



Facultad de Ciencias Agrarias

Universidad Nacional del Nordeste

Trabajo Final de Graduación

Modalidad Tesina

“Evaluación de la tolerancia al estrés salino mediante la transformación genética de *Lotus tenuis* con el gen que codifica para un transportador Na⁺/H⁺. ”

ALVAREZ, Mayra Yanet

2019

ÍNDICE

Resumen	4
Introducción	5
Antecedentes en relación al tema de trabajo	7
Objetivos	8
Hipótesis	9
Materiales y métodos	9
Resultados	12
Discusión y conclusiones	15
Bibliografía	17

Los trabajos experimentales aquí descriptos fueron realizados en el Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional de la Facultad de Ciencias Agrarias, UNNE - Instituto de Botánica del Nordeste (UNNE - CONICET).

ALUMNA:

Mayra Yanet ÁLVAREZ

DIRECTORA:

Ing. Agr. (Dra.) Fabiana Daniela ESPASANDIN

AGRADECIMIENTOS

- A la Universidad Nacional del Nordeste (UNNE) a través de su Unidad Académica, la Facultad de Ciencias Agrarias, por el marco académico e institucional.
- Al Instituto de Botánica del Nordeste, en particular al Laboratorio de Biotecnología Aplicada y Genómica Funcional, y a sus responsables: el Dr. Pedro Sansberro y la Dra. Claudia Luna por permitirme formar parte de su equipo de trabajo y brindarme los medios para mi formación.
- A mis compañeros de laboratorio por su colaboración para cualquier inquietud, acompañamiento y consejos brindados.
- A mi familia por el apoyo incommensurable en todos los años de carrera.
- Y finalmente a una persona que merece un agradecimiento especial, a mi directora de tesis la Ing Agr. (Dra.) Fabiana D. Espasandin, por su considerable apoyo, paciencia y comprensión durante la ejecución del presente trabajo.

1. RESUMEN

El estrés salino es uno de los principales estreses abióticos que afectan seriamente el crecimiento y rendimiento de los cultivos. Una de las estrategias de las plantas para mitigar los daños producidos por tal estrés es evitar la toxicidad iónica mediante la compartimentalización del Na⁺ en vacuolas, acumulando dicho ion en las mismas y favoreciendo una adecuada relación Na⁺/K⁺ en el citosol de las células. Dicho mecanismo se logra a través de anti-transportadores Na⁺/H⁺ del tipo NHX localizados en el tonoplasto (clase I) o en las membranas endosomales (clase II). Con el propósito de determinar la localización subcelular del anti-transportador de iones NHX1 de *Lotus tenuis*, se procedió a la modificación genética de plantas de la especie en estudio con el gen que codifica para la enzima NHX1 de *L. tenuis* y el gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP), mediante el protocolo de transformación indirecto con cepas de *Agrobacterium tumefaciens* contenido el vector binario pCaMV35S:NHX1:GFP y el gen *bar* como marcador selectivo. La metodología consistió en inocular los segmentos foliares con la suspensión de *A. tumefaciens*. Seguidamente, los explantes transformados fueron seleccionados con glufosinato de amonio e incubados en condiciones de luz y temperatura controladas. Las plantas resistentes a glufosinato fueron analizadas mediante amplificación (PCR), utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *gfp*. Como resultado se obtuvieron 5 líneas transgénicas de 28 plantas analizadas. Posteriormente, las hojas de las plantas transformadas genéticamente fueron plasmolizadas y observadas en un microscopio confocal, permitiendo localizar a la proteína en la membrana vacuolar, hebras transvacuolares y estructuras esféricas denominadas bulbs, sugiriendo que el anti-transportador NHX1 de *L. tenuis* pertenece a la clase I de la familia de los NHX, favoreciendo la compartimentalización de Na⁺ dentro de la vacuola, aliviando la toxicidad iónica.

