



## RESISTENCIA A SEQUÍA MEDIADA POR UN miARN EN PLANTAS DE MAÍZ

Miskevish, Franco

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

Directora: Dotto, Marcela

Codirector: Bouzo, Carlos

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Maíz, Sequía, miARN

### INTRODUCCIÓN

El maíz es un cultivo de gran importancia en nuestro país, utilizándose en la alimentación humana, animal y para muchas aplicaciones industriales. Gran parte de la superficie agrícola en Argentina se realiza en condiciones de secano, incrementándose así la probabilidad de episodios de limitación de agua en este cultivo. Esto destaca la necesidad de profundizar el conocimiento acerca las posibles mejoras que puedan introducirse a los fines de disminuir el efecto del estrés hídrico, tal como fue ya manifestado por otros investigadores (Zdenek *et al.*, 2017).

Existen evidencias de que la ruta regulada por el microARN miR394 en *Arabidopsis* participa en diversos procesos tales como el desarrollo del embrión y de las hojas, así como también en la respuesta a algunos tipos de estrés abióticos, producidos por la alta salinidad y sequía (Knauer *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2012; 2013). La caracterización de la ruta en maíz se encuentra en sus inicios; hasta el momento se ha comprobado que la ruta de miR394 está conservada en maíz y su estudio resulta sumamente interesante por la posibilidad de participar en la tolerancia a sequía en esta especie de gran interés agronómico. Se ha logrado avanzar en el estudio de la participación de esta ruta en la tolerancia a sequía de plantas de maíz, mediante el uso de líneas mutantes en los componentes de la ruta regulada por miR394. Para esto, se obtuvieron mutantes de maíz en los genes regulados post-transcripcionalmente por miR394, denominados ZmLCR1 y ZmLCR2, los cuales serían ortólogos al gen LCR, regulado por miR394 en *Arabidopsis* y posteriormente se obtuvieron líneas de mutantes dobles en ambos genes por cruzamientos dirigidos. Se realizaron ensayos de sequía para plantas de los genotipos salvajes y mutantes *zmlcr1*, *zmlcr2* y *zmlcr1/zmlcr2* y se determinó el porcentaje de sobrevivientes luego de 25 días de sequía junto con la determinación de parámetros ecofisiológicos a distintos puntos durante el ensayo.

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 los parámetros ecofisiológicos y de crecimiento de plantas salvajes y mutantes en condiciones de sequía en la parte aérea de plantas en estadios V2-V3.
- Analizar la posible influencia de las mutaciones en la tolerancia a sequía.

## METODOLOGÍA

### Material vegetal

Se utilizaron plantas de maíz salvajes de la línea endocriada T43 (WT), plantas mutantes simples *zmlcr1* y *zmlcr2*, y plantas mutantes dobles *zmlcr1/zmlcr2*.

### Ensayos de sequía

Se sembraron plantas de los genotipos antes mencionados en vasos de 1000 cm<sup>3</sup>, los cuales se llenaron con un sustrato homogéneo para garantizar la igualdad de condiciones en las que se desarrollaría el experimento; estos contenedores se colocaron en una cámara con condiciones de irradiancia, temperatura y humedad relativa atmosférica controladas. Se sembraron 22 individuos de cada genotipo en estudio (88 en total), de los cuales 11 se utilizaron como control, recibiendo una irrigación normal durante todo el tiempo que duró el experimento, mientras que los 11 individuos restantes recibieron una irrigación normal hasta alcanzar el estadio V2-V3, después de lo cual el suministro de agua se suspendió (D1) hasta la eliminación total de humedad en el suelo, determinado por pesaje de los contenedores hasta que el peso de estos se volvió constante, lo que sucedió 11 días después de la suspensión de la irrigación (DPC). Desde el punto en que los contenedores alcanzaron el peso constante se continuó sin irrigación por 15 días más, es decir que el tratamiento de sequía se prolongó por 25 días (D25) en total, después de lo cual el riego se reanudó durante 7 días (D7R).

