



Papel de la regulación por micro-RNA en embriogénesis somática y respuesta a estrés del maíz tuxpeño¹

Tzvetanka D. Dinkova,² Eduardo Luján-Soto,²
Emmanuel N. Zambrano-Zepeda,² Paola I. Aguirre de la Cruz,²
Vasti T. Juárez-González,² M.a Teresa de Jesús Olivera-Flores²

Resumen. Los micro-RNA son poderosos reguladores de la expresión de genes que pueden dictar cambios precisos en el programa de desarrollo y crecimiento de hongos, plantas y animales. Su tamaño es de 21 nucleótidos y pueden reconocer específicamente a RNA mensajeros celulares que son sus dianas de regulación. La principal contribución de esta investigación

fue entender cómo funcionan algunos micro-RNA para dirigir respuestas ante estrés ambiental y el desarrollo en plantas, con especial enfoque en la reproducción por embriogénesis somática del maíz. Su acumulación diferencial define la expresión de genes clave para promover el potencial embriogénico, la división celular y el crecimiento temprano de la planta.

Palabras clave: auxinas; embriogénesis somática; estrés; maíz; micro-RNA; regulación

Contenido

Las plantas tienen una increíble capacidad para adaptarse a diversas condiciones ambientales. Si bien no pueden moverse para escapar de una exposición prolongada a los rayos solares, o a frío, calor, inundaciones o sequías, pueden tomar de-

¹ Proyecto PAPIIT IN218921: “Regulación mediada por RNAs pequeños y factores de traducción en la respuesta a auxinas y estrés abiótico en plantas”

² Facultad de Química, UNAM. cesy@unam.mx



cisiones moleculares que les permiten retrasar o acelerar su reproducción, modificar su crecimiento y recordar la exposición al estrés. Si investigamos cuál es el arsenal de moléculas que utilizan para vivir, crecer y reproducirse en condiciones adversas, podremos aplicar el conocimiento para mejorar la sostenibilidad de cultivos agrícolas que representan fuentes indispensables de alimentación.

Para poder estudiar a las plantas en el laboratorio, entender a detalle cómo responden al ambiente, producir mutaciones y estudiar la función de genes, o incluso propagarlas a gran escala, podemos utilizar el cultivo de tejidos *in vitro* y la reproducción mediante embriogénesis somática.

La embriogénesis somática es la capacidad de formar embriones y plantas completas a partir de células somáticas, que pueden provenir de hojas, raíces, tallo o embriones inmaduros. La ventaja es que ese método permite analizar a detalle diferentes etapas del desarrollo en un frasco pequeño de cultivo y al final obtener múltiples individuos a partir de una pequeña porción de los tejidos utilizados inicialmente. Su uso tiene amplias aplicaciones prácticas, como la conservación de germoplasma sin la necesidad de ocupar grandes espacios de cultivo, la posibilidad de obtener plantas libres de patógenos gracias a la esterilidad con la que se trabaja, el mejoramiento de plantas mediante la exposición a retos que les permite expresar genes de resistencia y muchas otras ventajas. Entre las desventajas está que si bien este proceso puede ser aplicado potencialmente a cualquier especie, las condiciones ideales para lograr una regeneración óptima de plantas varían. Entonces, es necesario lograr ajustes en la formulación de medios de cultivo y las condiciones de trabajo, así como encontrar el tejido que puede funcionar mejor para promover el potencial embriogénico.

La embriogénesis somática de maíz se desarrolló como herramienta biotecnológica desde la década de los 1980. Desde los primeros estudios, quedó claro que no todas las variedades o razas de maíz presentaban el mismo potencial para desarrollar la embriogénesis somática, por lo que se trabajó con unas pocas líneas que tenían una elevada capacidad de producir embriones somáticos y regenerar plantas. Por otra parte, también quedó claro, desde aquel entonces, que el mejor tejido para desarrollar este proceso en el maíz es el de embrión cigótico inmaduro, en una ventana temporal pequeña de días posteriores a la polinización (alrededor de quince días). Sin embargo, los mecanismos moleculares que permiten regenerar una planta completa a partir de tejidos somáticos, las variantes genéticas que determinan si una variedad de maíz es o no embriogénica, así como la explicación de por qué es necesario usar una etapa precisa de tejido

embrionario como tejido de partida permanecieron desconocidos por mucho tiempo.

