



CAPÍTULO 7

Mecanismos de respuesta a estreses ambientales: en busca del aumento de la productividad de cultivos de interés agronómico

Giselle Martínez-Noël, Leandra Lechner,
María Victoria Martín, Néstor Aznar, Graciela L. Salerno

Instituto de Investigaciones en Biodiversidad y Biotecnología – Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas (INBIOTEC–CONICET), y Fundación para Investigaciones Biológicas Aplicadas, Mar del Plata, Buenos Aires, Argentina.
gnoel@fiba.org.ar

RESUMEN

En su ambiente natural, las plantas están expuestas frecuentemente a condiciones ambientales desfavorables para su crecimiento y desarrollo, causadas por diferentes factores climáticos (temperaturas extremas, sequía, inundación, aumento de la salinidad de los suelos). Dichos factores constituyen la principal causa de la disminución de la productividad de los cultivos de interés agronómico. Por otra parte, hay una necesidad actual de incrementar las áreas cultivables, desplazándose a zonas menos favorables y por lo tanto, menos productivas.

Desde hace más de dos décadas, nuestro grupo de investigación se ha enfocado en el estudio de las complejas respuestas de las plantas a diferentes estreses ambientales, con el objetivo de identificar puntos regulatorios que permitan generar herramientas para la obtención de cultivos que resulten más tolerantes a sequía, temperaturas extremas y salinidad. En la actualidad las líneas de inves-





tigación están enfocadas hacia el estudio de la interrelación entre el metabolismo del carbono y del nitrógeno y su vinculación con los distintos fenómenos ambientales adversos, haciendo énfasis en la comprensión de los caminos de señalización que involucran azúcares y reguladores de crecimiento. La identificación de los genes involucrados en dichas vías de transducción de señales que afecten la tolerancia de la planta frente a los estreses abióticos va a permitir diseñar estrategias para ser usadas en el mejoramiento de cultivos de interés.

INTRODUCCIÓN

En los próximos años se necesitará incrementar la producción agrícola teniendo en cuenta el aumento poblacional y la generación de biocombustibles [1]. Una de las limitaciones más importantes en la agricultura moderna es la disminución sostenida de la disponibilidad de áreas cultivables debido a condiciones ambientales desfavorables provocadas principalmente por el cambio climático y la práctica de cultivos intensivos [1, 2].

A diferencia de los animales, las plantas son organismos sin capacidad locomotora por lo que no pueden escapar a las condiciones ambientales adversas. Es así, que a lo largo de su evolución han desarrollado complejas respuestas de adaptación y supervivencia, que les permiten sobrellevar las situaciones de estrés. Sin embargo, frecuentemente las condiciones externas desfavorables se reflejan en una disminución en su tasa de crecimiento y desarrollo y una menor productividad. Se ha reportado que los estreses abióticos (principalmente temperaturas extremas, salinidad y sequía) provocan más del 50% de la pérdida de rendimiento global en la agricultura [3].

Las plantas perciben las señales del medio ambiente y las transmiten a sus células activando procesos complejos conocidos como vías de señalización, que implican la activación o inactivación de genes específicos. Dichos genes desencadenan mecanismos que protegen y/o reparan los daños ocasionados por el estrés permitiendo que la planta sobreviva (Figura 1). La comprensión de estas respuestas adaptativas es fundamental para poder abordar y desarrollar nuevas estrategias para la obtención de cultivos de interés agronómico más tolerantes a estreses ambientales. La disponibilidad de dichos cultivos permitirá, entonces, en el futuro, desplazar la agricultura hacia otras regiones, hoy consideradas marginales o poco productivas, y aprovechar suelos más inhóspitos, con la posibilidad de tener rendimientos aceptables. En nuestro país, el