2. INTRODUCCIÓN

2.1 Efecto de la salinidad sobre el crecimiento de las plantas.

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 10% de la superficie terrestre contiene altas concentraciones de sales debido al origen de sus suelos (Lamz Piedra y Gonzalez Cepero, 2013). 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 plantas experimentan cambios característicos desde el momento en que sufren la imposición del estrés hasta que alcanzan su madurez. Munns (2002) describe estos cambios en función de distintas escalas de tiempo del crecimiento y desarrollo de la planta. Al principio de la salinización, las células se deshidratan y contraen, además disminuye el período de división celular, acompañado de una menor expansión de las células resultantes, determinando una menor tasa de crecimiento de hojas y raíces. Pocos días después, la reducción en la división y expansión celular se traduce en un retraso en la aparición de las hojas y disminución del área foliar. Las plantas que son severamente afectadas por el estrés presentan, además, lesiones visibles debido a la absorción excesiva de sales, hasta que, transcurrido algunos meses puede comprobarse un claro efecto negativo en el crecimiento general de la planta estresada. Basado en estas diferencias temporales de respuesta a salinidad, Munns (2002) desarrolló el concepto de **respuesta bifásica a salinidad**. La **primera fase** de reducción del crecimiento ocurre rápidamente (en minutos) luego de la exposición a salinidad. Esta respuesta es inducida por los cambios osmóticos que se originan en el exterior de la raíz afectando las relaciones hídricas de las células. El efecto osmótico que se genera inicialmente reduce la habilidad de la planta para absorber agua. Este efecto es similar al estrés hídrico y presenta pocas diferencias genotípicas. La **segunda fase** transcurre de una manera más lenta, requiriendo de días, semanas o meses, y se origina como consecuencia de la acumulación de sales en las hojas. Esta toxicidad puede causar la muerte de tales órganos reduciendo el área foliar fotosintéticamente activa; hecho por el cual, disminuye el suministro de fotosintatos a la planta, en detrimento del balance de carbono necesario para mantener el crecimiento. La fitotoxicidad ocurre primero en las hojas más viejas, debido al incremento de Na^+ y Cl^- por efecto de la transpiración. Probablemente, los daños tisulares y la muerte de las hojas se deban a una elevada concentración de sales que supera la capacidad de compartimentalización en las

vacuolas; hecho por el cual el contenido de éstas en el citoplasma se eleva a niveles tóxicos (Munns, 2002; 2005). La velocidad con que se produce la muerte de las hojas y en consecuencia la reducción del área fotosintética determinará la sobrevivencia de la planta.

Por su parte, la toxicidad metabólica de Na^+ es la resultante de la competencia con el K^+ en muchas funciones celulares esenciales para el organismo (Rodríguez-Navarro y Rubio, 2006). Altos niveles de Na^+ o una relación Na^+/K^+ elevada puede interrumpir varios procesos enzimáticos en el citoplasma (Yao *et al.*, 2010). Por otro lado, una elevada concentración de Na^+ en el apoplasto puede ocasionar deshidratación celular (Tester y Davenport, 2003).

2.2 Mecanismos de defensa de las plantas ante el estrés. El gen NHX

Una de las estrategias de las plantas para mitigar los daños producidos por estrés salino es evitar la toxicidad iónica, mediante la limitación de la absorción de Na^+ , su expulsión y/o compartimentalización del Na^+ en vacuolas, manteniendo la menor concentración de iones en el citosol en comparación con el ambiente circundante (Lu *et al.*, 2014). En general, las plantas sensibles a salinidad mantienen el equilibrio osmótico mediante la síntesis de solutos compatibles y **limitan la absorción del Na^+** como primera línea de defensa impidiendo la acumulación del ión en la planta (Munns y Tester, 2008). Sin embargo, la similitud que presenta el ion Na^+ con respecto al K^+ favorece su ingreso a las células. La **exclusión** se basa en la liberación selectiva de iones Na^+ en el xilema y su reabsorción desde la corriente del xilema, eliminando el Na^+ desde la parte aérea y manteniendo elevados niveles de K^+ (Munns, 2002). Ésta estrategia de tolerancia podría no ser muy viable, dado que la acumulación de iones en el apoplasto impone un estrés hiperosmótico sobre el protoplasto (Kronzucker y Britos, 2011). Finalmente, las plantas tolerantes utilizan iones para el ajuste osmótico, ya que tienen la capacidad de secuestrar y acumular Na^+ en las vacuolas, previniendo su acumulación en el citosol, favoreciendo una adecuada relación Na^+/K^+ en las células, mecanismo denominado **compartimentalización en vacuolas**. Dicho mecanismo se logra a través de anti-transportadores Na^+/H^+ , especialmente del tipo NHX, localizados en el tonoplasto, acoplando el movimiento de Na^+ hacia dentro de vacuolas (en contra del gradiente de concentración) con el de H^+ hacia afuera, a favor del gradiente electroquímico generado por H^+ -ATPasas y H^+ -PPiasa (Apse y Blumwald, 2007). Los genes de la familia de anti-transportadores NHX se expresan en raíces, hojas, tallos, flores y frutos. Se encuentran presentes en todos los organismos vivos y se divide en dos grupos referidos como clase I y II basados en su localización subcelular y la selectividad del ion sustrato. En *Arabidopsis* los anti-transportadores NHX1, NHX2, NHX3 y NHX4 pertenecen a la clase I, mientras que las proteínas NHX5 y NHX6 a la clase II (Pardo *et al.*, 2006); en tanto que en tomate se identificó que el NHX2 pertenece a la clase II y NHX3 junto con NHX4 a la clase I (Rodríguez Rosales *et al.*, 2008). Los miembros de la clase I se localizan en la membrana vacuolar de plantas y catalizan los intercambios de Na^+/H^+ y K^+/H^+ ; mientras que los miembros de la clase II se

