



UNIVERSITAT
POLITÈCNICA
DE VALÈNCIA



Master en Biología Celular y Molecular de Plantas

**CARACTERIZACIÓN DEL GEN *CRIO6* DE *Beta vulgaris* Y SU
APLICACIÓN EN EL DESARROLLO DE PLANTAS TOLERANTES AL
FRÍO**

Antonio Bustamante González

**Director
José Miguel Mulet**

RESUMEN

Las acuaporinas (AQP) constituyen una gran familia de proteínas integrales de membrana que están presentes en toda la escala evolutiva, incluyendo las arqueas, bacterias y eucariotas. Las AQP forman poros proteicos que permiten el paso selectivo de agua, y en algunos casos de otros elementos como glicerol, urea, agua oxigenada o ácido bórico.

El material de partida de este proyecto surge de un trabajo previo hecho en el laboratorio del prof. Ramón Serrano. El prof. Roc Ros generó un biblioteca de cDNA de remolacha (*Beta vulgaris*), que fue evaluada frente a diferentes situaciones de estrés abiótico. Concretamente por estrés salino por Kanhonou, Serrano y Ros en 2001, por sequía por Mulet en 2004 y por frío por Mulet en 2004. En esta última caracterización se identificaron los genes *CRIO 1-6*.

En el presente trabajo evaluamos la tolerancia de plantas de *Arabidopsis* que sobreexpresan el gen *CRIO6* de *Beta vulgaris* obteniendo resultados en diferentes condiciones de estrés abiótico. Destacan el aumento del 30% de la germinación en condiciones de frío y el 11% en condiciones limitantes de boro.

En lo que respecta a la evaluación del desarrollo de las plantas bajo condiciones de salinidad y sequía, encontramos una clara ventaja de las plantas transformadas con *CRIO6* frente a las plantas control en las diferentes variables analizadas.

En conclusión el gen *CRIO6* otorga a las plantas un tolerancia en las distintas condiciones evaluadas en esta investigación, por lo cual sería un candidato prometedor para poder generar plantas de interés agronómico con mayor resistencia a estrés abiótico.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia, fuente incondicional de apoyo, ya que sin ellos no hubiera sido posible haber culminado esta meta en mi vida. A mis hijos Sebastián y Miguel, mi esposa María Fernanda, mis padres Zully y Antonio y mi hermana Carmen.

Un agradecimiento especial a JM Mulet por el apoyo para realizar esta tesis.

ÍNDICE

1	INTRODUCCIÓN	8
1.1	El estrés de las plantas	8
1.2	Estrés abiótico y la agricultura	9
1.3	Respuesta general de las plantas	11
1.4	Acuaporinas	12
1.5	El boro en las plantas	14
1.6	Resultados previos	15
2	OBJETIVOS	17
3	MATERIALES Y MÉTODOS	18
3.1	Material vegetativo	18
3.2	Esterilización de semillas	18
3.3	Medios de cultivo	19
3.3.1	Suplementos de los medios de cultivo	19
3.4	Condiciones de cultivo <i>in vitro</i>	20
3.5	Ensayo de germinación <i>in vitro</i>	20
3.6	Ensayo de longitud de raíces <i>in vitro</i>	20
3.7	Condiciones de cultivo en invernadero para evaluación de estrés por sequía y salinidad	21
4	RESULTADOS	22
4.1	Evaluación de germinación en medios selectivos	22
4.1.1	Estrés por cationes tóxicos (LiCl, Espermidina, Norespermidina)	23
4.1.1	Estrés osmótico (Manitol) y por salinidad (NaCl)	24
4.1.2	Estrés oxidativo (H ₂ O ₂)	26
4.1.1	Estrés por ácidos orgánicos débiles (ácido acético y ácido sórbico)	27
4.1	Evaluación de germinación en frío	28
4.2	Evaluación de boro	29
4.2.1	Datos de germinación en ácido bórico	29
4.2.2	Datos de longitud de raíz en MS suplementado con boro	30
4.3	Evaluación en condiciones de sequía y salinidad	31
4.3.1	Datos de materia seca en condiciones de sequía	31
4.3.1	Datos longitud de la planta en sequía	32
4.3.2	Porcentaje de contenido de agua en condiciones de sequía	33
4.3.3	Datos de salinidad	34
4.3.1	Datos de peso fresco y seco en condiciones de salinidad	35
4.3.1	Porcentaje de contenido de agua en condiciones de salinidad	36
5	DISCUSIÓN	37
6	CONCLUSIONES	40
7	BIBLIOGRAFÍA	41

ÍNDICE DE FIGURAS

<i>FIGURA 1 Estructura 3D de acuaporina.....</i>	<i>13</i>
<i>FIGURA 2 Porcentaje de germinación de plantas transformadas con CRIO6 y del ecotipo silvestre col2 en medio MS suplementado con LiCl 29 mM, Espermidina 3 mM y Norespermidina a 2,8 (1) y 3 (3) mM. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.....</i>	<i>23</i>
<i>FIGURA 3 Porcentaje de germinación de plantas transformadas con CRIO6 y del ecotipo silvestre col2 en medio MS suplementado con Manitol a 280 mM y 300 mM, y NaCl a 140 mM. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.....</i>	<i>24</i>
<i>FIGURA 4 Porcentaje de germinación de plantas transformadas con CRIO6 y del ecotipo silvestre col2 en medio MS suplementado H₂O₂ a 14 mM. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.</i>	<i>26</i>
<i>FIGURA 5 Porcentaje de germinación de plantas transformadas con CRIO6 y el ecotipo silvestre col2, en medio MS suplementado con ácido sórbico 0,5mM y ácido acético a 3,5 mM. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.....</i>	<i>27</i>
<i>FIGURA 6 porcentaje de germinación de plantas transformadas con CRIO6 y ecotipo silvestre col2, en medio MS en un ambiente a 10°C. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.</i>	<i>28</i>
<i>FIGURA 7 Porcentaje de germinación de plantas transformadas con el gen CRIO6 y ecotipo silvestre col2 en medio MS suplementado con 0 mM y 200 mM de boro. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.</i>	<i>29</i>
<i>FIGURA 8 Datos de longitud de raíz en cm de plantas transformadas con el gen CRIO6 y ecotipo silvestre col 2 en medio MS suplementado con 0 mM y 200 mM de Boro. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.</i>	<i>31</i>
<i>FIGURA 9 Peso (gr) de plantas transformadas con el gen CRIO6 y ecotipo silvestre col2 .(*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.....</i>	<i>32</i>

FIGURA 10 Longitud (cm) de plantas transformadas con el gen CRIO6 y ecotipo silvestre col2. () Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student..... 32*

FIGURA 11 Contenido de agua (%) de plantas transformadas con el gen CRIO6 y ecotipo silvestre col2. () Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student..... 33*

FIGURA 12 datos de longitud de plantas transformadas con el gen CRIO 6 y ecotipo silvestre col2. () Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student..... 34*

FIGURA 13 peso fresco y seco de plantas transformadas con el gen CRIO 6 y ecotipo silvestre col2. () Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student..... 35*

FIGURA 14 Porcentaje de contenido de agua de plantas transformadas con el gen CRIO6 y ecotipo silvestre col2. () Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student..... 36*

ÍNDICE DE FOTOS

<i>Ilustración 1 Placa con medio MS suplementado con Manitol</i>	25
<i>Ilustración 2 Placa con medio MS y crecimiento a 10°C</i>	28
<i>Ilustración 3 Placa con medio MS suplementado con ácido bórico</i>	30
<i>Ilustración 4 Placa con MS suplementado con ácido bórico, evaluación del desarrollo radicular (200 mM)</i>	30
<i>Ilustración 5 Foto de medición de longitud en plantas sometidas a un periodo de sequía</i>	33
<i>Ilustración 6 Foto de plantas sometidas a estrés por salinidad</i>	34

1 INTRODUCCIÓN

1.1 El estrés en las plantas

De acuerdo con Larcher se considera estrés a cualquier desviación de las condiciones óptimas para la vida de un organismo (Larcher, 1995). Según este criterio resulta difícil determinar en qué punto un factor biótico o abiótico se convierte en estrés. Las condiciones idóneas para el desarrollo normal de una especie, pueden ser estresantes para otra, e incluso puede haber diferencias entre las mismas variedades, ya que sus necesidades en las distintas fases del crecimiento son diferentes. Por ello es complicado definir en que condiciones una planta está estresada.

Los factores que puedan generar estrés en plantas se clasifican en dos categorías: bióticos y abióticos.

