



Encuentro
de JÓVENES
INVESTIGADORES

ESTUDIO DE LAS FUNCIONES DE LA RUTA DE miR394 EN PLANTAS DE MAÍZ Y DE *Arabidopsis thaliana*.

Garnero Patat, Paloma

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

Directora: Dotto, Marcela

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: *Arabidopsis*, miR394, maíz

INTRODUCCIÓN

El miARN miR394 juega un papel importante en la regulación de varios aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, entre los que se incluyen la regulación del tiempo de floración y la respuesta a estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana* (Song et al., 2013; Bernardi et al., 2022). Resultados de nuestro grupo de trabajo establecieron que plantas de *Arabidopsis* mutantes en los genes *MIR394* (denominadas *mir394a/mir394b*), presentan floración temprana en comparación con plantas salvajes del ecotipo Col-0, indicando que miR394 participa en la regulación del tiempo de floración en esta especie vegetal (Bernardi et al., 2022).

En maíz existen dos genes regulados por miR394, a los que hemos denominado *ZmLCR1* y *ZmLCR2* de acuerdo al nombre de su ortólogo *LCR* en *Arabidopsis*, para los cuales contamos con líneas mutantes simples y una línea mutante doble denominada *zmlcr1/zmlcr2*. Estas líneas mutantes muestran una mayor supervivencia que plantas salvajes de la línea endocriada W22 tras ser sometidas a tratamientos prolongados de 25 días de sequía (Miskevish et al., 2021).

En esta presentación se muestran resultados relacionados con el estudio del tiempo de floración de plantas de maíz mutantes *zmlcr1/zmlcr2* y de plantas de *Arabidopsis* mutantes *mir394a/mir394b*, en relación con su respuesta a estrés por sequía. Además, se presenta una caracterización inicial de mutantes de maíz *zmlcr1/zmlcr2* en contextos genéticos híbridos, con el fin de analizar la respuesta a sequía de estos mutantes en un contexto similar al de comercialización de esta especie de interés agronómico.

OBJETIVOS

1. Caracterizar el tiempo de floración en plantas de maíz mutantes en los genes regulados por miR394, *zmlcr1/zmlcr2*.
2. Caracterizar el tiempo de floración bajo condiciones de sequía en las plantas de *Arabidopsis thaliana* mutantes *mir394a/mir394b*.
3. Caracterizar la respuesta fisiológica de híbridos de maíz mutantes *zmlcr1/zmlcr2* en condiciones de sequía en cámaras de crecimiento.

Título del proyecto: Estudio de las funciones de la ruta de miR394 en plantas de maíz y de *Arabidopsis thaliana*

Instrumento: PICT-2021-CAT-I-00015

Año convocatoria: 2021

Organismo financiador: ANPCyT-FONCyT

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

METODOLOGÍA



Material vegetal y condiciones de crecimiento

Se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* salvajes de ecotipo Col-0 y mutantes *mir394a/mir394b*. Además, se trabajó con plantas de maíz salvajes de la línea W22 y mutantes *zmlcr1/zmlcr2* y plantas de maíz híbridos salvajes B73xW22 (W) y mutantes *zmlcr1/zmlcr2* en el contexto genético híbrido B73xW22, denominadas *zmlcr1/zmlcr2*^{B73xW22} (M).

Las condiciones de crecimiento fueron de día largo (16 h de luz/8 h de oscuridad) y temperatura entre 21 y 24 °C para *Arabidopsis* y de entre 24 y 28 °C para maíz.

Determinación del tiempo de floración de plantas de *Arabidopsis* y maíz.

El tiempo de floración en plantas de *Arabidopsis thaliana* se determinó contando el número de hojas de roseta al momento de floración y el número de días hasta la floración para todas las líneas en estudio.

En plantas de maíz se caracterizó el tiempo de floración como el número de días hasta alcanzar el estadio R1 (aparición de estigmas en la inflorescencia femenina).

