



UNIVERSIDAD NACIONAL DEL NORDESTE

Facultad de Ciencias Agrarias



## Trabajo Final de Graduación

Modalidad Tesina

# Análisis funcional de un anti-transportador NHX de *Lotus tenuis*.

**ALUMNO: Francisco Martín LUNA**

DIRECTORA: Fabiana Daniela ESPASANDIN

Lugar de Trabajo: Laboratorio de Biotecnología y Genómica Funcional (IBONE-CONICET).

**2023**

## ÍNDICE

<b>AGRADECIMIENTOS .....</b>	<b>3</b>
<b>FORMACIÓN ACADÉMICA EN EL CONTEXTO DE ESTA TESIS .....</b>	<b>4</b>
<b>RESUMEN .....</b>	<b>5</b>
<b>1. INTRODUCCIÓN .....</b>	<b>6</b>
<b>ANTECEDENTES:.....</b>	<b>7</b>
<b>2. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES .....</b>	<b>8</b>
Objetivo general:.....	8
Objetivos particulares: .....	8
<b>3. MATERIALES Y MÉTODOS.....</b>	<b>8</b>
<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>10</b>
<b>5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES.....</b>	<b>14</b>
<b>BIBLIOGRAFÍA .....</b>	<b>16</b>

## **AGRADECIMIENTOS:**

A mis padres, Claudia Gómez y José María Luna, y a toda mi familia que siempre estuvo acompañándome y haciendo posible este proceso.

A todos mis amigos, pero en especial a Maxi, Anto, Clelia, Larisa y Flor que han sido con quienes transité mi vida universitaria.

A mi directora de tesis, la Ing. Agr. (Dra.) Fabiana Daniela ESPASANDIN, por su confianza, apoyo y dedicación durante el tiempo de realización del trabajo. Por su tiempo, paciencia y predisposición.

Al Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional, por abrirme sus puertas y brindarme espacio, tiempo y recursos para poder llevar a cabo mi trabajo final. También a todo su personal del cual me llevo los mejores recuerdos.

A la Universidad Nacional del Nordeste que me brindó la formación y las herramientas necesarias para alcanzar mis metas.

Y a todas aquellas personas que han formado parte de este trayecto y posibilitaron el recorrido.

## FORMACIÓN ACADÉMICA EN EL CONTEXTO DE ESTA TESIS:

- *El desarrollo del trabajo de graduación, me permitió acceder a la siguiente beca:*

Beca de Estímulo a las Vocaciones Científicas (EVC), Consejo Interuniversitario Nacional, Universidad Nacional del Nordeste, Secretaría General de Ciencia y Técnica. Beca de Pregrado otorgada por Resolución P. N.º 1612/21. **Tema:** “**Estudio del estrés salino en *Lotus* mediante la sobreexpresión del gen de un anti-transportador NHX**”. **Código del proyecto:** 17336. **Lugar de trabajo:** Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional del IBONE-FCA (UNNE). Desde el 01/08/2021 y por el término de 1 año.

- *Posibilitó la siguiente producción científica:*

Presentaciones a Reuniones Científicas y Congresos:

- 1- XXXIII Reunión Argentina de Fisiología Vegetal, realizado del 13 al 17 de septiembre de 2021. “**Genetic transformation of *Lotus tenuis* with NHX1 antiporter gene**”. Autores: Fabiana Daniela Espasandin, Agostina Affinito, Mariana Del Vas, Mayra Álvarez, Francisco Luna, Antonio Díaz Paleo, Pedro Sansberro.
- 2- I Congreso Argentino de Genética y II Jornadas Regionales SAG-NEA, realizado del día 2 al 5 de octubre de 2022 en Corrientes: “**La sobreexpresión del gen NHX1 promueve el crecimiento de brotes y la capacidad de regeneración de *Lotus tenuis* en condiciones de salinidad**”. Autores: F. Luna, Fabiana D. Espasandin, A. Affinito, M. Álvarez, A. Díaz Paleo, Pedro Sansberro.

## RESUMEN:

La aplicación de ingeniería genética en estudios de estrés posibilita el análisis del comportamiento que tendrían genes sobre procesos bioquímicos y fisiológicos relacionados con la defensa de plantas al estrés. El estrés salino es uno de los principales estreses abióticos que afectan seriamente el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Una de las estrategias para evitar la toxicidad de las plantas en salinidad es por compartimentalización del  $\text{Na}^+$  en vacuolas mediante transportadores NHX, localizados en el tonoplasto. Éstos mantienen la homeostasis, disminuyendo la toxicidad celular y permitiendo el crecimiento de las plantas. Con el fin de evaluar la importancia del gen codificador de NHX1 en la tolerancia a salinidad, se obtuvieron plantas de *Lotus tenuis* modificadas genéticamente con el vector p35s:LtNHX1, mediante el método indirecto de transformación. A los 90 días de cultivo, en el medio de regeneración/selección el 36% de explantes brindaron  $3\pm1$  yemas/explante, obteniéndose tres genotipos transformados (eficiencia de transformación 3.75%). Se seleccionó el genotipo N2249 y se comparó el crecimiento de brotes o capacidad de regeneración de folíolos con el salvaje, en medios de cultivo con 100mM NaCl. En el ensayo de crecimiento, a los 45 días, sobrevivió el 50% de brotes del genotipo salvaje, con una tasa de crecimiento relativo  $\text{TCR}= 0.1\pm0.07$  mm/mm.día; en cambio en N2249 sobrevivió 76% de los brotes con  $\text{TCR}= 0.3\pm0.02$  mm/mm.día. En cuanto a la capacidad de regeneración de folíolos se observó en ambos genotipos una regeneración cercana al 50% y que el número de yemas adventicias formadas por explante, fue superior en N2249 respecto al salvaje ( $11\pm7$  y  $3.7\pm2$ , respectivamente). Los resultados muestran la funcionalidad del gen codificador de NHX1 para atenuar los efectos deletéreos de la salinidad.