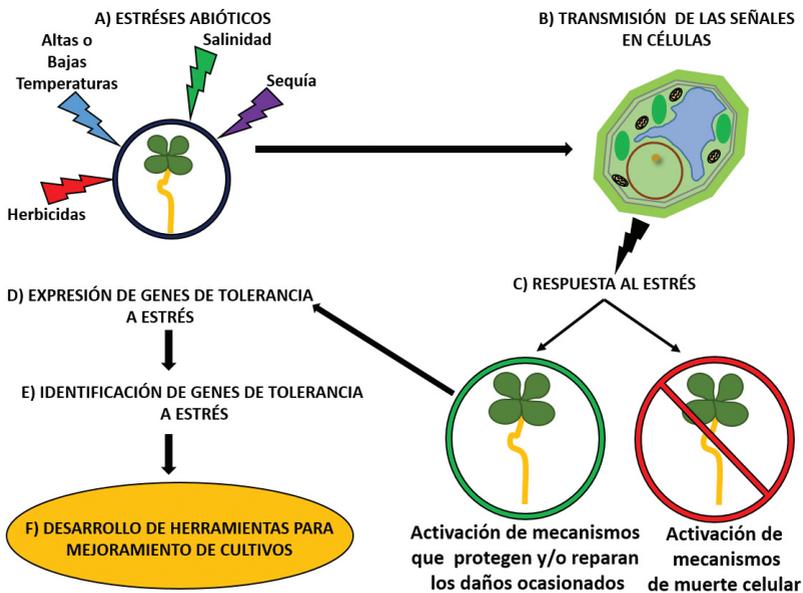


Figura 1. Esquema que ilustra los pasos para generar nuevas herramientas para la obtención de cultivos con tolerancia a un estrés abiótico.

mejoramiento de cultivos a nivel genético y la producción de semillas están comprendidos en uno de los Núcleos Socio-Productivos del Plan Estratégico Argentina Innovadora 2020 del Ministerio de Ciencia, Tecnología e Innovación Productiva (dado a conocer en el año 2012).

Con esta meta, nuestro grupo de investigación ha enfocado sus estudios en cultivares diferentes de trigo (*Triticum* spp.) y en una planta modelo (*Arabidopsis thaliana*), que permite la generación de mutantes en genes considerados de importancia en las respuestas a estreses abióticos. Se han puesto a punto técnicas para realizar una exploración rápida de los fenotipos de las distintas mutantes (nulas en uno o más genes de interés) y de distintos cultivares de trigo sometidos a diferentes condiciones de estrés.



El trigo provee aproximadamente un quinto del total de la ingesta calórica de la población mundial [4], y su cultivo es de gran relevancia para la Argentina, con un área sembrada de 3 millones de hectáreas y una producción de alrededor de 8 millones de toneladas según datos de la campaña 2012/1013 [5]. Sin embargo, aunque el trigo sigue siendo el cereal con mayor área cultivada del país, la tierra destinada a este cereal ha ido disminuyendo en los últimos años, siendo un factor determinante las condiciones climáticas adversas [5].

En Argentina, se estima que las pérdidas ocasionadas por factores abióticos ambientales (que incluyen, entre otros, sequía, salinidad, inundación, bajas y altas temperaturas) en el cultivo del trigo conducen a una gran disminución del rendimiento máximo anual [6]. Es por esto que el estudio de mecanismos genéticos que influyeran positivamente la productividad de diferentes cultivares de trigo, en un amplio rango de entornos ambientales, podría aportar directamente a una agricultura mejor adaptada a las condiciones agroclimáticas de diferentes regiones.

En este capítulo, se presentan los avances en las investigaciones, las herramientas desarrolladas y las potencialidades de las líneas de estudio de nuestro grupo de investigación.

RESULTADOS OBTENIDOS POR EL GRUPO

Desde hace más de dos décadas, nuestro grupo de investigación se ha centrado en el estudio a nivel fisiológico y bioquímico-molecular del metabolismo de los hidratos de carbono y su rol en la respuesta a condiciones ambientales adversas. Uno de los objetivos planteados en una primera etapa ha sido incrementar el contenido de almidón en los granos de cereales y/o el aumento del número de granos por planta a través del aumento de la síntesis de la sacarosa. Este azúcar es el principal producto de la fotosíntesis que es transportado a los tejidos que demandan carbono y energía. Se ha demostrado que la sacarosa, y polímeros de fructosa derivados de ella, tienen también una función importante en la tolerancia a bajas temperaturas, sequía y salinidad [7].

