

HAHB11 COMO HERRAMIENTA BIOTECNOLÓGICA: SU EXPRESIÓN CONSTITUTIVA EN MAÍZ GENERA PLANTAS TOLERANTES AL ANEGAMIENTO

Caraballo Maillet, Luciano

Instituto de Agrobiotecnología del Litoral IAL, CONICET-UNL

Directora: Raineri, Jesica
Codirectora: Chan, Raquel

Área: Ciencias Biológicas

Palabras claves: HaHB11, anegamiento, maíz.

INTRODUCCIÓN

A nivel global y debido al cambio climático, el estrés abiótico cada vez cobra más importancia como causante de grandes pérdidas en la producción agropecuaria. Los tipos de estrés abiótico más comunes son el déficit o exceso hídrico y las temperaturas extremas. Para paliar estas pérdidas, se han desarrollado nuevos cultivos transgénicos con mayor tolerancia a alguna o varias condiciones adversas, incurriendo en menores penalidades en la producción.

Nuestro laboratorio trabaja especialmente con factores de transcripción (FT), proteínas encargadas de controlar y regular la expresión de genes en las células de un individuo. Uno de estos FT de girasol (*Helianthus annuus*), de tipo HD-Zip tipo I llamado HaHB11, fue usado para transformar especies heterólogas, cuyas evaluaciones arrojaron resultados prometedores. Las plantas de *Arabidopsis* sobreexpresantes de *HaHB11* presentan un aumento en su producción de semillas, a la vez que toleran mejor el estrés por inundación (Cabello et al., 2016). Además, HaHB11 mostró ser capaz de conferir mejores rendimientos de producción cuando era expresado constitutivamente en plantas de maíz (Raineri et al., 2019). Es por esto que se procedió a evaluar si también era capaz de mejorar la tolerancia de estas plantas al estrés por exceso de agua, es decir, por anegamiento, en un ensayo en invernadero.

OBJETIVOS

Determinar si las plantas transgénicas de maíz, que expresan el factor de transcripción de girasol HaHB11, son más tolerantes a anegamiento que sus controles no transgénicos.

Evaluar posibles respuestas fisiológicas diferenciales de los maíces HaHB11 respecto a sus controles, al enfrentarlos a un estrés por anegamiento.

Título del proyecto: Mejoramiento de cultivos extensivos para condiciones de estrés hídrico: escalando niveles desde el laboratorio a la producción con una aproximación interdisciplinaria

Instrumento: PICT-2671

Año convocatoria: 2015

Organismo financiador: ANPCyT (Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica – MinCyT)

Director/a: Chan, Raquel Lía

METODOLOGÍAS

Ensayo de anegamiento

Para el experimento se utilizaron semillas pertenecientes a dos eventos independientes que fueron transformados con la construcción *35S:HaHB11* (Eventos 2 y 3, E2 y E3, respectivamente), así como plantas segregantes nulas que servirían como controles no transgénicos. Las semillas se germinaron directamente en macetas individuales de 8 cm x 7cm con sustrato Growmix master E y semanalmente se agregó fertilizante. El ensayo se llevó a cabo en un invernadero de bioseguridad BS1, con fotoperíodo regulado (16 h de luz, 8 h de oscuridad). La temperatura osciló entre 15°C y 40°C. Esta amplitud se debe a que el invernadero no dispone de un control estricto de temperatura, pues cuenta con un sistema de refrigeración compuesto por ventiladores y tela refractante de luz solar. Las condiciones de riego fueron normales hasta el comienzo del ensayo de anegamiento.

Al alcanzar los maíces el estadio V4, se procedió a disponerlos aleatoriamente en bandejas, y llenarlas hasta el nivel del suelo con agua. Se dispuso también una bandeja sin inundar, como condición control, a la cual se le mantuvo el riego normal.

Durante el ensayo se cosecharon entre 3 a 5 plantas por punto para evaluar biomasa y características alométricas, realizar cortes histológicos, y cuantificar carbohidratos, proteínas y pigmentos.

Con el fin de evaluar su capacidad de recuperación del estrés, una vez concluidos los 14 días del anegamiento se procedió a reubicar las plantas en condiciones normales de crecimiento: 8 de cada genotipo que sufrieron el estrés, y 3 de cada genotipo que se mantuvieron en control.

Fase de recuperación

Los maíces fueron trasplantados a macetones de 20 L, para continuar con el ensayo hasta el final del ciclo de vida. Se utilizó el mismo sustrato, fotoperíodo y condición de riego normal que en el resto del experimento. Se tomaron mediciones alométricas, como altura y ancho de tallo, número y largo de raíces, área foliar y biomasa aérea seca. También se llevó registro de las fechas de floración (*anthesis* y *silking*) y la senescencia de las hojas.

