

Plantas de *Arabidopsis thaliana* modificadas genéticamente a nivel de la vía glucolítica presentan potenciales mejoras en sus características agronómicas.

Bruno E. Rojas, Claudia V. Piattoni, Ivana L. Viola, Daniel H. González y Alberto A. Iglesias.

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (CONICET-UNL), Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB-UNL).

Palabras clave: Agrobiotecnología, glucólisis, *Arabidopsis thaliana*.

Área: Ciencias Biológicas.

Sub-Área: Biotecnología.

INTRODUCCIÓN

El vertiginoso crecimiento poblacional de los últimos años, junto con el desarrollo de la producción de biocombustibles, han provocado un aumento de la demanda de productos agrícolas, estimándose que en el corto plazo la capacidad productiva actual será superada. Sin embargo, la cantidad de tierra cultivable no ha cambiado, siendo poco probable un aumento en el futuro cercano debido a las pérdidas generadas por la urbanización, la salinización y la desertificación (Fedoroff y col. 2010). Además, hay que considerar los efectos del calentamiento global, ya que los rendimientos de las principales cosechas declinan abruptamente a temperaturas mayores a los 30 °C (Schlenker y Roberts 2009).

En este contexto, la Agrobiotecnología se suma a las prácticas convencionales de mejoramiento vegetal como una herramienta para modificar los cultivos de forma tal de aumentar la cantidad y calidad de las materias primas de tal origen. Gracias a esta tecnología, pueden generarse nuevas variedades que posean un crecimiento acelerado, mejores rendimientos por unidad de tierra, mayor resistencia a insectos, enfermedades y malezas o que estén adaptadas al crecimiento bajo condiciones de estrés ambiental. Asimismo pueden incorporarse mejoras en la calidad, el valor nutritivo o características de frutos y semillas o brindar ventajas para su procesado.

Hace varios años que en nuestro grupo de trabajo se viene estudiando cómo se regula el metabolismo del carbono en plantas de trigo, ricino, apio, durazno, manzano y naranja, como así también en organismos unicelulares fotosintéticos. De esta manera, hemos logrado identificar algunas enzimas que serían claves durante la adaptación metabólica ante situaciones de estrés. En este trabajo se planteó la obtención de plantas que tubieran aumentada o disminuida la expresión de un gen codificante de una enzima glucolítica involucrada en el metabolismo primario del carbono, cuyos niveles de actividad enzimática se han visto incrementados ante situaciones de estrés oxidativo. Nuestro interés se basa en que las plantas con niveles modificados de esta enzima podrían tener alterados los niveles de poder reductor, el cual es necesario para el funcionamiento de todas las vías metabólicas antioxidantes que se disparan en las plantas en respuesta a diferentes tipos de estrés ambiental, permitiendo así su sobrevivencia.

OBJETIVOS

1. Obtener plantas de *A. thaliana* que posean niveles aumentados y disminuidos de la enzima en estudio.
2. Estudiar los cambios morfológicos y en el desarrollo ocasionados al modificar los niveles de esta actividad enzimática en tejidos vegetales.
3. Estudiar el crecimiento y desarrollo de las plantas obtenidas ante situaciones medioambientales adversas.

Becas para Proyectos de Innovación Tecnológica 2014 de la Fundación del Nuevo Banco de Santa Fe.

Proyecto: Estudio de la funcionalidad de la vía glucolítica a la adaptación al crecimiento bajo situaciones de estrés en plantas de *Arabidopsis thaliana*. Producción y caracterización de mutantes con disminución o aumento en los niveles de enzimas claves de la vía metabólica.

Directora: Claudia V. Piattoni

Co-Director: Alberto A. Iglesias

METODOLOGÍA

Material vegetal y condiciones de cultivo: en todos los casos las plantas fueron crecidas en cámara de cultivo bajo condiciones de 16 h de luz/8h de oscuridad, 20-22 °C, 40-70% de humedad e iluminación controlada. En el ensayo de estrés salino, plantas de 3 semanas fueron regadas cada dos días con una solución 200 mM de NaCl hasta que completaron su ciclo de vida.

Identificación de mutantes nulas en el gen de interés: se adquirió un stock disponible en el ABRC (*Ohio State University*) correspondiente a una mutante insercional por ADN-T. Se controló la presencia de la mutación mediante reacciones de PCR con juegos de oligonucleótidos específicamente diseñados. Paralelamente se cuantificaron los niveles de proteína mediante *western blot* y actividad enzimática mediante un método espectrofotométrico.

Generación de líneas con niveles de expresión incrementados en el gen de interés: el gen se amplificó por PCR y se clonó en un vector adecuado para la transformación de plantas bajo el control transcripcional de un promotor constitutivo utilizando el sistema Gateway® (Life Technologies).

La transformación de plantas salvajes (*wt*) de *A. thaliana* se realizó empleando la técnica de inmersión floral mediada por *Agrobacterium tumefaciens* (Clough y Bent 1998). Las plantas transformantes se seleccionaron en placas de petri, cultivándolas en medio MS-Agar suplementado con el antibiótico kanamicina. De las sobrevivientes, se analizaron 5 líneas transgénicas. La presencia del transgén deseado en las transformantes se controló mediante reacciones de PCR sobre ADN genómico con oligonucleótidos específicos. En paralelo, se cuantificaron los niveles de proteína por *western blot* y actividad enzimática mediante un método espectrofotométrico.