Como resultados relevantes de nuestro grupo, se destacan la generación de plantas de tabaco (otro modelo experimental usado) y de arroz en las que se incrementó la producción de sacarosa por ingeniería genética y que resultaron tolerantes a sequía en ensayos de invernáculo. Los estudios más recientes se han enfocado hacia la importancia de los azúcares, como moléculas señal que regulan





el metabolismo, desarrollo y crecimiento de las plantas y en su rol en la respuesta a estreses. Actualmente se llevan a cabo proyectos cuyos objetivos específicos son: i) el estudio de la interrelación del metabolismo del carbono y del nitrógeno y su vinculación con fenómenos ambientales adversos; y ii) la dilucidación de caminos de señalización que involucran azúcares y reguladores claves del crecimiento y desarrollo. Nuestro grupo ha demostrado el rol fundamental de las invertasas alcalino/neutras (enzimas que hidrolizan la sacarosa en glucosa y fructosa) en la morfogénesis de la raíz, en la biosíntesis del aparato fotosintético, en la acumulación del almidón cloroplástico y en la adaptación a estreses abióticos [8]. Además, la relevancia de ciertas isoformas de invertasas en la tolerancia al estrés salino, fue puesta en evidencia cuando plantas mutantes de *Arabidopsis* incapaces de sintetizar estas proteínas, presentaron una notable disminución en el largo radicular en comparación con las plantas provenientes de semillas salvajes (Figura 2). Por otro lado, se ha demostrado que aumenta la expresión de algunas invertasas específicas en respuesta a estreses ambientales en hojas de trigo luego de ser sometidas a bajas temperaturas o a un estrés osmótico [8].

Por otra parte, hemos caracterizado en trigo moléculas claves involucradas en la regulación de la síntesis de fructanos, polímeros de fructosa que se acumulan en respuesta a bajas temperaturas [9].

HERRAMIENTAS UTILIZADAS EN EL DESARROLLO DE LAS INVESTIGACIONES

Para estudiar los mecanismos de percepción y señalización del estrés como una herramienta para aumentar la tolerancia de los cultivos frente a factores ambientales adversos, nos focalizamos en la identificación de genes reguladores claves en el control del reajuste metabólico ante condiciones desfavorables en una planta de interés agronómico (como el trigo) y en la planta modelo *Arabidopsis*.

Si bien el trigo es uno de los cultivos más importante en el mundo, la falta de disponibilidad de la secuencia completa de su genoma a nivel público constituye, en el presente, un impedimento para el avance en las investigaciones. El trigo es una especie hexaploide con un genoma de 17 gigabases, es decir, aproximadamente 125 veces más grande que el de *Arabidopsis*. A pesar de su complejidad genómica, se dispone de una gran variedad de bases de datos con una amplia gama de herramientas bioinformáticas. Por ejemplo, hasta



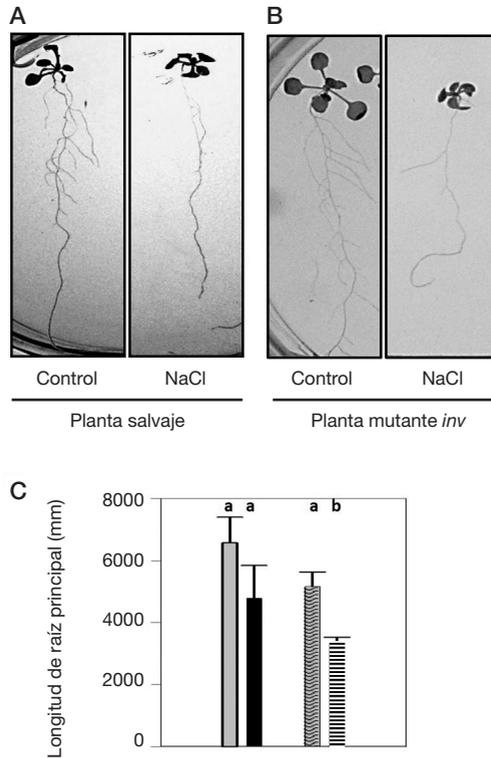


Figura 2. Fenotipo de plantas salvajes y mutantes en el gen que codifica una invertasa de *Arabidopsis thaliana* bajo estrés salino.

Plantas salvajes y mutantes de *Arabidopsis* fueron cultivadas en condiciones de crecimiento control por 7 días (T: 22 °C, 125 $\mu\text{moles m}^{-2} \text{s}^{-1}$ de intensidad lumínica y fotoperiodo de 16 h luz y 8 h oscuridad) y luego fueron transferidas a condiciones de estrés (100 mM de NaCl) por otros 7 días.

