

La sobreexpresión del gen hahb-4 de girasol confiere tolerancia al estrés hídrico en *Arabidopsis thaliana*

Carlos A. Dezar, Daniel H. González, Gabriela M. Gago y Raquel L. Chan
Cátedra de Biología Celular y Molecular-Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas-Universidad Nacional del Litoral-CC 242
"El Pozo" S/N-3000 Santa Fe- e-mail: rchan@fcb.unl.edu.ar

Resumen

El gen hahb-4 de girasol pertenece a la familia Hd-Zip. Este tipo de genes codifica factores de transcripción que contienen un dominio de unión a ADN llamado homeodominio asociado a un cierre de leucinas y se ha postulado que estarían involucrados en procesos del desarrollo ligados a factores ambientales. La expresión de hahb-4 está regulada a nivel transcripcional por la disponibilidad de agua y la presencia de la hormona ABA. Con el objeto de determinar la función de este gen se transformaron plantas heterólogas de *Arabidopsis thaliana* de forma tal que las mismas lo sobreexpresen. Estas plantas presentan un fenotipo particular en condiciones de crecimiento normal: germinan más rápido, tienen hojas más redondeadas y tallos más cortos. La producción de semillas no se ve afectada. En condiciones de estrés hídrico estas características se acentúan y las plantas presentan una tolerancia pronunciada durante todo el período germinativo y vegetativo a la sequía, sobreviviendo a condiciones adversas extremas en las cuales los controles sin transformar mueren.

Introducción

De todos los factores que afectan el crecimiento normal y la producción de las plantas, la escasez de agua es uno de los que tienen consecuencias más graves. El efecto indeseado más serio producido por la sequía es la baja productividad. Por este motivo es que se han desarrollado estrategias para disminuir la baja producción agropecuaria. Entre estas estrategias está el riego artificial y el cruzamiento con genotipos que presentan tolerancia aumentada, pero no siempre es factible aplicarlas. La Ingeniería Genética ha aportado la posibilidad de incorporar genes de otras o de la misma especie que demuestren aumentar la tolerancia a condiciones desfavorables. Para poder hacer esto es necesario identificar este tipo de genes y evaluar seriamente los efectos beneficiosos que pueden generar su sobreexpresión y los efectos adversos que pueden tener. Un grupo importante de genes reguladores del desarrollo en vegetales justamente involucrado en la respuesta a factores ambientales y nutricionales es la familia de genes Hd-Zip que codifica proteínas que contienen un homeodominio asociado a un cierre de leucinas. Nuestro grupo ha aislado un número de genes de girasol pertenecientes a esta familia, entre los cuales se encuentra hahb-4. La expresión de hahb-4 está regulada por la disponibilidad de agua y la hormona ABA a nivel transcripcional (Gago et al., 2002). La existencia de esta regulación nos llevó a pensar que la función de este gen podía estar relacionada con la respuesta de la planta al estrés hídrico. En este sentido decidimos sobreexpresar este gen en plantas heterólogas de *Arabidopsis thaliana* con el objeto de "avanzar" su función. En el presente trabajo mostramos la obtención de las plantas transgénicas y el análisis del fenotipo resultante en condiciones normales de crecimiento y en condiciones en que las plantas se encuentran sometidas a la falta de agua.

Objetivo

El objetivo fundamental de este trabajo es determinar cuál es la función del gen hahb-4 de girasol. Siendo que la expresión de este gen está regulada por la disponibilidad de agua, que hemos determinado si hahb-4 está involucrado en la respuesta a la sequía y si es capaz de conferir tolerancia a esta condición adversa, lo cual lo convertiría en una herramienta biotecnológica.

Materiales y métodos

Materiales biológicos: el cultivo de plantas de *Arabidopsis thaliana* se realizó en una cámara con iluminación y temperatura controladas. Para los experimentos de transformación de plantas se utilizó el método de inmersión (floral dip) descrito por Clough y Bent (1998).

El ADNc completo correspondiente al gen hahb-4 fue clonado bajo el control del promotor CaMV35S en el vector pBI121.

Las preparaciones de ARN total de *Arabidopsis thaliana* se realizaron según el método descrito por Carpenter y Simon (Carpenter and Simon, 1998). Para el análisis de northern, se usó el siguiente procedimiento: se utilizaron potes de 12 cm de diámetro y 10 cm de altura. Dieciséis macetas fueron puestas en hileras de cuatro en bandejas plásticas cuadradas de 45 cm de lado. Para realizar los ensayos de estrés hídrico, la bandeja fue suplementada desde la germinación con 1, 1.5 o 2 l de agua total. En todos los casos no se volvió a agregar agua hasta el final del ciclo reproductivo. Estas condiciones de riego, manteniendo la cámara de cultivo un muy bajo porcentaje de humedad, genera en las plantas un estrés hídrico cuando éstas tienen 2 pares de hojas, roseta completa o flores formadas, respectivamente. El estrés hídrico puede observarse por la sequedad y resquebrajamiento de la tierra, pérdida de turgencia en las hojas y finalmente la muerte de las plantas.

