







The mutation of the *MIR867* gene causes seed abortion and affects fruit size in the model plant *Arabidopsis thaliana*

La mutación del gen *MIR867* provoca aborto de semillas y afecta el tamaño del fruto en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*

Yemitzel Camarero-Arellano¹, Jesús Agustín Badillo-Corona¹, Andrea Tovar-Aguilar², Noé Valentín Durán-Figueroa^{1*}

¹Laboratorio de Biotecnología Molecular. Unidad Profesional Interdisciplinaria de Biotecnología. Instituto Politécnico Nacional. Ciudad de México, Mexico

²Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad (Langebio), Unidad de Genómica Avanzada, CINVESTAV-IPN. Irapuato, Guanajuato, Mexico

*Corresponding author

E-mail address: nduranf@ipn.mx (N. V. Durán-Figueroa).

Article history:

Received: 18 December 2023 / Received in revised form: 1 March 2024 / Accepted: 9 March 2024 / Published online: 1 April 2024.

<https://doi.org/10.29267/mxjb.2024.9.2.1>

ABSTRACT

MIR genes are genes that give rise to microRNAs (miRNAs), which are small RNAs that regulate key developmental processes such as flowering and embryogenesis. Little is known about its role in the formation of gametes, seeds and fruits. This work demonstrates that the activity of the promoter of the *MIR867* gene has a specific expression pattern in male tissue during flower development. Using two T-DNA insertional mutants, a reduction in fruit size (siliques) in length and thickness, and semi-sterility phenotype was demonstrated. To find the cellular reason for the semi-sterility, the Alexander staining technique of pollen grains was used observing that there is defective pollen in the mutant lines. This study is the first report that relates the MIR gene with fruit formation and semi-sterility if seeds in the model plant *Arabidopsis thaliana*.

Keywords: Plant miRNAs, Seed formation, fertilization in plants, insertional lines.

RESUMEN

Los genes MIR son genes que dan lugar a los microRNAs (miRNAs), los cuales son RNAs pequeños que regulan procesos fundamentales del desarrollo como la floración y la embriogénesis. Poco se sabe de su papel en la formación de gametos, de semillas y frutos. Este trabajo demuestra que la actividad del promotor del gen *MIR867* es de expresión específica en tejido masculino. Usando dos mutantes insercionales de T-DNA, se demostró una reducción en el tamaño del fruto (silicuas) en lo largo y en el grosor, y semi esterilidad. Para encontrar la razón celular de la semi esterilidad, se usó la técnica de tinción de Alexander de granos de polen, observando que existe polen defectuoso en las líneas mutantes. Este estudio es el primer reporte que relaciona un gen *MIR* con formación de fruto y la semi-esterilidad de semillas de la planta modelo *Arabidopsis thaliana*.

Palabras clave: miRNAs de plantas, formación de semillas, fecundación en plantas, líneas insercionales.

1. INTRODUCCIÓN

La reproducción sexual de las plantas con flores (angiospermas) da lugar a la formación de semillas y de fruto, dos de las principales fuentes nutrimentales para el ser humano. El crecimiento poblacional mundial, combinado con las consecuencias del cambio climático en la agricultura, representan un problema a resolver desde el punto de vista agroalimentario. Este problema se puede combatir optimizando e incrementando los rendimientos de los cultivos haciendo uso de herramientas biotecnológicas adecuadas (Moore *et al.*, 2021). Un método ampliamente usado en la mejora de cultivos es generar plantas llamadas *dobles haploides*, se ha demostrado que esta técnica que combina la genética con la biotecnología es de gran utilidad para fijar rasgos fenotípicos específicos en cortos periodos de tiempo; esta técnica puede hacerse *in vivo* y la meta es producir embriones haploides mediante la polinización aberrante usando polen muerto o inviable, este método estimula al ovulo para formar un embrión haploide sin fecundación (partenogénesis) y de esta forma, generar plantas homocigotas en la primer generación. Por esta razón, encontrar plantas mutantes masculinas es importante para generar plantas dobles haploides (Seguí-Simarro *et al.*, 2021).

Otra estrategia biotecnológica enfocada en la mejora de cultivos es primero, descubrir la función de genes involucrados en la reproducción sexual para después, evaluar su uso en la mejora de semillas. Por ejemplo, estudios funcionales sobre los microRNAs (miRNAs) en la planta modelo *Arabidopsis thaliana* demuestran que la sobre-expresión del miR408, incrementa el rendimiento de las semillas y en general, la biomasa de la planta (Song *et al.*, 2018); por otro lado, en Arroz el miR397 está relacionado en el rendimiento del grano mientras que miR156 puede promover la floración y el desarrollo de raíces y hojas en *Arabidopsis* y *Zea mays* (Dong *et al.*, 2022), demostrando así que el uso de miRNAs es una alternativa para la mejora y rendimiento de semillas.

Los microRNAs (miRNAs) son RNAs pequeños no codificantes de entre 18 y 25 nucleótidos de longitud (Li & Yu, 2021). En plantas, actúan como reguladores esenciales

de la expresión genética y están implicados en multitud de procesos de desarrollo y fisiológicos, tales como la morfogénesis de las hojas, transición juvenil-adulto, floración, vigor de las semillas, asimilación de nutrientes, así como la respuesta a estrés biótico y abiótico (Jin *et al.*, 2022; Dong *et al.*, 2022). El mecanismo de acción de los miRNAs depende de la complementariedad de secuencias con un RNA mensajero (mRNA) al cual se unen; con la ayuda de una proteína ARGONAUTA (AGO) que tiene actividad de nucleasa, escinden el mRNA o interrumpen su traducción a proteína. Los genes *MIR* que dan lugar a los miRNAs, están distribuidos en todo el genoma, preferentemente localizados entre genes que codifican para proteínas, pero también se pueden alojar en intrones (Leitao & Enguita, 2022). A la fecha, se sabe que todos los genes *MIR* son transcritos por la RNA Polimerasa II (RNA Pol II) la cual generará transcritos de entre 50 y 500 nt de longitud, los cuales se pliegan sobre si mismos, para formar horquillas tipo stem-loop llamados miRNAs primarios (pri-miRNAs). La transcripción de los genes *MIR* es el primer paso de la biogénesis de miRNAs (Rivera-Gutiérrez & Duran-Figueroa, 2022). Una vez formado, el pri-miRNA es procesado por un complejo enzimático donde una RNasa llamada Dicer-like 1 (DCL1), hace dos cortes que dan lugar primero al pre-miRNA y después a RNA de doble cadena (dúplex) de 21 nt de tamaño, el cual representa el miRNA maduro. El dúplex es metilado por la enzima HUA ENHANCER (HEN1: S-adenosyl-L-methionine-dependent RNA methyltransferase) para finalmente, el miRNA ser exportado por la enzima HASTY (HST) y la proteína TREX-2 al citoplasma (Zhang *et al.*, 2020). Una cadena del dúplex miRNA es cargada por la proteína AGO, donde el miRNA guía hacia su mRNA blanco, al cual se unirá por complementariedad de secuencias y así inhibir la expresión del gen (Wang *et al.*, 2019; Gao *et al.*, 2021).

Por otro lado, las semillas abortadas en las angiospermas representan un mecanismo normal y benéfico que tienen las plantas para mejorar la calidad de la progenie (Chen, 2022; Li *et al.*, 2016). El aborto puede producirse antes de la fecundación, debido a la presencia de óvulos senescentes y a la presencia de granos de polen defectuosos como consecuencia de factores reproductivos o fisiológicos. Posterior a la fecundación, los abortos pueden ser ocasionados por deficiencias nutrimentales o estrés abiótico, como incremento o disminución de temperatura o incluso afectaciones directas en la embriogénesis (Shen *et al.*, 2018). En nuestro grupo de trabajo, hemos estudiado el papel que pueden tener los miRNAs en la reproducción sexual de las plantas (Tovar-Aguilar *et al.*, 2023), particularmente aquellos de expresión específica en gametos masculinos o femeninos con miras a descubrir si pueden ser usados como genes de mejora a través de estrategias de biotecnología vegetal. En este trabajo reportamos que, mutaciones T-DNA que afectan la expresión del miR867 en la planta modelo *Arabidopsis thaliana*, tienen un efecto en la reducción del tamaño de fruto y provocan aborto de semillas, se muestra que el efecto de semiesterilidad puede ser debido a una esterilidad masculina, abriendo así la puerta para explorar nuevas funciones de genes para aplicaciones biotecnológicas como la generación de plantas dobles haploides.

