

Biotecnología agrícola para mejorar la tolerancia a sequía y salinidad

Pedro L. Rodríguez¹ y José Manuel Pardo²

¹ Instituto de Biología Molecular y Celular de Plantas (CSIC-UPV), Valencia.

² Instituto de Recursos Naturales y Agrobiología del CSIC, Sevilla.

Y llamé a la sequía sobre la tierra, sobre los montes, sobre el trigo, sobre el mosto, sobre el aceite, sobre lo que produce la tierra. (Hageo 1:11).

Efectivamente, y sin necesidad de intervención de la ira divina, la aparición de episodios de sequía es inevitable. Por ejemplo, en 2012 Estados Unidos sufrió una sequía grave que redujo notablemente la producción agrícola, causando pérdidas superiores a 20.000 millones de dólares. En general, diferentes tipos de estrés ambiental (sequía, salinidad, fluctuaciones de temperatura) pueden llegar a disminuir la productividad de las cosechas entre un 50-80%. Estas pérdidas son particularmente graves en el actual contexto de población mundial creciente, cambio climático, escasez de agua en amplias zonas del planeta y alto consumo de agua por la actividad agrícola. La salinidad y la sequía representan graves limitaciones ambientales para la agricultura y se requiere un esfuerzo vigoroso para generar nuevas variedades vegetales con mayor eficiencia en el uso del agua y tolerancia a salinidad.

RESPUESTA VEGETAL A LA SEQUÍA Y EL PAPEL DE LA HORMONA ABA

Las plantas son organismos sésiles por lo que han desarrollado sofisticados mecanismos fisiológicos para responder al estrés ambiental. En condiciones de sequía se disparan los niveles de la hormona ácido abscísico (ABA), que juega un papel crucial en la regulación del consumo de agua y en la fisiología vegetal de respuesta al estrés hídrico. La aparición de esta molécula durante la evolución fue decisiva para que las primeras plantas no acuáticas pudieran colonizar el medio terrestre hace ahora 450 millones de años. El ABA es un compuesto orgánico sintetizado por la planta, transportado a otras regiones de la misma, con potentes efectos fisiológicos a muy baja dosis y que desempeña un papel determinante en la coordinación de la respuesta vegetal a la sequía. Químicamente, el ABA ($C_{15}H_{20}O_4$) es un sesquiterpenoide (*Figura 1*) derivado de la unidad isopentenil pirofosfato sintetizada en el cloroplasto a través de la ruta 2C-metil-D-eritritol-4-fosfato >>>



»» (MEP). El ABA contiene un átomo de carbono asimétrico en C1 y el enantiómero natural es S (+) ABA. La existencia de este carbono asimétrico implica que la síntesis química en laboratorio produce una mezcla racémica y son necesarios métodos quirales para separar la forma activa. Además, la estructura del ABA es sensible a la acción del UV, lo que limita su aplicación de forma exógena como agroquímico. No obstante, avances recientes en la investigación básica sobre el ABA permiten plantear abordajes biotecnológicos para aprovechar el papel de esta hormona en mejorar la resistencia de las plantas a la sequía.

En situaciones de estrés hídrico, las plantas orquestan una red compleja de respuestas coordinadas por el ABA que tienen por objeto limitar la pérdida de agua mediante transpiración, mantener el crecimiento de la raíz, evitar la deshidratación de los tejidos y proteger las estructuras y componentes de las células vegetales (*Figura 1*). El mecanismo de acción del ABA conlleva cambios en la membrana de las células para modificar el transporte iónico y de agua así como en la transcripción del genoma vegetal para adaptar la célula a la situación de estrés. Por ejemplo, el ABA es capaz de regular la pérdida de agua que ocurre a través de los estomas, unos poros de la superficie vegetal que regulan el intercambio de gases (CO_2 , O_2 , H_2O) con el entorno. Los estomas se cierran en respuesta al ABA cuando la planta sufre un estrés hídrico, reduciendo la pérdida de agua por transpiración. El ABA también es necesario para mantener el crecimiento de la raíz principal cuando la capa freática desciende o para percibir en qué zonas del suelo sigue existiendo humedad.

LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN DEL ABA Y SU APLICACIÓN BIOTECNOLÓGICA

Un avance decisivo en la ruta de señalización fue el descubrimiento en 2009 de los receptores de la hormona, una familia de 14 genes que se denominaron PYR/PYL/RCAR (*Cutler et al., 2010*). Tras percibir la hormona, estos sensores son capaces de inhibir específicamente la actividad de proteínas fosfatasa de tipo 2C (PP2Cs) del grupo A, que desempeñan un papel fundamental como reguladores negativos de la señalización del ABA. Sólo 4-5 meses tras el descubrimiento de los receptores de ABA, hasta cinco grupos independientes publicaron las estructuras de tres miembros de esta familia, PYR1, PYL1 y PYL2, e incluso sus complejos ternarios con la parte catalítica de las PP2Cs, concretamente con ABI1 y HAB1. Ello permitió establecer que el mecanismo estructural y funcional por el cual el ABA es percibido, conduce a la inhibición de las PP2Cs y de ese modo se des-reprime la función de las quinasas SnRK2s (*Figura 1*). El módulo PYR/PYL/RCAR-ABA-PP2C, más las SnRK2s, ofrece un mecanismo elegante para el control de cascadas de señalización mediadas por fosforilación de una manera dependiente de ligando. En resumen, la percepción del ABA



por sus receptores conduce a la eliminación del freno fisiológico a la respuesta hormonal, el cual es necesario en condiciones de ausencia de estrés, donde no se necesita desplegar el costoso arsenal descrito anteriormente.

