

EVALUACIÓN DE LA TOLERANCIA A ESTRÉS ABIÓTICO DE CULTIVARES DE TRIGO QUE EXPRESAN EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN DE GIRASOL HAHB-4 CRECIDOS EN DIFERENTES CONDICIONES NUTRICIONALES

Ermilio, Alejo

Instituto Agrobiotecnológico del Litoral IAL (UNL-CONICET)

Directora: Ribichich, Karina

Codirectora: Gonzalez, Fernanda

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: Trigo, Hahb4, Estrés abiótico

Título del proyecto: Mejoramiento de cultivos extensivos para condiciones de estrés hídrico Instrumento: PICT 2015 2671 Año convocatoria: 2015 Organismo financiador: ANPCyT Director/a: Raquel L. Chan	Título del proyecto: Rendimiento de trigo en estrés Instrumento: Proyecto VT Año convocatoria: 2018 Organismo financiador: SPU Director/a: Karina F. Ribichich
---	--

INTRODUCCION

El cultivo de trigo es una de las principales fuentes de alimento para más de 4500 millones de personas. Altas temperaturas y sequías limitan su productividad y afectan la calidad de la harina. Las plantas responden al estrés con mecanismos que involucran cambios a nivel molecular, celular y fisiológico que varían con el genotipo y con su estatus nutricional (Altenbach, 2012). HaHB4 es un factor de transcripción de girasol que pertenece a la familia HD-Zip. La expresión del gen que codifica *Hahb4* es regulada a nivel transcripcional por factores externos como la disponibilidad de agua, el ácido abscísico y la salinidad del suelo (Gago et al., 2002; Dezar et al., 2005). Las plantas de trigo que presentan este gen han demostrado tener una mayor tolerancia al déficit hídrico (González et al., 2019). La disponibilidad de nitrógeno y agua interaccionan de manera compleja influyendo en el rendimiento y la calidad de los granos en trigo (Altenbach, 2012). Se desconoce si las plantas de trigo que expresan Hahb4 presentan distinta tolerancia a la disponibilidad hídrica bajo diferente disponibilidad de nitrógeno.

El objetivo general del presente proyecto fue evaluar el comportamiento de un cultivar mejorado genéticamente con Hahb4 sobre su parental, cuando crece bajo diferentes riegos y disponibilidad de nitrógeno. Para ello realizamos un ensayo en cámara de cultivo y se evaluaron características de crecimiento de las plantas y consumo de agua.

OBJETIVOS

- Determinar la influencia de diferentes niveles de nitrógeno sobre la tolerancia al déficit hídrico en un cultivar de trigo transgénico y su parental
- Evaluar el comportamiento de las plantas en cámara de cultivo.

METODOLOGÍA

El ensayo se realizó en cámara de cultivo, inicialmente a 22°C y con un fotoperiodo de 11 h de luz/13 h de oscuridad desde la germinación hasta el primer mes. Se fue aumentando la temperatura y fotoperiodo gradualmente hasta llegar a los 26°C y 14 h de luz/10 h de oscuridad respectivamente, simulando las alteraciones normales que sufren las plantas de trigo en el campo. Utilizando como sustrato arena en cada maceta, se sembraron

5 semillas por maceta, 12 macetas por genotipo. Se agruparon 3 macetas por genotipo a las cuales se les sometió uno o varios tipo(s) de estrés. Los genotipos utilizados correspondientes a salvaje y transgénica son Cadenza (CAD) e IND-00412-7 (IND) desarrollada por la empresa INDEAR. Las plantas R+ se regaron manteniéndose a capacidad de campo del sustrato utilizado (arena), y las plantas R- se mantuvieron a 60% de la capacidad de campo.

El riego se realizó cada 2-3 días hasta los valores acordados, pesándose las macetas previamente y registrando la cantidad de agua consumida. Para el caso del estrés por déficit de nitrógeno, la mitad de las macetas se fertilizó con una solución de Hoagland 0,2X (N-), representando el 40% del N usado a campo, mientras que el resto se regó con la misma solución suplementada con urea hasta alcanzar los valores de nitrógeno usados tradicionalmente (N+). Ambas se suplementaron con PK. Se realizaron 5 fertilizaciones, desde la aparición de la 5ta hoja del vástago y terminando en floración, siguiendo la escala de Zadoks (1974). Una vez completado el ciclo de vida de las plantas, se procedió a realizar la toma de medidas correspondientes a: la altura del vástago principal (sin la espiga), diámetros basal y apical, volumen de vástago principal, largo de la espiga principal, n° de espiguillas de la espiga principal y de las pertenecientes a los macollos, n° de granos de la espiga principal, de las pertenecientes a macollos y totales por planta, peso de biomasa (vástago+ espiga sin semillas), peso granos de espiga principal, los de las espigas de los macollos y total por planta, peso promedio por grano de espiga principal, espigas de los macollos y total por planta, n° de macollos e índice de cosecha. Para el procesamiento de los datos obtenidos, se realizó un ANOVA (usando Infostat), tomando como factores fijos: genotipo (CAD e IND), Riego (R+ y R-) y Nitrógeno (N+ y N-).

