión de un represor de la floración. Además se determinó que esta regulación es independiente del fotoperíodo.

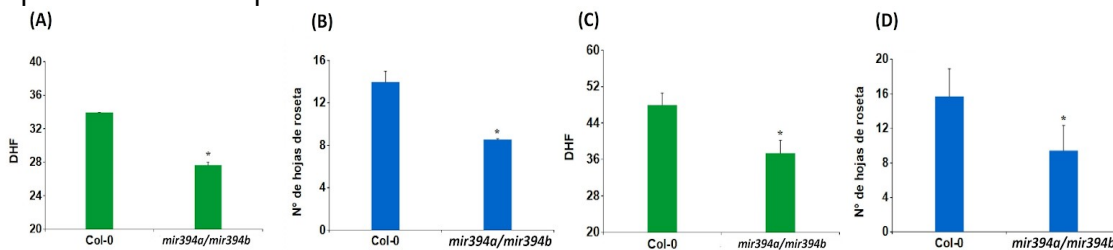


Figura 2. (A) Tiempo de floración de plantas Col-0 y *mir394a/mir394b* en condiciones de crecimiento de día largo determinado como días hasta la floración (DHF) y (B) como número de hojas de roseta. (C) Tiempo de floración en condiciones de crecimiento de día corto determinado como días hasta la floración (DHF) y (D) como número de hojas de roseta.

### Análisis de la expresión de genes clásicos de floración en *mir394a/mir394b*

Para estudiar si el fenotipo de floración temprana observado en las plantas mutantes se correlaciona con una mayor acumulación de los genes integradores florales, se analizó la expresión de *FT* y *SOC1* en plantas Col-0 y *mir394a/mir394b* a los 14 días de crecimiento, cuando las plantas están en fase vegetativa de desarrollo y a los 21 días, cuando las plantas están cerca de florecer (Figura 4). Se determinó que la expresión de *SOC1* se encuentra aumentada en plantas *mir394a/mir394b* para los dos tiempos de desarrollo analizados y la expresión de *FT* es mayor en las plantas mutantes a los 14 días. Este resultado indica que la desregulación del represor floral regulado por la ruta de miR394 determina que el umbral de expresión de los integradores florales se alcance a tiempos más cortos en comparación con las plantas salvajes, produciéndose así la floración temprana de las plantas *mir394a/mir394b*.

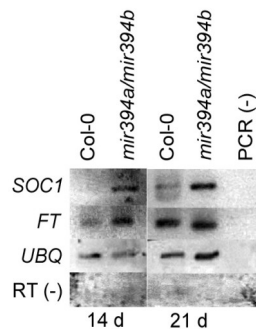


Figura 4. Expresión de los integradores florales *FT* y *SOC1* en plantas *Col-0* y *mir394a/mir394b* a los 14 y 21 días de crecimiento a través de la técnica de RT-PCR semicuantitativa

### Caracterización de la expresión de *LCR* durante la transición de fase y en la inflorescencia.

Debido a la ausencia de bibliografía que reporta la expresión de *LCR* en las inflorescencias de *Arabidopsis*, se procedió a realizar un estudio de tinción histoquímica de *GUS* en inflorescencias de plantas *GT-lcr*. Esta línea del tipo “gene trap” contiene al gen reportero *GUS* como parte de una inserción en la región codificante del gen *LCR*. De esta manera, en estas plantas se pudo evaluar que *LCR* se expresa principalmente en el gineceo de las inflorescencias, desde estadios iniciales en el desarrollo de las mismas.



Figura 5. Expresión de *LCR* durante el desarrollo de las inflorescencias en plantas de la línea *GT-lcr* (Tinción de *GUS*).

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bo Song, J., Gao, S., Sun, D., Li, H., Xia Shu, X., & Min Yang, Z.**, 2013. miR394 and LCR are involved in *Arabidopsis* salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner. *BMC Plant Biology*, 13, 210.
- Jones-Rhoades, M. W., & Bartel, D. P.**, 2004. Computational identification of plant MicroRNAs and their targets, including a stress-induced miRNA. *Molecular Cell*, 14, 787-799.
- Knauer, S., Holt, A. L., Rubio-Somoza, I., Tucker, E. J., Hinze, A., Pisch, M., ... Laux, T.**, 2013. A Protodermal miR394 Signal Defines a Region of Stem Cell Competence in the *Arabidopsis* Shoot Meristem. *Developmental Cell*, 24, 125-132.
- Song, J. B., Huang, S. Q., Dalmay, T., & Yang, Z. M.**, 2012. Regulation of leaf morphology by MicroRNA394 and its target LEAF CURLING RESPONSIVENESS. *Plant and Cell Physiology*, 53, 1283-1294.