- El estrés biótico es el causado por organismos vivos como: bacterias, hongos, animales superiores e incluso otras plantas, los cuales alteran el desarrollo normal de la misma, ocasionando alteraciones fisiológicas, por daños físicos o por competición por nutrientes.
- El estrés abiótico es provocado por condiciones climáticas que alteran el desarrollo vegetativo, las principales causas son las sequías, inundaciones, altas o bajas de temperatura, salinidad, presencia de sustancias tóxicas en el suelo, y mucha o poca luz.

Los efectos dependerán de la duración y la intensidad de las condiciones que provoque el estrés. Si esta duración e intensidad son cortas y moderadas, la planta puede recuperarse al desaparecer el estrés, si son duraderas e intensas pueden acabar causando la muerte del organismo. Si al someterse a un estrés de larga duración e intenso las plantas no mueren se las puede considerar tolerantes, por el contrario si estas mueren se las consideran susceptibles.

Los mecanismos que emplean las plantas para afrontar el estrés pueden ser:

- Evitar el estrés impidiendo la exposición al mismo, por medio de mecanismos fisiológicos.
- La tolerancia empleando mecanismos moleculares para ello.

Estos mecanismos de resistencia son lo que se denominan adaptaciones, son constitutivos, están genéticamente determinados por la planta. La resistencia se puede adquirir mediante aclimatación, dicho proceso provoca deficiencias fisiológicas no heredables (Hopkins y Huner, 2004).

1.2 Estrés abiótico y la agricultura.

La FAO estima que en el 2050 la población mundial será un 34% mayor que la actual, alcanzando los 9.100 millones de personas. Para poder alimentar esta creciente población, se estima a la vez que la producción de alimentos deberá incrementarse en un 70% (FAO, 2009).

A eso se le suma que la mayor parte de la tierra cultivable en el planeta presenta condiciones subóptimas para el crecimiento vegetal:

- El 40% de la tierra cultivable se asocia con suelo salino y/o pH menor a 5, donde el crecimiento está obstaculizado por la presencia de aluminio que en esas condiciones es soluble.
- Las temperaturas extremas ya sean altas o bajas, limitan la producción y en conjunto afectan prácticamente a toda el área cultivable.
- Periodos de sequía cada vez más largos y que afectan a grandes superficies.
- Contaminación del suelo por sustancias tóxicas y metales pesados.
- Aumento de la radiación UV.
- Mayor incidencia de plagas (FAO 2013).

En este contexto, una alternativa para lograr la mejora genética de las plantas es utilizar técnicas moleculares, ya que la exigencia de conseguir mejoras en los cultivos es mayor y se requiere realizarla en el menor tiempo posible.

Una de las opciones es la utilización de técnicas de ingeniería genética, aunque esta labor es complicada para obtener plantas resistentes a estrés abiótico, ya que la resistencia a este tipo de estrés depende de más de un gen (Mahajan y Tuteja 2005), por ello se está trabajando mediante varias estrategias para generar cultivos resistentes. Un claro ejemplo lo encontramos en (Khodakovskaya et al., 2006), al desarrollar una construcción inducible por frío mediante el promotor *cor15a* de *Arabidopsis* que expresa el gen de una desaturasa de ácidos grasos (FAD7). En este experimento observaron que el porcentaje de supervivencia de las líneas transgénicas en condiciones de crecimiento de frío (*chilling*) era muy superior al del control y que, a nivel celular, las membranas plastidiales no presentaban daños estructurales. Otras estrategias que están dando resultados implican la producción de osmoprotectores, proteínas LEA, chaperonas y la expresión de factores de transcripción de genes COR (*COld-responsive*, de respuesta de frío) (Jewel, Campbell y Godwin 2010).

1.3 Respuesta general de las plantas.

Gracias a distintos estudios realizados se ha podido dilucidar distintos mecanismos que poseen las plantas para enfrentar condiciones de estrés por frío, entre ellos destacan:

- Enzimas desaturasas de ácidos grasos, que intervienen en la modificación de la composición lipídica de las membranas celulares para su estabilización.
- Chaperonas moleculares, para evitar el plegamiento erróneo de proteínas provocado por el frío.
- Homólogos de proteínas LEA, prolina, mono y oligosacáridos, y proteínas altamente hidrofílicas que actúan como osmoprotectores.
- Proteínas con capacidad para funcionar como anticongelantes.
- Componentes de la cadena fotosintética que sirven para el transporte de electrones (Kosova et al., 2011).

La respuesta de la planta se inicia en la membrana, donde existen receptores de las señales provocadas por alteraciones del medio, esta señal genera segundos mensajeros como especies reactivas de oxígeno (ROS), calcio, e inositol-fosfatos. Otras proteínas responden a estos segundos mensajeros e inician diversas cascadas que activan o desactivan factores de transcripción que a su vez controlan grupos de genes (Mahajan y Tuteja, 2005). Algunos de estos genes activados codifican proteínas que se encargan de transmitir la señal de respuesta a estrés a otras células, iniciando la respuesta sistémica.

1.4 Acuaporinas

Las acuaporinas (AQP) constituyen una gran familia de proteínas integrales de membrana que están presentes en todos los ámbitos de la vida, incluyendo las arqueas, bacterias y eucariotas. Las AQP forman poros proteicos que permiten el paso selectivo de agua, y otras moléculas pequeñas como glicerol o urea.

La primera acuaporina identificada fue la AQP1 de los glóbulos rojos humanos. Actualmente hay identificadas más de 450 acuaporinas y en la literatura existen numerosos estudios funcionales y estructurales.

Las acuaporinas se agrupan en dos subfamilias principales,

- acuaporinas ortodoxas, que transportan únicamente agua.
- acuagliceroporinas, transportan agua, glicerol y otras moléculas (Zardoya 2005).

Los diferentes miembros de la familia de acuaporina participan en una gran variedad de procesos fisiológicos, pero la función que comparten estas proteínas es el transporte de agua, glicerol y moléculas pequeñas a través de la membrana (Magni et al., 2006).

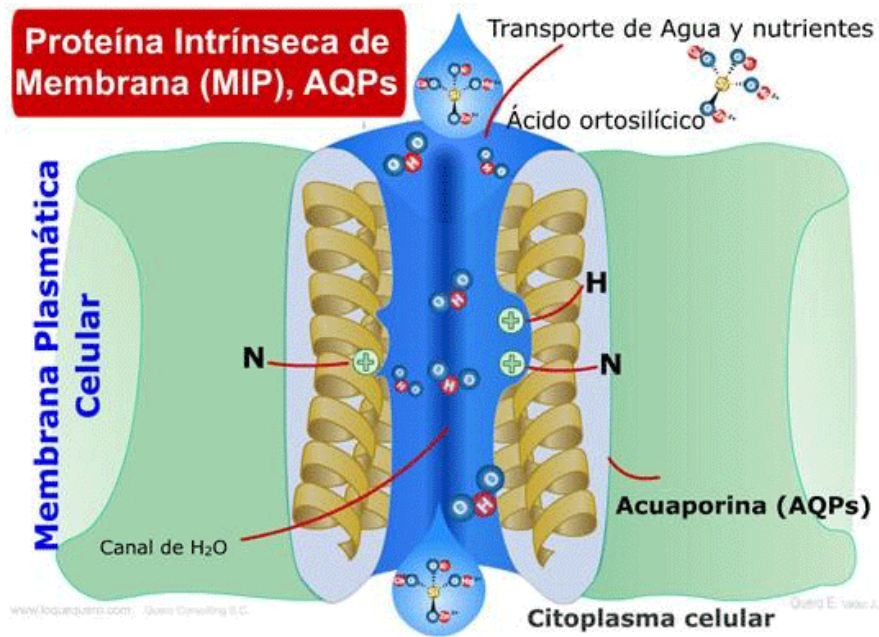


Fig. Representación de la proteína acuaporina integrada a la membrana plasmática

FIGURA 1 Estructura 3D de una acuaporina.

Todas las acuaporinas forman tetrámeros, en los cuales cada monómero funciona como un poro de agua independiente. Un monómero está compuesto por seis hélices transmembrana (figura 1) y (Wu y Beitz 2003).

1.5 El boro en las plantas

El boro (B) es un micronutriente esencial requerido en las funciones fisiológicas más importantes para el crecimiento y desarrollo normal de las plantas superiores, este elemento participa en:

- La formación de la estructura de la pared celular.
- Elongación de la raíz.
- Metabolismo de los carbohidratos.
- Acumulación de fenol.
- Crecimiento del tubo polínico.
- Integridad de la membrana de la célula (O’Nelli et al., 2004).

