



## **EVALUACIÓN DE PLANTAS QUE EXPRESAN DE FORMA ECTÓPICA Y CONSTITUTIVA EL FACTOR DE TRANSCRIPCIÓN HAHB11**

**Reato, Débora**

*Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Instituto de Agrobiotecnología del Litoral IAL- CONICET*

*Directora: Raineri, Jesica*

*Codirectora: Chan, Raquel*

Ciencias Biológicas

Palabras claves: HaHB11, producción, biomasa.

### **INTRODUCCIÓN**

El arroz (*Oryza sativa* L.) alimenta a más de la mitad de la población mundial. Debido a su importancia, se estima que la producción mundial de arroz debe aumentar en un 30% en los próximos 20 años para satisfacer las demandas proyectadas del aumento de la población y el desarrollo económico. Sin embargo, como otros cultivos el arroz está expuesto a condiciones ambientales desfavorables que afectan su rendimiento potencial. Frente a estos ambientes desfavorables, las plantas disparan un conjunto de respuestas moleculares en las que intervienen proteínas reguladoras llamadas factores de transcripción (FTs). Entre los FTs se encuentran los genes de la familia con homedominio y cierre de leucinas (HD-Zip) que tienen diversas funciones en el desarrollo de las plantas y en la respuesta al estrés.

HaHB11 es un FT de girasol que pertenece a esta familia. En ensayos controlados de estrés salino, estrés por sequía e inundaciones, las plantas de *Arabidopsis* transformadas de forma de expresar *HaHB11* demostraron ser más tolerantes que los controles sin transformar. Las plantas de maíz que expresan HaHB11 también logran desarrollar mayor biomasa que sus controles. Esto plantea la hipótesis de que el FT de girasol HaHB11 es una herramienta potencial en el mejoramiento de plantas.

### **OBJETIVOS**

El objetivo general de este trabajo fue determinar si el gen *HaHB11* tiene efectos benéficos en plantas de arroz como los observados en *Arabidopsis* y maíz.

### **METODOLOGÍA**

#### **Material vegetal modificado genéticamente:**

Se utilizaron plantas Kitaake control y transgénicas para la construcción *35S:HaHB11*. Se identificaron tres líneas homocigotas que expresan *HaHB11* que se denominaron Arroz Evento 1, 2 y 3 (AE1, AE2 y AE3).

#### **Cultivo de semillas de arroz a campo:**

Título del proyecto: Obtención de plantas transgénicas de maíz, arroz y soja con características de alta productividad y tolerancia a estrés abiótico.

Año convocatoria: 2014

Organismo financiador: FONCYT

Directora: Raquel Lía Chan

Se trabajó con una densidad de siembra de 230 plantas/m<sup>2</sup>. Las semillas se sembraron tres piletones de 2 m de ancho x 5 m de largo.

#### **Clasificación de las líneas homocigotas de acuerdo a su nivel de expresión:**

Para evaluar los niveles de transcritos de *HaHB11*, se realizó una extracción de ARN utilizando el reactivo Trizol® (Invitrogen™) de acuerdo a las instrucciones del fabricante, seguida de la medición de la expresión de *HaHB11*, con la técnica RT-qPCR que fue llevada a cabo utilizando un termociclador PTC-200TM (MJ Research Inc). Los niveles de expresión de los genes de Actina se usaron como normalizadores.

#### **Cortes histológicos de hojas enrolladas y medición del área y número de células buliformes:**

Se tomaron muestras de las hojas banderas de los genotipos transgénicos y Kitaake sin transformar e inmediatamente se las colocó en etanol 70% y luego se realizó una inclusión en parafina para finalmente realizar cortes transversales por medio de un micrótopo de rotación. Los cortes se tiñeron con Safranina-verde rápido. Las fotografías se tomaron con una cámara Nikon montada sobre un microscopio Eclipse E200 (Nikon) con la ampliación 40 X. El número y área de las células buliformes fueron analizados con el programa ImageJ.

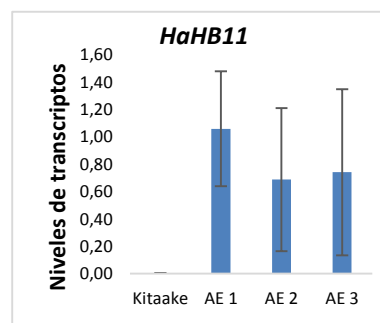
#### **Toma de muestras:**

Se tomaron muestras en los distintos estadios fenológicos: prefloración (15 días antes de floración), floración y posfloración (15 días después de la floración). Se cuantificaron número de macollos y número de panojas. También se midió por separado la biomasa de hojas, tallos y panojas. Las partes vegetativas se secaron en estufa hasta peso constante para obtener valores de biomasa. Se debe aclarar que la forma de obtener los datos fue juntar plantas de cada piletón en cada muestra y luego un promediar los valores obtenidos de los 3 piletones. Se trabajó con desviaciones estándar o con desviación estándar de la media como se indica en cada ilustración.