Resultados

Se obtuvieron muchas líneas independientes de plantas, aunque sólo cuatro de ellas se sobreexpresaron el gen. En las demás líneas, si bien el gen fue incorporado, la expresión del mismo no se produjo a causa del fenómeno de silenciamiento. En la Figura 1 se puede observar un experimento de northern blot donde se aprecian los niveles de expresión del gen en las líneas obtenidas.

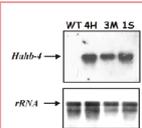


Figura 1 - Expresión de hahb-4 en plantas transformadas de *Arabidopsis thaliana*. Se muestra un experimento de northern blot donde en la primera calle se sembraron 20 mg de ARN total extraído de un conjunto de plantas sin transformar, y en las tres siguientes la misma cantidad de ARN de tres líneas independientes transformadas con 35S-hahb-4. En el panel superior la sonda utilizada corresponde a la región codificante de hahb-4 y en el panel inferior se utilizó una sonda ribosómica como control de la similitud entre las cantidades sembradas y transferidas.

Las plantas transgénicas germinan más rápido que las no transformadas. En la Figura 2A se pueden observar las diferencias en el % de germinación en condiciones normales. A su vez, la longitud de las raíces es mayor en las plantas transformadas que en las sin transformar (Figura 2B). La segunda característica notoria en el fenotipo causado por el transgén es el acortamiento de la longitud del tallo que emerge de la roseta una vez iniciada la fase reproductiva. Las plantas transformadas elongan el tallo más lentamente y llegan a una altura máxima equivalente al 85% de la altura de una planta salvaje crecida en las mismas condiciones (Figura 2C). Sin embargo, el número de vainas formadas no varía significativamente entre las plantas salvajes y transgénicas, siendo levemente mayor en las transgénicas a pesar del acortamiento del pedúnculo floral. Este acortamiento del tallo genera una inflorescencia más compacta, se puede apreciar en la Figura 2D.

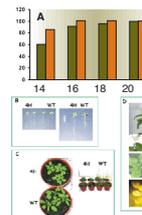


Figura 2 - Fenotipo de plantas transformadas con 35S-hahb4 en condiciones control. A: % de germinación a distintos tiempos de plantas transformadas (verde) o sin transformar (naranja). Los tiempos se cuentan una vez que las plantas fueron puestas en cámara de cultivo después de romper la dormancia por tratamiento de 48 hs a 4°C (n: 22 plantas por ensayo). B: largo de las raíces de plantas transformadas y salvajes de 5 y 10 días. C: forma de las hojas y el tallo de plantas transformadas y salvajes adultos. D: forma de la inflorescencia de plantas transformadas adultas.

Siendo que el producto del gen hahb-4 actúa como factor de transcripción, y que su expresión a nivel transcripcional está regulada por la presencia de agua, nos resultó interesante examinar qué tipo de respuesta ofrecían las plantas transformadas en condiciones de escasez de agua. En ensayos de tolerancia a la sequía hechos en forma independiente y de forma tal que el estrés hídrico se produjera en distintas etapas del desarrollo de plantas cultivadas en tierra se observa claramente una mayor tolerancia de las plantas transgénicas a las condiciones adversas.

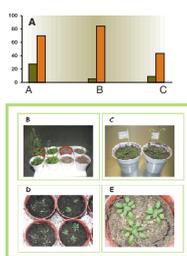


Figura 3 - Tolerancia al estrés hídrico en plantas transformadas con 35S-hahb4. A: Porcentaje de supervivencia alcanzado por plantas salvajes (barras verdes) o transgénicas (barras naranjas) en tres ensayos independientes. En el primer ensayo el estrés se produjo cuando las plantas eran adultas (estadio reproductivo) en el segundo las plantas estaban en período vegetativo avanzado (roseta completa) y en el último el estrés se produjo desde la germinación. B: Fenotipo de plantas transgénicas (1ª y 2ª fila) o no transformadas (3ª y 4ª fila) sometidas a estrés hídrico cuando las plantas son adultas y regadas nuevamente al final del ciclo de vida. C: Fenotipo de plantas transgénicas (izquierda) o no transformadas (derecha) sometidas a estrés hídrico cuando las plantas están en período vegetativo. D: Fenotipo de plantas transgénicas (derecha) o no transformadas (izquierda) sometidas a estrés hídrico desde la germinación y regadas nuevamente. E: Plantas transgénicas sometidas a extrema sequía en estadio de desarrollo vegetativo.