Seguimiento fenotípico: se realizó en cámaras de cultivo bajo condiciones de día largo. Se analizó el número de hojas, el diámetro de roseta, la longitud del tallo y el tiempo de floración.

Caracterización morfológica de semillas: para determinar el peso seco de semillas maduras se emplearon lotes de semillas cosechados en el mismo momento y de plantas sometidas a las mismas condiciones de cultivo. La extracción y cuantificación de lípidos en semillas se realizó según el método de Bligh y Dyer (1959).

RESULTADOS

Al realizar el análisis fenotípico de las plantas con niveles aumentados y disminuidos de la enzima en estudio, pudimos observar que los mismos eran opuestos. Las plantas con niveles disminuidos de esta enzima [mutantes negativas (MN)] presentaban un crecimiento más lento que las plantas salvajes (*wt*, de su nombre en inglés), con un menor número de hojas y diámetro de roseta, y comenzaban a elongar el tallo más tarde que las plantas *wt*. De forma contraria, las plantas con niveles aumentados de la enzima en estudio (OE, por sobreexpresión en inglés) comenzaban a elongar el tallo antes que la línea control transformada con el vector sin inserto (VSI), mostrando un pasaje acelerado al estadio reproductivo (Figura 1).

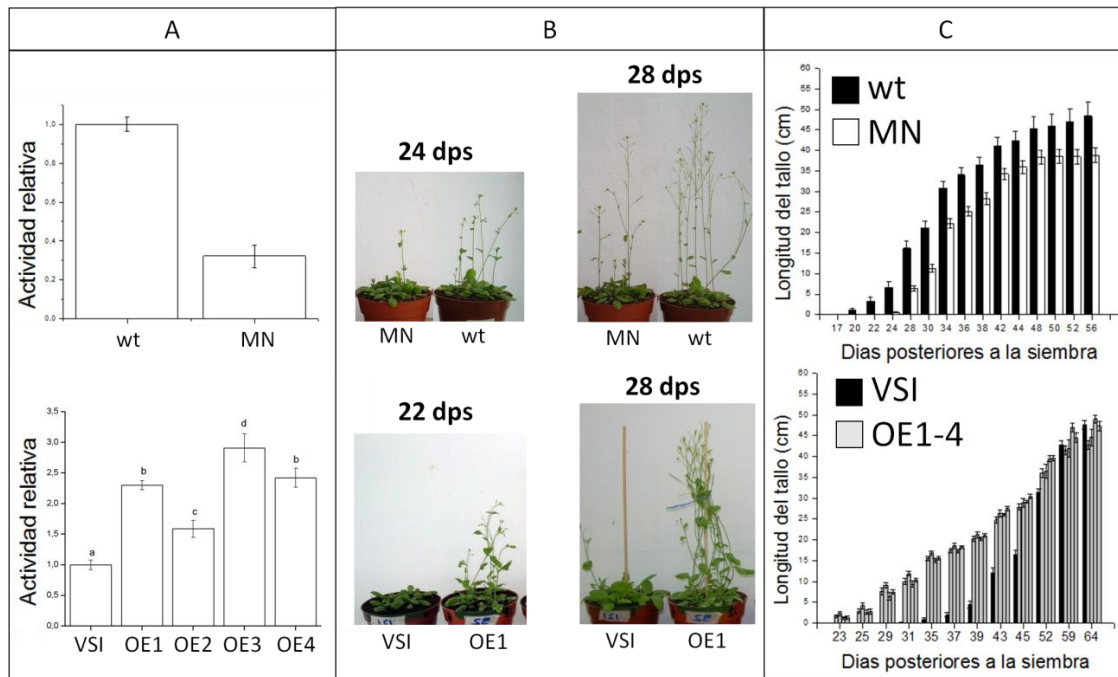


Figura 1: A) Niveles relativos de actividad enzimática en hojas de roseta para la línea mutante negativa (MN) en comparación con plantas salvajes (wt) [superior] y de las líneas sobreexpresantes 1 a 4 (OE1-4) en comparación con una línea transformada con el vector sin inserto (VSI) [inferior].

B) Fotografías del fenotipo de las líneas MN vs. wt (superior) y de las líneas OE1 vs. VSI (inferior). Dps: Días post-siembra.

C) Longitud del tallo en función de los días posteriores a la siembra para las plantas MN vs. wt (superior) y OE1-4 vs. VSI (inferior).

Al realizar la caracterización morfológica de las semillas de las plantas con niveles aumentados de la enzima en estudio observamos que las mismas poseían un mayor peso que el de las plantas control (Figura 1 A). Además, mostraban un mayor contenido de lípidos totales (Figura 1 B).