RESULTADOS

En primer término, evaluamos si se reproducían algunas de las características esperadas para IND para la situación de estrés por déficit hídrico que fueran significativamente diferentes de las obtenidas para CAD (genotipo x riego). Las plantas IND presentaron mayor volumen del vástago ($p=0,0059$), mayor número de macollos ($p=0,028$) y un menor peso de cada grano ($p=0,056$) (**Tabla 1a, b, c**). Además de una tendencia a un mayor número de granos ($p=0,0739$), no hubo diferencias significativas para las otras variables evaluadas.

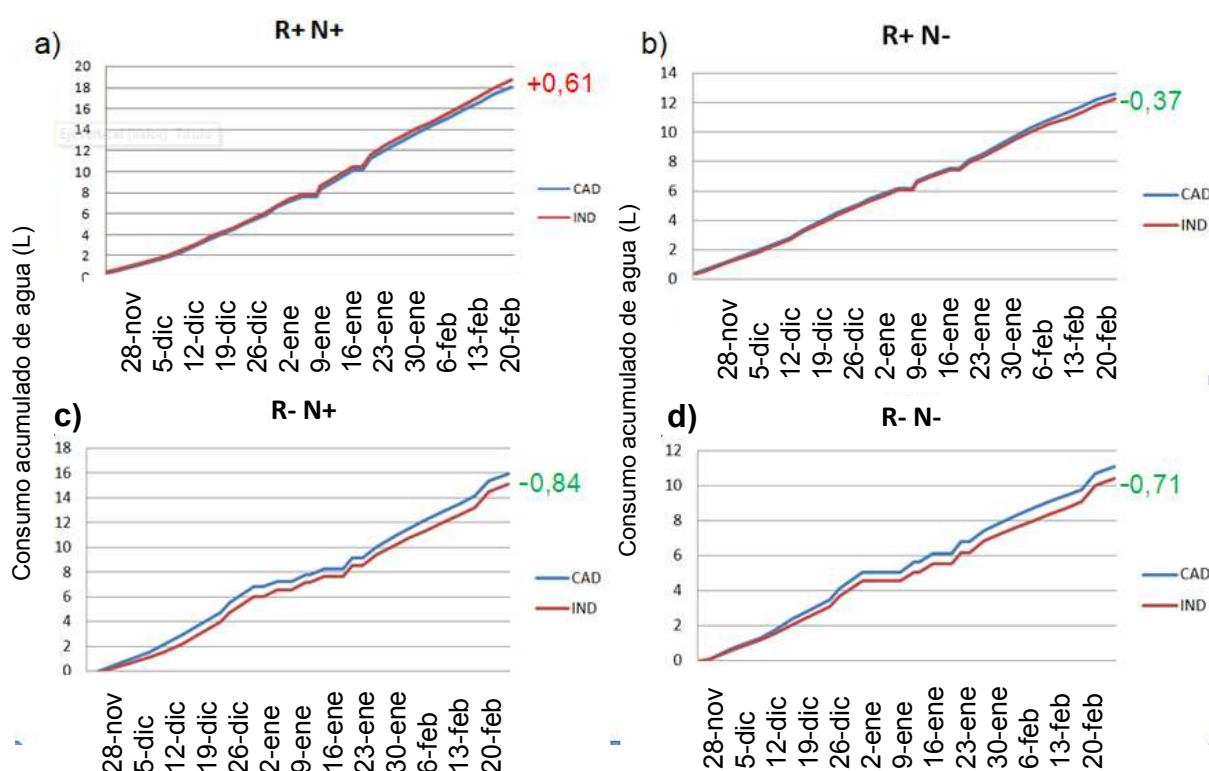
Tabla 1. Comparación de variables fenotípicas entre CAD e IND en ausencia (Riego -) o presencia (Riego +) de déficit hídrico por el test de Tukey

a) Variable: Volumen vástago (cm ³) Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,29739							
Genotipo	Riego	Medias	n	E.E.			
CAD	+	1,88	30	0,08	A		
IND	-	1,89	30	0,08	A		
CAD	-	2,03	30	0,08	A B		
IND	+	2,20	30	0,08			B
b) Variable: N° de macollos Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,60765							
Genotipo	Riego	Medias	n	E.E.			
CAD	-	1,83	30	0,16	A		
IND	+	1,93	30	0,16	A		
CAD	+	2,07	30	0,16	A B		
IND	-	2,43	30	0,16			B
c) Variable: Peso del grano (mg) (Test:Tukey Alfa=0,05 DMS=0,00272							
Genotipo	Riego	Medias	n	E.E.			
IND	-	21,90	30	0,16	A		
IND	+	23,09	30	0,16	A	B	
CAD	+	24,43	30	0,16		B	C
CAD	-	26,92	30	0,16			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Estos resultados fueron acompañados por los obtenidos en la evaluación del consumo de agua a lo largo del ciclo del cultivo (ver Metodología). En condiciones óptimas de riego y nitrógeno, las plantas IND consumieron 3,3% más que las CAD (**Figura 1a**). Las plantas de trigo IND presentaron un consumo total de 3 a 6,4 % menor que las plantas CAD en condiciones subóptimas de crecimiento (de riego, de nitrógeno o en ambas), con el menor consumo registrado en condiciones subóptimas de riego y de nitrógeno, equivalente a 0,71 litros en 11,12 litros (**Figuras 1b-d**).

