



## CARACTERIZACIÓN DE LA FUNCIÓN DE LA RUTA DE MIR394 EN LA TOLERANCIA A SEQUÍA EN MAÍZ

**Ponso, María**

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

*Directora: Dotto, Marcela*

*Área: Ciencias Biológicas*

Palabras claves: maíz, sequía, miARN.

### INTRODUCCIÓN

Los microARNs son capaces de reconocer y unirse por complementariedad de bases a un ARN mensajero *target* para regular negativamente su acumulación y de esta forma controlan diversos procesos biológicos (Cuperus y col., 2011). miR394 participa en la respuesta a estrés abiótico en *Arabidopsis thaliana* producidos por alta salinidad y sequía (Song y col., 2013) y regula a nivel post-transcripcional la acumulación del transcripto que codifica para la proteína LEAF CURLING RESPONSIVENESS (LCR) que pertenece a la familia F-BOX (Jones-Rhoades y Bartel, 2004). LCR forma parte de un complejo SCF que participa en la ubiquitinación de MLP28, una proteína perteneciente a la familia MAJOR LATEX PROTEIN-like (MLP) (Celso y col., 2016) para su posterior degradación por parte del proteasoma. Por su parte, la caracterización de la ruta de miR394 es inexistente en maíz. Estudios iniciales realizados en el laboratorio establecieron que, como ocurre en *Arabidopsis*, en maíz también existen dos genes que codifican para precursores de miR394. Además, en el genoma de maíz existen dos genes regulados por miR394 que codifican para proteínas de la familia F-BOX (*ZmLCR1* y *ZmLCR2*).

En el laboratorio se obtuvieron plantas de *Arabidopsis* mutantes insercionales dobles *ath-mir394a/ath-mir394b* y plantas de *Arabidopsis* ecotipo Col-0 sobreexpresantes de uno de los genes precursores de este microARN de maíz (*2X35S::ZM-MIR394B*). En este trabajo se analizó el comportamiento de estas líneas de plantas de *Arabidopsis* frente a estrés hídrico. Por otro lado, se realizó un análisis filogenético para la identificación de genes ortólogos putativos de las proteínas MLP de *Arabidopsis* reguladas por LCR. Aquí se presenta el análisis de expresión génica de genes *ZmMLP* en plantas de maíz mutantes *zmlcr1/zmlcr2*.

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

## OBJETIVOS

- Analizar el efecto de la sequía en plantas de *Arabidopsis Col-0*, dobles mutantes *ath-mir394a/ath-mir394b* y sobreexpresantes *2X35S::ZM-MIR394B*.
- Identificar en maíz a los genes ortólogos putativos de las proteínas MLP de *Arabidopsis* reguladas por LCR a través de estudios filogenéticos.
- Analizar la expresión de los genes *ZmMLP* en plantas de maíz mutantes dobles *zmlcr1/zmlcr2*.

## METODOLOGÍA

### Material vegetal.

Se trabajó con plantas de *Arabidopsis thaliana* salvajes del ecotipo Col-0, mutantes dobles *ath-mir394a/ath-mir394b* y plantas Col-0 sobreexpresantes *2X35S::ZM-MIR394B*, obtenidas en el laboratorio a través del método de inmersión floral. También se utilizaron plantas de maíz salvajes T43 y plantas mutantes dobles *zmlcr1/zmlcr2*.

### Ensayos de sequía.

Se cultivaron plantas de *Arabidopsis Col-0* y sobreexpresantes *2X35S::ZM-MIR394B* en tierra y, posterior a un período de estratificación a 4°C, se llevaron a una cámara de cultivo durante dos semanas con irrigación normal. Se suspendió el suministro de agua durante 15 días, para luego reanudar la irrigación. Se observó el crecimiento de los distintos grupos de plantas y se cuantificó el porcentaje de sobrevivencia para los genotipos en estudio.

Para los ensayos en placas, se desinfectaron semillas de *Arabidopsis Col-0* y mutantes dobles *ath-mir394a/ath-mir394b* y se colocaron en placas de petri conteniendo medio MS. Luego de un período de estratificación a 4°C, se llevaron a cámara de crecimiento en posición vertical. Se dejaron crecer por 8 días, momento en el cual se transplantaron a placas de petri conteniendo medio MS o MS con manitol. Se determinó el largo de las raíces para ambos genotipos en estudio en distintos puntos durante 15 días.

### Análisis filogenético.

Se construyó un árbol filogenético con secuencias de proteínas que comparten el dominio Bet\_v1, característico de las proteínas MAJOR LATEX PROTEIN-like (MLP), proveniente de distintas especies. Para esto, se buscaron las secuencias proteicas de MLP de *Arabidopsis* y se realizó una búsqueda por homología de secuencia usando BLASTP en el genoma de maíz. Una vez obtenidas todas las secuencias, se utilizó el algoritmo Muscle del programa MEGA 6.0 para realizar un alineamiento, a partir del cual se construyó un árbol filogenético usando el método Neighbor-Joining con un bootstrap de 1000 réplicas.

