

# Caracterización de plantas de *Arabidopsis thaliana* sobre-expresantes del gen MsMDHAR de alfalfa con posible resistencia a estrés abiótico

CAMILA JAIME

## Introducción

La alfalfa es una leguminosa perenne ampliamente utilizada para alimentación animal y uno de los alimentos de mayor valor nutritivo y energético por masa seca (Bolton, 1962; Van Keuren y Matches, 1989), ya que puede obtenerse 1 kg de peso vivo de carne u 11 litros de leche de vaca por cada 10 kg de masa seca consumida (Basigalup *et al.*, 2007), por lo que se la considera como el principal forraje utilizado para la alimentación de vacas lecheras. Argentina es uno de los principales productores mundiales de alfalfa con una producción de entre 8000 y 22000 kg de masa seca/ha/año y un área promedio implantada de 4,5 millones de hectáreas (Hijano y Basigalup, 1995; Van Keuren y Matches, 1989) lo que ilustra la importancia de este cultivo para la economía nacional (Itria, 1986; Hijano y Navarro, 1995).

Debido a la expansión de cultivos extensivos, como ser los de soja, la producción de alfalfa se ha desplazado a zonas marginales con suelos pobres y emplazados en regiones

sometidas a ciclos de sequía y anegamiento. La exposición constante a factores de estrés abiótico produce efectos deletéreos en las plantas, provocando pérdidas millonarias en la producción.

Durante el estrés, se generan en las plantas un gran número de especies reactivas del oxígeno (ROS), moléculas de señalización muy importantes. Sin embargo, cuando el nivel de las ROS aumenta excesivamente, se produce un estallido redox en las células, pudiendo llevar a la muerte celular (Mittler, 2002). En esta situación, cumplen un rol muy importante los antioxidantes, cuyo objetivo es disminuir la toxicidad de las especies reactivas. Uno de ellos es el ascorbato, el cual es formado en el ciclo del glutatión-ascorbato por la acción de la enzima monodehidroascorbato reductasa (MDHAR) sobre el monodehidroascorbato (Pandey *et al.*, 2015).

Debido a esto, se generaron plantas de *Arabidopsis thaliana* sobre-expresantes del gen codificante para la MDHAR de alfalfa, con el objetivo de estudiar la función de este gen y su posible rol en conferir tolerancia a estrés hídrico. El objetivo de esta pasantía fue caracterizar molecular y fenotípicamente la respuesta de estas líneas bajo condiciones de estrés abiótico, con la hipótesis de que el aumento de la expresión de este gen conllevará a un posterior aumento en la síntesis de ascorbato y, de esta manera, una consecuente disminución del contenido de ROS en las plantas bajo estrés.

### Objetivos de la estadía

1. Análisis de los niveles de expresión del gen MsMDHAR en plantas transgénicas de *Arabidopsis thaliana*.
2. Siembra y sometimiento a estrés abiótico (sequía y anegamiento).

3. Determinación de ascorbato (AA) y dehidroascorbato (DHA) de los tres eventos homocigotas y de los controles.
4. Análisis molecular de plantas de *arabidopsis* luego del estrés.
5. Análisis de resultados.

## Materiales y métodos

### Material vegetal

Se trabajó durante toda la estadía con 5 líneas de semillas de *arabidopsis*: tres eventos independientes sobreexpresantes del gen codificante para la MDHAR de alfalfa, una línea control transformada con el vector pCHF3 vacío y una línea del ecotipo Columbia (Col-0).

### Extracción de ARN y RT-qPCR

Se realizó la extracción de ARN total de hojas de cada una de las líneas analizadas en las distintas condiciones ensayadas. Se colocaron 100 mg de tejido en un tubo de 1,5 ml y se agregó 1 ml de trizol (TRIZOL, *Thermo Scientific*). El tejido se centrifugó a 12000 g durante 15 minutos a 4°C. Se transfirió el homogenado a un nuevo tubo y se agregaron 500 µl de cloroformo. Se invirtió vigorosamente por 15 segundos y se centrifugó a 10000 g durante 15 minutos a 4°C. La fase superior, conteniendo el ARN, fue transferida a un tubo nuevo para luego adicionar un volumen (500 µl aproximadamente) de isopropanol. Se incubó por 30 minutos a temperatura ambiente, se centrifugó a 10000 g durante 10 minutos a 4°C, se removió el sobrenadante y se agregó 1 ml de etanol al 75% (v/v) frío. Se mezcló y centrifugó a 7500 g

durante 5 minutos a 4°C. Se extrajo el sobrenadante y se repitió el lavado con etanol y centrifugación. Se descartó el sobrenadante y se dejó secar el pellet por 5-10 minutos. Se procedió a resuspender el pellet de ARN total en 30 µl de agua libre de DNAsa/RNAsa.