2. MATERIALES Y MÉTODOS

2.1. Material vegetal y condiciones de cultivo

Se utilizaron semillas de *Arabidopsis thaliana* ecotipo Col-0 adquiridas en el instituto SALK (Alonso *et al.*, 2003), las cuales tienen una inserción de ~795 nucleótidos en el promotor del gen *MIR867* en la posición 11375330 del cromosoma 4 (SALK_072076; nombrado *mir867-1* en este artículo) y en la posición 11375335 (SALK_120221; nombrado *mir867-2* en este artículo) del mismo cromosoma. Las semillas se desinfectaron utilizando cloro gaseoso, de acuerdo con el protocolo reportado por Rivera-Gutiérrez *et al.* (2022). Brevemente, las semillas se colocaron en tubos para microcentrífuga en una gradilla dentro de un desecador, junto con un vaso de precipitados conteniendo 200 mL de hipoclorito de sodio comercial. Se adicionaron 3 mL de HCl a la solución de hipoclorito, y el desecador fue sellado con papel Parafilm. El Cl₂ generado en el desecador, actuó por 4 horas y las semillas se utilizaron para ser sembradas en cajas Petri de 90 x 15 mm, conteniendo medio MS sólido de la marca Sigma-Aldrich suplementado con de sacarosa (30 g/L), pH 5.7. Después de 12 días en cámara de incubación a 25 °C, 50 % de humedad, fotoperiodo de 16 horas luz (7000 lux) y 8 horas de oscuridad, las plántulas se trasplantaron a macetas de 11 x 8 x 5 cm conteniendo una mezcla de Peat moss (no estéril), vermiculita y perlita (relación 3-1-1) suplementado con 0.5 gramos de fertilizante 15x15x15. Las plantas en maceta se desarrollaron en ambiente controlado de 50% de humedad, 25 °C, un fotoperiodo de 16 horas luz y 8 horas oscuridad y se fertilizaron con 0.5 gramos del mismo fertilizante cada 15 días hasta la cosecha de semillas.

2.2. Genotipificación de líneas SALK

Las semillas adquiridas en el instituto Salk se crecieron y desarrollaron en tierra para la extracción de DNA genómico y realizar el rastreo de plantas homocigotas. Los oligonucleótidos (oligos) utilizados para la genotipificación se presentan en la Tabla S1. Se llevaron a cabo dos amplificaciones por la técnica de PCR para lo cual, se utilizaron los siguientes oligos RP, LB, y un oligo universal BP, diseñados por la herramienta “iSect primer design tool” disponible y recomendado por el instituto Salk en SIGnAL: signal.salk.edu/isects.html (Alonso *et al.*, 2003). LP + RP amplifica un segmento de ~1208 pares de bases (pb), correspondiente al gen más un segmento del DNA que incluye el promotor, mientras que RP + BP amplifica un fragmento de ~550-850 pb que corresponden al T-DNA más el gen MIR.

2.3. Cuantificación de semillas

Para el conteo de semillas se utilizó la quinta silicua de cada planta. Las silicuas se disectaron con ayuda de jeringas de insulina y se observaron utilizando un estereoscopio Leica modelo MEB115. Se contabilizó el número de semillas aberrantes por silicua y se consideró como semilla aberrante las que fenotípicamente eran más pequeñas, y amarillas en comparación con la silvestre.

2.4. Extracción de DNA

Se recolectó una hoja de roseta y se colocó dentro de un tubo para micro centrífuga de 1.5 mL. Se adicionaron 300 µL de una solución de CTAB (Tris-HCl 50 mM pH=8, NaCl 0.7 M, EDTA 10 mM, CTAB de 2% v/v; estéril) para macerarse con un pistilo de plástico estéril. Se incubó por diez minutos a 65 °C y se mezcló por inversión ocasionalmente. Se

adicionaron 300 μL de cloroformo y se mezcló en vórtex para centrifugar por 5 minutos a 12100 g. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo, y se le adicionó 1 μL de RNasa A de la marca Thermo Fisher Scientific para incubarse por 15 minutos a 37 °C. Se adicionaron 300 μL de isopropanol y se mezcló por inversión. Se incubó por una hora a temperatura ambiente y se centrifugó a 12100 g por 20 minutos. Se descartó el sobrenadante y se lavó el pellet con 500 μL de etanol al 70%. Se centrifugó por 3 minutos a 12100 g y se descartó el sobrenadante para dejar secar el pellet a temperatura ambiente. Finalmente, el pellet se resuspendió en 30 μL de agua estéril, para ser almacenado a -20 °C hasta ser utilizado.

2.5. Extracción de RNA

Con la ayuda de un estereoscopio, se disectaron 20 anteras de flores de *Arabidopsis*, las cuales se congelaron con nitrógeno líquido para ser pulverizadas en mortero con pistilo. Se adiciono 1 mL de Trizol, y la mezcla se transfirió a tubos para microcentrifuga de 1.5 mL. Se agregaron 200 $\mu\text{L}/\text{mL}$ de cloroformo, y los tubos se centrifugaron a 12100 g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se transfirió a tubos nuevos y se les añadieron 500 μL de isopropanol, y se incubaron a -70 °C por 30 min. Posteriormente, los tubos se centrifugaron a 7200 g por 15 min a 4 °C. El sobrenadante se descartó, y el RNA se resuspendió en 20 μL de agua tratada con DEPC (1 mL/L de agua). El RNA se almacenó a -70 °C hasta ser utilizado.

2.6. Cuantificación de miR867 usando qRT-PCR

La cuantificación se llevó a cabo mediante la estrategia descrita por Varkonyi-Gasic & Hellens (2011). Para ello, se diseñó un oligonucleótido de tipo stem-loop y dos oligos adicionales para la amplificación por PCR (Tabla S1). Se utilizó 1 μg de RNA de anteras para realizar los RT-PCR correspondientes, el cual se incubó con el oligo del tipo stem-loop a 65 °C por 10 minutos, seguido de una retro transcripción utilizando 50 U de retro transcriptasa RevertAid (Thermo Fisher EP0441), con la cual se incubó la mezcla de reacción por 60 minutos a 42 °C para obtener el cDNA. Posteriormente, se realizó la amplificación por PCR (Taq DNA Polymerase Máster Mix RED marca AMPLIQON-52003001250), y se utilizó 1 μL del producto de PCR para su visualización en un gel de agarosa al 1 %. Finalmente, los niveles de expresión de miR867 se determinaron mediante RT-qPCR, para lo cual, se utilizó 1 μL de cDNA, 5 μL de Master Mix (Maxima SYBR Green/ROX K0221), 5 pmol de oligo forward y 5 pmol de oligo reverse en un termociclador illumina Eco Real-Time PCR System 101018. Se realizaron tres réplicas técnicas, y los niveles de expresión relativos se analizaron mediante el método de CT comparativo (Schmittgen & Livak, 2008). Como referencia, se utilizó el miR161.

2.7. Tinciones de GUS

Se utilizaron inflorescencias de plantas transgénicas que contienen la fusión transcripcional *MIR867pro::GUS* de *Arabidopsis thaliana* (Tovar Aguilar *et al.*, 2023) Los tejidos vegetales se incubaron por 48 horas a 37 °C en una solución de tinción GUS (1 mg/mL de x-gluc [ácido 5-bromo-4-cloro-3-indolil- β -D-glucurónido] en 50 mM de buffer de fosfatos pH 7.4, 5 mM K4Fe (CN) 6, 5 mM K3Fe (CN)6, 0.1% Tritón X-100).

Posteriormente, los tejidos se sometieron a una serie de lavados con etanol al 70% (v/v) durante 5 días, reemplazando la solución de lavado cada 24 horas. Finalmente, se observaron en un estereoscopio Leica modelo MEB115 para los experimentos correspondientes.