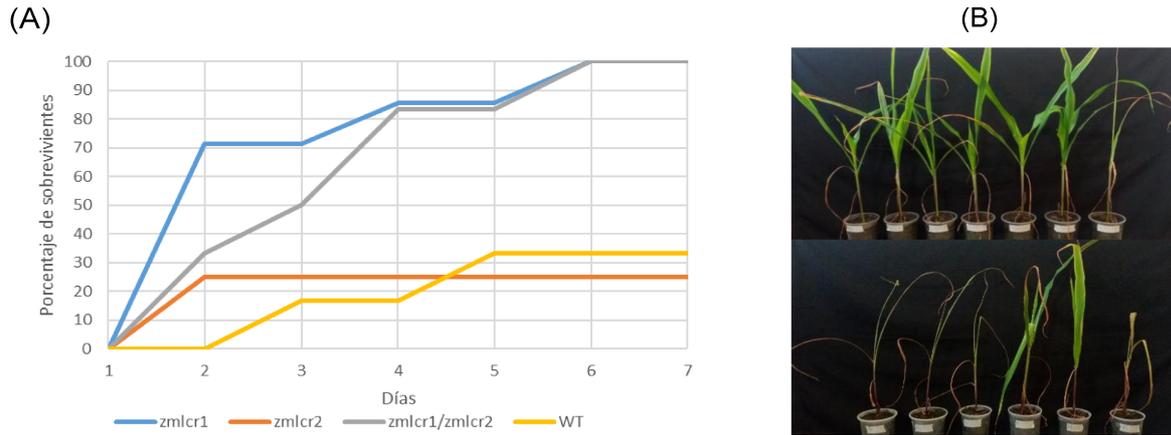
### Determinación de parámetros ecofisiológicos y de crecimiento

Se midieron distintos parámetros asociados al crecimiento de las plantas, tales como altura, índice de verdor usando el medidor SPAD, conductividad estomática, tasa fotosintética y tasa respiratoria usando el medidor CIRAS-2. Además, se tomaron fotografías para poder evaluar visualmente el estado general de las plantas. Estas determinaciones se realizaron en algunos de los distintos puntos mencionados anteriormente: D1, DPC, D15 y D25.

## RESULTADOS

### Supervivencia al tratamiento de sequía

Con el fin de analizar si los genes *ZmLCR1* y *ZmLCR2* están relacionados con la tolerancia a sequía en maíz, se analizó el porcentaje de sobrevivientes para plantas WT, *zmlcr1*, *zmlcr2* y *zmlcr1/zmlcr2* tras reanudar el riego durante 7 días, luego de 25 días de sequía. Como se muestra en la Figura 1, luego de reiniciar el riego, el 100% de las plantas *zmlcr1* y *zmlcr1/zmlcr2* reanudaron su crecimiento, mientras que por otro lado solo un 33,33% de las plantas WT y un 25% de las plantas *zmlcr2* lo hicieron.

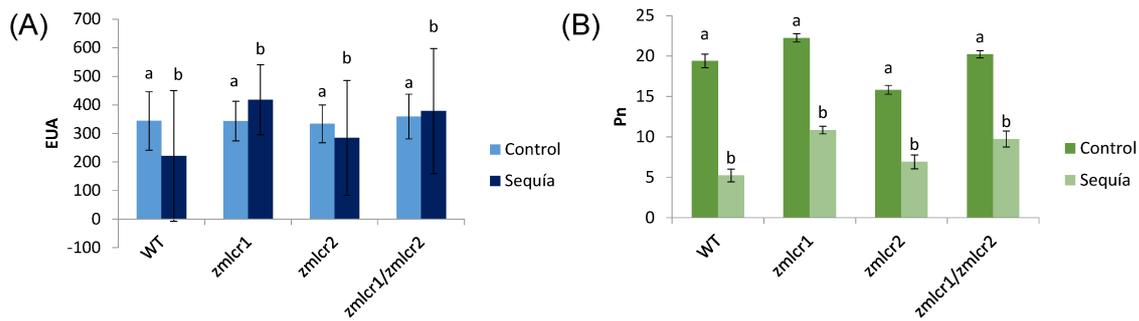


**Figura 1:** (A) Porcentaje de plantas de los genotipos en estudio que se recuperaron del estrés hídrico en los días posteriores a la reanudación del riego, (B) Plantas pertenecientes al genotipo *zmlcr1* (arriba) y al salvaje (abajo), luego de 7 días de reanudado el riego