La investigación desarrollada en el proyecto asociado con este trabajo permitió identificar reguladores que resultan clave para promover el potencial embriogénico de los tejidos somáticos de maíz tuxpeño, variedad sintética vs-535. La reprogramación de la expresión genética resulta indispensable para inducir la dediferenciación y formación de callos embriogénicos, mantener su proliferación y posteriormente promover la regeneración de plantas. La señal ejercida por las hormonas vegetales —auxinas— es indispensable, así como lo es la participación de factores de transcripción que permiten que solo ciertos genes produzcan RNA mensajero y proteína, mientras que otros permanezcan sin expresarse.

Tanto la señalización hormonal como los factores de transcripción repercuten en la acumulación diferencial de moléculas micro-RNA, las que a su vez regulan la expresión de otros genes y resultan indispensables para controlar la duración y amplificación de la respuesta al estímulo. Los micro-RNA son pequeñas secuencias de ribonucleótidos (NT), generalmente de 21-22 NT, que se expresan en forma de precursores a partir de genes y son procesados por una enzima que las corta precisamente a este tamaño de secuencia. Una vez producidos son unidos por proteínas que los llevan a reconocer secuencias complementarias en RNA mensajeros que codifican para proteínas. Este reconocimiento es específico y capaz de silenciar el paso de RNA a proteína mediante la degradación o inhibición de la traducción.

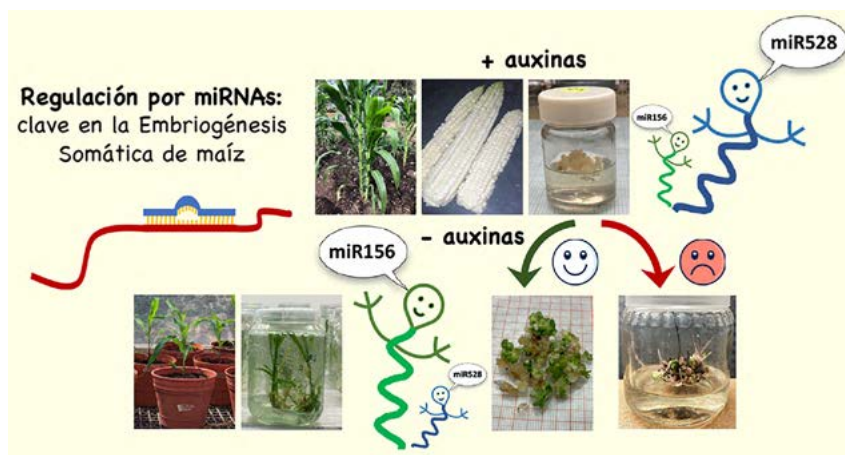
Se han descrito cambios importantes en la presencia de micro-RNA durante la inducción de callos embriogénicos para diferentes especies de plantas. Durante el desarrollo de un proyecto previo encontramos diferencias significativas en estos cambios cuando se utilizaban embriones cigóticos maduros en lugar de los de contaban con 15 días posteriores a la polinización, que es la temporalidad óptima para conservar el potencial embriogénico del tejido.³ Esto nos permitió proponer una batería de micro-RNA que podría resultar clave para orquestar la plasticidad de las células en la embriogénesis somática de maíz.⁴ En algunos ca-

3 Vasti T. Juárez-González, Brenda A. López-Ruiz, Patricia Baldrich, Eduardo Luján-Soto, Blake C. Meyers y Tzvetanka D. Dinkova, “The Explant Developmental Stage Profoundly Impacts Small rna-Mediated Regulation at the Dedifferentiation Step of Maize Somatic Embryogenesis”, *Scientific Reports*, 9 (2019): 14511. <https://doi.org/10.1038/s41598-019-50962-y>.

