

**UTILIZACIÓN DE LA PROTEÍNA CGR COMO HERRAMIENTA
AGROBIOTECNOLOGICA PARA LA GENERACIÓN DE PLANTAS CON MAYOR
PRODUCCIÓN Y CICLO DE VIDA ACORTADO**

**Sofía Racca. Becaria Fundación NBSF (FBCB-IAL-UNL-CONICET).
Licenciatura en Biotecnología, FBCB,UNL.
raccasofia@gmail.com. Ciencias Biológicas. Biotecnología.**

INTRODUCCIÓN

La creciente demanda de alimentos como consecuencia del aumento de la población mundial trae consigo la necesidad de mejorar la productividad y el rendimiento de los cultivos. La Agrobiotecnología constituye una disciplina que nos brinda poderosas herramientas para dar solución a estas necesidades. Investigaciones llevadas a cabo en nuestro laboratorio nos permitieron postular que la eficiencia con la cual se lleva a cabo la respiración celular impactaría de manera directa en el crecimiento, el desarrollo y la producción vegetal. Así, identificamos a la proteína mitocondrial de *Arabidopsis thaliana* CGR (del inglés, Central Growth Regulator) la que tendría un rol central en la coordinación de las señales celulares que conectan el metabolismo energético, el crecimiento y la producción en vegetales (Resultados no publicados). Nuestro objetivo consiste en obtener plantas que expresen elevados niveles de la proteína CGR y evaluar su potencial agrobiotecnológico como herramienta para obtener plantas con mayor biomasa, mayor producción de semillas por área cultivada y un ciclo biológico más corto. De confirmarse nuestras hipótesis, estas características podrían ser trasladadas a plantas de interés agroeconómico permitiendo optimizar el rendimiento de los cultivos.

OBJETIVOS

Emplear técnicas de ingeniería genética para obtener plantas de *Arabidopsis thaliana* con mayores niveles de expresión de la proteína CGR y evaluar su posible utilización como herramienta agrobiotecnológica para generar plantas con mayor BIOMASA, mayor RENDIMIENTO y con un acortamiento en el CICLO BIOLÓGICO. Evaluar su posible aplicación en cultivos de interés agronómico lo que permitiría aumentar la productividad y reducir los tiempos de cada ciclo siembra-cosecha.

METODOLOGÍA

Mediante reacciones de PCR con oligonucléotidos específicos y siguiendo técnicas de clonado molecular básicas de un laboratorio de Biología molecular (Mertinez-Zapater y col., 1998; Sambrook y col., 1989) se obtuvo la construcción para sobreexpresar la proteína CGR en plantas de *Arabidopsis thaliana*, donde la secuencia codificante de la misma se encuentra fusionada al promotor constitutivo 35S CaMV.

Luego de transformar las plantas mediante el método de Inmersión Floral (Clough y col., 1998), las semillas transgénicas fueron seleccionadas en sucesivas rondas de selección con el antibiótico Kanamicina hasta lograr homocigosis.

Para evaluar su potencial importancia agrobiotecnológica, se efectuó un exhaustivo seguimiento fenotípico de dos líneas 35S::CGR que presentaron elevados niveles de transcritos detectados mediante qRT-PCR (Clifton y col., 2007).

Esta caracterización se llevó a cabo siguiendo el modelo de Boyes y Col. 2001 registrando parámetros como: diámetro de roseta, número de hojas, momento de la aparición del botón floral, peso fresco, peso seco y contenido de clorofila durante la etapa de senescencia.

RESULTADOS

Para poder evaluar el impacto generado por la sobreexpresión de CGR en *Arabidopsis*, se seleccionaron las líneas 35S::CGR 4 y 35S::CGR 5 las cuales no solo presentaron elevados niveles de transcritos detectados mediante qRT-PCR sino también de proteína funcional detectada mediante la técnica de Western Blot.

Ambas líneas presentaron una mayor biomasa durante la etapa de crecimiento vegetativo (Figura 1, A y B) producto de un mayor diámetro de roseta (Figura 1C) y un mayor número de hojas (Figura 1D) comparadas con el control salvaje (WT).