encuentran en los endosomas y generalmente muestran una preferencia por K⁺ sobre Na⁺ como sustrato (Pardo *et al.*, 2006). Éstas características diferenciales sugieren que los transportadores vacuolar y/o endosomal desempeñan papeles distintos en las plantas.

Se ha utilizado la sobreexpresión de genes NHX para conferir tolerancia a sales en diversas especies vegetales (Kronzucker y Britos, 2011). Las plantas mejoradas genéticamente incrementan crecimiento, mejoran homeostasis Na⁺/K⁺ (Zhang y Blumwald, 2001) y ajuste osmótico (Pardo *et al.*, 2006), y regulan el pH celular (Sakano, 1998). El silenciamiento génico en el gen del antiporter NHX2 en plantas de tomate muestran reducido crecimiento, inhibición en la producción de frutos y semillas y mayor sensibilidad a la salinidad (Rodríguez Rosales *et al.*, 2008). Teakle y col. (2010) caracterizaron y aislaron un gen de un anti-transportador NHX de *Lotus tenuis*, relacionado con la acumulación de Na⁺ 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, éste último, niveles del transcripto reducido.

3. ANTECEDENTES EN RELACIÓN AL TEMA DE TRABAJO

3.1 Mejoramiento genético para incrementar la tolerancia al estrés

La aplicación de la ingeniería genética en estudios de estrés brinda la posibilidad de analizar el comportamiento y eventual contribución diferencial que tendría un determinado gen o grupo de genes sobre el/los procesos bioquímicos y fisiológicos relacionados con la defensa de la planta y su tolerancia a dicha situación desfavorable. Es claro que no todas las plantas producen los mismos compuestos y en el caso de que así lo hagan, no todas los sintetizan en las cantidades requeridas para enfrentar la situación adversa. El clonado de secuencias génicas ha generado el concepto de que su sobre-expresión contribuye al incremento de la tolerancia. En efecto, algunas líneas transgénicas obtenidas han presentado un mejor comportamiento frente al estrés, en relación con sus pares no transformadas; sin embargo, el mecanismo involucrado difiere en cada especie y/o situación.

Las técnicas de transformación indirecta de plantas utilizando *Agrobacterium tumefaciens* constan de las siguientes etapas: **infección** de la planta u órganos, **selección** de las células infectadas (crecimiento en medios selectivos), **eliminación** de *Agrobacterium* utilizando antibióticos que no afectan el crecimiento del vegetal y **regeneración** de una planta entera a partir de las células transformadas.