El conocimiento estructural de la ruta de ABA ha allanado el camino para el diseño de agonistas de ABA capaces de modular la respuesta al estrés hídrico, o bien para el diseño de receptores modificados capaces de activarse en respuesta a agroquímicos ya en uso. Entre los primeros podemos citar la quinabactina, un derivado de las sulfonamidas que es capaz de activar ciertos receptores de ABA y aumentar así la resistencia a sequía. No obstante, esta molécula deberá demostrar todavía su efectividad en campo y superar los estrictos controles de seguridad ambiental y alimentaria. Alternativamente, podríamos aprovechar ciertos agroquímicos ya en uso para dotarlos de nuevas propiedades, por ejemplo la activación de los receptores de ABA (*Park et al., 2015*). Obviamente, estas moléculas no fueron diseñadas para ocupar el bolsillo específico de unión del ABA, pero con el conocimiento estructural de los receptores y tras una mutagénesis dirigida, se ha conseguido generar un receptor modificado que posee sensibilidad nanomolar para la percepción de un agroquímico llamado mandipropamid. Finalmente, también podríamos sobreexpresar (de modo constitutivo o inducible por estrés) los receptores o versiones sensibilizadas de los mismos para reforzar la respuesta de la planta y conseguir de este modo una respuesta adaptativa más rápida y eficaz, lo cual no requiere la adición de compuestos químicos (*Pizzio et al., 2013*).

OTRAS ESTRATEGIAS: LA RUTA DE SEÑALIZACIÓN MEDIADA POR FACTORES DE TRANSCRIPCIÓN DREB1/CBF, DREB2 Y CHAPERONINAS BACTERIANAS DE RNA

Además de la ruta dependiente de ABA, existen otras respuestas al estrés ambiental que son aparente- »»



mente independientes de la hormona, aunque también se han descrito ejemplos de su cooperación con ABA. Entre ellas cabe destacar la señalización inducida por las proteínas DREB2, miembros de la familia de factores de transcripción (TFs) AP2/ERF. Existen 8 DREB2s en *Arabidopsis*, de los cuales DREB2A y DREB2B son muy inducidos por sequía, salinidad y calor, y funcionan como activadores transcripcionales de numerosos genes de respuesta al estrés, que también suelen presentar en sus promotores secuencias de unión para los TFs de respuesta a ABA. Puesto que las respuestas a diferentes tipos de estrés ambiental convergen en una respuesta celular común, es fácil encontrar que algunas rutas sirven para generar tolerancia simultánea ante situaciones de frío, sequía y salinidad. Un buen ejemplo de ello son los TFs DREB1/CBFs, que desempeñan un papel crucial en la respuesta al estrés por frío, pero que también mejoran tolerancia a sequía y salinidad en plantas transgénicas. De hecho, se han generado diferentes plantas de cosecha con mayor tolerancia a sequía mediante la sobreexpresión de los DREB1/CBFs. También se ha demostrado que proteínas del mundo bacteriano pueden ser útiles para conferir tolerancia a varios estreses ambientales (Castiglioni *et al.*, 2008). En particular, las proteínas Csp, que son sintetizadas en *E. coli* en respuesta al frío y desempeñan una función crucial como chaperoninas de RNA, han servido para desarrollar la primera generación de plantas de cosecha con mayor tolerancia a sequía (maíz *DroughtGard*). Varias formas de estrés convergen en un daño celular común e inducen que el RNA sea atrapado en formas mal plegadas y las chaperoninas de RNA son cruciales para proteger el metabolismo del RNA durante un estrés celular. *DroughtGard* se introdujo en 2013 en USA y ya se han plantado más de 300.000 Has. A destacar que Monsanto ha donado *DroughtGard* al proyecto WEMA (*Water Efficient Maize for Africa*) y

que en 2017 se plantarán ocho millones de Has. en Sudáfrica, Kenia, Uganda, Tanzania y Mozambique.