4 Brenda A. López-Ruiz, Vasti T. Juárez-González, Estela Sandoval-Zapotitla y Tzvetanka D. Dinkova. “Development-Related miRNA Expression and Target Regulation During Sta-

Los resultados confirman que también presentaban cambios significativos en el proceso de regeneración de plantas; sin embargo, no observamos una relación clara con la señalización hormonal por auxinas ni relación directa con la regulación de proteínas clave para el proceso de embriogénesis somática de maíz.

Figura 1
Embriogénesis somática del maíz



Fuente: Elaboración propia.

En el caso de la embriogénesis somática de maíz, inicia mediante la inducción de callos embriogénicos a partir de embriones inmaduros a los 15 días de polinización, en presencia de elevadas concentraciones de auxina. Una vez establecidos los callos, estos pueden proliferar aumentando la cantidad de tejido embriogénico mediante subcultivos periódicos en presencia de la auxina. Al retirar la auxina se promueve la regeneración de plantas. En este proyecto encontramos que la regulación por dos micro-RNA, miR528 y miR156, resulta clave para la etapa de callo embriogénico y regeneración de plantas, respectivamente. Al interrumpir su función (figura 1, flecha roja) el proceso se ve severamente comprometido.

gged in Vitro Plant Regeneration of Tuxpeno Vs-535 Maize Cultivar”, *International Journal of Molecular Sciences*, 20, 9 (2019): 2079. <https://doi.org/10.3390/ijms20092079>.

Durante el desarrollo de esta investigación, nos enfocamos en desentrañar la relevancia de dos micro-RNA en particular: miR528 y miR156. La función del primero es de especial interés porque se trata de un micro-RNA específico de plantas monocotiledóneas, como maíz, trigo, arroz, cebada y otras de gran interés agronómico, además de ser más abundante en los callos embriogénicos de maíz. Por otro lado, miR156 es un micro-RNA conservado en todas las plantas terrestres y ha sido descrito como regulador importante en la embriogénesis cigótica y el desarrollo temprano para varias especies. El comportamiento de los niveles de estos dos micro-RNA es opuesto durante la etapa de inducción de callos embriogénicos de maíz. Mientras que miR156 disminuye sus niveles, miR528 aumenta su acumulación, particularmente en la etapa de proliferación de los tejidos no diferenciados. Por otra parte, miR156 aumenta durante la etapa de regeneración de plantas, mientras que miR528 disminuye. Nuestro primer enfoque fue tratar de entender la repercusión de estos cambios en la expresión de genes diana de estos micro-RNA, debido a que solo es posible entender su función a través de la regulación de transcritos diana mediante su degradación o inhibición de la traducción.

Los transcritos diana para miR156 corresponden a miembros de algunas familias de factores de transcripción que regulan el desarrollo temprano o la respuesta a auxinas. Como hallazgo relevante, encontramos que la disminución de miR156 durante la inducción de callos embriogénicos de maíz corresponde con el incremento de los niveles de factores de respuesta a auxinas, que a su vez promueven la transcripción de otros genes. También demostramos que estos factores regulan a su vez la expresión de miR528, el micro-RNA más abundante en la etapa de callos embriogénicos. Es decir, encontramos una cadena de relación entre los dos micro-RNA que explica su comportamiento opuesto de acumulación. Estos datos nos permitieron proponer su regulación por las auxinas y su papel en la reprogramación de expresión genética necesaria para mantener un estado no diferenciado de los tejidos.⁵

Los elevados niveles de miR528 en la fase de inducción de callos embriogénicos para la embriogénesis somática de maíz se correlacionaron negativamente con los niveles de varios de sus transcritos diana, entre los cuales destacan un transportador de metabolitos, que incluye a las auxinas; una superóxidodismu-

5 Eduardo Luján-Soto, Paola I. Aguirre de la Cruz, Vasti T. Juárez-González, José L. Reyes, María de la Paz Sánchez y Tzvetanka D. Dinkova, "Transcriptional Regulation of zma-MIR528a by Action of Nitrate and Auxin in Maize", *International Journal of Molecular Sciences*, 23, 24 (2022): 15718. <https://doi.org/10.3390/ijms232415718>.