El RNA total obtenido fue cuantificado y tratado con DNAsa (DNase I, NEB) según las indicaciones del fabricante. El ARN resultante (1 µg por reacción) se retrotranscribió a ADNc utilizando el kit *First-Strand cDNA Synthesis Kit* (Nzytech) siguiendo las indicaciones del fabricante.

El análisis por qPCR se llevó a cabo utilizando un termociclador AriaMx Real Time PCR System (Agilent Technologies). Las reacciones se realizaron en un volumen final de 10 µl, utilizando una Master Mix Maxima SYBR Green/ROX qPCR (Thermo Fisher Scientific), 200 ng de ADNc como molde y oligonucleótidos específicos para los genes MsMDHAR y AtGR. Para los controles basales de expresión se utilizaron oligonucleótidos específicos para actinas de *arabidopsis*.

#### Determinación de ascorbato y dehidroascorbato

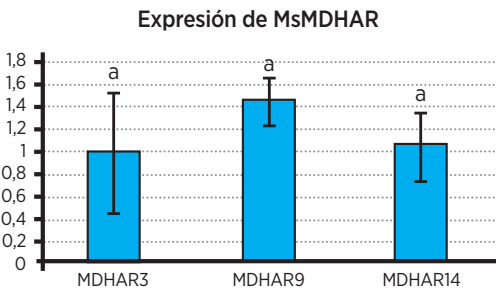
Se utilizó el método de Gillespie y Ainsworth (2007) con modificaciones. Brevemente, se cosechó el material vegetal (40 mg) en tubos y se homogeneizó el tejido con nitrógeno líquido usando un mortero previamente enfriado. Se añadieron 2 ml de TCA al 6% y se transfirió a un microtubo de 2 ml. Se centrifugaron las muestras (13000 g 5 min 4°C) y transfirió el sobrenadante a un nuevo tubo de 2 ml. Se conservaron los extractos en hielo y se comenzó el ensayo inmediatamente para evitar la degradación del ácido ascórbico.

Se agregaron 100 µl de buffer fosfato 75 mM (pH 7) y 200 µl de TCA 6% (en blancos), estándares AA (0,15–10 mM) o muestra a un tubo de 2 ml. Se añadió 100 µl de DTT 10

mM a los tubos AA totales e incubó a temperatura ambiente durante 10 minutos. Se añadió 100 ul de NEM al 0,5% a los tubos de ascorbato total para eliminar el exceso de DTT. Luego se agregaron 200 ul de agua a los tubos de ensayo de AA reducidos para equilibrar el volumen de todos los tubos. Finalmente se agregaron 500 ul de TCA al 10%, 400 ul de  $H_3PO_4$  al 43%, 400 ul de 2,2 bipyridilo al 4% y 200 ml de  $FeCl_3$  al 3% a todos los tubos. Se incubaron las muestras a  $37^\circ C$  durante 1 hora luego de la cual se leyó la absorbancia a 525 nm.

## Resultados

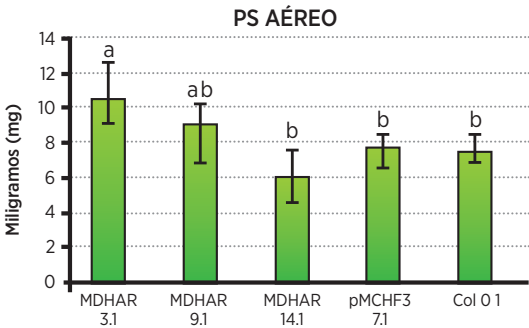
1. Se analizaron los niveles de expresión del gen MsMDHAR en 3 eventos independientes de *Arabidopsis thaliana*. Se utilizaron 3 réplicas biológicas para cada evento y 3 réplicas técnicas para la PCR en tiempo real. Los resultados fueron expresados relativizados al evento 3 (Figura 1). El análisis de los datos se realizó con el software estadístico Rstudio. Se utilizó un ANOVA de una vía para identificar la varianza entre los distintos eventos. No se encontraron diferencias significativas en la expresión del gen entre los eventos analizados ( $p > 0,05$ ).