Aplicación de estrés por sequía

Las plantas de *Arabidopsis* fueron cultivadas con riego normal durante 10 días, luego el total de plantas se dividió en dos grupos: el grupo control recibió irrigación normal y el grupo sequía no fue regado durante 15 días y luego se retomó el riego normal hasta el final del ciclo de vida.

Las plantas de maíz recibieron riego normal hasta el estadio V2-V3 (15 días), luego se dividieron en dos grupos y se suspendió el riego para el grupo sequía, durante 40 días, mientras que el grupo control recibió riego normal durante todo el experimento. Luego se reanudó el riego durante 7 días para evaluar supervivencia.

Determinación de parámetros fisiológicos.

Para los híbridos de maíz salvajes y mutantes se determinó transpiración (E), conductividad estomática (gs) y tasa fotosintética (Pn) usando el medidor CIRAS-2 (PP biosystems), y se calculó la eficiencia de uso de agua (EUA = Pn/gs). Además, se midió el índice de verdor usando el medidor SPAD 502 (Minolta). Estas determinaciones se realizaron el primer día de sequía (día 1 de sequía y día 15 de crecimiento) y luego de 15 días de sequía (día 15 de sequía y día 30 de crecimiento).

Análisis estadísticos

Los datos se analizaron empleando la prueba t de Student, ANOVA de dos o tres vías utilizando el software SigmaPlot 12.0 sobre aquellos datos que superaron las pruebas de normalidad de Shapiro e igualdad de varianzas de Levene ($p > 0,05$), seguido de comparaciones múltiples utilizando el método de Tukey ($p < 0,05$).

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Tiempo de floración de *Arabidopsis thaliana*

El análisis estadístico del tiempo de floración para plantas de *Arabidopsis* indica que no existe interacción entre genotipo y tratamiento, tanto para los días hasta floración como para el número de hojas de roseta (Fig. 1), observándose que el



fenotipo de floración temprana se mantiene tanto en condiciones de irrigación normal como en sequía.

Los resultados obtenidos para las plantas mutantes *mir394a/mir394b* sugieren que el papel de miR394 en la respuesta a sequía (Song y col., 2013) es independiente del papel que este grupo de trabajo demostró para miR394 en la regulación del tiempo de floración (Bernardi y col., 2022).

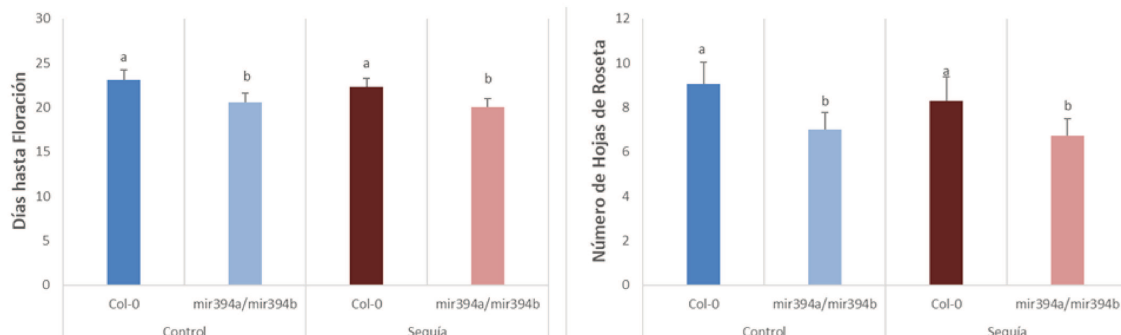


Figura 1: Tiempo de floración de plantas de *Arabidopsis thaliana* (plantas salvajes Col-0 y mutantes dobles *mir394a/mir394b*) en condiciones control de irrigación normal y de sequía. (Promedio \pm DE; letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA a dos factores ($p < 0,05$), seguido de comparaciones múltiples por el método de Tukey; $n = 18$)

Tiempo de floración de plantas de maíz mutantes *zmlcr1/zmlcr2*

Las plantas de maíz *zmlcr1/zmlcr2* no mostraron diferencias significativas en el tiempo de floración con respecto a plantas salvajes W22 (Fig. 2). Este resultado está de acuerdo con resultados obtenidos por este grupo de trabajo al estudiar el papel del módulo regulatorio miR394/LCR en plantas de *Arabidopsis thaliana*, donde tampoco se observaron cambios en el tiempo de floración entre plantas salvajes y mutantes *lcr* (Bernardi y col., 2022), sugiriendo que la regulación del tiempo de floración por miR394 ocurre a través de otro gen regulado por este miARN, desconocido hasta el momento.