## 1. INTRODUCCIÓN:

Una planta padece estrés cuando un factor externo, ya sea biótico o abiótico, ejerce una influencia desventajosa sobre ella, induciendo un cambio fisiológico que produce una reducción en el crecimiento (Taiz, 2003). El estrés salino es uno de los principales estreses abióticos que afectan seriamente el crecimiento y rendimiento de los cultivos. En el mundo alrededor del 6% de la superficie terrestre contiene altas concentraciones de sales debido al origen de sus suelos (FAO). Asimismo, alrededor de 32 millones de hectáreas son afectadas por salinidad secundaria o de origen antrópico representando aproximadamente el 2% de la superficie destinada a la actividad agrícola de secano (Munns y Tester, 2008); a la vez que el 30% de la superficie irrigada manifiestan problemas de salinidad.

La salinidad afecta negativamente a las plantas por efectos osmóticos, toxicidad de iones específicos y/o desórdenes nutricionales (Läuchli y Grattan, 2007), donde las células desarrollan estrategias para protegerse. La toxicidad metabólica de  $\text{Na}^+$  es la resultante de la competencia con  $\text{K}^+$  en muchas funciones celulares esenciales para el organismo (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Altos niveles de  $\text{Na}^+$  o una relación  $\text{Na}^+/\text{K}^+$  elevada puede interrumpir varios procesos enzimáticos en el citoplasma (Yao et al. 2010). Por otro lado, una elevada concentración de  $\text{Na}^+$  en el apoplasto puede ocasionar deshidratación celular (Tester y Davenport, 2003). Una de las estrategias es evitar la toxicidad iónica mediante la limitación de la absorción de  $\text{Na}^+$ , su expulsión o compartimentalización del  $\text{Na}^+$  en vacuolas, manteniendo la menor concentración de iones en el citosol en comparación con el ambiente circundante (Lu et al. 2014). El último punto de control, con el fin de evitar que los iones alcancen la parte aérea, podría considerarse la carga neta del xilema (Barrett-Lennard, 2003). En cuanto a la limitación de la absorción del  $\text{Na}^+$ , podría ser la primera línea de defensa impidiendo la acumulación del ion en la planta. Sin embargo, la similitud que presenta el ion  $\text{Na}^+$  con respecto al  $\text{K}^+$  favorece su ingreso a las células. La extrusión de iones puede no ser una estrategia de tolerancia muy viable, dado que la acumulación de iones en el apoplasto impone un estrés hiperosmótico sobre el protoplasto (Kronzucker y Britos, 2011). El mecanismo de compartimentalización en vacuolas se logra a través de antitransportadores  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  del tipo NHX localizados en el tonoplasto, acoplando el movimiento de  $\text{Na}^+$  hacia dentro de vacuolas (en contra del gradiente de concentración) con el de  $\text{H}^+$  hacia afuera, a favor del gradiente electroquímico generado por  $\text{H}^+$ -ATPasas y  $\text{H}^+$ -PPiasa. Los genes de la familia de anti-transportadores NHX están presentes en todos los organismos vivos mientras que en plantas se expresan en raíces, hojas y tejidos florales. Los antitransportadores NHX han sido ampliamente estudiados en relación a la tolerancia a salinidad, especialmente en su rol de compartimentalización de  $\text{Na}^+$  y el mantenimiento de la homeostasis del  $\text{K}^+$  (Ma et al. 2014; Bassil et al. 2019). La sobre-expresión de genes NHX incrementa la tolerancia a sales en diversas especies vegetales (Kronzucker y Britos, 2011; Zhang y Blumwald, 2001; Xue et al. 2004; Chen et al. 2007; Gouiaa et al. 2012; Agarwal et al.

2014), mejorando homeostasis (Zhang y Blumwald, 2001) y regulando el pH celular (Sakano, 1998). Teakle et al. (2010), caracterizaron y aislaron el gen de un anti- transportador NHX1 de *Lotus tenuis*, relacionándolo con la acumulación de Na<sup>+</sup> en las vacuolas de las raíces de *L. tenuis* sometidas a salinidad, aumentando su tolerancia cuando se la comparaba con *L. corniculatus* en similares condiciones, mostrando, ésta última especie, niveles del transcripto reducido. En otras leguminosas, como *Glycine max* y *Medicago sp.* se observan mayores niveles de expresión del gen NHX1 al ser sometidas a salinidad (Yang et al. 2005, Li et al. 2006).