### Extracción de ARN total y retrotranscripción

Se realizó la extracción de ARN total a partir de 100 mg de tejido de plantas de maíz salvajes T43 y mutantes dobles *zmlcr1/zmlcr2*, 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 2 µg de ARN total usando la enzima retrotranscriptasa EasyScript Reverse Transcriptase (M-MLV, Transgen Biotech), oligo(dT) y siguiendo las indicaciones del fabricante.

### Análisis de expresión génica.

Se diseñaron oligonucleótidos específicos para analizar expresión génica de genes de interés usando RT-PCR semicuantitativa. Para esto, luego de evaluar la zona de linealidad de las reacciones de PCR para cada gen de interés y para el gen de referencia, se seleccionó el número de ciclos adecuado para comparar la expresión de los genes en estudio en las muestras de interés.

## RESULTADOS Y CONCLUSIONES

### Ensayos de sequía

Con el fin de evaluar si la ruta de miR394 de maíz participa en la tolerancia a estrés hídrico, tal como ha sido reportado en *Arabidopsis* (Song y col., 2013), se generaron plantas de *Arabidopsis* transgénicas sobreexpresantes de uno de los genes miR394 de maíz, a las cuales denominamos *2X35S::ZM-MIR394B*. Las mismas fueron utilizadas en ensayos de sequía en tierra, junto con plantas salvajes Col-0. Para plantas mutantes *knock out* en los dos genes endógenos *MIR394* de *Arabidopsis*, a las que denominamos *ath-mir394a/ath-mir394b*, se realizaron ensayos de sequía en placas verticales con medio MS suplementado con manitol.

En los ensayos en tierra, luego de un período de 15 días de sequía se reanudó la irrigación y se cuantificó la cantidad de plantas que reiniciaron su crecimiento para los distintos genotipos en estudio. En la Figura 1 se presentan los porcentajes de sobrevivencia para un total de 19 individuos salvajes Col-0 y 23 individuos *2X35S::ZM-MIR394B*, donde se observó que las plantas sobreexpresantes son más tolerantes a la sequía en comparación con las plantas salvajes. Este ensayo se realizó para obtener datos preliminares sobre un posible rol de la ruta de miR394 de maíz en la tolerancia a sequía. Cabe aclarar que el análisis de las plantas *2X35S::ZM-MIR394B* se realizará utilizando como control plantas de una línea transgénica transformada con el vector pGWB402Ω vacío que ya se está generando en el laboratorio, ya que es el control más adecuado para plantas sobreexpresantes.

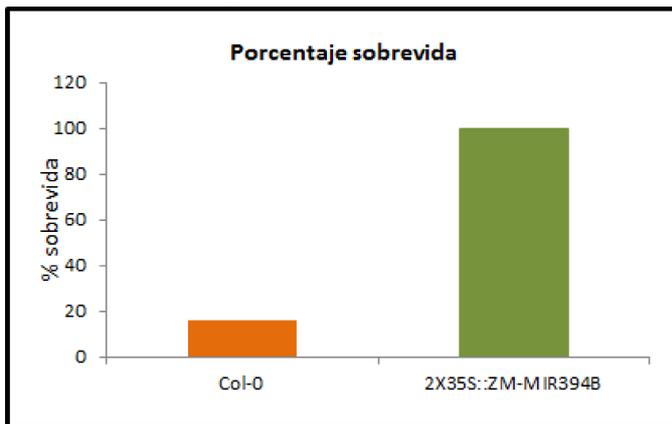


Figura 1: Porcentaje de sobrevivencia para Col-0 y *2X35S::ZM-MIR394B*.

Para simular el efecto de condiciones de sequía y estudiar el patrón de desarrollo radicular, se sembraron semillas de *Arabidopsis* Col-0 y *ath-mir394a/ath-mir394b* en placas conteniendo MS y luego de 8 días de crecimiento se transplantaron a medio MS (control) o a medio MS suplementado con 250 mM de manitol (tratadas). Se midió el largo de las raíces de todos los individuos para 5 puntos dentro de los 15 días de crecimiento. En la Figura 2 se puede ver que tanto las plantas salvajes como las mutantes dobles en medio MS+manitol desarrollan raíces significativamente más cortas en comparación con su control. Además, dentro del grupo de plantas tratadas existe diferencia significativa entre ambos genotipos a partir del día 8, siendo más cortas las raíces de las plantas dobles