A nivel molecular, el primer transportador de boro (B) identificado en un sistema biológico fue BOR1, un transportador de salida tipo B esencial para la carga eficiente en el xilema de *Arabidopsis thaliana*. Este gen se expresa principalmente en células del periciclo de la raíz y su sobreexpresión aumenta el tamaño de la raíz en condiciones de limitación de boro (Miwa et al., 2006). En cultivos frutales, se ha caracterizado recientemente el transportador CmBOR1 en *Citrus macrophylla* (Paola et al., 2013).

Por otra parte, NIP5 es un canal de ácido bórico que facilita el flujo de boro a las células de la raíz en *A. thaliana* y *B. napus* y es necesario para la absorción de boro de la superficie radicular y se activa en condiciones de déficit de boro. En *A. thaliana*, la sobreexpresión de AtNIP5, resulta en el alargamiento de la raíz en condiciones deficientes en boro, además, algunas evidencias indican que otras acuaporinas podrían estar involucradas en el transporte de boro (Martínez MC et al., 2008).

Parte del boro absorbido se acumula en vacuola. Esta reacción se ha relacionado con la actividad de AtTIP5, un miembro de la familia de acuaporinas localizado a la membrana celular del tonoplasto. Plantas

transgénicas que sobreexpresan AtTIP5 son capaces de crecer en niveles tóxicos de boro gracias a que reducen la concentración del mismo en el citoplasma y aumentan la concentración vacuolar (Pang et al., 2010).

1.6 Resultados previos

El material de partida de este proyecto surge de un trabajo previo hecho en el laboratorio del prof. Ramón Serrano. El prof. Roc Ros generó un biblioteca de cDNA de remolacha (*Beta vulgaris*) inducida por estrés abiótico (salinidad) en un vector (pYPGE15) que permitía la expresión en levadura de panadería (*Saccharomyces cerevisiae*) bajo el control de un promotor constitutivo y fuerte. Esta estrategia nos permite identificar y evaluar la funcionalidad de los genes frente a diferentes situaciones de estrés. Originalmente esta genoteca se probó en condiciones de salinidad (Kanhonou et al., 2001). Con posterioridad a este trabajo se utilizó esta genoteca para identificar genes que dieran tolerancia a sequía con el resultado de la identificación del gen *BvSAT1* (Mulet et al., 2004a) y de *BvGLB2* una hemoglobina no simbiótica de tipo II (Mulet et al., 2004b).

Un estudio adicional utilizó esta genoteca en condiciones de frío. La expresión de la biblioteca de cDNA en levadura permitió identificar 6 genes de *B. vulgaris* (tabla 1). En medio de crecimiento YPD se identificaron 4 genes, nombrados como *CRIO* 1-4. En medio de crecimiento SD se identificaron 2 genes nombrados *CRIO* 5 y 6. La lógica de hacer el escrutinio en dos medios diferentes se debe a que en medio rico YPD la levadura tiene muchas rutas bioquímicas reprimidas, mientras que en medio SD la mayoría de rutas de biosíntesis están activas, lo que incide en que diferentes genes pueden ser determinantes en diferentes circunstancias.

Tabla 1 cDNAs identificados en el rastreo de genes que confieren tolerancia a frío.

Medio	cDNA	Característica
YPD	CRIO 1	Homologo de <i>ScDID1/AtSNF7/CHMP4/VPS32</i>
	CRIO 2	Homologo <i>CRIO1</i>
	CRIO 3	Homologo de <i>ScDID2/AtVPS46/CHMP1</i>
	CRIO 4	Homologo de <i>PDR16/SEC14</i>
SD	CRIO 5	Proteína con dominio Ring-Finger
	CRIO 6	Proteína Intrínseca del tonoplasto (TIP)

Se empleo medio YPD y SD, en condiciones de 10°C. Se muestran los cDNAs según fueron nombrados y las características de cada uno

Según resultados del Dr. Mulet los genes *CRIO1-3* están localizados en el endosoma tardío en células vegetales, formando parte del complejo ESCRTIII.

2 OBJETIVOS

- Estudiar el comportamiento de plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con el gen *CRIO6* bajo diferentes condiciones de estrés abiótico.
- Estudiar si el gen *CRIO6* puede participar en el transporte de boro en plantas.
- Determinar una posible función molecular del gen *CRIO6* basándose en los resultados de esta investigación.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Material vegetativo

Para esta investigación se utilizaron plantas de *Arabidopsis thaliana* transformadas con una construcción que permite la sobreexpresión del gen *CRIO6* de forma constitutiva bajo el control del promotor 35S. Se seleccionaron las líneas que daban mayor expresión por experimentos de *Northern*, que fueron denominadas como líneas 4, 6 y 7. Como control se utilizó el ecotipo silvestre col2 transformado con la misma construcción que se utilizó para introducir el gen *CRIO6*, pero vacía. Estas plantas fueron obtenidas y seleccionadas por ser las que más expresan el gen *CRIO6* por la Dra. Rosa Porcel.

3.2 Esterilización de semillas.

Las semillas se trataron en primer lugar con una solución de etanol al 70% (v/v) en agitación durante 25 minutos. Después se eliminó el etanol, se añadió una solución de hipoclorito sódico (lejía) al 2,5% (v/v) y Triton X-100 al 0,05% (v/v), y se mantuvo en agitación durante 9 minutos. A continuación se eliminó la lejía y se hicieron 3 lavados con agua destilada estéril. Las semillas se mantuvieron en agua estéril a 4°C durante 3 días, para que tuviera lugar la estratificación.

3.3 Medios de cultivo

Se utilizó MS (Murashagi-Skooge) que es el medio utilizado habitualmente para el cultivo *in vitro* de *A. thaliana*. Está compuesto por sacarosa al 1% (m/v), sales MS al 0,4% (m/v) y 10mM de MES (ácido 2-N Morfolino etanosulfónico), agar al 0,8% (m/v), el pH se ajustó a 5.7 con Tris-base.

Los medios se esterilizaron en un autoclave durante 60 minutos a 120°C y una atmosfera de presión. Las sustancias termolábiles o que podían precipitar al ser sometidas a alta presión y temperatura como espermidina, ác. bórico y ác. sórbico se añadieron en las concentraciones indicadas al medio de cultivo ya estéril y enfriado por debajo de los 50°C.

3.3.1 Suplementos de los medios de cultivo

En la tabla se muestra los diferentes suplementos utilizados y las condiciones de trabajo para cada uno

Tabla 2 Suplementos de medios

Espermidina	3 mM
Norespermidina	2,8 mM y 3 mM
Ác. acético	2,5 mM
Ác. sórbico	0,55 mM
Manitol	280 mM y 300 mM
Basta	75 µM y 100 µM
H₂O₂	14 mM
NaCl	140 mM
LiCl	29 mM
Ác. bórico	12,5 mM y 15 mM
Na₂SO₄	70 mM

3.4 Condiciones de cultivo *in vitro*.

Para el cultivo en medio sólido se utilizaron placas Petri de 9 cm de diámetro y placas cuadradas de 12 cm de largo que contenían medios MS sólidos suplementado con las sustancias que se mencionan en la tabla 2. Para el cultivo en medio MS sin boro se utilizaron placas cuadradas para poder evaluar el desarrollo radicular.

Todas las placas se sellaron con cinta adhesiva (3M Micropore) que contiene microporos que permiten la transpiración y se dejaron en incubación en una cámara e condiciones controladas de 24°C de temperatura, fotoperiodo de día largo (16 horas de luz y 8 de oscuridad) y una intensidad de luz de $100 \mu\text{E} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

3.5 Ensayo de germinación *in vitro*.

Se trata de un ensayo de germinación en los distintos medios a evaluar, se sembraron en medio sólido 30 semillas de cada línea, y se incubaron a 23°C ó a 10°C. Cada tratamiento se repitió 3 veces. Las placas fueron examinadas a los 7 y 10 días.

3.6 Ensayo de longitud de raíces *in vitro*.

Se sembraron en placa cuadradas 12 semillas, 3 de cada línea, colocándolas todas sobre una misma línea. Las placas se colocaron verticalmente, de manera que las raíces continuaran creciendo sobre la superficie del medio y se incubaron durante una semana a 24°C y durante 4 semanas a 10°C. Las placas se escanearon y se midió la longitud.

3.7 Condiciones de cultivo en invernadero para evaluación de estrés por sequía y salinidad.

Se utilizaron bandejas de plástico con 51 alvéolos de 5 x 5 cm (altura x diámetro), dispuestas en el interior en cubetas de plástico. En los alveolos se colocaron cestillos de plástico rellenos de sustrato, a cada uno de los cuales se trasplantó una sola planta germinada de placa Petri.