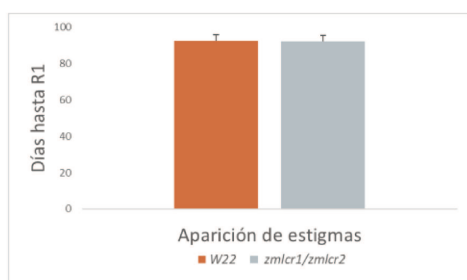


Figura 2: Determinación del tiempo de floración a través del número de días hasta aparición de estigmas en plantas de maíz salvajes W22 comparadas con mutantes *zmlcr1/zmlcr2*. (Promedio \pm DE; * = $p < 0,05$ según prueba t de Student; $n = 5$)

Análisis de parámetros fisiológicos durante el crecimiento de híbridos salvajes B73xW22 y mutantes *zmlcr1/zmlcr2*^{B73xW22}

Los resultados de las mediciones asociadas a la fisiología de plantas de maíz salvajes (W) y mutantes (M) en contextos genéticos híbridos se presentan en la Figura 3. No existen diferencias significativas entre plantas salvajes y mutantes al día 1 de tratamiento para las variables transpiración (E), conductividad estomática (gs) y eficiencia del uso de agua (EUA), tanto para el grupo control como para el tratado (Figura 3a, b, d). La tasa fotosintética (P_n) al día 1 fue mayor para plantas salvajes del grupo control (Fig. 3c) y el índice de verdor en este día fue menor para plantas mutantes del grupo control (Fig. 3e). Tras 15 días de sequía se evidencia una disminución para E y P_n en el grupo sequía comparado con el control, pero sin diferencias entre genotipos (Fig. 3a, c). Por otra parte, a los 15 días de sequía no

existen diferencias entre grupos o genotipos para el índice de verdor, siendo superiores en todos los casos a los observados en el día 1 (Fig. 3e). Finalmente, no existen diferencias para EUA entre plantas salvajes y mutantes del grupo control, ni con plantas salvajes en sequía, pero sí se observó una disminución en la EUA de plantas mutantes en sequía durante 15 días (Fig. 3e). Por lo tanto, las mutaciones no afectarían la fisiología de las plantas para la mayoría de los parámetros analizados. Sin embargo, la disminución observada en EUA para las plantas mutantes sometidas a sequía indica que serían más susceptibles que las plantas salvajes a este estrés, lo cual se contrapone a resultados previos obtenidos por este grupo de trabajo para mutantes en la línea endocriada W22 (Miskevish et al., 2021). Será necesario llevar adelante nuevos experimentos para corroborar los datos obtenidos hasta el momento.