Un 70% de las plantas *zmlcr1* mostró una mejoría luego de solo 1 día de reanudado el riego, comenzando a recuperar la turgencia y a expandir nuevamente sus hojas que hasta el momento se encontraban deshidratadas y enrolladas sobre sí mismas, a la vez que recuperaban una tonalidad más verde. Las plantas *zmlcr1/zmlcr2* tuvieron un comportamiento similar, aunque en este caso la recuperación fue algo más lenta, ya que luego de 1 día de reanudado el riego solo se habían recuperado el 33,33% de los individuos, pero al llegar al día 6 el 100% de los mismos se encontraba en buenas condiciones. Por otro lado, los individuos pertenecientes al genotipo *zmlcr2* mostraron el menor porcentaje de recuperación de entre todos los genotipos en estudio, recuperándose el día 1 el 25% de las plantas tratadas, pero permaneciendo en ese valor hasta el día 7. Finalmente, las plantas de genotipo salvaje tuvieron la recuperación más lenta, siendo la misma en el día 1 de solo el 16,67% del total de plantas tratadas de este genotipo, pero aumentando gradualmente hasta alcanzar en el día 4 el 33,33%, permaneciendo así hasta el día 7. De esta manera se puede concluir que la mutación en el gen *ZmLCR1* confiere a las plantas una mayor tolerancia a la sequía.

### Evaluación de los parámetros ecofisiológicos y de crecimiento

Con el fin de caracterizar los cambios en algunos parámetros ecofisiológicos y de crecimiento en las plantas en estudio durante el tratamiento, se determinó la Eficiencia de uso de agua (EUA=  $Pn/Gs$ , [ $mmol CO_2 \cdot mmol H_2O^{-1}$ ], siendo  $Gs$  la conductividad estomática y  $Pn$  la fotosíntesis neta. En la Figura 2 se muestran los resultados de las determinaciones de EUA y  $Pn$  luego de 15 días de sequía, donde puede verse que hay diferencias significativas entre las plantas crecidas en condiciones control y aquellas que fueron sometidas a sequía para todas las líneas en estudio. Sin embargo, en ningún caso se observaron diferencias en EUA o en  $Pn$  entre los distintos genotipos que puedan explicar las diferencias en la tolerancia a sequía observada.



**Figura 2:** (A) Eficiencia del uso de agua (EUA, [mmol CO<sub>2</sub>.mmol H<sub>2</sub>O<sup>-1</sup>], (B) Fotosíntesis neta (Pn) para plantas crecidas con irrigación normal (Control) o sin riego durante 15 días (Sequía).

### BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Knauer S, Holt A, Rubio-Somoza I, Tucker E, Hinze A, Pisch M, Javelle M, Timmermans M, Tucker M, Laux T.,** 2013. A protodermal miR394 signal defines a region of stem cell competence in the Arabidopsis shoot meristem. *Dev. Cell* 24, 125-132.

**Song J, Huang S, Dalmay T, Yang Z.,** 2012. Regulation of leaf morphology by microRNA394 and its target LEAF CURLING RESPONSIVENESS. *Plant Cell Physiol* 53(7), 1283-1294.

**Song J, Gao S, Sun D, Li H, Shu X, Yang Z.,** 2013. miR394 and LCR are involved in Arabidopsis salt and drought stress responses in an abscisic acid-dependent manner. *BMC Plant Biol* 13, 210

**Zdenek Z, Hlavinka P, Prokes K et al.,** 2017. Impacts of water availability and drought on maize yield. A comparison of 16 indicators. *Agric. Water Management* 188:126-135.