Para la evaluación del estrés por salinidad, las plantas fueron irrigadas 2 veces por semana mediante inundación de la cubeta con una solución que contenía 8,55 gr. de NaCl por litro. Para la evaluación en condición de sequía las plantas una vez trasplantadas no se les proporcionó agua durante todo el experimento.

Las condiciones de crecimiento del invernadero fueron de día largo a $24 \pm 2^\circ\text{C}$ de temperatura y $70 \pm 5\%$ de humedad relativa, con una intensidad de luz aproximada de $130 \text{ uE} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Las plantas fueron evaluadas a los 70 días posterior al trasplante.

4 RESULTADOS

4.1 Evaluación de germinación en medios selectivos

Las plantas que sobreexpresan el gen *CR106* se ha sometido a diferentes tratamientos para generar diversos tipos de estrés como:

- Cationes tóxicos (LiCl, espermidina, noespermidina).
- Estrés salino (NaCl).
- Estrés osmótico (manitol).
- Estrés oxidativo (H₂O₂).
- Estrés por ácido orgánico débil (ác. acético y ácido sórbico).

El objetivo de esta diversidad de medios, es determinar si la sobreexpresión del gen en plantas confiere tolerancia o sensibilidad a las distintas condiciones, y así podernos hacer una idea sobre su posible función en la planta, y cual podría ser el mecanismo que afecta de forma positiva o negativa en el desarrollo de éstas.

4.1.1 Estrés por cationes tóxicos (LiCl, espermidina y noespermidina)

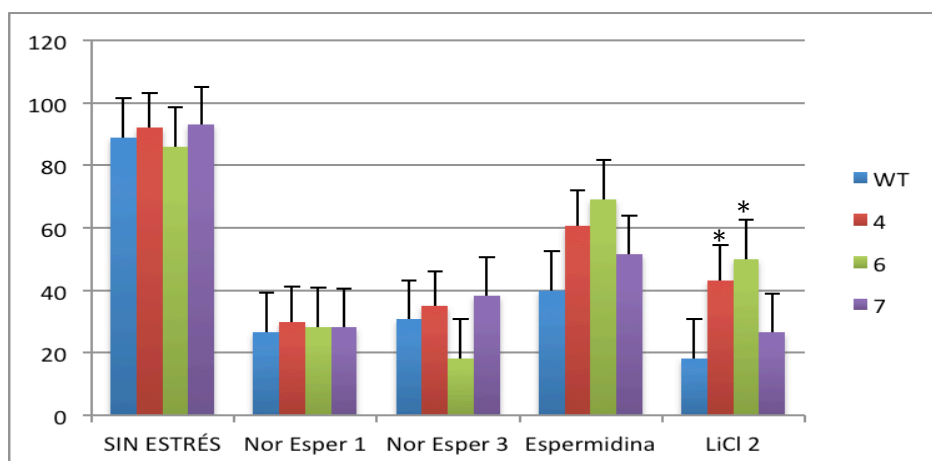


FIGURA 2 Porcentaje de germinación de plantas transformadas con *CRIO6* y del ecotipo silvestre *col2* en medio MS suplementado con LiCl 29mM, espermidina 3mM y noespermidina a 2,8 (1) y 3 (3) mM. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

Frente al estrés causado por cationes tóxicos, podemos observar en la figura 2, que el comportamiento de las líneas 4 y 6, transformadas con el gen *CRIO6* fue diferente estadísticamente bajo estas condiciones.

Respecto al medio suplementado con la noespermidina a concentración de 2,8mM y 3mM, fue similar para todas las plantas evaluadas, teniendo un promedio de germinación entre el 30 y 40%; por el contrario el comportamiento de las líneas en el medio suplementado con espermidina, mostró una diferencia en las líneas 4 y 6, ya que obtuvieron una mayor germinación 60,8% y 69,2% respectivamente, mientras que el control obtuvo el 40%, pero el test estadístico no la consideró relevante.

La diferencia de resultados entre la espermidina y la noespermidina puede deberse al hecho de que, la primera se encuentra en forma natural en las plantas y esto la hace naturalmente mas resistente a concentraciones altas de ella, mientras que la segunda no la encontramos de forma natural en las plantas.

Sin embargo el resultado de tolerancia a la toxicidad por espermidina, otorgada por el gen *CR106*, puede deberse a que este eliminando de forma mas eficiente el contenido de agua oxigenada que se produce en la célula por degradación de las poliaminas. En estos momentos estamos repitiendo estos experimentos por ver si se pueden considerar significativos.

En el caso del cloruro de litio (LiCl) el comportamiento de las líneas transformadas 4 y 6 fue estadísticamente diferente con un 43,3% y 50% de germinación al compararlos con el control que presenta un 18,3%.

4.1.1 Estrés osmótico (Manitol) y por salinidad (NaCl)

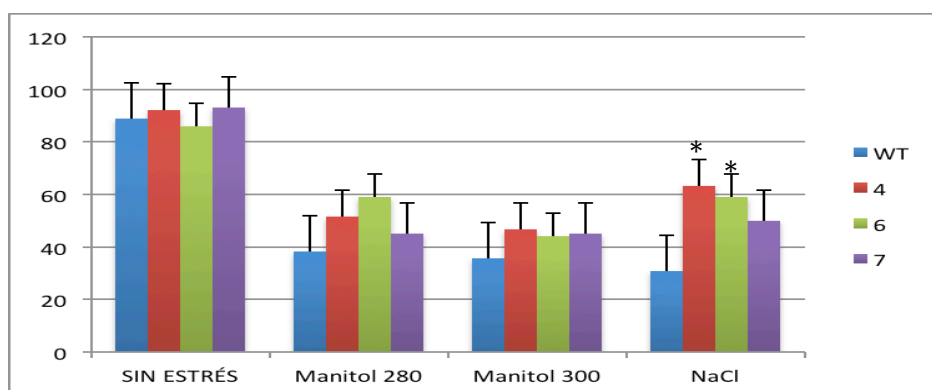


FIGURA 3 Porcentaje de germinación de plantas transformadas con *CR106* y del ecotipo silvestre *col2* en medio MS suplementado con Manitol a 280mM y 300mM, y NaCl a 140mM. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

Los resultados obtenidos y expuestos de forma visual en la figura 3 muestran que la germinación de las líneas transformadas 4, 6 y 7 con el gen *CRIO6*, muestran claramente mayor porcentaje de germinación en un medio suplementado con NaCl. Concretamente presentaron un 63,3%, 59,2% y 50% respectivamente, mientras que el control solo un 30,8%; esto indica claramente que el gen esta otorgando resistencia a condiciones de salinidad a nivel de germinación.

En el caso de 280mM de manitol las líneas muestran una diferencia frente al control, aunque un test estadístico no demostró diferencias significativas.

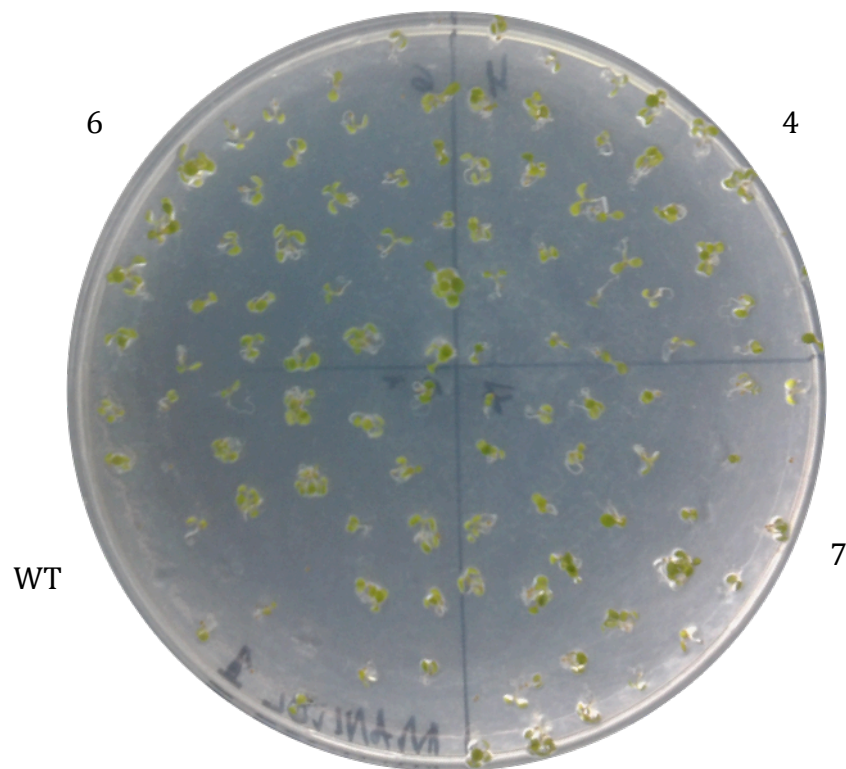


Ilustración 1 Placa con medio MS suplementado con Manitol

4.1.2 Estrés oxidativo (H₂O₂)

Hicimos experimentos con estrés oxidativo inducido por agua oxigenada, pero en experimentos con medio MS suplementado con H₂O₂ no mostró diferencias entre las líneas transformadas y el control:

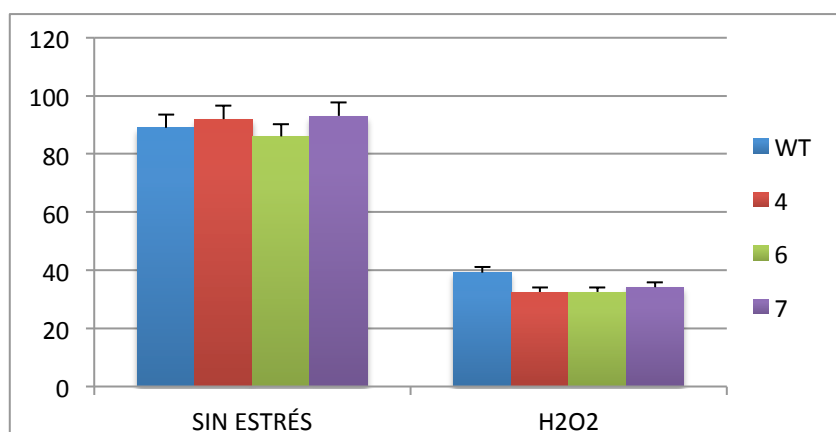


FIGURA 4 Porcentaje de germinación de plantas transformadas con *CRIO6* y del ecotipo silvestre *col2* en medio MS suplementado con 14mM de H₂O₂. (*) Diferencia estadística al comparar con el control mediante desviación t de Student.

4.1.1 Estrés por ácidos orgánicos débiles (ácido sórbico).

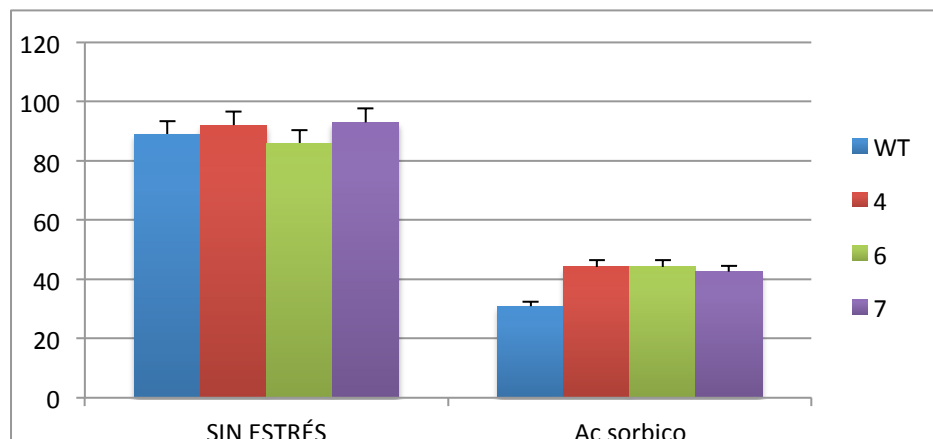


FIGURA 5 Porcentaje de germinación de plantas transformadas con *CRIO6* y el ecotipo silvestre *col2*, en medio MS suplementado con 0,5mM de ácido sórbico. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

Para probar si la sobreexpresión de *CRIO6* confería tolerancia a ácidos orgánicos débiles hicimos ensayos con ácido acético y sórbico. Con 3,5mM de de ácido acético ninguna de las semillas germinaba y con concentraciones menores no vimos ninguna diferencia (datos no mostrados).

En contraposición la germinación de las plantas evaluadas en ácido sórbico fue considerable, reflejando que las líneas transformadas con *CRIO6* presentan mayor número de semillas germinadas con un 44% la línea 4 y 6, 43% la línea 7, mientras que el control un 31%, aunque el porcentaje fue insuficiente para resulta significativo según un test de Student.

4.1 Evaluación de germinación en frío

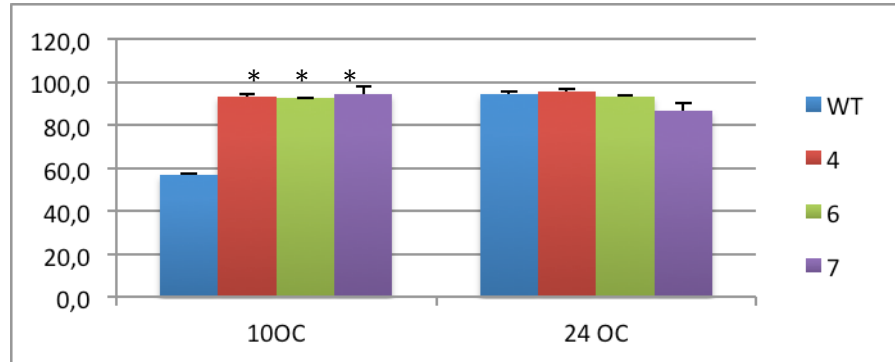


FIGURA6 porcentaje de germinación de plantas transformadas con *CRIO6* y ecotipo silvestre *col2*, en medio MS en un ambiente a 10°C (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

Al someter las plantas a condiciones de frío (10°C), podemos notar que las líneas transformadas responde mejor bajo estas condiciones que el control, ya que estas obtuvieron un porcentaje de germinación superior al 90%, mientras que el control no supero el 60%, y como era de esperar en condiciones normales el comportamiento de las plantas fue muy homogéneo. En el control las plantas germinan, pero no prosiguen el desarrollo (Ilustración 2).

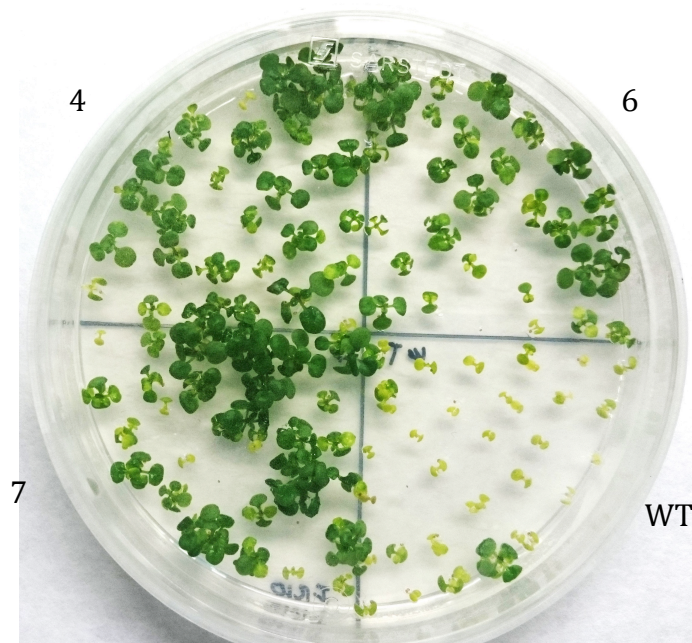


Ilustración 2 Placa con medio MS sometida a condiciones de crecimiento 10°C

4.2 Evaluación de boro

Mediante revisión bibliográfica se determinó que el gen *CRIO6*, es una acuaporina tipo TIP y que algunas proteínas de su familia están implicadas en el transporte de boro. Esto puede aumentar el interés del estudio ya que el boro es un micronutriente limitante en el cultivo de la remolacha, por ello dentro del análisis para determinar la función del gen, se sometieron a las plantas a condiciones en concentración normal de boro 200mM y en ausencia de este en medio MS.