Finalmente, al cabo de aproximadamente 140 días, y una vez que los maíces hubieran secado sus hojas por completo, se los cosechó y se cuantificaron distintos parámetros relacionados con la producción: biomasa vegetativa total, biomasa de la espiga, peso y número de granos producidos, e índice de cosecha.

Los promedios provienen de al menos tres réplicas biológicas. El error corresponde a la desviación estándar media de la muestra. Se realizaron test estadísticos: el asterisco (*) indica una diferencia estadísticamente significativa respecto al control en una prueba T de dos colas, con $p < 0,05$. Por otro lado, los símbolos *a*, *b* y *c* indican diferencias significativas en un ANOVA a 2 factores y test de múltiples comparaciones de Tuckey.

RESULTADOS/CONCLUSIONES

Durante el estrés pudimos observar que los maíces transgénicos desarrollaban tallos más anchos y de mayor volumen que los maíces Control, así como una mayor biomasa de raíces. Los distintos genotipos (Control, E2 y E3) mostraron diferencias en la estructura de sus raíces. Los cortes histológicos pusieron en evidencia que los transgénicos tendrían mayor número de vasos protoxilemáticos y una menor relación de área xilemática/medular.

Por otro lado, en las extracciones de pigmentos se vió que E2 y E3 presentan un mayor nivel de carotenoides y menores niveles de clorofila B que las plantas Control. Las extracciones de carbohidratos mostraron que los maíces E2 y E3, durante el estrés, tienden a acumular menores niveles de almidón en hojas que los controles, mientras que acumulan mayor cantidad en sus raíces, respecto al genotipo Control (Figura 1).

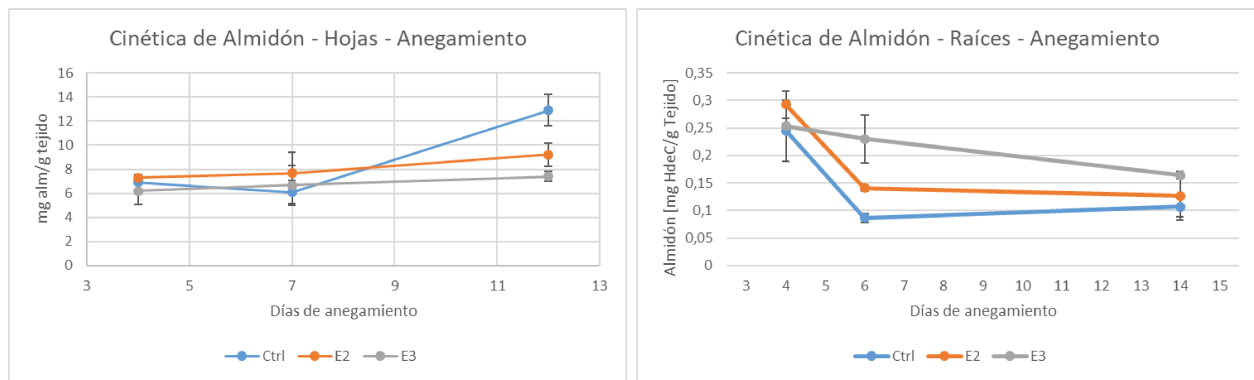


Figura 1: Cinética de los contenidos de almidón en hojas (izquierda) y raíces (derecha) de maíces durante el ensayo de anegamiento.

Más adelante, durante la fase de recuperación, pudimos ver que la altura final del tallo en maíces transgénicos era mayor que los Controles, así como su número de raíces nodales. Respecto a las hojas, los eventos E2 y E3 desarrollaron mayor número y consecuentemente mayor área foliar máxima que sus controles (Figura 2).

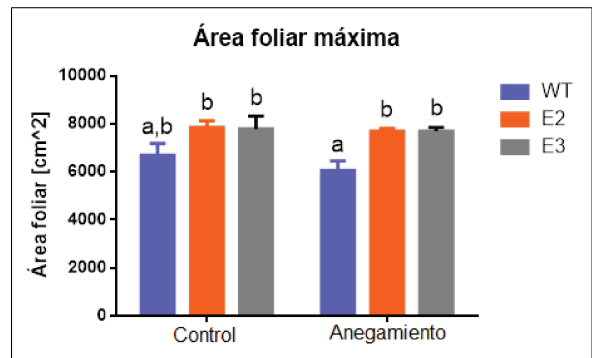


Figura 2: Área foliar máxima desarrollada por maíces Control, E2 y E3 que se mantuvieron en condiciones normales o fueron sometidos el estrés.

También se observó floración tardía para los genotipos transgénicos, acentuada en maíces que sufrieron el estrés, aunque también se ve la tendencia en las plantas que se mantuvieron en condiciones control (Figura 3.A). Asimismo, se ve una senescencia tardía en los maíces transgénicos, incluso después de relativizar el área verde foliar restante a los días después de floración (Figura 3.B).