*Lotus tenuis* es un forraje perenne nativo de Europa y naturalizado en la Argentina, especialmente en la Pampa Deprimida del Salado. Posee alta plasticidad y adaptación a diversos tipos de estrés abiótico, entre ellos sequía y salinidad (Ayers, 1948; Rogers et al. 1997; Sanchez et al. 2011; Uchiya et al. 2016). A pesar de que se la considera como una especie tolerante a sales, los mecanismos implicados en su respuesta al estrés no son completamente comprendidos. Probablemente, *L. tenuis* secuestra Na<sup>+</sup> en las vacuolas de sus raíces, es decir posee una mayor compartimentalización cuando se la compara con otras especies del mismo género. Basándose en la caracterización molecular, la posible estructura de la proteína NHX1 y la caracterización funcional en levadura, se determinó que es probable que LtNHX1 sea un antiportador vacuolar de Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> y podría mostrar una función similar a la de *Arabidopsis thaliana* AtNHX1 (Teakle et al. 2010). A pesar de las conclusiones de este estudio previo, el papel de LtNHX1 en la tolerancia a la sal aún no se ha evaluado en planta.

## **ANTECEDENTES:**

En el laboratorio de biotecnología vegetal y genómica funcional se llevan a cabo estudios de genes involucrados en la tolerancia a estrés abiótico, en este contexto se realizan ensayos de transformación genética en *Lotus tenuis* y caracterización de genes relacionados al estrés. Por otro lado, la Ing. Agr. Affinito (INTA Pergamino) estudió la expresión transcripcional de NHX1 en muestras de hoja y raíz de *L. tenuis* en condiciones de salinidad a largo plazo (Affinito et al. 2015) y se logró localizar de manera intracelular dicho transportador (Affinito et al. 2021). Posteriormente se aisló el gen del anti-transportador NHX1 de *L. tenuis* y se realizó la construcción del vector binario pBi 35s:LtNHX1 (comunicación personal). La evidencia previa permite llevar a cabo el presente plan de trabajo.

## 2. OBJETIVOS GENERALES Y PARTICULARES:

### **Objetivo general:**

Análisis funcional del anti-transportador de iones NHX1 en la tolerancia a estrés salino de *Lotus tenuis* (Mill.) mediante la sobreexpresión del gen involucrado en su síntesis.

### **Objetivos particulares:**

- I. Producción de plantas modificadas genéticamente de *Lotus tenuis*, con el gen del anti-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (*LtNHX1*), detección y análisis de la inserción del gen de interés.
- II. Análisis fisiológico de las plantas controles (no transformadas) y portadoras del gen (transformadas), en condiciones normales y estresantes.

## 3. MATERIALES Y MÉTODOS:

### **Objetivo Particular I: Producción de plantas transgénicas de *Lotus tenuis*, con el gen del anti-transportador $\text{Na}^+/\text{H}^+$ (*LtNHX1*), detección y análisis de la inserción del gen de interés.**

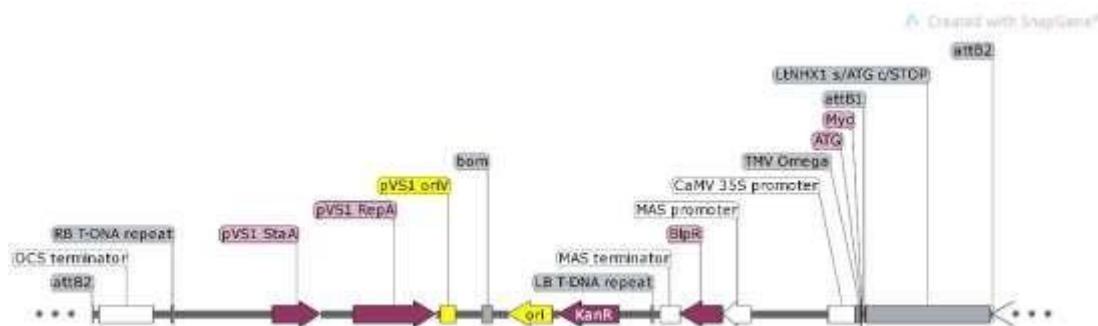
Las técnicas de regeneración y transformación genética de las plantas de *Lotus tenuis* se llevó a cabo mediante el uso de protocolos desarrollados previamente consistente en el empleo de un medio de cultivo compuesto por las sales de Murashige y Skoog (1962) enriquecido con reguladores de crecimiento vegetal (Espasandin et al. 2010). Se emplearon folíolos extraídos de plántulas de *L. tenuis*, obtenidas mediante la germinación in vitro de semillas de una población mejorada obtenida por selección recurrente (“INTA-PAMPA”). Los folíolos fueron inoculados con un cultivo líquido ( $\text{OD}_{600}= 0.6$ ) de *A. tumefaciens* (strain GV3101 pMP90) y co-cultivados durante tres días en oscuridad (Fig. 1).



Figura 1: Representación esquemática del proceso de transformación genética de *Lotus tenuis* mediante el método indirecto.