Las características que se evaluaron fueron

- Germinación
- Desarrollo radical

4.2.1 Datos de germinación en ácido bórico

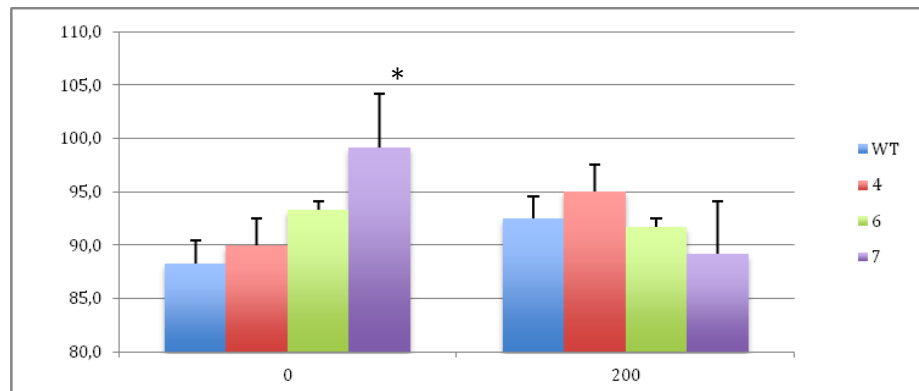


FIGURA7 Porcentaje de germinación de plantas transformadas con el gen *CRIO6* y el ecotipo silvestre col2 en medio MS suplementado con 0mM y 200mM de boro. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

Los datos obtenidos en estas condiciones nos permiten inferir que el gen *CRIO6* está influyendo en el transporte de boro dentro de la planta, ya que en condiciones de ausencia del mineral en el medio de cultivo, las líneas transformadas obtuvieron un mayor porcentaje de germinación, que en el caso de la línea 7 fue del 99 %, mientras que el control fue un 11% inferior.

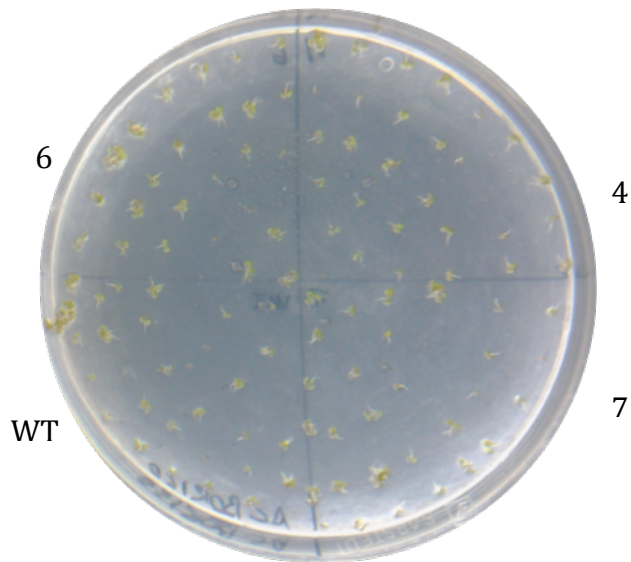


Ilustración 3 Placa con medio MS suplementado con ácido bórico.

4.2.2 Datos de longitud de raíz en MS suplementado con boro

Al analizar el comportamiento radical de las plantas en condiciones de contenido normal de boro (200mM) y en ausencia de este, podemos notar que las líneas 4 y 7 no mostraron diferencias en comparación con el control, mientras que la línea 6 mostro una clara diferencia, obteniendo un longitud radical de 1,49 cm en ausencia del mineral y 1,45 cm en condición normal de éste.

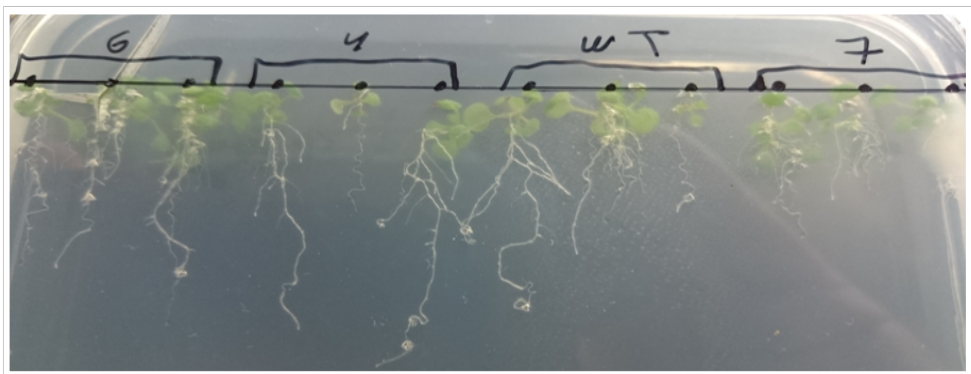


Ilustración 4 Placa con MS suplementado con ácido bórico, evaluación del desarrollo radicular (200 mM).

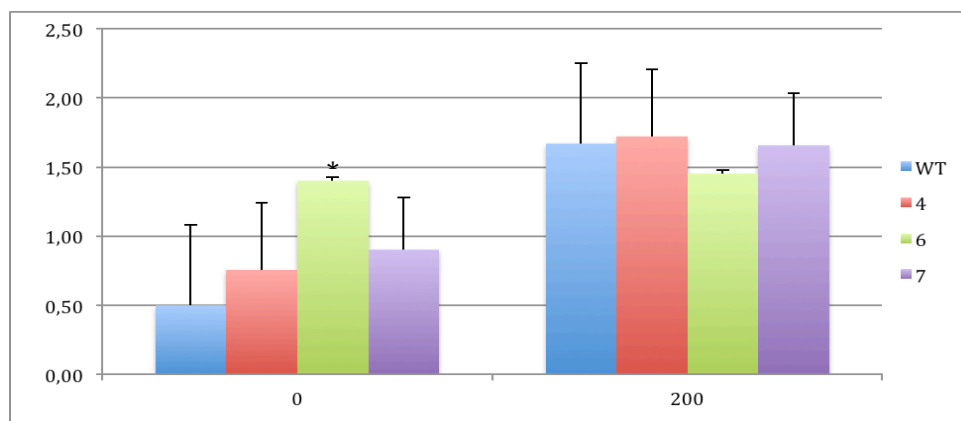


FIGURA8 Datos de longitud de raíz en cm de plantas transformadas con el gen *CRIO6* y ecotipo silvestre col 2 en medio MS suplementado con 0 mM y 200 mM de Boro. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

4.3 Evaluación en condiciones de sequía y salinidad

Como se mencionó anteriormente la proteína codificada por el gen *CRIO6* es una acuaporina, una de cuyas funciones principales es el transporte de agua y moléculas pequeñas, considerando esta situación evaluamos el desarrollo de las plantas al someterlas al estrés por sequía y salinidad.

Las variables a evaluar fueron:

- Longitud de la planta.
- Peso fresco.
- Materia seca.
- Contenido de agua.

4.3.1 Datos de Materia seca en condiciones de sequía

Según los resultados obtenidos, podemos inferir que el gen *CRIO6* influye de una manera positiva en el desarrollo de la planta, cuando esta se encuentra en condiciones de sequía, ya que menos una mayor cantidad de materia seca en las líneas transformadas, sobresaliendo las líneas 6 y 7 con más del 40% de materia seca si lo comparamos con el control.

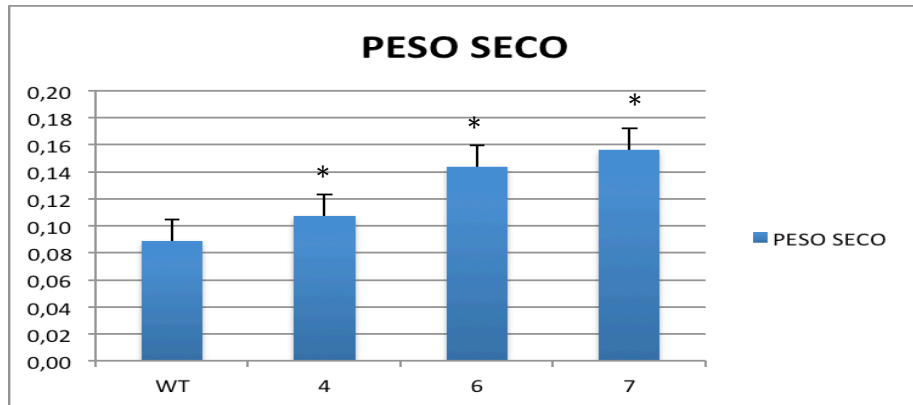


FIGURA 9 Peso (gr) de plantas transformadas con el gen *CRIO6* y ecotipo silvestre *col2* (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

4.3.1 Datos longitud de la planta en sequía.

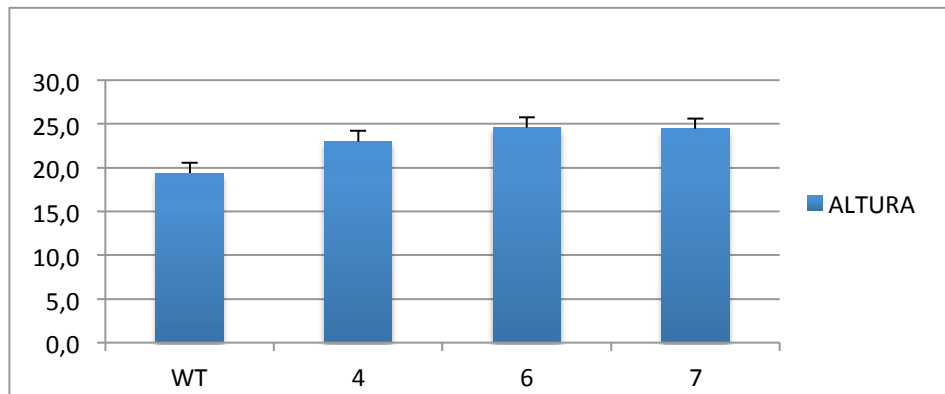


FIGURA 10 Longitud (cm) de plantas transformadas con el gen *CRIO6* y ecotipo silvestre *col2* (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

En la figura 13 presentamos los datos de longitud de la planta, los cuales reflejan que las líneas transformadas tiene un mejor comportamiento en salinidad comparándolo con el testigo, ya que el tamaño de las líneas transformadas va desde 15,4 cm la líneas 4, hasta 16,3 cm la línea 7, mientras que el testigo obtuvo una longitud de 14,6 cm.