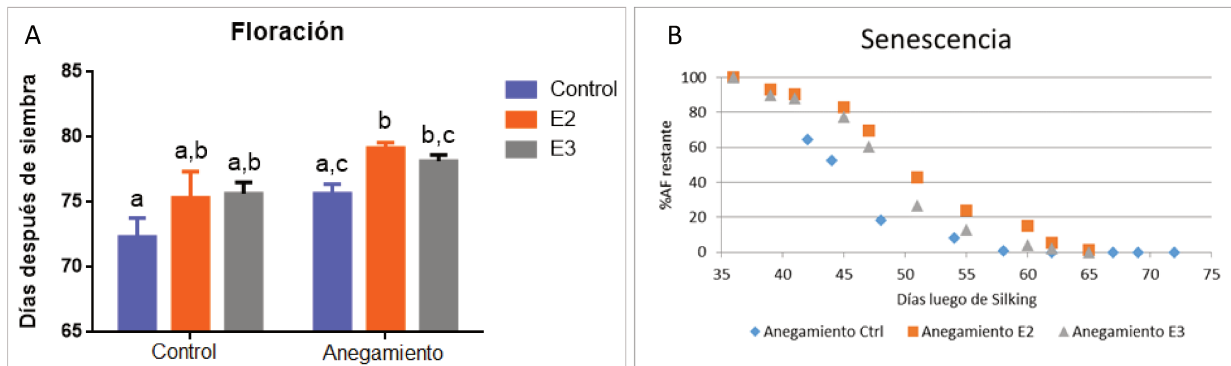


Figura 3.A) Fechas de floración promedio para plantas Control, E2 y E3 en condición control o de anegamiento. B) Senescencia foliar, medida como porcentaje de área foliar máxima verde, de maíces enfrentados al anegamiento.

Por último, al evaluar la producción final de granos y biomasa vegetativa, observamos que los transgénicos mostraron resultados muy interesantes a nivel agronómico (Figura 4). Los que sufrieron el estrés mostraron una tendencia a producir mayor biomasa total y de granos que sus controles; mientras que en condiciones control, si bien se vería una tendencia al aumento de la producción de biomasa vegetativa, ésta no se traduce en aumento del peso de granos, sugiriendo que no serían capaces de transportar o transformar todos los fotosintatos en granos. Si bien las diferencias no son significativas, pensamos que esto se debe a la dispersión y al bajo número de muestras. Se planean realizar futuros estudios con un número mayor de réplicas biológicas para evaluar estos parámetros.

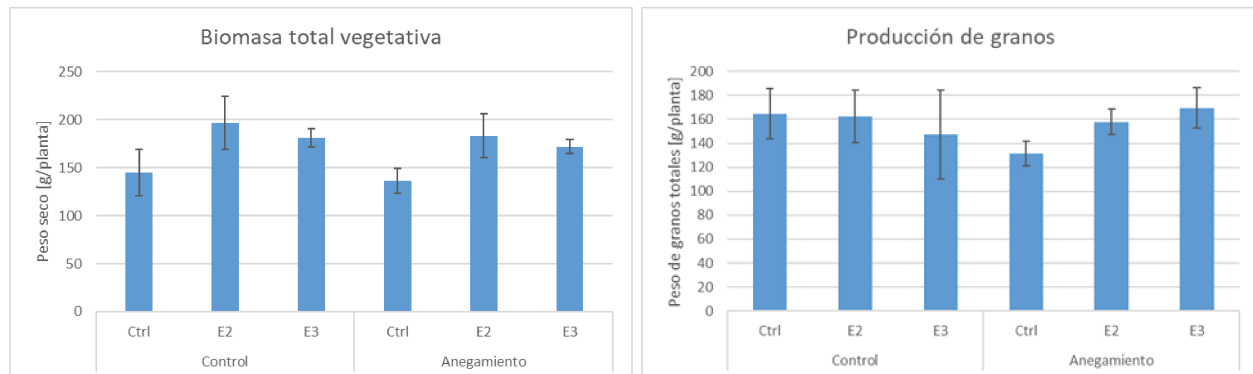


Figura 4: Producción de biomasa vegetativa (izquierda) y de granos (derecha) por planta, para maíces en condiciones control y maíces enfrentados al estrés por anegamiento.

BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

Cabello, J. V., Giacomelli, J. I., Piattoni, C. V., Iglesias, A. A., & Chan, R. L. (2016). The sunflower transcription factor HaHB11 improves yield, biomass and tolerance to flooding in transgenic Arabidopsis plants. *Journal of biotechnology*, 222, 73–83.

Raineri, J., Campi, M., Chan, R. L., & Otegui, M. E. (2019). Maize expressing the sunflower transcription factor HaHB11 has improved productivity in controlled and field conditions. *Plant science*, 287, 110185.