El vector binario contiene CaMV35s: *LtNHX1*; el gen bar fue el gen selectivo (Fig. 2). El vector fue construido en colaboración con la Ing. Agr. Affinito A. del INTA CASTELAR (Affinito et al. 2015). Posteriormente, los explantes fueron

transferidos a un medio de regeneración contenido cefotaxima ( $300 \mu\text{g ml}^{-1}$ ) y herbicida glufosinato de amonio ( $5 \text{ mg l}^{-1}$ ) durante 45 días, efectuándose subcultivos cada 15 días, a fin de eliminar la bacteria y seleccionar los explantes transformados. Los brotes neoformados fueron subcultivados a medios de elongación y enraizamiento bajo condiciones de luz (14 h de fotoperíodo,  $116 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  PPF) y temperatura ( $27 \pm 2^\circ\text{C}$ ) controlada.



*B izq – NOSter – Bar – NOSpro – 35Ster – LtNHX1 – p35S – B der*

#### **Vector CaMV35s: *LtNHX1***

Figura 2: Representación esquemática del vector binario utilizado (Programa SnapGene Viewer).

Verificación y caracterización de las plantas transgénicas. Las plantas resistentes al glufosinato fueron analizadas mediante amplificación (PCR). Se extrajo ADN genómico a partir de brotes de las plantas regeneradas mediante el protocolo de CTAB (Yamamoto et al., 2000). Fueron analizadas mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el vector binario con los genes NHX1 R ( $5'$ -gtggaccaacatccatccact –  $3'$ ), 35s F ( $5'$  - gacgtaaggatgacgcacaa –  $3'$ ). El fragmento amplificado del ADN genómico fue sometido a electroforesis en geles de agarosa (1%). Finalmente, las plantas que contenían el gen de interés (“plantas transformadas”), fueron clonadas mediante el cultivo *in vitro* de segmentos uninodales para llevar a cabo los ensayos de salinidad.

#### **Objetivo Particular II: Análisis fisiológico de las plantas controles (no transformadas) y portadoras del gen, en condiciones normales y estresantes.**

##### **1) Tratamientos de estrés salino en cultivo *in vitro*:**

a) Determinación de crecimiento: Se utilizó la parte aérea (estacas) de plantas “salvajes” y transformadas (N2249) que crecieron en un cuarto climatizado, en tubos de ensayo contenido 3 ml de medio basal de Murashige y Skoog (1962) semisólido adicionando 100mM NaCl y sin añadir NaCl como tratamiento control. Por otro lado, se realizó un ensayo con estacas en un medio de cultivo con concentraciones crecientes de NaCl, incrementando la concentración cada 3 días, iniciando el ensayo con 50 mM hasta 250 mM. Se

tomaron 10 tubos por repetición con una planta por tubo y se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento.

b) Capacidad de regeneración: Se indujo regeneración de explantes (folíolos) con el medio de regeneración de definida concentración de hormonas (Espasandin et al. 2010) para regeneración de *L. tenuis* adicionando 100mM NaCl o sin adicionar NaCl como tratamiento control, durante 45 días. Se tomaron 10 tubos por repetición y se realizaron 3 repeticiones de cada tratamiento.

2) Determinación de los parámetros morfológicos y fisiológicos:

a) Determinación de crecimiento: Se determinó el porcentaje (%) de sobrevivencia de las plantas con y sin estrés (Xiong et al. 2019). En el transcurso del ensayo se midió longitud aérea y se determinó la tasa de crecimiento relativo (TCR).

b) Capacidad de regeneración: Se determinó el % de regeneración y el n° de yemas neoformadas/explante de los explantes con y sin el agregado de NaCl en el medio de cultivo.

Análisis estadístico: Para los análisis estadísticos se utilizó ANOVA, y para las diferencias entre las medias, su significancia fue analizada por el Test de Tukey ( $p \leq 0,05\%$ ) con el programa Info- Stat (Di Rienzo et al. 2011) y Graph Pad Prism Software.

#### 4. RESULTADOS:

**Objetivo Particular I: Producción de plantas transgénicas de *Lotus tenuis*, con el gen del anti-transportador  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  (*LtNHX1*), detección y análisis de la inserción del gen de interés.**

Luego de realizar el protocolo de transformación descripto en materiales y métodos, y transcurridos 90 días de cultivo, 36% de los 66 explantes tratados con vectores portadores de CaMV35S:NHX1 brindaron de 2 a 4 yemas adventicias/explante (Fig. 3B), a través de un sistema de regeneración directa (sin formación de callos). Asimismo, el crecimiento bacteriano y fúngico se incrementó en el tiempo ocasionando contaminación en algunos explantes. Las yemas adventicias fueron aisladas y transferidas a un medio fresco desprovisto de reguladores de crecimiento a fin de estimular su elongación. Seguidamente los brotes resultantes fueron aislados para la posterior verificación de la transgénesis mediante el uso de la técnica de PCR (Fig. 3A).

Finalmente, se obtuvieron 3 líneas transformadas con CaMV35S:NHX1 (Fig. 3A) de las 80 plantas obtenidas. La integración del gen fue confirmada a partir

de secciones de hojas extraídas de las líneas transgénicas, mediante análisis de PCR, obteniendo el producto de amplificación de 0,67 kb para las líneas transformadas. Estos resultados se corresponden con una eficiencia de transformación de 3,75%.