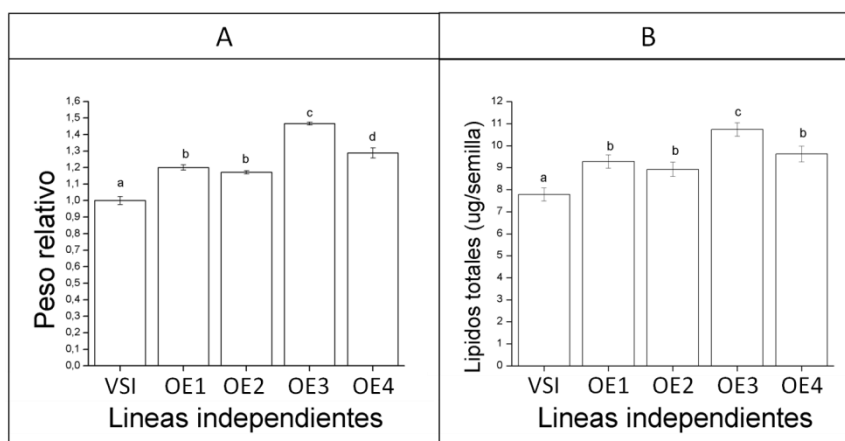
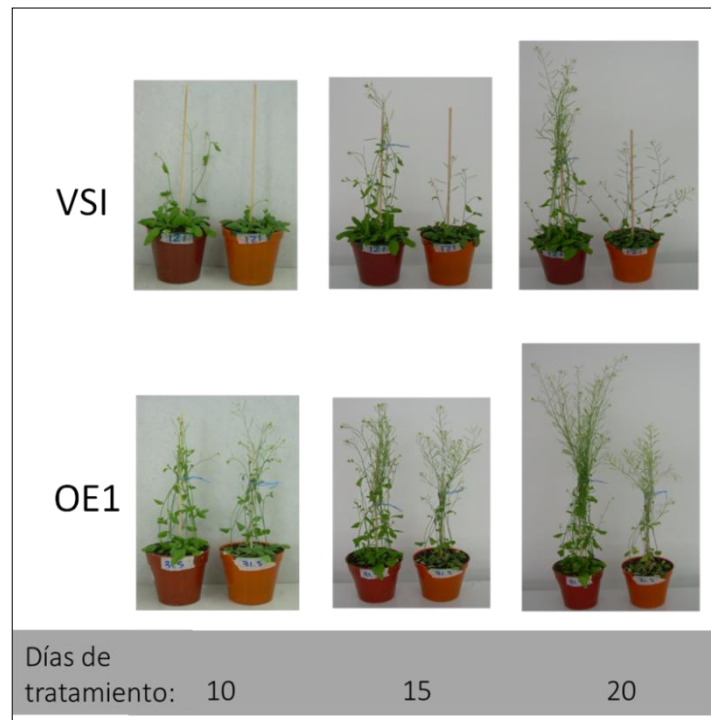


Figura 2: Medidas de peso relativo de semillas maduras (A) y lípidos totales en semillas (B) para las líneas OE1-4 vs. VSI.

Al someter a las líneas sobreexpresantes a un ensayo de estrés salino, observamos que si bien las líneas con niveles incrementados de la enzima en estudio se vieron

afectadas con respecto a las mismas plantas crecidas bajo condiciones normales, ante la situación de estrés su crecimiento fue mayor que el de la línea empleada como control (Figura 3).

Figura 3: Ensayo de estrés salino realizado sobre las líneas OE1-4 vs. VSI. En la imagen solo se muestran los resultados para la línea OE1, obteniéndose resultados similares para las demás líneas. Macetas rojas: control, riego normal cada dos días con solución Hoagland 1X. Macetas naranjas: Estrés salino, riego cada dos días con una solución de NaCl 200 mM.



CONCLUSIONES

En su conjunto, los resultados obtenidos con respecto a las diferencias en la tasa de crecimiento de las plantas con niveles modificados de la enzima en estudio y el contenido lipídico de las semillas de las líneas sobreexpresantes indicarían que la modificación genética de enzimas involucradas en el metabolismo primario del carbono en las células vegetales es una estrategia adecuada para obtener plantas con mejoras en sus características agronómicas. Si bien los resultados obtenidos para las plantas sometidas a estrés salino indicarían algún grado de mejora en el crecimiento ante la presencia del estrés, aún debe evaluarse como dicho estrés impacta en la productividad de estas plantas.

BIBLIOGRAFÍA

- Bligh, E. G. and Dyer W. J.,** 1959. "A rapid method of total lipid extraction and purification." *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8): 911-917.
- Clough, S. J. and Bent A. F.,** 1998. "Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*." *The Plant Journal*, 16(6): 735-743.
- Fedoroff, N., Battisti D., Beachy R., Cooper P., Fischhoff D., Hodges C., Knauf V., Lobell D., Mazur B., and Molden D.,** 2010. "Radically rethinking agriculture for the 21st century." *Science*, 327(5967): 833.
- Schlenker, W. and Roberts M. J.,** 2009. "Nonlinear temperature effects indicate severe damages to U.S. crop yields under climate change." *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(37): 15594-15598.