Ilustración 5 Comparación de longitud en plantas sometidas a un periodo de sequía

4.3.2 Porcentaje de contenido de agua en condiciones de sequía

A pesar que las líneas que sobreexpresan *CRIO6* tienen un mejor comportamiento en condiciones de sequía, el contenido de agua en estas líneas es menor que en el control, lo que nos hace suponer que este gen le otorga a las plantas una mejor optimización del agua dentro de ella, ya que se desarrolla mejor a pesar de contener una menor cantidad de agua.

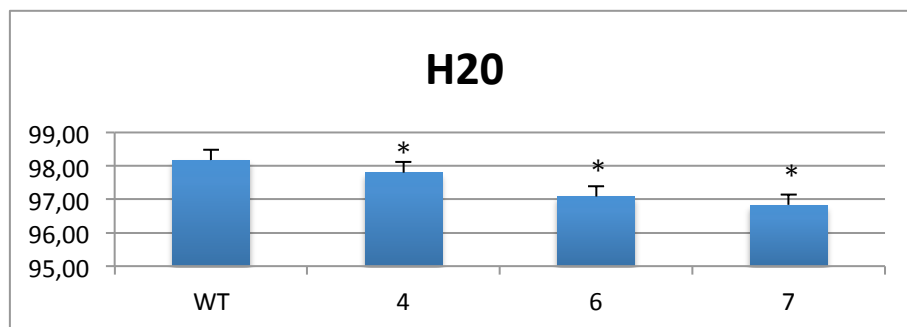


FIGURA 11 Contenido de agua (%) de plantas transformadas con el gen *CRIO6* y ecotipo silvestre col 2 (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

4.3.3 Datos de Salinidad

En la figura 12 presentamos los datos de longitud de planta, los cuales reflejan que las líneas transformadas tiene un mejor comportamiento en salinidad comparándolo con el control, ya que el tamaño de las líneas transformadas va desde 15,4 cm (línea 4) hasta 16,3 cm (línea 7), mientras que el control obtuvo una longitud de 14,6 cm.



Ilustración 6 Comparación de plantas sometidas a estrés por salinidad.

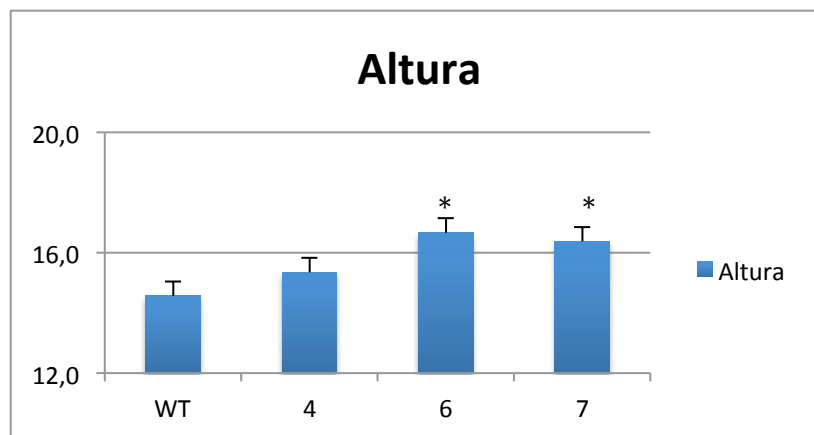


FIGURA12 datos de longitud de plantas transformadas con el gen *CR106* y ecotipo silvestre *col2*. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

4.3.1 Datos de peso fresco y seco en condiciones de salinidad

Los datos de peso fresco y seco obtenidos en condiciones de salinidad, muestran que la línea 6 tiene un comportamiento superior al las líneas 4 y 7 así como al testigo, presentando un promedio de 0,21gr en fresco y 0,11gr de materia seca, mientras que el testigo obtuvo un peso promedio en fresco de 0,7gr y materia seca de 0,3gr, pero las diferencias son estadísticamente significativas en todos los casos.

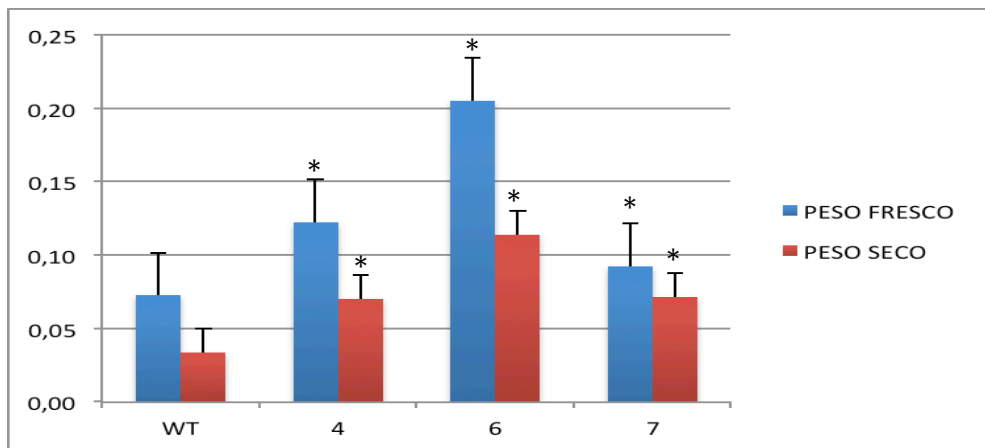


FIGURA13 peso fresco y seco de plantas transformadas con el gen *CRIO6* y ecotipo silvestre *col2*. (*) Diferencia estadística al comparar con el testigo mediante desviación t de Student.

4.3.1 Porcentaje de contenido de agua en Salinidad

En el caso de el estrés provocado por salinidad, se repite la situación de sequía ya que el control tiene un mayor contenido de agua, pese a ello las líneas transformadas tiene un mejor desarrollo, lo que refuerza mas aun la teoría de que el gen *CRIO6* optimiza el contenido de agua celular y esto le permite tener un desarrollo normal en los distintos estreses evaluados.

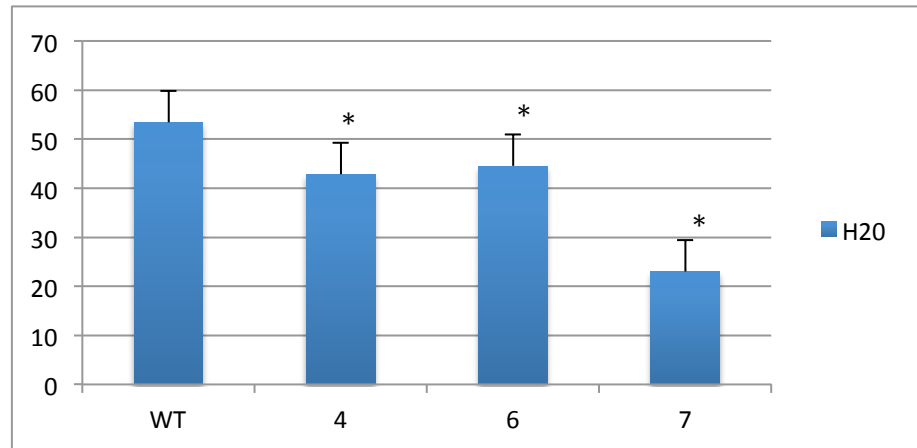


FIGURA14 Porcentaje de contenido de agua de plantas transformadas con el gen *CRIO6* y ecotipo silvestre col2. (*) Diferencia estadística al comparar con el control mediante desviación t de Student.