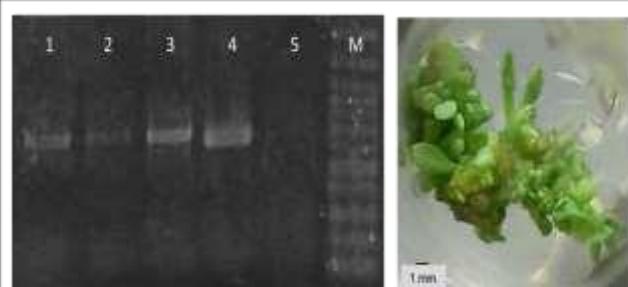


Figura 3A: PCR y electroforesis en gel usando primers específicos de *LtNHX* (671 bp). Calle 1: control positivo. Calles 2-4: plantas transformadas. Calle 5: control negativo. M: PM 100 bp plus.

Figura 3B: Organogénesis directa de yemas adventicias a partir de explantes foliares inoculados con el agente vector.

Las características fenotípicas del material neoformado fueron similares al tratamiento control (sin inocular), correspondiéndose con una organogénesis directa del 81±6 % en el tratamiento sin inocular y un ulterior crecimiento normal de ambos tratamientos bajo condiciones normales de crecimiento. Los brotes extraídos de las plantas genéticamente modificadas fueron sometidos a un ciclo de multiplicación. Este procedimiento permitió el escalado de la producción, con el fin de llevar a cabo el 2º objetivo particular.

**Objetivo Particular II: Análisis fisiológico de las plantas controles (no transformadas) y portadoras del gen, en condiciones normales y estresantes.**

Se seleccionó el genotipo transformado denominado N2249 y se comparó el crecimiento de brotes o capacidad de regeneración de folíolos con el genotipo salvaje, en medios de cultivo *in vitro* con y sin el agregado de NaCl. El cultivo *in vitro* ha sido aceptado y adaptado como técnica de selección para el ensayo de cultivos en la tolerancia a salinidad (Ayolié et al. 2020).

Ensayo de determinación de crecimiento: Con el fin de obtener resultados preliminares se inició con el ensayo de concentraciones crecientes de NaCl, incrementando la concentración de NaCl el medio de cultivo cada 3 días (50mM, 100mM, 150 mM, 200mM y 250mM NaCl). Se pudo observar que ninguno de los genotipos se adaptó a 200mM y 250 mM más de 3 días (Fig. 4). Por tal motivo, se tomó la concentración de 100mM NaCl en el medio de cultivo para realizar los siguientes ensayos.



Figura 4: Plantas sometidas a 200mM NaCl en el medio de cultivo. Izq.: genotipo salvaje – Der.: genotipo transformado

Las estacas del genotipo salvaje y transformado (N2249) fueron sometidas a 100mM de NaCl durante 45 días, observamos que sobrevivió el 50% de brotes del genotipo salvaje, con una tasa de crecimiento relativo  $TCR= 0.1\pm0.07$  mm/mm.día; en cambio el N2249 sobrevivió 76% de los brotes con  $TCR= 0.3\pm0.02$  mm/mm.día. En condiciones normales de crecimiento se obtuvieron similares TCR en ambos genotipos (salvaje=  $0.58\pm0.1$  mm/mm.día y transformado=  $0.55\pm0.17$  mm/mm.día). En la figura 5, se observa la elongación de los brotes en el transcurso del ensayo. Las líneas completas corresponden a las condiciones normales de crecimiento, mientras que las líneas punteadas fueron las condiciones de estrés salino. Se puede observar que, en condiciones normales, ambos genotipos crecieron de manera similar en el tiempo; sin embargo, en condiciones de salinidad, las plantas transformadas crecieron 3 veces más respecto al genotipo salvaje. En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas. En la figura 6, se observa el genotipo transformado, que en condiciones salinas tiende a brotar sus yemas axilares, sin embargo, el genotipo salvaje es más clorótico y disminuye el crecimiento.

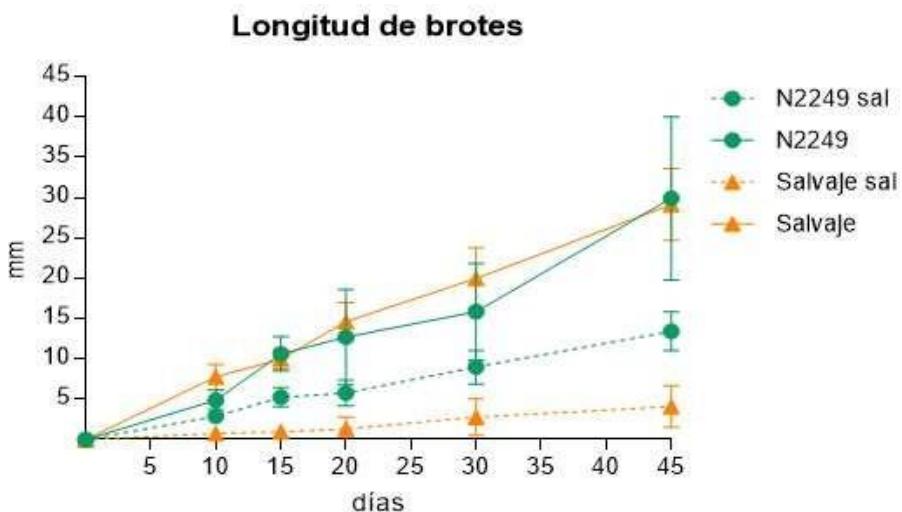


Figura 5: Elongación de brotes en el transcurso del ensayo en ambos genotipos sometidos a salinidad y en condiciones control.