2.8. Ensayos de viabilidad del polen por tinción de Alexander

Se recolectaron granos de polen de flores en etapas 12-13 del desarrollo y se analizaron mediante el método modificado de tinción de Alexander descrito por Peterson *et al.* (2010). Los granos de polen recolectados se colocaron sobre portaobjetos y protegidos por un cubreobjetos. Con ayuda de una micropipeta, por una arista del cubreobjetos se adicionó la solución de teñido (se prepara en este orden: 1 mL de etanol al 95 %, 100 µL de verde malaquita al 1 % disuelto en etanol al 95 %, 5 mL de agua destilada, 2.5 mL de glicerol, 500 µL de Fucsina ácida al 1 % v/v, 50 µL de Orange G al 1 % v/v, 400 µL de ácido acético glacial, 450 µL de agua destilada). La muestra fue sellada por la periferia del cubreobjetos para ser incubada toda la noche, previo a su observación al microscopio. Los granos teñidos de fucsia-rojo son viables. Los granos teñidos de verde-azul o vanos son inviables.

2.9. Clasificación de flores de *A. thaliana* en etapas de desarrollo

Las flores de *A. thaliana* se clasificaron de acuerdo con las etapas del desarrollo reportadas por Álvarez-Buylla *et al.* (2010). Aquí las describimos someramente. Etapa 1: existen señales de inicio de formación de primordios; Etapa 2: el primordio crece y aumenta de volumen en sus tres dimensiones; Etapa 3: el primordio del sépalo se hace visible y comienza a aparecer el pedicelo; Etapa 4: se alarga el pedicelo y la flor continúa engrosando; Etapa 5: los primordios de pétalos y estambres son visibles, y da inicio la formación del gineceo; Etapa 6: los sépalos crecen y cubren los estambres, mientras que ya es visible el segundo par de estambres, así como el gineceo; Etapa 7: aparecen los filamentos de los estambres mientras que los pétalos aún están pequeños; Etapa 8: los lóculos de las anteras son visibles y los pétalos comienzan a crecer; Etapa 9: los pétalos se elongan y todos los órganos crecen, incluyendo la aparición de las glándulas nectarinas y el crecimiento de los estambres; Etapa 10: los pétalos alcanzan el tope superior y aparecen las papilas en el gineceo; Etapa 11: las papilas estigmáticas se desarrollan; Etapa 12: los sépalos se abren, mientras que los pétalos y el gineceo se alargan al mismo tiempo; Etapa 13: El estigma es receptivo, los pétalos emergen de la flor, los estambres superan al gineceo, y comienzan los eventos de autopolinización; Etapa 14: inicia el desarrollo de las silicuas y de las semillas, por lo que a esta etapa se le conocen como “etapa cero después de la floración (0 HAF: hours after flowering)”; Etapa 15: el estigma supera las anteras, el xilema se lignifica, e inicia la senescencia de la flor; Etapa 16: la silicua crece, mientras que los sépalos y pétalos se marchitan; Etapa 17: la silicua crece hasta maduración; Etapa 18: la silicua se torna amarilla; Etapa 19: la silicua se abre; Etapa 20: las semillas están maduras.

2.10 Análisis *in silico* de genes blanco

Se utilizó la base de datos de “The *Arabidopsis* information Resource (TAIR, www.arabidopsis.org)” para obtener la secuencia del miR867 maduro así como del gen

completo (TAIR 2024, Locus ID: AT4G21362). La secuencia del miRNA maduro se usó para identificar los genes blanco mediante el servidor “psRNATarget: A Plant Small RNA Target Analysis Server” desarrollada por el grupo de Dai *et al.* (Dai *et al.*, 2018). Posteriormente, para determinar la interacción nucleotídica miRNA-mRNA, se usó el programa bioinformático TAPIR (Bonnet *et al.*, 2010). Para determinar la expresión de los genes blanco se usó el algoritmo ePlant (Waese *et al.*, 2017).

3. RESULTADOS

3.1. El promotor del gen *MIR867* tiene actividad específica en tejido masculino de *Arabidopsis*

Para determinar dónde y cuándo se expresan los genes *MIR* que pudieran estar asociados en la reproducción sexual, previamente nuestro grupo de trabajo generó líneas transgénicas con diferentes fusiones transcripcionales donde el monitoreo del gen *uidA* (GUS) permite encontrar el patrón de expresión (Tovar-Aguilar *et al.*, 2019). El análisis detallado en diferentes estados de desarrollo floral de la línea transgénica *MIR867*pro::GUS, mostró una expresión específica en anteras entre las etapas 8 y 14 del desarrollo de la flor descritas en la sección 2.9, indicando que la región reguladora (promotor) dirige la expresión del *MIR867* de una manera específica en tejido masculino (Fig. 1). El patrón de expresión encontrado, sugiere que el gen *MIR867* puede tener una función asociada en la formación de la antera y/o en el grano de polen.

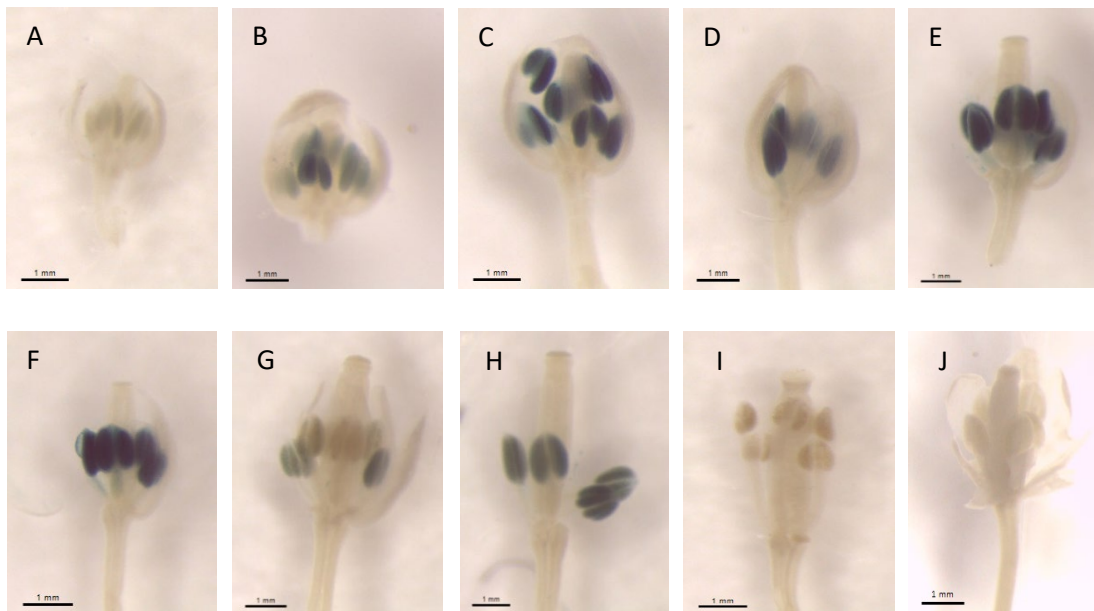


Fig. 1. Expression pattern of miR867 in *Arabidopsis thaliana* flowers. (A-I): Lines expressing the miR867::GUS cassette. A, stage 7 of flower development without expression of the promoter. B-H, stages 8-14 showing promoter expression. I), stage 15 showing absence of promoter expression. J) Inflorescence of a wild type plant at stage 11.

Fig. 1. Patrón de expresión del gen *MIR867* en flores de *Arabidopsis thaliana*. (A-I): Líneas que expresan el casete de miR867::GUS. A, etapa 7 del desarrollo de la flor sin mostrar expresión del promotor. B-H, etapas 8-14 mostrando expresión del promotor. I), etapa 15 mostrando ausencia de expresión del promotor. J) Inflorescencia de una planta del tipo silvestre en etapa 11.