**FIGURA 1.** Expresión del gen MsMDHAR en 3 eventos independientes de *Arabidopsis thaliana* utilizando PCR en tiempo real. No se encontraron diferencias significativas entre los eventos ( $p > 0,05$ )

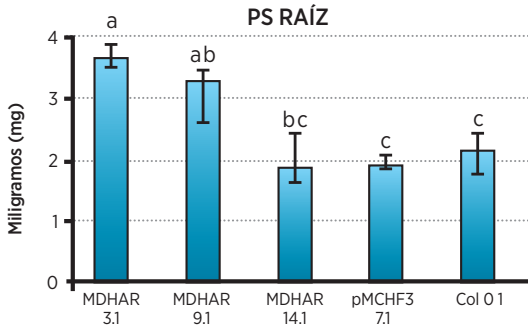
2. Se evaluó el peso seco (PS) de parte aérea y de raíz de los eventos sobreexpresantes y de los controles bajo condiciones de riego control, en anegamiento y en sequía. En el presente informe se presentarán los resultados obtenidos en condiciones control ya que, dados los tiempos de la pasantía, no se pudo culminar con el peso de las plantas en anegamiento y sequía. Los mismos están siendo realizados por personal del laboratorio del CBGP.

En la Figura 2 se puede observar el promedio del PS de las líneas analizadas en condiciones de riego control. Se puede observar que el evento MDHAR 3 presenta un mayor peso seco aéreo al compararlo con el resto de las líneas. Se utilizaron 10 plantas por grupo analizado. Las barras de error indican la desviación estándar.



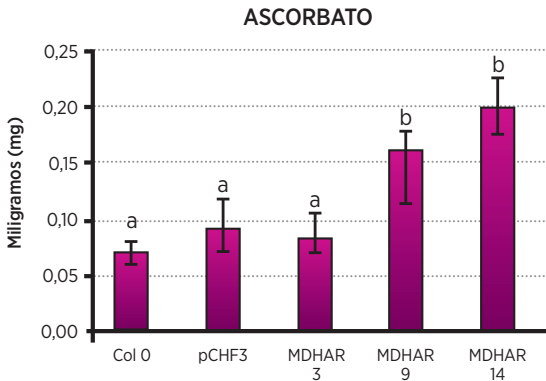
**FIGURA 2.** Peso seco aéreo de los 3 eventos sobreexpresantes y de los controles en condiciones de riego normal. Se observa un aumento del PS aéreo en el evento MDHAR 3. Se utilizó un n=10 para cada línea.

En la Figura 3 se observa el promedio del PS de raíz de las líneas ensayadas. Los eventos MDHAR 3 y 9 presentan diferencias significativas al compararlos con el evento MDHAR 14 y con los controles. Las barras de error indican la desviación estándar.

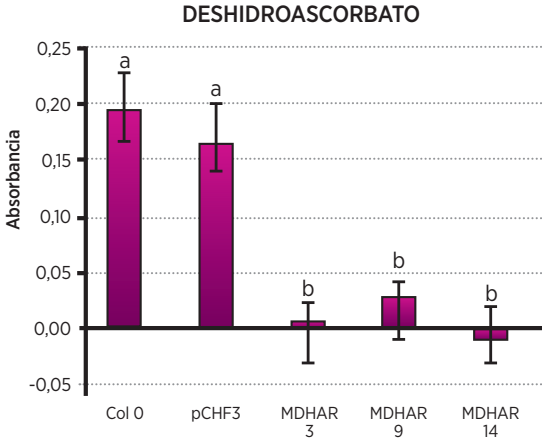


**FIGURA 3.** Peso seco de raíz de los 3 eventos sobreexpresantes y de los controles en condiciones de riego normal. Los eventos MDHAR 3 y 9 muestran un mayor PS en comparación al resto de las líneas. Se utilizó un n=10 para cada grupo.

3. El contenido de ascorbato y dehidroascorbato de los eventos sobreexpresantes y los controles se determinó utilizando el método colorimétrico descrito por Gillespie y Ainsworth (2007). Se realizaron 3 ensayos independientes con un n=6 para cada línea por ensayo. En las Figuras 4 y 5 se observa el promedio de la absorbancia a 525nm de las 5 líneas obtenido de los 3 ensayos. Se puede ver que el contenido de ascorbato aumenta considerablemente en los eventos MDHAR 9 y 14, sin embargo, no sucede lo mismo con el evento MDHAR 3. Es interesante notar que el contenido de dehidroascorbato sí disminuye de manera drástica en los tres eventos transgénicos.