Figura 1. Consumo acumulado de agua de las plantas de trigo de CAD e IND durante todo el ensayo. Los números en rojo (positivo) y verde (negativo) indican la diferencia de agua consumida de IND con respecto a CAD.



A seguir evaluamos la interacción entre el déficit hídrico y el nivel de nitrógeno para cada uno de los genotipos considerados (genotipo x riego x nitrógeno). Los resultados indicaron un peso promedio del grano menor de las plantas IND ($p=0,0151$) en la condición R⁻N⁺ en relación a CAD, lo que junto con una tendencia a producir mayor biomasa en condiciones de R⁻, influyó negativamente ($p=0,0051$) en el índice de cosecha (**Tabla 2**)

Tabla 2. Comparación de variables fenotípicas entre CAD e IND en ausencia (Riego -) o presencia (Riego +) de déficit hídrico y ausencia (Nitrógeno -) o presencia Nitrógeno (+) de déficit nutricional por el test de Tukey

a) Variable: Peso promedio del grano (mg) Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,00456									b) Variable: Índice de cosecha (mg granos/mg biomasa) Test: Tukey Alfa=0,05 DMS=0,07359								
Gen	R	N	Media	n	E.E				Gen	R	N	Media	n	E.E			
IND	-	+	20,53	15	0,0E-3	A			IND	+	-	0,30	15	0,02	A		
IND	+	-	21,71	15	0,0E-3	A	B		IND	-	+	0,38	15	0,02		B	
IND	-	-	23,35	15	0,0E-3	A	B	C	IND	+	+	0,39	15	0,02		B	
CAD	+	+	23,00	15	0,0E-3	A	B	C	CAD	+	-	0,41	15	0,02		B	C
IND	+	+	24,52	15	0,0E-3	A	B	C	CAD	+	+	0,43	15	0,02		B	C
CAD	-	+	25,58	15	0,0E-3		B	C	IND	-	-	0,44	15	0,02		B	C
CAD	+	-	25,06	15	0,0E-3		B	C	CAD	-	-	0,47	15	0,02			C
CAD	-	-	27,25	15	0,0E-3			C	CAD	-	+	0,48	15	0,02			C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

CONCLUSIONES y DISCUSIÓN

Las plantas de trigo IND mostraron características fenotípicas asociadas a la tolerancia a estrés hídrico (mayor número de macollos, menor peso del grano y una tendencia a un mayor número de granos) coincidentes con lo ya reportado (González et al, 2019).

Por otro lado, las plantas de trigo IND consumieron menos agua en condiciones de déficit hídrico durante el ciclo del cultivo, concordando con los resultados de estudios previos para plantas de trigo (González et al, 2019) y de Arabidopsis (Dezar et al., 2005) expresando *Hahb4*. Además, consumieron menos agua en déficit de nitrógeno, una característica no analizada previamente y que resulta promisorio para el objetivo de disminuir el uso de fertilizantes a campo.

El menor tamaño del grano, una característica no deseable, es compensado en la mayoría de los ambientes evaluados por el mayor número de granos y un mayor índice de cosecha (González et al, 2019), mientras que en este ensayo solo se observó una tendencia a un mayor número de granos. Este resultado sugiere que las condiciones en la cámara empleada pueden no reflejar las condiciones ambientales a campo.

BIBLIOGRAFÍA

- Altenbach, S.**, (2012) New insights into the effects of high temperature, drought and post-anthesis fertilizer on wheat grain development. *Journal of Cereal Science* 56, 39-50
- Dezar, C., Gagoz, G., González, D, et al.** (2005) *Hahb-4*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, is a developmental regulator and confers drought tolerance to Arabidopsis thaliana plants. *Transgenic Research* 14:429–440
- Gago, G., Almoguera, C., Jordano, J., et al.** (2002) *Hahb-4*, a homeobox-leucine zipper gene potentially involved in abscisic acid-dependent responses to water stress in sunflower. *Plant, Cell and Environment* 25, 633–640
- González, F, Capella, M., Ribichich, K., et al.** (2019). Field-grown transgenic wheat expressing the sunflower gene *HaHB4* significantly outyields the wild type. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 70, No. 5 pp. 1669–1681
- Hawkesford M.**, (2013). Reducing the reliance on nitrogen fertilizer for wheat production. *Journal of Cereal Science* 59. 276-283
- Zadoks JC, Chang TT, Konzak C.** (1974). A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14, 415–421.