5 DISCUSIÓN

El gen *CRIO6* proviene de remolacha y fue hallado en un rastreo en condiciones de baja temperatura, por su capacidad de conferir tolerancia al ser sobreexpresado en levadura. Analizando su secuencia por homología, se pudo determinar que es una proteína de membrana, pertenece a la familia de las acuaporinas y probablemente transporta boro.

Partiendo de este conocimiento previo, en esta investigación se planteó evaluar si plantas transgénicas de *Arabidopsis* transformadas con el gen *CRIO6* serían más tolerantes al estrés abiótico que las plantas control col2 transformadas con el plásmido vacío. Este trabajo describe estas evaluaciones.

Entre los resultados más sobresalientes encontramos la clara diferencia en germinación bajo condiciones de frío ya que se obtuvo una mejora del 30% de las plantas transgénicas frente al control; probablemente la ventaja que proporciona *CRIO6*, se debe a que este mantendría la circulación activa de agua y solutos en el interior de la célula, conservando la permeabilidad de la membrana, y confiriendo una mayor tolerancia al estrés. Esto concuerda con Maurel que en su revisión propone este mecanismo como forma de generar resistencia (Maurel 2007).

Como se menciona en párrafos anteriores *CRIO6* además del transporte de agua posiblemente transporta boro. Para comprobar esto, se procedió a realizar pruebas en medio MS en condiciones de boro normal y de boro limitante. En dicho experimento se determinaron las siguientes variables: porcentaje de germinación y desarrollo radicular.

En lo que respecta a la germinación pudimos notar un efecto positivo en las líneas transformadas con *CRIO6* ya que mostraron un 11% más de germinación que el control, esto concuerda con los publicados por Vander Willigen que probó el efecto de las acuaporinas en la germinación de las semillas (Vander Willigen et al., 2006).

La elongación de raíz fue otro parámetro en el que se vieron diferencias estadísticas ya que la línea 6 mostró una mayor elongación radicular, en condiciones de boro limitante, lo que concuerda con Hanaoka ya que en su publicación puso de manifiesto que en ausencia boro, las plantas activan un proceso de elongación radicular para poder encontrar el mineral y suplir sus necesidades, lo que da como resultado plantas con un sistema radicular más largo (Hanaoka et al., 2014).

Los resultados de germinación en MS suplementado con espermidina y LiCl también presentaron diferencias estadísticas frente al testigo. En el caso de la espermidina, que es una sustancia existente en las plantas de forma natural, relacionada directamente con la germinación de las semillas. Las acuaporinas podrían estar eliminando algún catión tóxico proveniente de la degradación de esta molécula. En el caso de LiCl, recordar que el litio es un catión tóxico, por lo que el efecto de gen *CRIO6* se daría por el transporte activo de agua, el cual probablemente impida concentraciones tóxicas de este catión dentro de la célula.

En los experimentos en los que se sometió a condiciones de salinidad las plantas se pudieron determinar diferencias estadísticas en germinación, en las cuales se ve una clara ventaja en las líneas transformadas frente al testigo, ya que germinaron un 50% más. En cuanto a la altura de las plantas, las líneas transformadas siguen presentando mejores resultados que el control, en este caso la línea 7 fue la que presentó mayor altura, con más de 16 cm, lo cual corrobora que el gen está proporcionando algún mecanismo que les permite desarrollarse mejor en estas condiciones.

En condiciones de sequía se repite el mismo patrón, siendo las líneas 6 y 7 las que presentan mayor longitud que el control y materia seca.

Analizando todo los resultados, podemos inferir que el gen *CRIO6* proporciona una clara ventaja en condiciones de frío, salinidad y sequía, ya que bajo estas circunstancias las plantas transformadas germinaron y se desarrollaron mucho mejor que el testigo.

Los posibles efectos que está generando el gen dentro de la planta es una mayor facilidad en el transporte de agua, lo cual le permite a las células mantener todas sus funciones bajo condiciones de estrés, y así la planta podría desarrollarse de una manera normal. Otro dato interesante que se podría rescatar de esta investigación es que a pesar de la sobreexpresión del gen en la planta no hemos visto ninguna penalización en el desarrollo, posiblemente debido a que las acuaporinas para su funcionamiento no consumen ATP, ya que trabajan a favor de gradiente.

6 CONCLUSIONES

- Basándonos en los resultados obtenidos se puede concluir que el gen *CRIO6* confiere resistencia a estrés abiótico al ser sobreexpresado en *Arabidopsis thaliana*.
- Las plantas transformadas no presentaron ninguna penalización en el crecimiento.
- La posible función que está ejerciendo *CRIO6* en la célula es de regular los procesos fisiológicos mediante el mantenimiento un flujo continuo de agua y moléculas pequeñas.

7 BIBLIOGRAFÍA

- FAO. «*La agricultura mundial en la perspectiva del año 2015*» Roma (2009). 2-6.
- Hanaoka H, Uraguchi S, Takano J, Tanaka M y Fujiwara T. «OsNIP3;1, a rice boric acid channel, regulates boron distribution and is essential for growth under boron-deficient conditions.» *Plant Journal* (2014). 890-902.
- Hopkins W y Huner N. «*Introduction to Plant Physiology 3rd ed.*» John Wiley and Sons Inc., New York (2004). 156-180.
- Jewel M, Campbell B y Godwin I. «transgenic plants for abiotic stress resistance.» *transgenic crop plants* (2010). 67-132.
- Kanhonou R, Serrano R y Palau RR. «A catalytic subunit of the sugar beet protein kinase CK2 is induced by salt stress and increases NaCl tolerance in *Saccharomyces cerevisiae* .» *Plant Molecular Biology* (2001) 47: 571-579.
- Khodakovskaya M, McAvoy R, Peters J y Li Y. «Genetic enhancement of cold tolerance by expression of gene for chloroplast w-3 fatty acid desaturase controlled with col inducible promoter in transgenic tobacco.» *Planta* (2006): 1090-1100.
- kosova K, Vitamvas P, Prasil I, y Renaut J. «Plant proteome changes under abiotic stress -Contribution on proteomics studies to understanding plant stress response.» *Journal of Molecular Biology* (2011): 1301-1322.
- Larcher, W. «*Physiological Plant Ecology 3rd ed.*» Springer. Berlin (1995).
- Magni F. «Proteomic knowledge of human aquaporins.» *Proteomics* (2006): 5637-5649.
- Mahajan S y Tuteja N. «Cold, salinity and drought stresses.» *Biochemistry and Biophysics* (2005): 139-158.
- Maurel C. «Plant aquaporins: novel functions and regulation properties.» *FEBS letters* (2007): 2227-2236.
- Miwa K, J Takano y Fujiwara T. «Improvement of seed yields under boron-limiting conditions through overexpression of *BOR1*, a boron

- transporter for xylem loading in *Arabidopsis thaliana*. .» *Plant J* (2006): 1084–1091.
- Mulet JM, Alemany B, Ros R, Calvete J y Serrano R. «Expression of a plant serine O-acetyltransferase in *Saccharomyces cerevisiae* confers osmotic tolerance and creates an alternative pathway for cysteine biosynthesis.» *Yeast* (2004): 303-312.
 - Mulet JM, Sanz AI y Serrano R. Plant Haemoglobin .Patente WO/2004/087755. 23 de abril de 2004.
 - O’Nelli MA, Ishii T, Albersheim P y Darvill AG. «Rhamnogalacturonan II structure and function of a borate cross-linked cell wall peptic polysaccharide.» *Ann Rev Plant Biol* (2004): 109–139.
 - Pang Y, Li L, Ren F, Lu P, Wei P y Cai J. «Overexpression of the tonoplast aquaporin AtTIP5;1 conferred tolerance to boron toxicity in *Arabidopsis*» *J Genet Genomics* (2010): 389–397.
 - Paola C, Aquea F y Rodríguez A. «Functional characterization of *Citrus macrophylla* BOR1 as a boron transporter.» *Physiologia Plantarum* (2013): 329-339.
 - Vander Willigen C, Postaire O, Tournaire-Roux C, Boursiac Y y Maurel C. «Expression and inhibition of aquaporins in germinating *Arabidopsis* seeds.» *Plant Cell Physiology* (2006): 1241-1250.
 - Wu B y Beitz E. «Aquaporins with selectivity for unconventional permeants.» *Cellular and Molecular Life Sciences*, (2003): 2413 – 2421.
 - Yadav S. «Cold stress tolerance mechanisms in plant.» *Agronomy for sustainable development*, 2010: 515-527.
 - Zardoya, R. «Phylogeny and evolution of the major intrinsic protein family.» *Biol Cell* (2005): 397 – 414.