3.2. Identificación de plantas homocigotas en la colección de mutantes insercionales de T-DNA

Una vez demostrado que el *MIR867* tiene actividad en tejido masculino, para elucidar su función, se utilizaron líneas insercionales de T-DNA generadas por el Instituto Salk (Alonso *et al.*, 2003). Con el objetivo de utilizar plantas homocigotas en los experimentos de la caracterización del fenotipo, se realizó un rastreo de las semillas, las cuales cuentan con una inserción de T-DNA en el promotor del gen *MIR867* (Fig. 2A). El sitio de inserción del T-DNA para las líneas *mir867-1* y *mir867-2* se encuentra 32 y 24 pb río arriba del primer nucleótido en posición 5' del pri-miRNA que codifica para el miRNA maduro miR867, respectivamente. Se realizaron dos amplificaciones por PCR, la primera amplificó una región del gen *MIR867*, mientras que la segunda amplificó el T-DNA insercional. Las plantas que contenían la inserción no presentaron amplicón en la primera PCR, mientras que las de tipo silvestre sí. De manera inversa, en la segunda PCR, las plantas que contenían la inserción presentaron un amplicón, mientras que las plantas del tipo silvestre no. Los resultados de las dos amplificaciones sirvieron para identificar las plantas con genotipo insercional homocigoto (Fig. 2B). Para demostrar la ausencia de expresión del microRNA maduro miR867, se realizaron ensayos semicuantitativos y cuantitativos mediante RT-qPCR, ambos alelos mutantes mostraron una reducción en los niveles de expresión de miR867 con respecto a la línea silvestre (Fig. 2C y 2D). Los datos obtenidos por RT-qPCR mostraron una disminución del 62.12% para la línea insercional *mir867-1* y del 87.97% para la línea *mir867-2* con respecto a la línea silvestre (Fig. 2D). Por lo tanto, estas líneas Salk se pueden usar para caracterizar el fenotipo con disminución de la de expresión del gen.

3.3. La disminución de la expresión del miR867 afecta el tamaño del fruto y provoca semillas abortadas

El tamaño de las plantas obtenidas fue similar a las del tipo silvestre, pero se observaron silicuas anormales. Para determinar los efectos fenotípicos que tiene la interrupción del gen *MIR867* durante la formación de semillas, se caracterizó el tamaño de fruto (silicua) y se cuantificó el porcentaje de semiesterilidad (semillas abortadas). Las dimensiones de la silicua mostraron una reducción significativa en el tamaño. El largo de la silicua para *mir867-1* fue 41.1 % menos que la del tipo silvestre y 34.9 % menos, para *mir867-2*, mientras que el ancho fue 15.5 % y 13.43 % menos, respectivamente (Figs. 3A-3B). El análisis fenotípico en la disección de las silicuas mostró que solo las plantas que contenían la inserción de T-DNA presentaban un porcentaje de semillas abortadas o aberrantes: 15.9% para *mir867-1* y 27.1% para *mir867-2*, el fenotipo fue estable en 5 generaciones (Fig. 3C). Para determinar la posible razón de las semillas abortadas y, dado que el gen no mostró expresión en tejido femenino, se evaluó la viabilidad del polen mediante la tinción de Alexander, como se observa en la Figura 3D se detectaron granos de polen

colapsados (de las fotos analizadas, el 26.95 %). Por todo lo anterior, la disminución de la expresión del miR867 afecta la formación de semillas, muy probablemente debido a la viabilidad del polen.

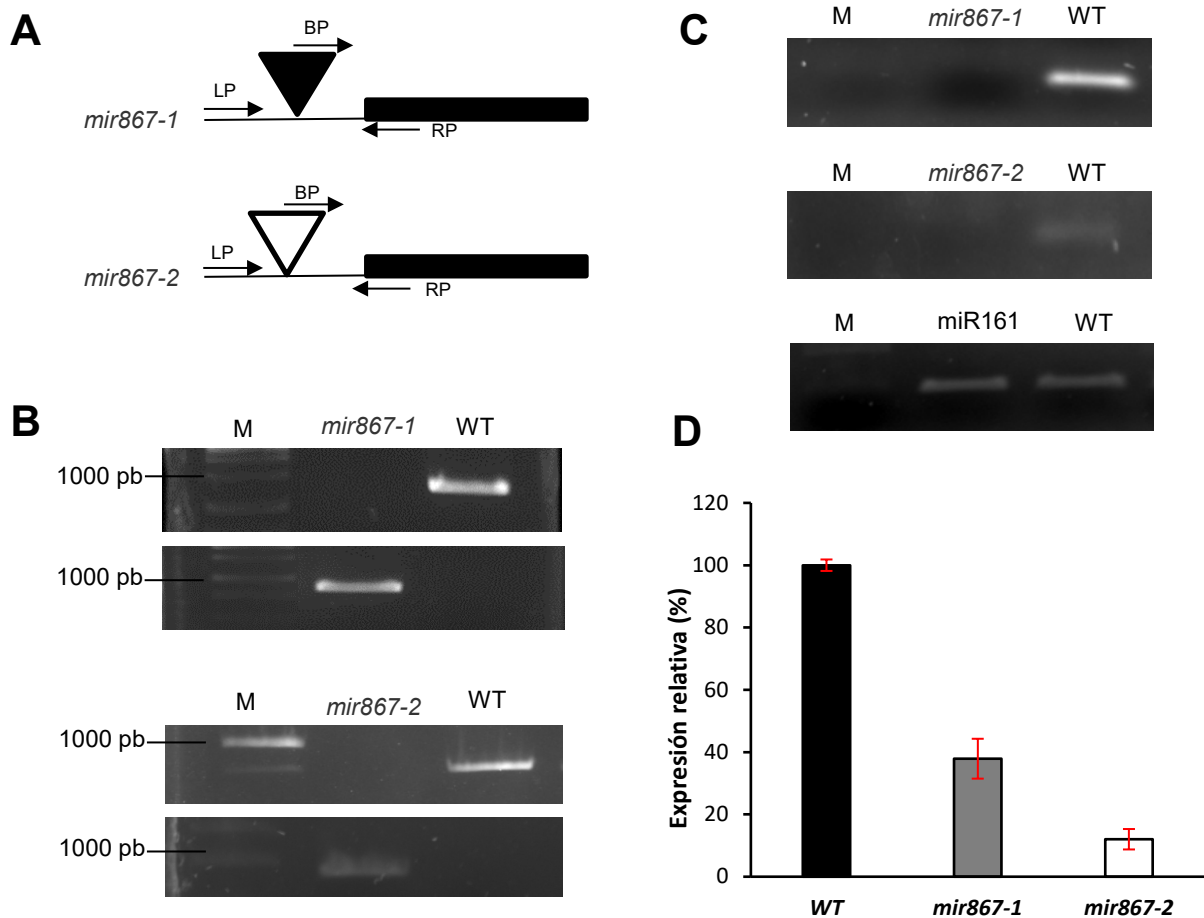


Fig. 2. Genotyping of miR867 insertional lines. A) Insertion map of *mir867-1* and *mir867-2* mutant lines. The black band refers to miR867, the thin horizontal line corresponds to the gene promoter and the inverted triangles indicate the T-DNA insertion site (Image designed based on the annotation hosted at <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). B) PCR amplifications (from gDNA) that identifies homozygous miR867 lines. The top panel corresponds to *mir867-1*, while the bottom panel corresponds to *mir867-2*. C) Semiquantitative RT-PCR of lines *mir867-1* (upper gel) and *mir867-2* (middle gel). miR161 was used as a control (bottom gel). D) Relative expression of miR867 in wild-type and mutant plants (at least three biological replicates were used).

Fig. 2. Genotificación de líneas insercionales de miR867. A) Mapa de inserción de líneas mutantes *mir867-1* y *mir867-2*. La banda color negra hace referencia al miR867, la línea horizontal delgada corresponde al promotor del gen y los triángulos invertidos señalan el lugar de la inserción del T-DNA (Imagen diseñada en base a la anotación alojada en <http://signal.salk.edu/cgi-bin/tdnaexpress>). B) Amplificaciones por PCR (a partir de gDNA) que identifican líneas homocigotas de miR867. El panel superior corresponde a *mir867-1*, mientras que el panel inferior a *mir867-2*. C) RT-PCR semicuantitativo de las líneas *mir867-1* (gel superior) y *mir867-2* (gel intermedio). Como control se utilizó el miR161 (gel inferior). D) Expresión relativa del miR867 en plantas silvestres y mutantes (al menos tres replicas biológicas fueron utilizadas).