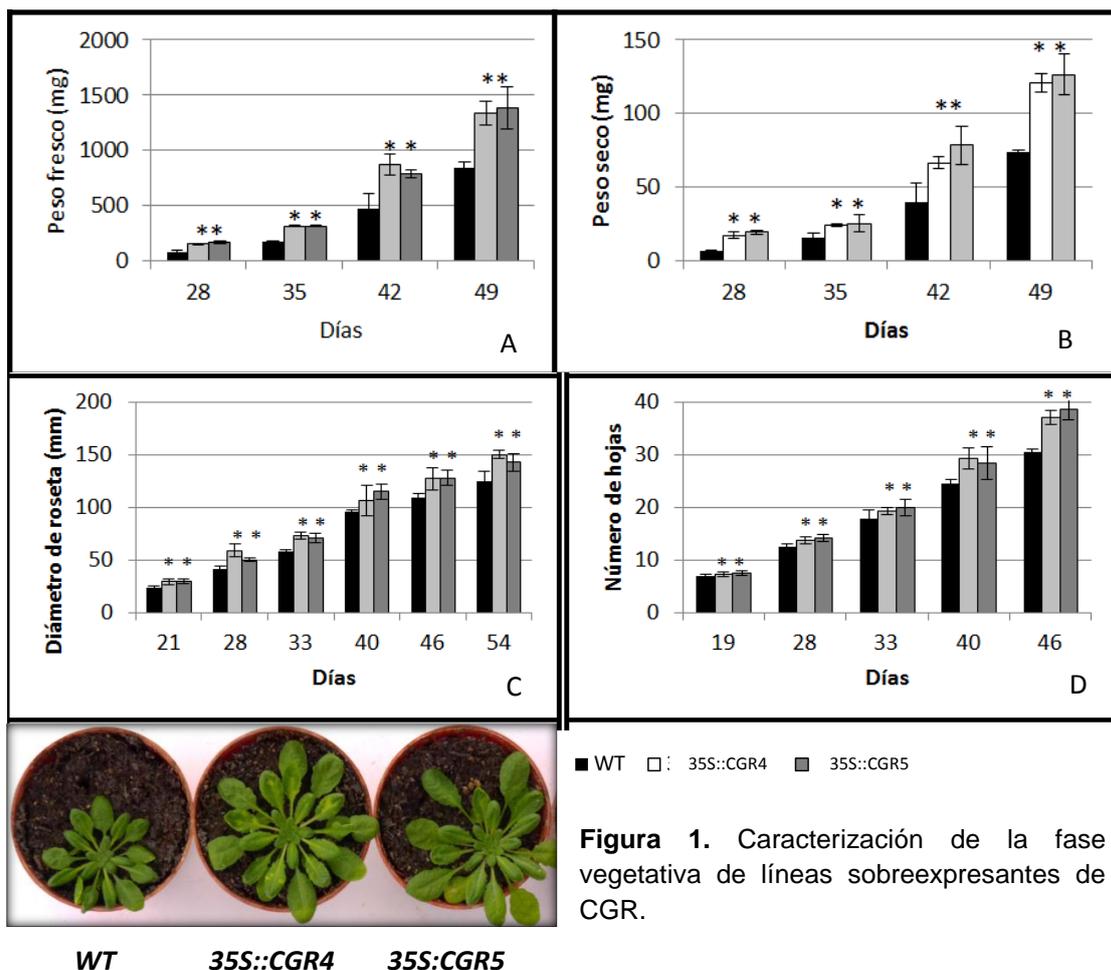


Figura 1. Caracterización de la fase vegetativa de líneas sobreexpresantes de CGR.

Por otra parte, las plantas transgénicas presentaron una aceleración en el pasaje a estadio reproductivo (Figura 2A), sin una alteración evidente de la etapa de senescencia (Figura 2C) lo que provoca una prolongación de la etapa reproductiva y un incremento en la producción de semillas por planta (Figura 2B).