ESTRATEGIAS PARA AUMENTAR LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD

La salinidad, definida como el exceso de sales en el suelo, limita el crecimiento vegetal porque dificulta la captación de agua desde un medio más hipertónico y porque inhibe la entrada de nutrientes esenciales que están diluidos en una combinación de sales heterogénea que incluye otros minerales no deseados o directamente tóxicos para la planta. Por tanto, la respuesta adaptativa de la planta tiene elementos comunes con la sequía, y otros específicos más relacionados con la homeostásis iónica, fundamentalmente del sodio, que es tóxico a altas concentraciones, y del potasio, un nutriente esencial cuya captación se ve afectada por los iones sodio. Las plantas utilizan, en proporción variable, tres mecanismos esenciales para prevenir el envenenamiento sódico: 1) la restricción de la entrada indeseada de sodio; 2) su retirada activa del citosol, ya sea mediante su expulsión al exterior celular (apoplasto y suelo) o su secuestro en la vacuola; y 3) la redistribución de Na entre los distintos tejidos de la planta, de manera que el contenido de sodio en las raíces no sobrepasa el umbral de toxicidad y el exceso de sodio es transportado vía xilema para su acumulación preferente en tallos y en las hojas más viejas. La combinación de estas estrategias permite el mantenimiento de una adecuada relación K/Na en el citosol y la acumulación vacuolar de osmolitos que contribuyen a disminuir el potencial hídrico de la planta y aumentar la turgencia celular. La mejora convencional mediante la explotación de la variabilidad natural por genética cuantitativa asistida por marcadores moleculares de alta densidad ha permitido la selección de trigo más tolerante a la salinidad (Munns *et al.*, 2012). El mecanismo subyacente es una mayor >>>



retirada del sodio en el flujo xilemático mediada por proteínas de tipo HKT que actúan como canales de sodio. Se han identificado procesos similares en arroz y tomate, y anticipan un margen razonable de mejora, pero la variabilidad natural disponible en especies cultivadas es claramente insuficiente para satisfacer la demanda tecnológica.

Por otro lado, a pesar de la identificación de un altísimo número de genes implicados en la respuesta a la salinidad el éxito en la traslación de los resultados de laboratorio al campo ha sido muy limitado, debido a que la tolerancia a la salinidad es muy poligénica en las condiciones de cultivo. La planta debe controlar su homeostasis iónica y el balance hídrico, reducir el estrés oxidativo, reajustar su metabolismo y reprogramar su desarrollo vegetativo y reproductivo. La activación ectópica de rutas enteras o de procesos metabólicos relacionados con el estrés celular mediante la expresión de proteínas reguladoras, principalmente TFs, han producido los fenotipos más tolerantes pero frecuentemente conllevan una penalización en el crecimiento y producción del cultivo en condiciones no estresantes. Aquellos casos en los que ha obtenido un fenotipo interesante (eficacia, estabilidad, sin penalización) se han visto obstaculizados por el exceso regulatorio que dificulta la comercialización de un cultivo transgénico.

No obstante, el formidable desarrollo que están suponiendo las nuevas técnicas de edición génica (nucleasas TALEN y el sistema CRISPR/Cas) anticipan una oleada de nuevos productos biotecnológicos con distintas modificaciones poligénicas diseñadas *ad-hoc*. Entre todos los avances recientes en este campo, quisiéramos destacar la demostración práctica de la edición génica dirigida directamente por un comple-

jo ribonucleico de RNA guía y nucleasa Cas9, sin la transferencia de DNA recombinante a la planta (Woo *et al.*, 2015).

CULTIVOS BIOTECNOLÓGICOS CON MAYOR RESISTENCIA A SEQUÍA Y SALINIDAD

Puesto que la ruta de señalización del ABA y los factores de transcripción DREB1 y DREB2 están conservados en todo el universo vegetal, el conocimiento generado en la planta modelo *Arabidopsis* puede ser implementado en plantas de cosecha según avanza nuestro conocimiento genómico. Alternativamente, los microorganismos pueden aportar soluciones como ocurre con las proteínas Csp. Esta vía y otras nos permitirán generar cultivos biotecnológicos que aprovechan los avances de la ciencia básica para mejorar significativamente la resistencia a sequía y salinidad de cereales que sirven de sustento básico a la población del planeta.

BIBLIOGRAFÍA

- Castiglioni P, et al. (2008). Bacterial RNA chaperones confer abiotic stress tolerance in plants and improved grain yield in maize under water-limited conditions. *Plant Physiol* **147**, 446-55.
- Cutler SR, et al. (2010). Abscisic acid: emergence of a core signaling network. *Annu. Rev. Plant Biol.* **61**, 651-79.
- Munns R, et al. (2012). Wheat grain yield on saline soils is improved by an ancestral Na(+) transporter gene. *Nat Biotechnol* **30**, 360-64.
- Park SY, et al. (2015). Agrochemical control of plant water use using engineered abscisic acid receptors. *Nature* **520**, 545-48.
- Pizzio GA, et al. (2013). The PYL4 A194T mutant uncovers a key role of PYR1-LIKE4/PROTEIN PHOSPHATASE 2CA interaction for abscisic acid signaling and plant drought resistance. *Plant Physiol* **163**, 441-55.
- Woo JW, et al. (2015). DNA-free genome editing in plants with preassembled CRISPR-Cas9 ribonucleoproteins. *Nat Biotechnol* **33**, 1162-64.