## **RESULTADOS**

Para cumplir con los objetivos propuestos, se evaluaron tres líneas de plantas transgénicas de arroz disponibles en el Instituto de Agrobiotecnología del Litoral (IAL) transformadas con la construcción *35S:HaHB11*.

Un aspecto importante a tener en cuenta en este apartado es que todos los parámetros discutidos se midieron en el mismo estadio fenológico y por ende, en diferentes tiempos, ya que se observó que el genotipo *HaHB11* tiene un retraso en la floración de 15 días. Se trabajó con tres eventos que expresan *HaHB11* que de ahora en más llamaremos AE1, AE2 y AE3. Las tres líneas de arroz con las que se trabajó expresan en niveles similares *HaHB11* (figura 1)



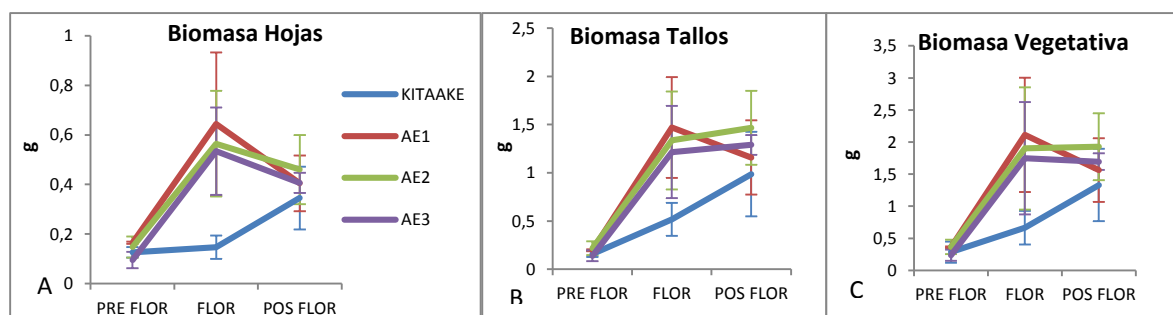
**FIGURA 1.** Niveles de transcritos de los genotipos *HaHB11* y Kitaake

#### **Estudio del desarrollo de las plantas**

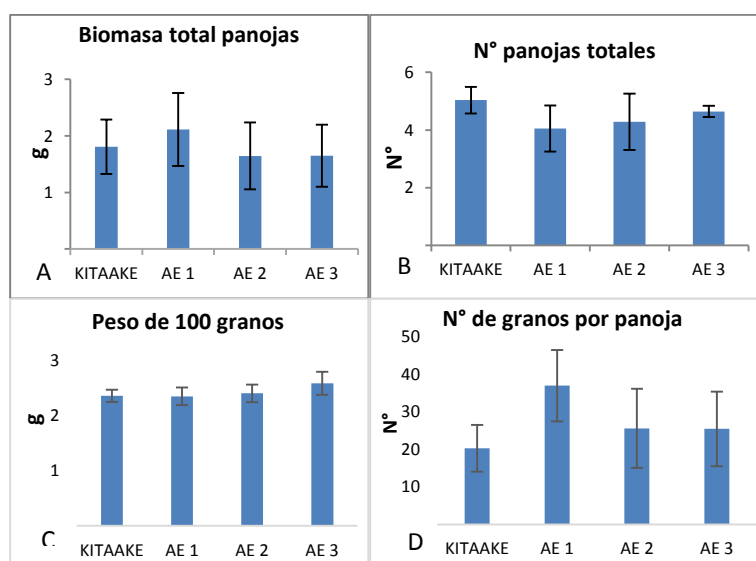
Se realizaron mediciones para analizar la acumulación de biomasa, hacia qué órgano se particiona y en las distintas etapas del desarrollo.

Se cuantificó la biomasa de tallos, hojas y la biomasa vegetativa (que corresponde a la suma de la biomasa de tallos y hojas) y en todos los casos, las plantas transgénicas mostraron mayor biomasa que sus controles sin transformar en floración (figura 2). Esta diferencia deja de ser significativa al final del ciclo de vida.