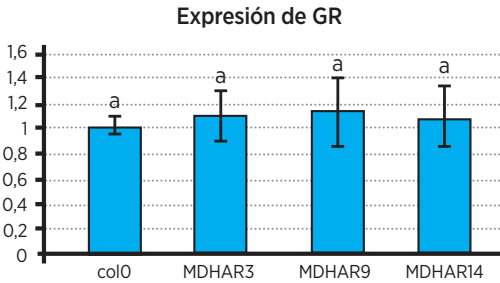


**FIGURA 4.** Determinación de ascorbato contenido en las líneas control (col 0, pCHF3) y en las transgénicas (MDHAR 3, 9 y 14). Se grafica el promedio de los valores obtenidos en 3 ensayos independientes. Se utilizó un n=6 para cada grupo en cada ensayo.



**FIGURA 5.** Determinación de dehidroascorbato contenido en las líneas control (col 0, pCHF3) y en las transgénicas (MDHAR 3, 9 y 14). Se grafica el promedio de los valores obtenidos en 3 ensayos independientes. Se utilizó un n=6 para cada grupo en cada ensayo.

4. Se realizó la cuantificación de la expresión del gen AtGR codificante para la enzima glutatión reductasa de arábidoopsis mediante PCR en tiempo real (Figura 6). Se observó que, en condiciones de riego normal, la expresión de este gen no se ve modificado en las líneas sobreexpresantes del gen MsMDHAR en comparación al genotipo Col0.



**FIGURA 6.** Nivel de expresión relativo del gen AtGR involucrado en el ciclo del glutatión-ascorbato. La cuantificación fue realizada mediante PCR en tiempo real y los resultados fueron expresados como valores relativos al ecotipo col0.

### Conclusiones y discusión

Los objetivos de la pasantía fueron concluidos casi en su totalidad durante la estadía en Madrid. Se confirmó la expresión del gen de alfalfa en las líneas transgénicas, aunque no



se logró determinar una diferencia de expresión entre los eventos analizados.

En condiciones control podemos observar un aumento del PS de los eventos MDHAR 3 y 9 en comparación con los controles, sin embargo, el evento MDHAR 14 no muestra diferencia significativa. Hay que tener en cuenta que este evento mostró un retraso en la germinación respecto al resto de las líneas, lo que podría explicar el menor tamaño comparado con las líneas MDHAR 3 y 9. Se esperarán los datos de PS de las líneas en condiciones de anegamiento y sequía para evaluar el comportamiento frente a estrés abiótico.

El aumento en el contenido de AA y la disminución drástica en el contenido de DHA indicarían que nuestra hipótesis inicial acerca de la acción de la sobreexpresión es correcta. Sin embargo, el evento MDHAR 3 no muestra diferencia en el contenido de ascorbato en comparación con los controles, lo que llama la atención si tenemos en cuenta el comportamiento frente al dehidroascorbato. El ensayo será repetido por personal del CBGP para confirmar este resultado.

Finalmente, se vio que en condiciones de riego control la expresión del gen codificante para la enzima AtGR participante del ciclo de glutatión-ascorbato no se ve modificada en las plantas transgénicas con respecto a las salvajes, por lo que se estima que la sobreexpresión del gen de alfalfa no estaría afectando esta parte de la vía, al menos durante estas condiciones.

## Referencias bibliográficas

- BASIGALUP, D., Rossanigo, R., y Ballario, M. V. (2007). Panorama actual de la alfalfa en la Argentina. En D. Basigalup (Ed.), *El cultivo de la alfalfa en la Argentina* (pp. 13-25). INTA.

- BOLTON J. L., (1962). *Alfalfa. Botany cultivation and utilization*. Interscience.
- GILLESPIE, K., y Ainsworth, E. (2007). Measurement of reduced, oxidized and total ascorbate content in plants. *Nature Protocols*, 2, 871–874. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.101>
- HIJANO, E. H., & Basigalup, D. H. (1995). *La alfalfa en la Argentina*. INTA.
- HIJANO, E. H. y Navarro, A. (Eds.). (1995). *La alfalfa en la Argentina*. INTA, SubPrograma Alfalfa.
- ITRIA, C. D. (1986). El cultivo de la alfalfa en la República Argentina. En C. Bariggi, V. L. Marble, C.D. Itria, & J. Brun (Eds.), *Investigación, Tecnología y Producción de Alfalfa* (pp. 7-22). INTA.
- MITTLER, R. (2002). Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends in Plant Science*, 7(9), 405-410. [https://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02312-9](https://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02312-9)
- PANDEY, P., Singh, J., Achary, V. M. M., & Reddy, M. K. (2015). Redox homeostasis via gene families of ascorbate-glutathione pathway. *Frontiers in Environmental Science*, 3, 25. <https://doi.org/10.3389/fenvs.2015.00025>
- VAN KEUREN, R. W., & Matches, A. G. (1989). Alfalfa and alfalfa improvement. *American Society of Agronomy*, 515-532.