Figura 6: Plantas sometidas a 100mM NaCl durante 45 días. Izq arriba: genotipo salvaje. Izq abajo: Genotipo transformado. Der.: 3 plantas salvajes y 3 plantas N2249. Barra: 1 cm

Comparando el mismo genotipo sometido a salinidad y en condiciones control pudimos observar que el genotipo salvaje disminuyó su longitud aérea  $9 \pm 1,8$  veces con respecto en condición control, en cambio el N2249 disminuyó  $2 \pm 0,25$  veces. En la tabla 1 se observa cuántas veces disminuyó la longitud del tallo en cada genotipo, con respecto a su control, en el tiempo, expresado en %.

Tabla 1: Comparación de la longitud del tallo en cada genotipo, con respecto a su control, expresado en porcentaje (%).

	DÍA 0	10 DÍAS	15 DÍAS	20 DÍAS	30 DÍAS	45 DÍAS
<b>N2249 ctol.</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>N2249 sal</b>	<b>0</b>	<b>59,39</b>	<b>49,62</b>	<b>45,45</b>	<b>56,68</b>	<b>44,91</b>
<b>WT ctol.</b>	<b>0</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>	<b>100</b>
<b>WT sal</b>	<b>0</b>	<b>10,04</b>	<b>10,00</b>	<b>9,15</b>	<b>13,91</b>	<b>14,13</b>

En cuanto a la capacidad de regeneración de folíolos se observó que, a los 60 días del inicio del ensayo, los dos genotipos disminuyeron su capacidad de regeneración, sin embargo, el genotipo transformado incrementó el n° yemas/explantos. Ambos genotipos tuvieron una regeneración cercana al 50% y el promedio del número de yemas adventicias formadas por explante fue superior en N2249 respecto al salvaje ( $11 \pm 7$  y  $3.7 \pm 2$  respectivamente) (Fig. 7). En cuanto a la regeneración en condiciones de crecimiento controles (sin el agregado de NaCl) se observó que el genotipo sin transformar tuvo un 65% de regeneración con un promedio de  $8 \pm 1$  yemas adventicias/explante y el genotipo N2249 (transformado) tuvo una regeneración de 79% y  $7 \pm 2$  yemas adventicias/explante (Fig.7).

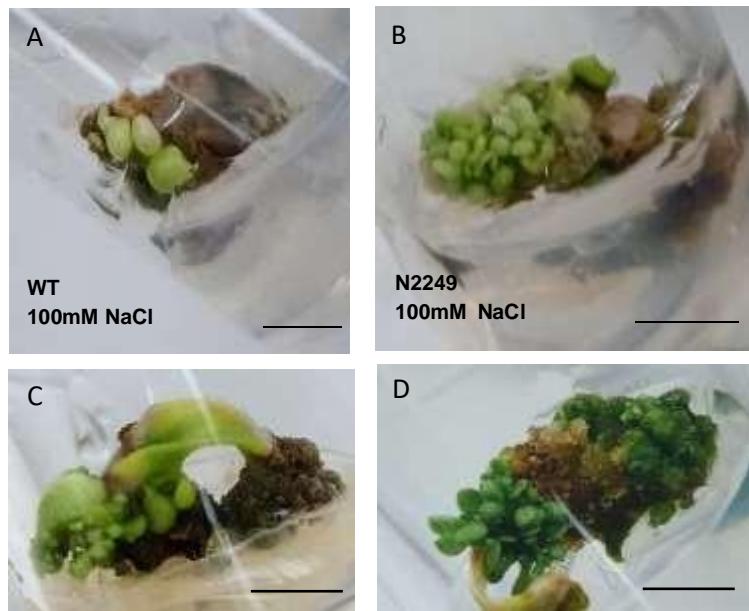


Figura 7: Regeneración de explantes a los 60 días del inicio del ensayo. A: Explantes sin transformar sometidos a 100mM de NaCl. B: Explantes del genotipo transformado sometidos a 100mM de NaCl. C: Explantes del genotipo sin transformar en medio de regeneración sin agregado de NaCl. D: Explantes transformados en medio de regeneración sin agregado de NaCl. Barra: 1cm.

## 5. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES:

En el marco de la presente tesina de graduación se obtuvieron plantas transgénicas de *Lotus tenuis* que expresan CaMV35s::NHX1 de manera constitutiva, basado en un sistema directo de regeneración de brotes, sin proliferación de callos (Espasandin et al. 2010). Este hecho, en adición al uso de segmentos foliares como fuente de explante reduce el riesgo de producirse variación somaclonal (Webb y Watson, 1991). Las plantas transformadas no presentaron diferencias fenotípicas respecto a sus pares no transformadas bajo condiciones óptimas de crecimiento, sin embargo, bajo estrés salino moderado (100mM NaCl) en cultivo *in vitro*, se observó mayor restricción de crecimiento en el genotipo salvaje con respecto al transformado. En plantas de *Triticum aestivum* se pudo observar que el NaCl ocasiona una gran variación en la capacidad de regeneración en medios de cultivo con el agregado de diferentes concentraciones de NaCl, disminuyendo la tasa de regeneración a medida que incrementa el NaCl en el medio, demostrando que las sales disminuyen la capacidad de regeneración. (Ayolié et al. 2020).