tasa que controla los niveles de especies reactivas de oxígeno, y un factor transcripcional involucrado en la respuesta a estrés nutrimental. También se demostró la regulación de miR528 mediante la inhibición de la traducción de otro transcrito diana involucrado en el transporte de electrones y el potencial redox de la célula. Dada la diversidad de funciones que corresponde a estos transcritos diana, la regulación por miR528 afecta varios procesos fisiológicos de la célula, mientras que miR156 incide principalmente en la transcripción de genes. De manera interesante, se encontró que entre la fase de callos embriogénicos y la regeneración de plantas se redujeron los niveles de miR528 y aumentaron los de sus transcritos diana. Esto permitió proponer que miR528, el micro-RNA más abundante en los callos embriogénicos de maíz, funciona como un regulador versátil para diferentes genes en la etapa de callos embriogénicos de maíz en proliferación.⁶

Ahora bien, aunque ya habíamos seguido la cadena de regulación mediada por miR156 y miR528 en el proceso de embriogénesis somática, seguía sin resolverse una pregunta crucial: ¿qué tan importante resulta para el proceso la regulación mediada por estos micro-RNA? Para poder responder esta pregunta era necesario apagar la función de cada micro-RNA y observar las consecuencias. Existen diversas herramientas biotecnológicas que permiten la mutación de genes y la evaluación de las mutantes obtenidas; sin embargo, en el caso de los micro-RNA, es común que varios genes diferentes produzcan el mismo micro-RNA maduro, por lo que para inhibirlos es necesario interferir con la secuencia de 21 nt que funciona como reguladora. Para lograrlo, se introducen imitadores de los transcritos diana que pueden secuestrar a los micro-RNA, de manera que impiden el reconocimiento de sus transcritos diana e incluso disminuyen sus niveles celulares mediante degradación. Aprovechando esta tecnología de imitadores, fue posible secuestrar miR528 o miR156, propiciando el incremento en la acumulación de sus dianas en los callos embriogénicos de maíz.

El secuestro de miR528 provocó una disminución significativa en la proliferación de callos, lo que produjo mayores niveles de oxidación y muerte celular. Aunque los pocos callos que presentaron viabilidad fueron capaces de regenerar plantas, su número fue reducido respecto a los callos silvestres. Por otra parte, el secuestro de miR156 inhibió totalmente la regeneración de plantas, con lo

6 Eduardo Luján-Soto, Vasti T. Juárez-González, José L. Reyes y Tzvetanka D. Dinkova, "MicroRNA Zma-miR528 Versatile Regulation on Target mRNAs during Maize Somatic Embryogenesis", *International Journal of Molecular Sciences*, 22, 10(2021): 5310. <https://doi.org/10.3390/ijms22105310>.

que se confirma que su actividad reguladora es crucial para completar el ciclo del proceso de embriogénesis somática. También se confirmó que al menos un transcrito diana de cada uno de los miRNA presentaba incremento significativo en presencia del secuestrador correspondiente; sin embargo, en cada caso es necesario ampliar el abanico de transcritos analizados para comprender mejor los fenotipos observados. Por otra parte, se podría utilizar una expresión temporal inducida de los secuestradores para evitar los fenotipos drásticos que fueron observados en este estudio.

Esta investigación fue posible porque podemos cultivar in vitro el maíz en el laboratorio y observar las diferentes etapas de desarrollo en un modelo llamado embriogénesis somática. Uno de los propósitos a futuro es analizar la acumulación de micro-RNA y transcritos diana relevantes en las respuestas a estrés y desarrollo para diferentes variedades mexicanas de maíz, de manera que se puedan relacionar con la tolerancia a cambios ambientales adversos. Dado que los micro-RNA actúan sobre el intermediario de la expresión genética (el RNA mensajero), pueden tener un gran potencial para ser usados como herramientas biotecnológicas promotoras de la embriogénesis somática en plantas, sin la necesidad de recurrir a la modificación genética. En este sentido, no sería necesaria una transformación en el dna, pues la secuencia del micro-RNA maduro puede ser llevada al interior de las células mediante nanoacarreadores o virus modificados.