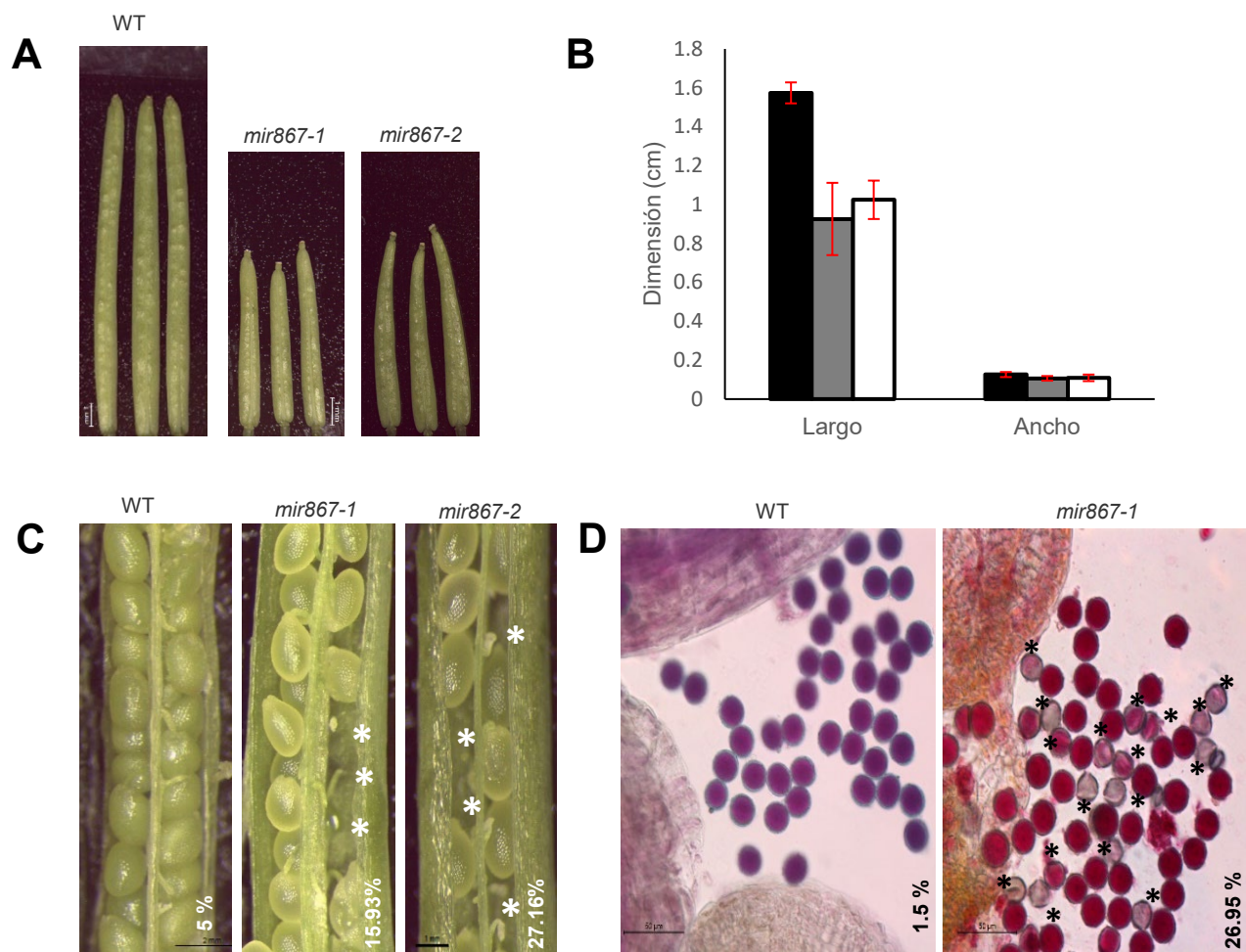
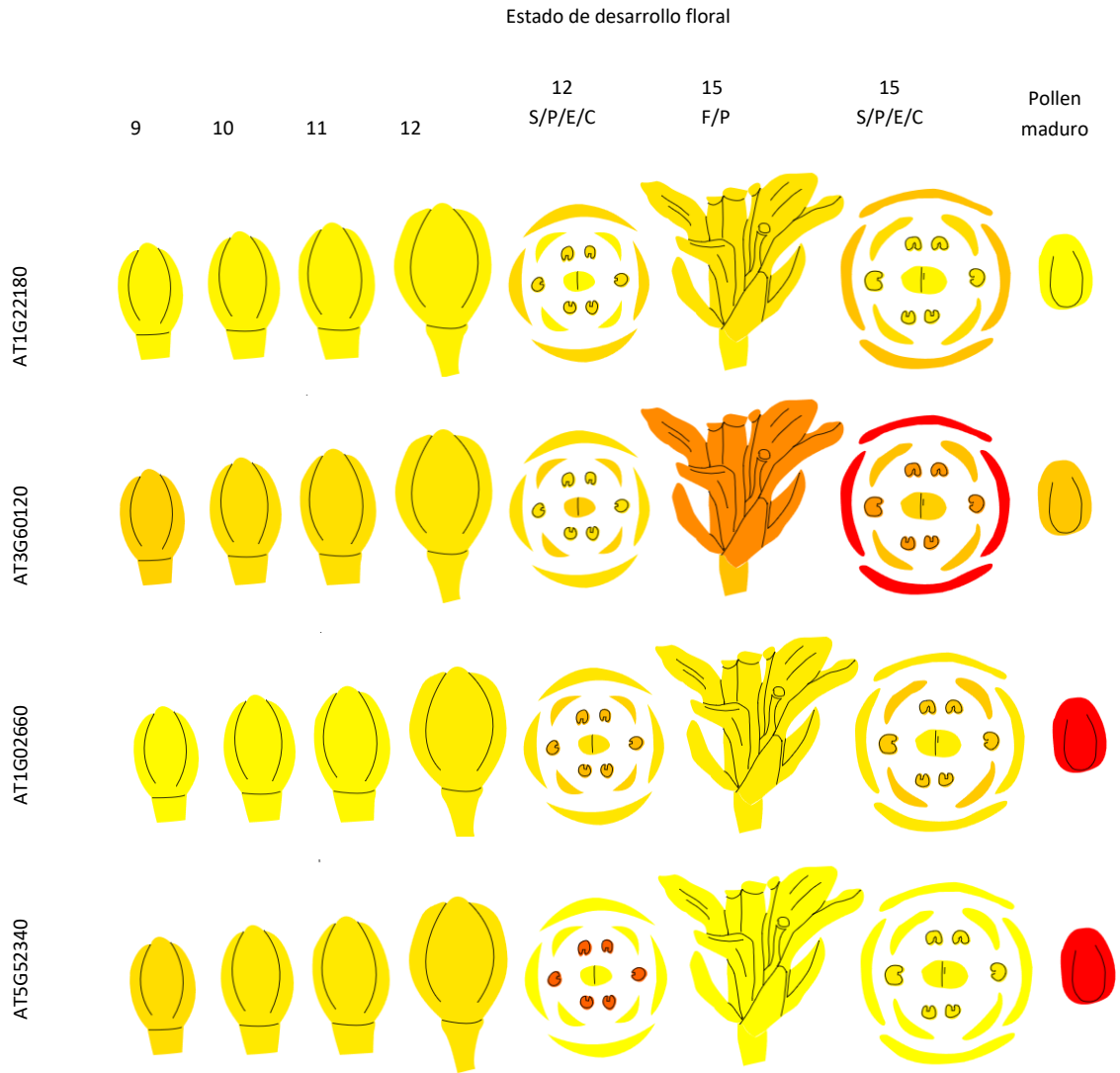


Fig. 3. Phenotypic characterization of insertional lines presenting decreased expression of miR867. A) Comparison of fruit size between wild and mutant plants. B) Quantification of fruit size. Black bars, WT; gray bars, *mir867-1*; white bars, *mir867-2* (ANOVA: $n=9$, $\alpha=0.05$, $SD=0.053$, 0.185, 0.098, 0.013, 0.011, 0.016, respectively). C) Interior of the siliques showing the percentage of aborted seeds. Asterisks indicate the positions of aborted seeds with respect to the WT (ANOVA: $n=18$, $\alpha=0.05$, $SD_{mir867-1}=7.6$ and $SD_{mir867-2}=2.7$). D) Pollen grains stained with Alexander's solution. The left panel shows pollen grains from wild plants, while the right panel shows pollen grains from the insertional lines (ANOVA: $n=5$, $\alpha=0.05$, $SD=5.81$).