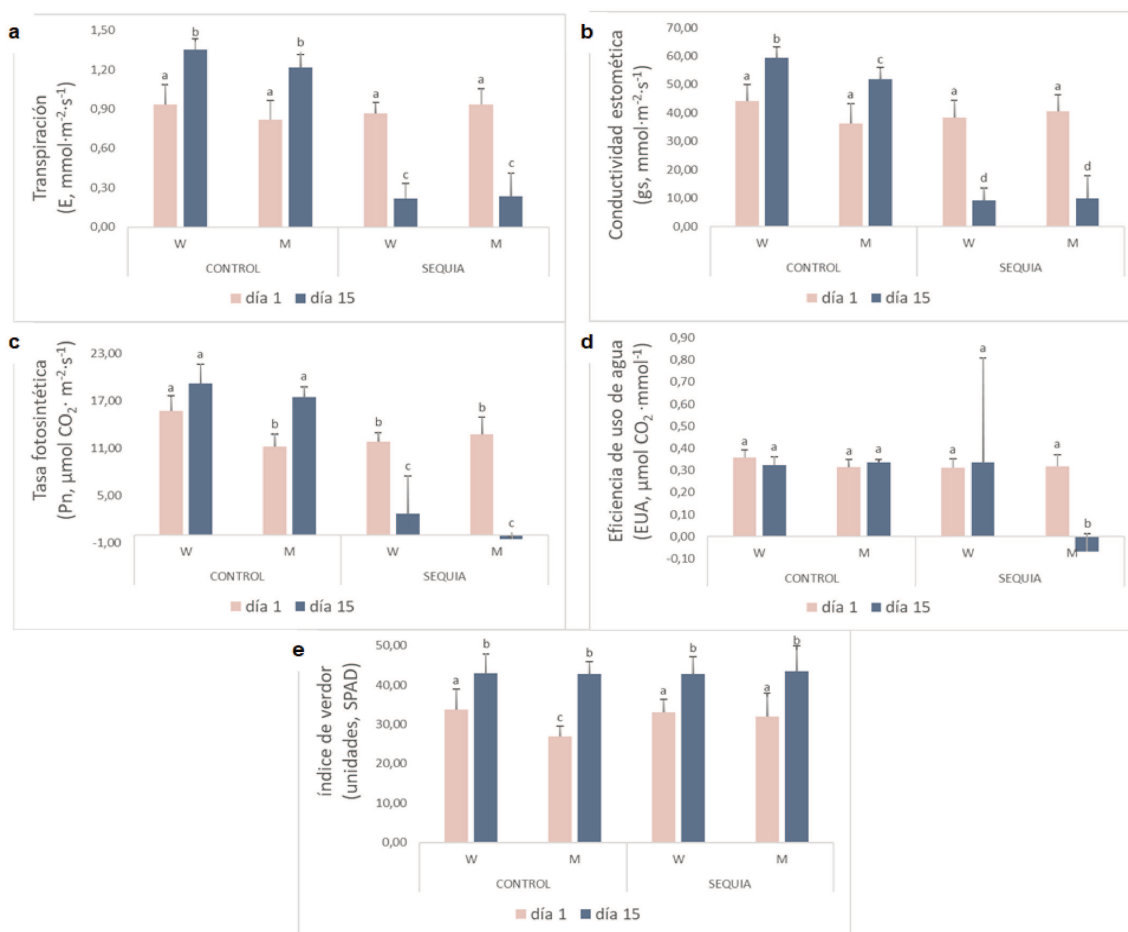


Figura 3: Parámetros fisiológicos durante el crecimiento de plantas de maíz híbridos salvajes (W) y mutantes en el mismo contexto genético (M). **a)** Transpiración (E), **b)** Conductividad estomática (gs), **c)** Fotosíntesis neta (Pn), **d)** Eficiencia del uso de agua (EUA) y **e)** Índice de verdor, en condiciones normales de irrigación (CONTROL) y en condiciones de sequía (SEQUIA). Día 1: inicio del tratamiento de sequía, día 15: 15 días de sequía, corresponden a 15 y 30 días de crecimiento, respectivamente. (Promedio ± DE; letras distintas indican diferencias significativas según ANOVA a tres factores ($p < 0,05$), comparaciones múltiples por el método

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Bernardi Y, Ponso A, Belen F, Vegetti A, Dotto M.** (2022). MicroRNA miR394 regulates flowering time in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Reports*.
- Miskevish F, Bouzo C, Dotto M** (2021). Tolerancia a sequía mediada por microARNs en plantas de maíz. Tesina para Ingeniería Agronómica, UNL.
- Song, J.B.** et al. (2013) miR394 and LCR are involved in *Arabidopsis* salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner. *BMC Plant Biol.* 13, 210.