La salinidad y el anegamiento ocasionan disminución en el crecimiento de la mayoría de los cultivos y pasturas (Munns y Tester 2008, Teakle et al. 2010). En especies halófitas también se ha observado disminución de la longitud de la parte aérea y raíces en condiciones de salinidad moderada, y en elevadas concentraciones de NaCl muestran clorosis, abscisión de hojas y disminución del peso fresco (Xiong et al. 2019). Nosotros hipotetizamos que las plantas

transgénicas crecen mejor por el hecho de que el  $\text{Na}^+$  es compartimentalizado en vacuolas y disminuye la toxicidad en planta, ocasionando un mejor crecimiento. En especies vegetales, como *Gossypium hirsutum*, *Oryza sativa*, *Arabidopsis thaliana*, *Triticum aestivum*, *Suaeda salsa* (Affinito et al. 2021), que sobreexpresan el antitransportador NHX1 se ha observado que ofrecen un mayor crecimiento de la parte aérea en condiciones de altas concentraciones de NaCl, comparadas a la misma especie en condiciones normales de crecimiento. Teakle et al. (2010), observaron que *L. tenuis* mostraba mayor crecimiento en condiciones salinas, mayor acumulación de  $\text{Na}^+$  en sus vacuolas y mayores niveles de transcripto del antitransportador NHX1 contribuyendo en la tolerancia a salinidad comparado a *L. corniculatus*. A pesar que se observó una reducción en el crecimiento de las transgénicas al incrementar el contenido de NaCl en el medio de cultivo, se pudo observar que se adaptó mejor que el genotipo salvaje ya sea en cuanto al crecimiento en longitud de estacas y en la capacidad de regeneración.

Como conclusión final, en este estudio, se obtuvieron plantas transgénicas que sobreexpresan el antitransportador NHX1 de *L. tenuis*, observando mayor tolerancia al estrés salino en el genotipo transformado con respecto al genotipo sin transformar. El gen codificador de NHX1 atenuaría los efectos deletéreos de la salinidad.

## BIBLIOGRAFÍA:

- Affinito MA, Diaz Paleo A, Andrés A (2015). Expression of the vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene in *Lotus tenuis* half-sibs families under salt stress. 5th International Symposium of Forage Breeding. Bs As. Argentina. [http://www.conicet.gov.ar/new\\_scp/detalle.php?keywords=&id=46647&amp;congresos=yes&detalles=yes&congr\\_id=6066772](http://www.conicet.gov.ar/new_scp/detalle.php?keywords=&id=46647&amp;congresos=yes&detalles=yes&congr_id=6066772).
- Affinito MA, Espasandin FD, Del Vas M, Alvarez MY, Andrés AN, Sansberro P, Diaz Paleo A (2021). Functional characterization and intracellular localization of a *Lotus tenuis* NHX antiporter. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC). <https://doi.org/10.1007/s11240-021-02094-3>.
- Agarwal P, Shukla PS, Gupta K, Jha B (2014). Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of the art. Mol Biotechnol 54:102–123.
- Ayers A (1948). Salt tolerance of birdsfoot trefoil. Agron J 40:331–334. <https://doi.org/10.2134/agronj1948.00021962004000040005x>.
- Ayolié Koutoua, Mouhssine Fatine, Elyacoubi Houda, Rochdi Atmane (2020). *In vitro* regeneration from immature embryos calli of durum wheat under salinity stress conditions. Research Journal of Biotechnology 15 (9).
- Barrett-Lennard E.G. (2003). The interaction between waterlogging and salinity in higher plants: causes, consequences and implications. Plant and soil 253:35- 54.
- Bassil E, Zhang S, Gong H, Tajima H, Blumwald E (2019). Cation Specificity of Vacuolar NHX-Type Cation/ $\text{H}^+$  Antiporters. Plant Physiology 179: 616-629. <https://doi.org/10.1104/PP.18.01103>.
- Chen H, An R, Tang J-H, Cui X-H, Hao F-S, Chen J, Wang X-C (2007) Over-expression of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene improves salt tolerance in an upland rice. Mol Breed 19:215–225. <https://doi.org/10.1007/s11032-006-9048-8>.
- Di Rienzo JA, F Casanoves, MG Balzarini, L Gonzalez, M Tablada, CW Robledo (2011). Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.Infostat.com.ar>.
- Espasandin F, Collavino M, Luna C, Tarragó J, Paz R, Ruiz O, Mroginski L, Sansberro P (2010). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Lotus tenuis* Mill. And regeneration of transgenic lines. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 102: 181-189.

FAO. <http://www.fao.org/contact-us/en/>

Gouiaa S, Khoudi H, Leidi EO, Pardo JM, Masmoudi K (2012) Expression of wheat  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter TNHXS1 and  $\text{H}^+$ -pyrophosphatase TVP1 genes in tobacco from a bicistronic transcriptional unit improves salt tolerance. *Plant Molecular Biology* 79:137–155. <https://doi.org/10.1007/s11103-012-9901-6>.