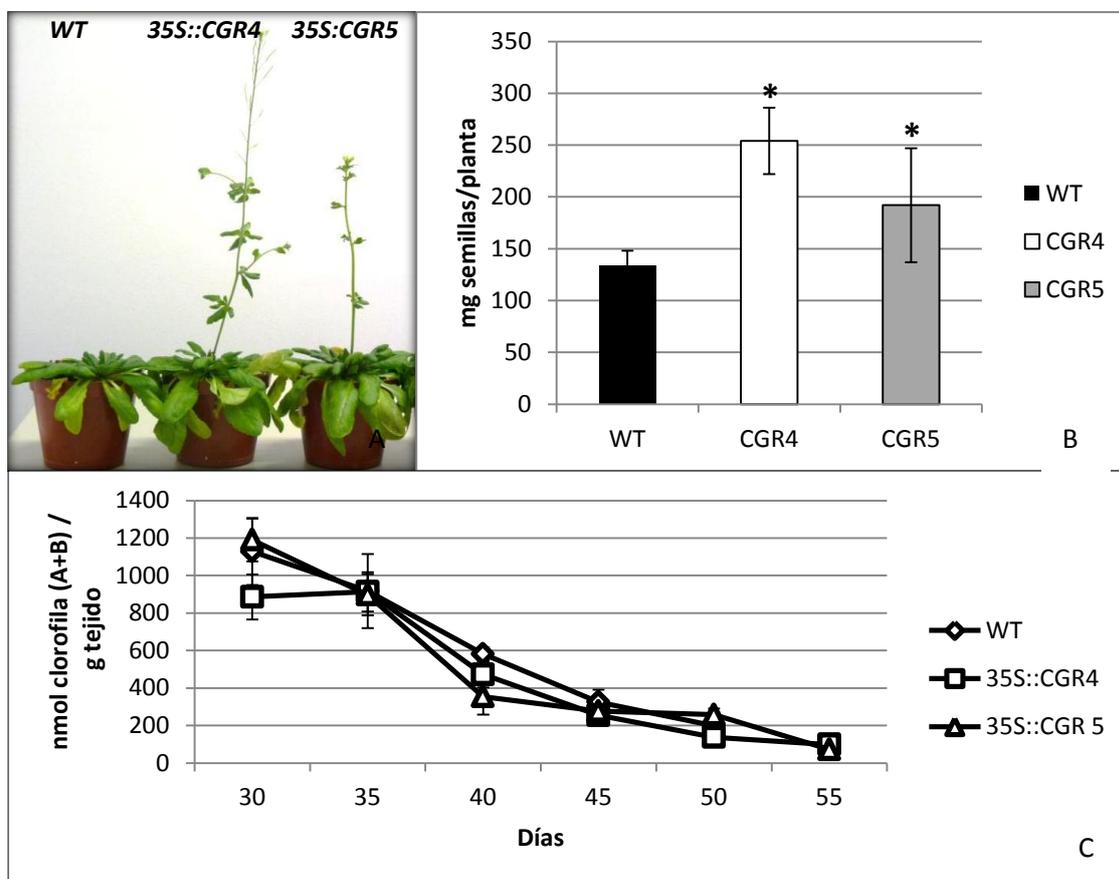


Figura 2. (A) Pasaje a estadio reproductivo de líneas 35S::CGR. (B) Producción de semillas por individuo. (C) Cinética del contenido de clorofila durante la etapa de senescencia.

Todos estos resultados fueron reproducidos en cuatro condiciones de fotoperiodo diferentes: Día Largo (16 hs luz/ 8 hs oscuridad), Día corto (8hs luz/16 hs oscuridad), Luz continua (24 hs luz) y Día Corto con baja intensidad lumínica. En todos los casos, las plantas que sobreexpresan CGR presentaron una aceleración de la tasa de crecimiento, reduciendo el tiempo de transición vegetativo-reproductivo, prolongando la fase reproductiva e incrementando la producción de granos.

CONCLUSION

Luego de analizar los resultados obtenidos, se puede concluir que un aumento en los niveles de la proteína CGR en plantas de *Arabidopsis thaliana* provoca un aumento de la tasa de crecimiento durante la fase vegetativa generando una mayor biomasa comparada con plantas WT de la misma edad. Por otra parte pudo evidenciarse un adelanto en la floración, prolongando la etapa reproductiva e incrementando significativamente la producción de semillas por planta.

Estas características resultan sumamente interesantes desde el punto de vista agrobiotecnológico. La generación de una mayor biomasa durante la etapa vegetativa puede implicar ventajas para su empleo en la industria de bioplásticos o combustibles alternativos, mientras que un aumento en la generación de granos podría ser útil para transferir esta tecnología a cultivos de interés agronómico permitiendo incrementar las ganancias y el rendimiento por área cultivada.

BIBLIOGRAFÍA

- Boyes, DC.; Zayed, AM.; Ascenzi, R.; McCaskill, AJ.; Hoffman, NE.; Davis, KR. and Görlach, J. (2001) Growth Stage-Based Phenotypic Analysis of Arabidopsis: A Model for High Throughput Functional Genomics in Plants. *Plant Cell*, 13, 1499-1511.
- Clifton, R. and Whelan, J. (2007) Plant Mitochondrial Transcriptomics by Quantitative RT-PCR. In *Mitochondria. Practical Protocols. Methods in Molecular Biology* (ed. by Leister, D. and Herrman, JM) pp 529-542. Humana Press.
- Clough, SJ. and Bent, AF. (1998) Floral dip: a simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 16, 735-743
- *Arabidopsis mitochondria*. *Plant J.* 32, 891-904.
- Martínez-Zapater José M.; Salinas J. (1998) *Methods in molecular Biology: Arabidopsis protocols*. Humana Press Vol. 82.
- Taylor, NL. and Millar, AH. (2007) Oxidative Stress and Plant Mitochondria. In *Mitochondria. Practical Protocols. Methods in Molecular Biology* (ed. by Leister, D. and Herrman, JM) pp 389-404. Humana Press.
- Sambrook J.; Fritsch E.F.; Maniatis T. (1989). *Molecular cloning: a laboratory manual*. Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.