En la Figura 3A se ilustran tres ensayos de este tipo y las diferencias que se producen en la supervivencia de las plantas sometidas a tratamientos muy drásticos de sequía. De la misma forma, en la Figura 3 (B-F) se puede apreciar el estado de las plantas sometidas a este tratamiento y el grado de recuperación de las mismas. Además, las plantas transformadas germinan más rápido y mejor en medios que contienen manitol o NaCl, mostrando de esta forma que en el período germinativo presentan una tolerancia aumentada al estrés osmótico o causado por altas concentraciones salinas (Figura 4).

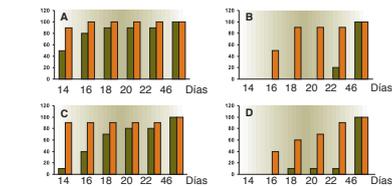


Figura 4 - Tolerancia al estrés salino y osmótico en plantas transformadas con 35S-hahb4. A: Porcentaje de plantas salvajes (celestes) o transgénicas (violeta) germinadas a los distintos tiempos luego de rota la dormancia en presencia de manitol 50 mM. B: Porcentaje de plantas salvajes (celestes) o transgénicas (violeta) germinadas a los distintos tiempos luego de rota la dormancia en presencia de manitol 200 mM. C: Porcentaje de plantas salvajes (celestes) o transgénicas (violeta) germinadas a los distintos tiempos luego de rota la dormancia en presencia de NaCl 30 mM. D: Porcentaje de plantas salvajes (celestes) o transgénicas (violeta) germinadas a los distintos tiempos luego de rota la dormancia en presencia de NaCl 150 mM.

Discusión

En el presente trabajo describimos la obtención de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas de forma tal que sobreexpresan el gen hahb-4 de girasol bajo el control del promotor 35S del virus del mosaico de la coliflor. Las plantas transformadas que expresan el gen hahb-4 presentan características particulares que nos indican cual sería el rol que juega este factor de transcripción en girasol. Las plantas que portan el transgén tienen en promedio un tallo más corto, hojas redondeadas y germinan más rápido en condiciones normales de crecimiento. El acortamiento del tallo se debe principalmente a una inhibición de la expansión celular. Estas características en conjunto parecen indicar que el producto del gen estaría actuando como un inhibidor de la elongación y expansión celular. Esta observación nos llevó a pensar que este podría ser un mecanismo de la planta para soportar la escasez de agua. Cuando se observa lo que sucede con las raíces pareciera haber un efecto en cierto modo contrario al observado en hojas y tallos. Las raíces se elongan más en las plantas transgénicas que en las no transformadas. Esto podría servir para que la planta utilice sus recursos energéticos para elongar raíces y obtener la mayor cantidad de agua disponible. Todo esto, junto con la observación primaria de que la expresión de este gen aumenta considerablemente cuando las plantas sufren estrés hídrico, nos llevó a analizar el comportamiento de las plantas transgénicas frente a diversas condiciones que reducen la disponibilidad de agua.

En numerosos ensayos en los cuales se sometieron las plantas a estrés hídrico se observó una tolerancia aumentada de las plantas transformadas. Esto pudo comprobarse en distintos períodos del desarrollo, tanto en la germinación como en período vegetativo temprano y tardío, y en período reproductivo. El porcentaje de supervivencia de las plantas transformadas es notoriamente alto con respecto al de las plantas salvajes sometidas a sequía. Además, las transgénicas germinan mejor y alcanzan mejor desarrollo de las raíces en medios salinos y con alta osmolaridad.

Todos estos resultados en su conjunto nos permiten concluir que hahb-4 es un gen involucrado en la respuesta de la planta al estrés hídrico, y que su función específica sería la de generar cambios fenotípicos favorables a la tolerancia a esta condición adversa. Notoriamente, ninguno de estos cambios afecta negativamente la producción de semillas ni la germinación de las mismas.

Siendo el producto del gen hahb-4 un factor de transcripción, se puede suponer que el mismo regula la expresión de un conjunto de genes involucrados en la producción del fenotipo observado. La determinación de los genes cuya expresión se ve modificada al sobreexpresar hahb-4 permitiría inferir que mecanismos utiliza la planta para aumentar su tolerancia al estrés hídrico. El conjunto de resultados hace vislumbrar un uso biotecnológico de este gen para la producción de plantas de interés comercial con tolerancia a la sequía.

Referencias

-Ausubel, F.M., Brent, R., Kingston, R.E., Moore, D.D., Seidman, J.G., Smith, J.A. and Struhl, K. (1980) Current Protocols in Molecular Biology. John Wiley & Sons, N.Y.
-Carpenter, C. and Simon, A. (1998) En: Methods in Molecular Biology, vol 82: *Arabidopsis* Protocols. J.M. Martinez-Zapater and J. Salinas (Eds.), Humana Press Inc., Totowa, New Jersey.
-Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Plant J. 16, 735-743.
-Gago, G.M., Almoguer, C., Jordano, J., González, D.H. and Chan, R.L. (2002) Plant Cell & Environment 25, 633-640.