Fig. 3. Caracterización fenotípica de líneas insercionales que presentan disminución de la expresión del miR867. A) Comparativa del tamaño de fruto entre plantas silvestres y las mutantes. B) Cuantificación del tamaño de fruto. Barras negras, WT; barras grises, *mir867-1*; barras blancas, *mir867-2* (ANOVA: $n=9$, $\alpha=0.05$, $SD=0.053$, 0.185, 0.098, 0.013, 0.011, 0.016, respectivamente). C) Interior de las silicuas mostrando el porcentaje de semillas abortadas. Los asteriscos indican las posiciones de semillas abortadas con respecto a la WT (ANOVA: $n=18$, $\alpha=0.05$, $SD_{mir867-1}=7.6$, y $SD_{mir867-2}=2.7$). D) Granos de polen teñidos con

solución de Alexander. El panel izquierdo muestra granos de polen provenientes de plantas tipo silvestre mientras que el derecho muestra granos de polen de las líneas insercionales (ANOVA: n=5, $\alpha=0.05$,



SD=5.81).

Fig. 4. In silico expression pattern of miR867 candidate target genes. From the 4 candidate genes with the highest miRNA-mRNA interaction score, the genes AT1G22180, AT3G60120 and AT1G02660 show low expression in anthers, while the gene AT5G52340 shows expression in anthers at floral development stage 12. The yellow color means low or no expression, while the orange-red high level of expression (image generated and modified from <https://bar.utoronto.ca>). S=Sepals, P=Petals, E=Stamen, C=Carpel, F=Flower.

Fig. 4. Patrón de expresión *in silico* de genes blanco candidato del miR867. De los 4 genes candidato con mayor puntaje de interacción miRNA-mRNA, los genes AT1G22180, AT3G60120 y AT1G02660 presentan baja expresión en anteras, mientras que el gen AT5G52340 se aprecia expresión en anteras en el estado

de desarrollo floral 12. El color amarillo significa baja o nula expresión, mientras el naranja-rojo nivel alto de expresión (imagen generada y modificada de <https://bar.utoronto.ca>). S=Sépalos, P=Pétalos, E=Estambre, C=Carpelo, F=Flor.

3.4 Identificación *in silico* de genes blanco del miR867

Para determinar *in silico* los posibles genes blanco del miR867, se usó la plataforma psRNATarget así como la plataforma TAPIR para determinar la interacción mRNA-miRNA. Derivado de este análisis, se seleccionaron los primeros 4 genes categorizados con los parámetros de mayor interacción de hibridación miRNA-mRNA (Puntaje esperado de 2.5-3), estos son: 1) AT1G22180: familia de proteínas de transferencia de fosfatidilinositol similar a Sec14p, 2) AT3G60120: β -glucosidasa 27 (BGLU27), 3) AT1G02660: Lipasa de Plastidio 2 (PLIP2) y, 4) AT5G52340: subunidad del exociste proteína A2 de la familia *exo70*, exociste A2 (EXO70A2). De estos 4 genes, se hizo un análisis de expresión con la plataforma bioinformática *ePlant*, la cual permite visualizar el patrón de expresión de genes de acuerdo datos obtenidos de secuenciación masiva. Considerando el caso del desarrollo floral, los cuatro genes blanco candidato tienen patrones de expresión a la baja o nula en los estados de desarrollo floral 9 al 12 (Fig. 4). Particularmente, los genes AT1G22180, AT3G60120 y AT1G02660 tienen baja expresión en anteras, esta evidencia contrasta con la expresión del *MIR867* (Fig. 1), el cual tiene actividad desde los estados 8 al 14. El gen AT5G52340 se observa incremento en los niveles de expresión en anteras en el estado de desarrollo 12 así como en polen maduro. En conjunto, estos datos *in silico* sugieren que el microRNA maduro miR867 regula la expresión de estos genes blanco candidato durante el desarrollo floral y, abren la puerta para una investigación sobre su función en el proceso de reproducción sexual de las plantas.

4. DISCUSIÓN

Los microRNAs son moléculas involucradas en la regulación de una gran diversidad de procesos biológicos en los seres vivos. En plantas, se ha descrito ampliamente su función a nivel vegetativo (Waheed & Lihui, 2020; Vyas *et al.*, 2023) pero poco se sabe a nivel reproductivo, ya que aunque se tiene información valiosa relacionada con este proceso, como la importancia que tiene la transición de la etapa juvenil a adulto para que las plantas adquieran ese potencial reproductivo adecuado, incluyendo la etapa de transición floral donde miR172 juega un papel importante, o el hecho de saber que las familias miR160 y miR167 impactan en el desarrollo adecuado de óvulos, estambres y semillas en *Arabidopsis* y jitomate, que posteriormente también impactarán en el proceso de reproducción, o que la mutación de miR159a, miR159b, miR164b, miR319a en *Arabidopsis* y miR2118 en arroz reducen la fertilidad (Arnud & Laufs, 2023), aún falta mucho por averiguar en el proceso de reproducción de las plantas.

En este trabajo reportamos que cuando se disminuye la expresión del miR867 a consecuencia de una mutación por T-DNA, se compromete el tamaño del fruto y la fertilidad. Evidencia de genómica comparada demuestra que el miR867 podría estar involucrado en la fecundación, ya que este gen está conservado en el locus S de la autocompatibilidad sexual entre *A. thaliana*, *A. suecica* y *A. arenosa* (Novikova *et al.*,

2023). El mecanismo de autocompatibilidad evita la autofecundación activando un autorreconocimiento entre el polen y el pistilo de las plantas, dando como resultado semillas abortadas, un mecanismo que hoy se sabe, es benéfico y normal para que las plantas puedan mejorar y/o mantener la calidad de la progenie (Leducq *et al.*, 2014; Okamoto *et al.*, 2007).

Las líneas mutantes evaluadas mostraron una menor expresión de miR867 con respecto a la línea silvestre. Esta interrupción provocó efectos fenotípicos pleiotrópicos como semillas abortadas y reducción en el tamaño de las silicuas comparado con el de las plantas del tipo silvestre. La prueba de viabilidad de los granos de polen sugiere que la causa de semiesterilidad es debida a una deficiente fertilidad masculina, lo cual explicaría el porcentaje de abortos. Además, mediante ensayos cuantitativos se detectó expresión de miR867 en las etapas maduras de polen y anteras, y no en silicuas, por lo que sugiere un papel en el desarrollo de las anteras o del grano de polen. También es posible que el miR867 esté involucrado en el proceso de fecundación, específicamente en el proceso de autocompatibilidad sexual necesario para el autorreconocimiento de autofecundación reportado por Novikova *et al.* (2023), y posibles líneas de pérdida completa de función tengan efectos letales para las plantas.