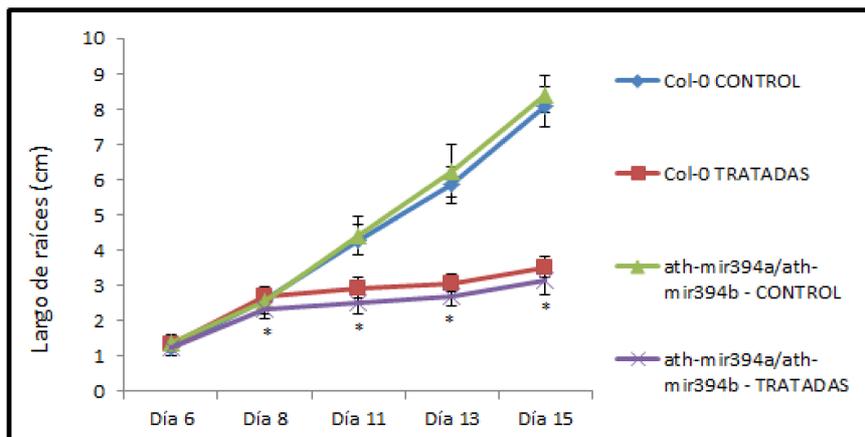


Figura 2: Largo de raíces de plantas Col-0 y *ath-mir394a/ath-mir394b* a los días 6, 8, 11, 13 y 15 de crecimiento en condiciones control y tratadas. Se marca con asterisco las diferencias significativas ( $p < 0,05$ ).

mutantes. Dentro del grupo control, no se observaron diferencias significativas entre los genotipos estudiados.

### Análisis filogenéticos y de expresión génica.

Se buscaron secuencias proteicas de MLP de Arabidopsis para identificar proteínas homólogas usando BLASTP en el genoma de maíz. Las proteínas identificadas, junto con secuencias proteicas de otras especies de monocotiledóneas y dicotiledóneas que contienen el dominio denominado Bet\_v1, característico de esta familia de proteínas se utilizaron para construir un árbol filogenético (no mostrado). A partir de este árbol se identificó un único ortólogo putativo de las proteínas MLP de Arabidopsis reguladas por miR394, al que denominamos *ZmMLP*. Se diseñó un par de oligonucleótidos específicos para este gen y para uno de los genes de maíz que no pertenece al clado de las proteínas MLP, al que denominamos *ZmBetv1-like*; y se usaron para analizar cambios en la expresión de estos genes usando RT-PCR semicuantitativa en platas de maíz salvajes o mutantes en los genes *ZmLCR* de maíz, denominadas *zmlcr1/zmlcr2* (Figura 3).

En la Figura 3 (A y B) se muestra que no hay diferencia de expresión de *ZmBetv1-like* tanto en muestras de hoja como de ápice para ambos genotipos estudiados, mientras que en la figura 3B se observa una mayor expresión de *ZmMLP* en plantas *zmlcr1/zmlcr2* comparado con las plantas salvajes, lo cual podría estar relacionado con una regulación en la acumulación del gen *ZmMLP* por parte de las proteínas *ZmLCR1* y/o *ZmLCR2*.

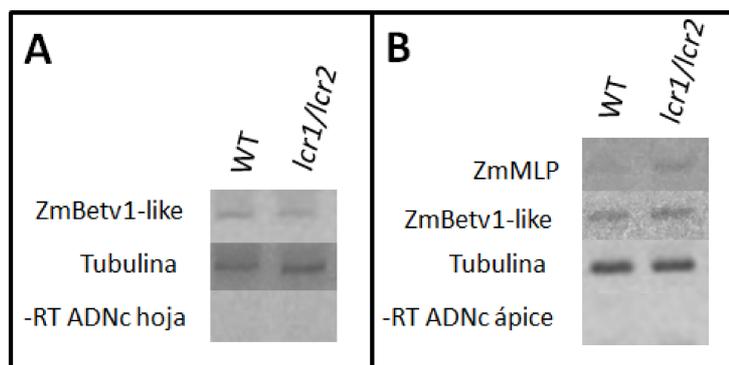


Figura 3: (A) RT-PCR semicuantitativa sobre muestras de ADNc de hoja. (B) RT-PCR semicuantitativa para muestras de ADNc de ápice. Para ambos casos se usó tubulina como control interno.

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

- Celso G. L. Jr., Benjamin L. P., Andrew L. E., Martin R. L., Stuart J. C., & Peter M. W. (2016).** Proteomic Identification of Putative MicroRNA394 Target Genes in Arabidopsis thaliana Identifies Major Latex Protein Family Members Critical for Normal Development. <https://sci-hub.tw/10.1074/mcp.M115.053124>
- Cuperus, J. T., Fahlgren, N. and Carrington, J. C. (2011).** Evolution and functional diversification of MIRNA genes. *The Plant Cell*, 23, 431–442. <https://doi.org/10.1105/tpc.110.082784>
- Song, J. B., Gao, S. Sun, D., Li, H., Shu, X. X. and Yang, Z. M. (2013).** miR394 and LCR are involved in Arabidopsis salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner. *BMC Plant Biology*, 13. Retrieved from <http://www.biomedcentral.com/1471-2229/13/210>
- 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.