La mutante, en el gen que codifica una invertasa (*inv*), no presenta diferencias fenotípicas con respecto a las plantas salvajes en condición control. Por otro lado, las plantas mutantes sujetas a estrés salino redujeron la longitud de la raíz principal (B), respecto de las plantas salvajes (A), demostrando la importancia de la expresión de este gen en respuesta al estrés salino. C) Cuantificación de la longitud de la raíz principal en plantas salvajes (barra gris) y mutantes de *inv* (barra gris con rayas) crecidas bajo condiciones control y de plantas salvajes (barra negra) y mutantes *inv* bajo tratamiento de estrés salino (barras negras con rayas). Los resultados corresponden al promedio de tres experimentos independientes. Las letras indican diferencias estadísticas ($P = <0.001$).





el momento se conoce la secuencia de aproximadamente 40.000 genes que se transcriben (EST, www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/dbEST_summary.html). Además, se encuentra disponible la secuencia genómica completa del arroz, que junto al trigo y al maíz constituyen los cereales más importantes para la alimentación mundial, y a partir de esta información se pueden obtener secuencias de genes homólogos en trigo [10].

Arabidopsis es una herramienta que posee grandes ventajas para el estudio en genética y biología molecular de plantas, a pesar de que no posee interés agronómico. Es una planta de fácil cultivo y manipulación en condiciones de laboratorio, posee un ciclo de vida corto, tiene un gran número de descendencia, su genoma ha sido secuenciado y hay disponibles un gran número de líneas mutantes a las que puede accederse fácilmente. También es importante destacar que se cuenta con bases de datos y herramientas bioinformáticas de acceso libre referentes a esta planta modelo [11].

El sistema experimental puesto a punto en nuestro grupo de trabajo se resume en la Figura 3. Brevemente, realizamos análisis bioinformáticos exhaustivos en las bases de datos disponibles de experimentos de expresión génica a gran escala de Arabidopsis, trigo o arroz con el objetivo de identificar genes candidatos potencialmente involucrados en respuestas a los diferentes estreses abióticos. En segundo lugar, se obtienen las mutantes en el/los gen/es de interés de la base de germoplasma “The Arabidopsis Biological Resource Center (TAIR)” (Fig. 3 A).

Las semillas de plantas mutantes y salvajes (utilizadas como control) de Arabidopsis o de distintos cultivares de trigo son germinadas en medio nutritivo estéril o en suelo, respectivamente. Las plántulas de 6-7 días, son expuestas frente a distintos tratamientos o condiciones de estrés (salinidad, sequía, estrés oxidativo producido por herbicidas y temperaturas extremas) y posteriormente se analizan las características fenotípicas (Fig. 3 B-D). A partir de estos resultados se identifican los genes candidatos que podrían conferir tolerancia a un estrés en particular. Estos genes luego son caracterizados mediante técnicas de biología molecular, bioquímica y bioinformática. Se realizan estudios de la expresión génica (RT-PCR y/o qPCR) y se analizan los tejidos de plantas que expresan genes reporteros (GUS o GFP) bajo el control del promotor del gen de interés, por técnicas histoquímicas (Fig. 3 E y F). Por otro lado, la caracterización funcional de los genes de interés se lleva a cabo por estudios bioquímicos de las proteínas recombinantes expresadas en un sistema heterólogo.