Los resultados de las tinciones de GUS obtenidos en este trabajo indican que la expresión del gen *MIR867* inicia en la etapa 8 del desarrollo de la flor, cuando los lóculos de las anteras se ven perfectamente y el pétalo comienza a crecer. De las etapas 10 a 12 la expresión del gen se presenta específica y fuertemente en las anteras, cuando estas y los pétalos se prolongan alcanzando el tope de la flor, comienzan a aparecer las papilas en el gineceo, y finalmente las anteras comienzan a abrirse para liberar los granos de polen maduros. Cuando la fecundación se lleva a cabo, en la etapa 13, la expresión del miRNA comienza a desaparecer, aunque su presencia se extiende hasta la etapa 15, cuando la xilema del carpelo ya está lignificado y ha iniciado la senescencia de la flor. Por lo tanto, el microRNA maduro *miR867* estaría expresado desde la formación del grano del polen hasta después del proceso de fecundación. El patrón de expresión demostrado con la fusión transcripcional concuerda con los datos de expresión publicados por Meng *et al.* (2012) que reportaron la presencia de miR867 en el desarrollo floral. Los datos bioinformáticos, basados en datos de secuenciación de RNA, indican que los genes blanco candidatos del miR867 no se expresan en las anteras donde el miRNA si se expresa, lo cual correlaciona con la evidencia funcional de los miRNAs: mientras el miRNA está presente el gen blanco está ausente. El gen blanco con mayor valor de interacción corresponde a una proteína de transferencia de fosfatidilinositol similares a Sec14p, estas proteínas están consideradas como actores críticos en la integración de circuitos de señalización de lípidos debida a fosfoinosítidos y fosfatos de inositol solubles (Huang *et al.*, 2017), lo que podría fortalecer la tesis de una vía de señalización entre el grano de polen y los tejidos en el órgano femenino. Además, se ha demostrado que estas proteínas tienen funciones en la polaridad del crecimiento celular (Mao *et al.*, 2019). Por otro lado, otro gen blanco es la β -glucosidasa 27 (BGLU27), se ha reportado que algunas β -glucosidasas pueden desempeñar funciones en el desarrollo del polen en arroz, *Brassica rapa* y *Arabidopsis* (Dong *et al.*, 2019), o incluso, podrían actuar como mirosinasas protectoras contra el ataque de patógenos durante la etapa de floración, ya que se ha reportado que BGLU27 se induce ante la infección del hongo *Verticillium longisporum* (Agerbirk *et al.*, 2018). El gen blanco PLIP2 que codifica para una Lipasa, se ha asociado

en la biosíntesis de aceites en las semillas y, se sabe que responden a ácido abscísico, su papel en la formación de tejido masculino no ha sido determinado (Wang *et al.*, 2018). Aunque el gen AT5G52340 (EXO70A2) si se expresa cuando el miR867 también lo hace, es el único gen blanco candidato que ha sido asociado directamente en el desarrollo del polen, el estudio del fenotipo de una mutante generada por la técnica CRISPR/Cas demostró que el gen EXO70A2 es fundamental para la maduración y la germinación del polen así como la formación del tubo polínico (Marković *et al.*, 2020). En general, es claro que la regulación mediada por el miR867 tiene un impacto directo sobre muchas vías durante el desarrollo, y abre la puerta para profundizar en su papel en la formación del tejido masculino.

Este es el primer reporte que relaciona al miR867 con el aborto de semillas y abre la puerta para experimentos futuros no solo a nivel de ciencia básica, sino para explorar su aplicación en biotecnología vegetal. Por ejemplo, como maximizar el proceso de polinización en cultivos de interés agronómico como el jitomate que, aunque se sabe, es una planta autógama, se requiere el uso de polinizadores en cultivos a gran escala, y con el uso de líneas parentales mejoradas, se podría disminuir el uso de tales polinizadores, o de manera contraria, utilizar líneas mutantes de miR867 para evitar la propagación de líneas parentales no deseadas o, para fijar rasgos genéticos generados plantas dobles haploides. Por todo lo anterior, podemos concluir que el miR867 está involucrado en el proceso de reproducción sexual en *Arabidopsis*, colocando a este miRNA como una posible herramienta biotecnológica.

AGRADECIMIENTOS

Al Instituto Politécnico Nacional por el proyecto SIP-IPN 20231042 para NVDF. Al CONAHCYT por la beca de doctorado para YCA. A todos los miembros del laboratorio de biotecnología molecular por las discusiones.

CONFLICTO DE INTERESES

Los autores declaran que no existe conflicto de intereses.

REFERENCIAS

Agerbirk N., Matthes A., Erthmann P. Ø., Ugolini L., Cinti S., Lizaridi E., Nuzillard J-M., Müller C., Bak S., Rollin P. & Lazzeri L. 2018. Glucosinolate turnover in Brassicales species to an oxazolidin-2-one, formed via the 2-thione and without formation of thioamine. *Phytochemistry* 153:79-93. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2018.05.006>

Alonso J.M., Stepanova A.N., Leisse T.J., Kim C.J., Chen H., Shinn P., Stevenson D.K., Zimmerman J., Barajas P., Cheuk R., Gadrinab C., Heller C., Jeske A., Koesema E., Meyers C.C., Parker H., Prednis L., Ansari Y., Choy N., Deen H., Geralt M., Hazari N., Hom E., Karnes M., Mulholland C., Ndubaku R., Schmidt I., Guzman P., Aguilar-Henonin L., Schmid M., Weigel D., Carter D.E., Marchand T., Risseuw E., Brogden D., Zeko A., Crosby W.L., Berry C.C. & Ecker J.R. 2003. Genome-wide insertional mutagenesis of *Arabidopsis thaliana*. *Science*. 301: 653-657. <https://doi.org/10.1126/science.1086391>

Álvarez-Bullya E.R., Corvera-Poiré A., Chaos C.A., dFolter S., Gamboa dB.A., Garay-Arroyo A., García-Ponce B., Jaimes-M F., Perez-Ruiz V., Piñero-Nelson A. & Sánchez-Corrales Y. 2010. Flower Development. In: The *Arabidopsis* Book, (American Society of Plant Biologists, ed). e0127. <http://doi.org/10.1199/tab.0127>

Arnud N. & Laufs P. 2023. Plant miRNA integrated functions in development and reproduction. *Frontiers in Plant Physiology*. 1:1271423. <https://doi.org/10.3389/fphgy.2023.1271423>

Bonnet E, He Y, Billiau K, Van de Peer Y. TAPIR, a web server for the prediction of plant microRNA targets, including target mimics. *Bioinformatics*. 2010 Jun 15;26(12):1566-8. doi: 10.1093/bioinformatics/btq233.

Chen T., Xie M., Jiang Y. & Yuan T. 2022. Abortion occurs during double fertilization and ovule development in *Paeonia ludlowii*. *Journal of Plant Research*. 135(2): 295-310. <https://doi.org/10.1007/s10265-021-01366-5>

Dong Q., Hu B. & Zhang C. 2022. "microRNAs and their roles in plant development". *Frontiers in Plant Sciences*. 13: 824240. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.824240>

Dong X., Yuan J. & Hur Y. 2019. Genome-Wide analysis of glycoside hydrolase family 1 β -glucosidase genes in *Brassica rapa* and their potential role in pollen development. *International Journal of Molecular Sciences* 20(7):1663. <https://doi.org/10.3390/ijms20071663>

Gao Z., Nie J. & Wang H. 2021. MicroRNA biogenesis in plant. *Plant Growth Regulation* 93(1): 1-12. <https://doi.org/10.1007/s10725-020-00654-9>

Huang J., Ghosh R. & Bankaitis V.A. 2017. Sec14-like phosphatidylinositol transfer proteins and the biological landscape of phosphoinositide signaling in plants. *Biochimica Biophysica Acta*. 1861(9):1352-1364. <https://doi.org/10.1016/j.bbali.2016.03.027>

Jin Y., Wang B., Tian L., Zhao L., Guo S., Zhang H., Xu L. & Han Z. 2022. Identification of miRNAs and their target genes associated with improved maize seed vigor induced by gibberellin. *Frontiers in Plant Science*. 13: 1008872. <https://doi.org/10.3389/fpls.2022.1008872>

Leducq J-B., Gosset C-C., Gries R., Calin K., Schmitt É., Castric V. & Vekemans X. 2014. Self-Incompatibility in Brassicaceae: Identification and characterization of SRK-like sequences linked to the S-locus in the Tribe biscutelleae. *Genes|Genomes|Genetics*. 4(6): 983-992. <https://doi.org/10.1534/g3.114.010843>

Leitao A.L. & Enguita F.J. 2022. A structural view of miRNA biogenesis and function. *Non-coding RNA*. 8(1): 10. <https://doi.org/10.3390/ncrna8010010>

Li M. & Yu B. 2021. Recent advances in the regulation of plant miRNA biogenesis. *RNA Biology*. 18(12): 2987-2096. <https://doi.org/10.1080/15476286.2021.1899491>

Li M., Dong X., Peng J., Xu W., Ren R., Liu J., Cao F. & Liu Z. 2016. De novo transcriptome sequencing and gene expression analysis reveal potential mechanisms of seed abortion in dove tree (*Davidia involucrate* Baill). *BMC Plant Biology*. 16: 82. <https://doi.org/10.1186/s12870-016-0772-x>

Mao H.Y., Su Y.C. & Que Y.X. 2019. Plant Sec14-like phosphatidylinositol transfer proteins: diverse structures and multi-munctions. *Journal of Agricultural Biotechnology*. 27(2): 348-360. doi: 10.3969/j.issn.1674-7968.2019.02.018.