Por otro lado, para lograr un mayor entendimiento de las componentes del rendimiento, se evaluó el número de panojas por planta y su biomasa, el número de granos por cada panoja y el peso promedio de 100 granos (figura 3). Se observa que AE1 es la única línea que logra mayor rendimiento que sus controles (figura 3A). En cuanto al número de panojas, las plantas transgénicas presentan un menor valor respecto a sus controles. Al evaluar el número de granos, se observa una gran diferencia entre ambos genotipos: las plantas transgénicas logran fijar mayor número de granos por panoja que las plantas control. Sin embargo, al observar el peso de los granos se observa una similitud entre los genotipos. Estos resultados explican cómo las plantas transgénicas a pesar de lograr un número de panojas menor que sus controles, las igualan o incluso superan en rendimiento de semillas.



**FIGURA 2.** Promedio de la biomasa de hojas (A), tallos (B), y biomasa vegetativa (C) en cada estado fenológico.



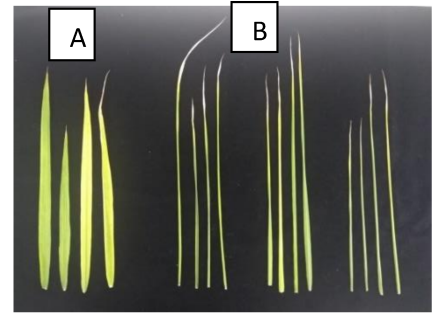
**FIGURA 3.** Promedio de biomasa de panojas por planta (A), promedio de número de panojas totales por planta (B), promedio del peso de 100 granos (C) y número de granos por panoja (D) en madurez fisiológica.

### Fenotipo de hojas

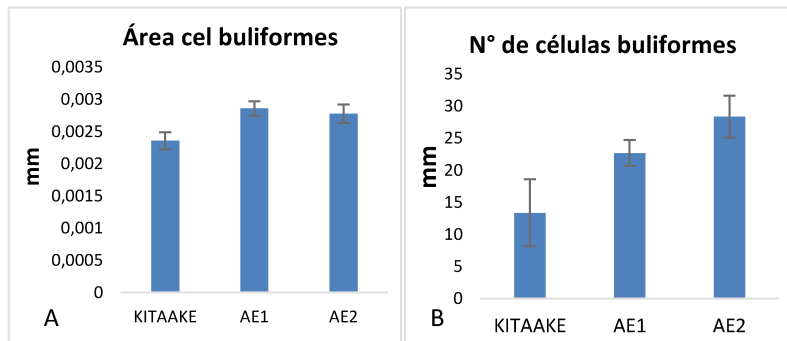
Las hojas son órganos que tienen funciones esenciales como la fotosíntesis, la respiración y la transpiración. Estas funciones dependen de la forma de la hoja y de su arquitectura tridimensional. El enrollamiento moderado de las hojas en el arroz conduce a la formación de toldos foliares y una mayor eficiencia fotosintética, mejorando las respuestas al estrés al reducir la pérdida de agua por transpiración.

Durante el transcurso de la investigación se observó que las plantas transgénicas presentaban un fenotipo particular en sus hojas, que se caracterizó por el enrollamiento de la hoja sobre la cara abaxial como se muestra en la figura 4.

Para comprender mejor el fenotipo, se midió el área y número de células buliformes (figura 5A y 5B), observándose que las plantas modificadas con *HaHB11* presentaron mayor número y área de éstas células.



**FIGURA 4.** Enrollamiento de las hojas. Control Kitaake (A), hojas de plantas transgénicas (B).



**FIGURA 5.** Gráficos de Área (A) y Número (B) de células buliformes.

## CONCLUSIONES

Las plantas del genotipo *HaHB11* logran acumular más biomasa en hojas y tallos en floración. Esto puede estar relacionado a que presentan un fenotipo especial en sus hojas caracterizado por mayor área y número de las células buliformes. En estadio reproductivo, las plantas *HaHB11* desarrollan un menor número de panojas que sus controles, pero esto no tiene penalidad en la biomasa de panojas, incluso la línea AE1 logra mayor producción de semillas que su control. Este hecho se explica debido a que en las panojas de las plantas transgénicas se fijan más granos, que no difieren en peso con los controles.

## BIBLIOGRAFÍA BÁSICA

**Cabello, JV.** 2016. *The sunflower transcription factor HaHB11 improves yield, biomass and tolerance to flooding in transgenic Arabidopsis plants.* Journal of Biotechnology 222 (2016) 73–83

**Cabello, JV.** 2017. *The sunflower transcription factor HaHB11 confers tolerance to water deficit and salinity to transgenic Arabidopsis and alfalfa plants.* Journal of Biotechnology 257 (2017) 35–46.

**Raineri, J.** 2019. *Maize expressing the sunflower transcription factor HaHB11 has improved productivity in controlled and field conditions.* Plant Science, 110185.