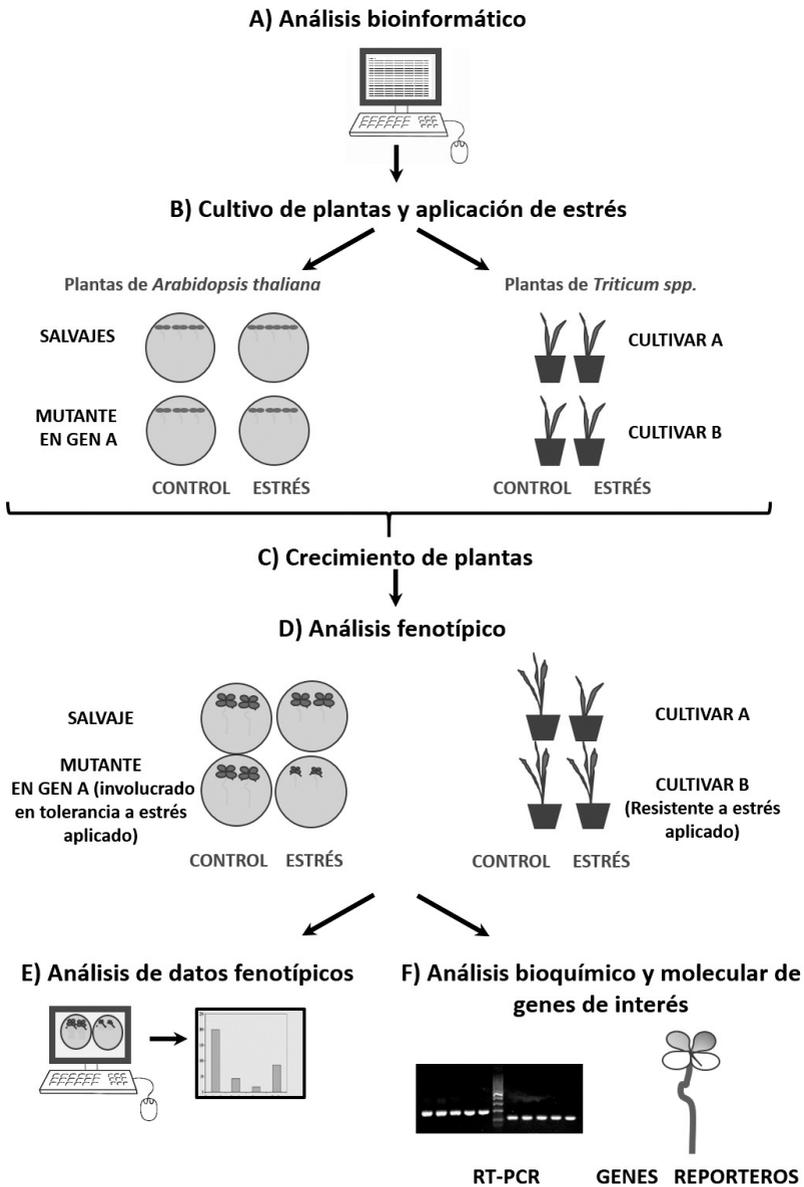


Figura 3. Esquema que ilustra el sistema experimental utilizado.



PERSPECTIVAS FUTURAS

El aumento de la productividad agrícola es la principal meta de la agricultura, y teniendo en cuenta el incremento en la demanda por el aumento de la población mundial, la disminución de las áreas cultivables, y las condiciones desfavorables asociadas al cambio climático global, esto sólo podrá lograrse a partir de la obtención de cultivos tolerantes, en particular, a estreses abióticos. La estrategia más prometedora y que puede llevar a logros en tiempos más cortos, es la que ofrece la ingeniería genética.

El estudio y conocimiento de los mecanismos de percepción y señalamiento de las respuestas a estreses abióticos son esenciales e indispensables para lograr este objetivo. Consideramos que identificar genes que codifican proteínas involucradas en el metabolismo y regulación de azúcares, por ejemplo las invertasas, son blancos claves para aumentar la tolerancia y productividad de cultivos de interés agronómico.



REFERENCIAS

1. FAO. Agricultura en el mundo 2015/2030 (2002) <http://apps.fao.org/>.
2. Ronald PC (2014) Lab to Farm: Applying Research on Plant Genetics and Genomics to Crop Improvement. *PLoS Biol* 12(6):e1001878.
3. Cramer GR, Urano K, Delrot S, Pezzotti M, Shinozaki K (2011) Effects of abiotic stress on plants: a systems biology perspective. *BMC Plant Biol* 11(163):1471-2229.
4. Reynolds M, Foulkes MJ, Slafer GA, Berry P, Parry MAJ, Snape JW, William JA (2009) Raising yield potential in wheat. *J Exp Bot* 60(7):1899-1918.
5. Barberis, N (2014) Evolución y perspectiva mundial y nacional de la producción y el comercio de trigo. *Cartilla Digital Manfredi* 2014/4.
6. RET- Red de ensayos comparativos de variedades de trigo. Instituto Nacional de Semillas (INASE). (inase.gov.ar).
7. Puebla AF, Salerno GL, Pontis HG (1997) Fructan metabolism in two species of Bromus subjected to chilling and water stress. *New Phytol* 136(1):123-129.
8. Vargas WA, Martin ML, Salerno GL (2013) Myths and Facts on Cytosolic Sucrose Hydrolysis. *Properties, Biosynthesis and Health Implications*, ed Salvatore Magazù.
9. (NOVA Science Publishers INC., Hauppauge, NY, USA), pp 155-176.
10. Tognetti J, Pontis H, Martínez-Noël G (2013) Sucrose signaling in plants: A world yet to be explored. *Plant Signal & Behav* 8(3):e23316.
11. International Wheat Genome Sequencing Consortium (2014) A chromosome-based draft sequence of the hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*) genome. *Science* 345(6194):1251788.
12. The Arabidopsis Genome Initiative (2000) Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 408(6814):796-815.