Marković V, Cvrčková F, Potocký M, Kulich I, Pejchar P, Kollárová E, Synek L, Žárský V. EXO70A2 Is Critical for Exocyst Complex Function in Pollen Development. *Plant Physiol*. 2020 Dec;184(4):1823-1839. doi: 10.1104/pp.19.01340.

Meng Y., Shao C., Ma X., Wang H. & Chen M. 2012. Expression-based functional investigation of the organ-specific microRNAs in *Arabidopsis*. *PLoS ONE*. 7(11): e50870. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0050870>

Moore D., Heilweck M. & Petros P. 2021. Saving the planet with appropriate biotechnology: 1. Diagnostic the problems. *Mexican Journal of Biotechnology* 6(1): 1-30. <https://doi.org/10.29267/mxjb.2021.6.1.1>

Novikova P.Y., Kolesnikova U.K. & Scott A.D. 2023. Ancestral self-compatibility facilitates the establishment of allopolyploids in Brassicaceae. *Plant Reproduction*. 36: 125-138. <https://doi.org/10.1007/s00497-022-00451-6>

Okamoto S., Odashima M., Fujimoto R., Sato Y., Kitashiba H. & Nishio T. 2007. Self-compatibility in *Brassica napus* is caused by independent mutations in S-locus genes. *The Plant Journal*. 50(3): 391-400. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2007.03058.x>

Peterson R., Slovin J.P. & Chen C. 2010. A simplified method for differential staining of aborted and non-aborted pollen grains. *International Journal of Plant Biology*. 1(2): e13. <https://doi.org/10.4081/pb.2010.e13>

Dai X, Zhuang Z, Zhao PX. psRNATarget: a plant small RNA target analysis server (2017 release). *Nucleic Acids Res*. 2018 Jul 2;46(W1):W49-W54. doi: 10.1093/nar/gky316.

Rivera-Gutiérrez S., Camarero-Arellano Y., Oliver-Salvador M.dC., Badillo Corona J.A & Durán-Figueroa N. 2022. Rapid and massive protocol to disinfection of *Arabidopsis* sees using gaseous chlorine. *Bio-protocol Preprint*. <https://doi.org/10.21769/p1959>

Rivera-Gutiérrez S. & Durán-Figueroa N.V. 2022. Los microRNAs de plantas: biogénesis y aplicaciones biotecnológicas. *Biología y Sustentabilidad*. 7(1): 12-21. <https://doi.org/10.57737/biotecnologiaysust.v7i1.1633>

Schmittgen T.D. & Livak K.J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C_T method. *Nature Protocols*. 3(6): 1101-1108. <https://doi.org/10.1038/nprot.2008.73>

Seguí-Simarro JM, Jacquier NMA, Widiez T. Overview of In Vitro and In Vivo Doubled Haploid Technologies. *Methods Mol Biol*. 2021; 2287:3-22. doi: 10.1007/978-1-0716-1315-3_1. PMID: 34270023.

Shen S., Zhang L., Liang X-G., Zhao X., Lin S., Qu L-H., Liu Y-P., Gao Z., Ruan Y-L. & Zhuo S-L. 2018. Delayed pollination and low availability of assimilates are major factors causing maize kernel abortion. *Journal of Experimental Botany*. 69(7): 1599-1613. <https://doi.org/10.1093/jxb/ery013>

Song Z, Zhang L, Wang Y, Li H, Li S, Zhao H & Zhang H. 2018. Constitutive expression of miR408 improves biomass and seed yield in *Arabidopsis*. *Frontiers in Plant Science*. 8:2114. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02114>

Tovar-Aguilar A, Grimanelli D, Acosta-García G, Vielle-Calzada JP, Badillo-Corona JA & Durán-Figueroa N. 2023. The miRNA822 loaded by ARGONAUTE9 modulates the monosporic female gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Reproduction* <https://doi.org/10.1007/s00497-023-00487-2>

Tovar-Aguilar A, Sánchez-Elizondo KA, Rodríguez-Rodríguez A, González-Jaime MI, Patiño-López G, Perez-Koldenkova V, Badillo-Corona JA & Durán-Figueroa NV. 2019. Expression pattern of plant miRNAs by classical transcriptional fusion constructs. *Methods Molecular Biology*. 1932:175-185. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-9042-9_13

Varkonyi-Gasic E. & Hellens R.P. 2011. Quantitative Stem-loop RT-PCR for detection of microRNAs. In: *RNAi and Plant Gene Function Analysis*, (Kodama H. & Komamine A., ed.) Springer Link. 145-157. https://doi.org/10.1007/978-1-61779-123-9_10

Vyas L., Ojha N., Sharma R., Pathak H. & Sudan J. 2023. Functional aspects of miRNAs in flower development and flowering. *South Africa Journal of Botany*. 156: 392-397. <https://doi.org/10.1016/j.sajb.2023.03.034>

Waheed S. & Lihui Z. 2020. The critical role of miRNAs in regulation of flowering time and flower development. *Genes*. 11: 319. <https://doi.org/10.3390/genes11030319>

Wang J., Mei J. & Ren G. 2019. Plant microRNAs: biogenesis, homeostasis, and degradation. *Frontiers in Plant Science*. 10: 360. <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00360>

Waese J., Fan J., Pasha A., Yu H., Fucile G., Shi R., Cumming M., Kelley LA., Sternberg MJ., Krishnakumar V., Ferlanti E., Miller J., Town C., Stuerzlinger W., Provart N. 2017. ePlant: Visualizing and Exploring Multiple Levels of Data for Hypothesis Generation in Plant Biology. *The Plant Cell*. 29(8): 1806–1821, <https://doi.org/10.1105/tpc.17.00073>

Wang K, Guo Q, Froehlich JE, Hersh HL, Zienkiewicz A, Howe GA, Benning C. Two Abscisic Acid-Responsive Plastid Lipase Genes Involved in Jasmonic Acid Biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell*. 2018. doi: 10.1105/tpc.18.00250.

Zhang B., You C., Zhang Y., Zeng L., Hu J., Zhao M. & Chen X. 2020. Linking key steps of microRNA biogenesis by TREX-2 and the nuclear pore complex in *Arabidopsis*. *Nature Plants*. 6(8): 957-969. <https://doi.org/10.1038/s41477-020-0726-z>

MATERIAL SUPLEMENTARIO

Tabla S1. Lista de oligonucleótidos empleados en este estudio.

OLIGOS ESPECÍFICOS PARA LINEAS T-DNA		
GEN	NOMBRE	SECUENCIA
miR867	<i>mir867-1</i> (LP)	CTTACGGGTTTGTAAAGGGGTG
	<i>mir867-1</i> (RP)	TAAACACAGGGGCAATTTTG
	<i>mir867-2</i> (LP)	CAAAATGGCAGCTTATTCCTG
	<i>mir867-2</i> (RP)	CGAAAGTCGCCTTAGAAGACC
LBb1.3	T-DNA de líneas SALK (BP)	ATTTTGCCGATTCGGAAC
OLIGOS ESPECÍFICOS PARA STEM-LOOP		
miR867	Específico miR867	GCGGCGTTGAACATGGTTTAT
miR867	Loop-miR867 (RV)	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CCAGAGCCAACCTTCTA
Loop	Universal	GTGCAGGGTCCGAGGT
miR161	Específico miR161	CGGCGGTCAATGCATTGAAAG
miR161	Loop-miR161	GTTGGCTCTGGTGCAGGGTCCGAGGTATTCGCA CCAGAGCCAACCTAGTCA