Koutoua Ayolié, Mouhssine Fatine, Elyacoubi Houda, Rochdi Atmane (2020). *In vitro* regeneration from immature embryos calli of durum wheat under salinity stress conditions. *Research Journal of Biotechnology*, vol 15(9).

Kronzucker HJ, Britos DT (2011). Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytologist* 189: 54–81.

Läuchli A, Grattan SR (2007). Plant growth and development under salinity stress. In: Jenks MA, Hasegawa PM, Jain SM (eds.). *Advances in Molecular Breeding Toward Drought and Salt Tolerant Crops*. Springer, The Netherlands 1–32.

Li WY, Wong FL, Tsai SN, Phang TH, Shao G, Lam HM (2006). Tonoplast-located GmCLC1 and GmNHX1 from soybean enhance  $\text{NaCl}$  tolerance in transgenic bright yellow (BY)-2 cells. *Plant Cell and Environment* 29:1122–1137.

Lu W, Guo CH, Li X, Duan W, Ma CH, Zhao M, Gu J, Du X, Liu Z, Xiao K (2014). Overexpression of TaNHX3, a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene in wheat, enhances salt stress tolerance in tobacco by improving related physiological processes. *Plant Physiology and Biochemistry* 76: 17-28.

Ma Y, Auge R, Dong Ch, Cheng Z (2014). Increased salt tolerance with overexpression of cation/proton antiporter 1 genes: a meta-analysis. *Plant Biotechnology Journal* 15:162-173. doi: 10.1111/pbi.12599.

Munns R, Tester M (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Plant Biology* 59: 651-81.

Murashige T, Skoog F (1962). A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures. *Physiologia Plantarum* 15:473-497.

Rodríguez-Navarro A, Rubio F (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 1149–1160.

Rogers M, Noble C, Pederick R (1997). Identifying suitable temperate forage legume species for saline areas. *Aust J Exp Agric* 37:639–645. <https://doi.org/10.1071/EA96102>.

Sakano K (1998). Revision of biochemical pH-Stat: Involvement of alternative pathway metabolisms. *Plant Cell. Physiology* 39: 467-473.

Sanchez DH, Pieckenstain FL, Szymanski J, Erban A, Bromke M, Hannah MA, Kraemer U, Kopka J, Udvardi MK (2011) Comparative functional genomics of salt stress in related model and cultivated plants identifies and overcomes limitations to translational genomics. *PLoS One* 6:e17094.

Taiz L, Zeiger E (2003). Plant physiology. 3<sup>o</sup> edition. In: Sinauer Associates Inc. USA. 690 págs.

Tester M, Davenport R (2003).  $\text{Na}^+$  tolerance and  $\text{Na}^+$  transport in higher plants. *Annals of Botany* 91: 503-527.

Teakle N, Amtmann A, Real D, Colmer T (2010). *Lotus tenuis* tolerates combined salinity and waterlogging: maintaining  $\text{O}_2$  transport to roots and expression of an NHX1-like gene contribute to regulation of  $\text{Na}^+$  transport. *Physiologia Plantarum* 139:358-374.

Uchiya P, Escaray FJ, Bilenca D, Pieckenstain F, Ruiz OA, Menéndez AB (2016) Salt effects on functional traits in model and in economically important *Lotus* species. *Plant Biology* 18:703–709. <https://doi.org/10.1111/plb.12455>.

Webb K, Watson E (1991). *Lotus corniculatus* L.: morphological and cytological analysis of regenerants from three sources of tissue and selected progeny. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 25:27–33.

Xiong Y, Liang H, Yan H, Guo B, Niu M, Chen S, Jian S, Ren H, Zhang X, Li Y, Zeng S, Wu K, Zheng F, Teixeira da Silva J, Ma G (2019). NaCl-induced stress: physiological responses of six halophyte species in in vitro and in vivo culture. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 140: 469–471. <https://doi.org/10.1007/s11240-019-01697-1>.

Xue Z-Y, Zhi D-Y, Xue G-P, Zhang H, Zhao Y-X, Xia G-M (2004). Enhanced salt tolerance of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) expressing a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene with improved grain yields in saline soils in the field and a reduced level of leaf  $\text{Na}^+$ . *Plant Science* 167:849–859. <https://doi.org/10.1016/J.PLANTSCI.2004.05.034>

Yamamoto T, Iketani H, Ieki H, Nishizawa Y, Notsuka K, Hibi T, Hayashi T, Matsuta N(2000). Transgenic grapevine plants expressing a rice chitinase with enhance resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Report* 19:639–646.

Yang Q, Wu M, Wang P, Kang J, Zhou X (2005). Cloning and expression analysis of a vacuolar  $\text{Na}^+/\text{H}^+$  antiporter gene from alfalfa. *DNA seq* 16:352-357.

Yao X, Horie T, Xue S, Leung H-Y, Katsuhara M, Brodsky D, Wu Y, Schroeder J (2010). Differential sodium and potassium transport selectivities of the *rice* OsHKT2;1 and OsHKT2;2 transporters in plant cells. *Plant Physiology* 152: 341–355.

Zhang HX, Blumwald E (2001). Transgenic salt-tolerant *tomato* plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* 19: 765-768.