En este contexto, en el marco de la tesina y tesis doctoral de la Ing. Agr. (Dra.) Espasandin se realizó la transformación de *Lotus tenuis* y la caracterización de genes relacionados con la tolerancia a estrés hídrico y salino (Espasandin *et al.*, 2010). Por otro lado, a través de un programa interdisciplinario creado con el objeto de llevar a cabo el estudio fisiológico y bioquímico de genes de anti-transportadores, la Ing. Agr. Affinito

(INTA Castelar) 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). Posteriormente, aisló el gen del anti-transportador NHX1 de *L. tenuis* y realizó la construcción del vector binario pBi 35s:*LtNHX1*:GFP con el fin de llevar a cabo la obtención de las plantas transgénicas de *L. tenuis* que sobreexpresen el gen que codifica para el anti-transportador NHX1 junto con el gen reportero GFP.

Por su parte, los genes reporteros son genes que se vinculan a una secuencia regulatoria de otro gen de interés. Son usualmente usados para indicar si un determinado gen ha sido tomado o expresado en la célula y/o tejido. Idealmente, un gen reportero debe ser fácil de ensayar, identificar y medir; si es posible en condiciones no destructivas del tejido, ya que puede usarse para observar el desarrollo de ciertos fenómenos biológicos en tiempo real. Actualmente, se cuenta con los siguientes genes reporteros de uso frecuente: β -glucuronidasa (GUS), la proteína de fluorescencia verde (GFP), los de luciferasa y cloranfenicol acetiltransferasa.

La proteína fluorescente verde (GFP) fue aislada de la medusa *Aequorea victoria* por Shimomura y col. (1962). Estos investigadores observaron que una solución de GFP fluorescía con luz verde al ser irradiada con luz UV. Su expresión es autónoma e independiente de la localización celular y se requiere solamente la presencia de luz UV o azul y de oxígeno para la emisión de la fluorescencia (Stewart, 2001).

4. OBJETIVOS

Objetivo general:

Determinar la localización subcelular del anti-transportador de iones Na^+/H^+ denominado NHX1, mediante la sobreexpresión del gen que codifica para la enzima NHX1 de *Lotus tenuis* y del gen que codifica para la proteína verde fluorescente (GFP) en plantas de *Lotus* transformadas.

Objetivos específicos:

- I. Producir plantas transgénicas de *Lotus tenuis* con el vector binario pCaMV35s:*LtNHX1*:GFP y detectar la inserción del gen de interés.
- II. Analizar la localización subcelular del gen *LtNHX1* en plantas transformadas, mediante la detección del gen reportero GFP (proteína verde fluorescente).

5. HIPÓTESIS

Se presume que el anti-transportador de iones Na^+/H^+ (NHX1) de *Lotus tenuis* se encontraría ubicado en el tonoplasto de hojas y raíces y favorecería la compartimentalización de Na^+ dentro de la vacuola, aliviando la toxicidad iónica.

6. MATERIALES Y MÉTODOS

Objetivo Específico I: Producir plantas transgénicas de *Lotus tenuis* con el vector binario pCaMV35s:*Lt*NHX1:GFP y detectar la inserción del gen de interés.

Transformación genética de Lotus tenuis mediada por Agrobacterium tumefaciens.

Las técnicas de regeneración y transformación genética de las plantas de *Lotus tenuis* se llevaron 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”). Las semillas fueron previamente escarificadas con NaOH (0,5%) durante 15 min. y desinfectadas por inmersión en una solución de hipoclorito de sodio (NaOCl) al 10% (20 min.), para luego ser lavadas 3 veces con agua destilada estéril. Finalmente, las semillas fueron sembradas en condiciones de asepsia, en tubos (11 cm³) que contenían 3 ml de un medio basal semisólido de Murashige y Skoog (1962) adicionado con 3% sacarosa, (agar Sigma A-1296; 6,5%). Plántulas de 30 días de edad fueron utilizadas como fuente de explantes (folíolos).

Los segmentos foliares fueron inoculados con una suspensión de *A. tumefaciens* transformada ($\text{OD}_{600}= 0,6$) y co-cultivados a 28 °C en el medio de regeneración desarrollado previamente (Espasandin *et al.*, 2010) compuesto por las sales minerales y vitaminas de Murashige y Skoog (MS) suplementado con ácido naftalenacético 0,5 μM y benciladenina (BA) 0,5 μM , durante 3 días en oscuridad. Seguidamente, los explantes transformados fueron seleccionados, adicionándose al medio de cultivo glufosinato de amonio 5 $\mu\text{g L}^{-1}$ y cefotaxima (cf) 400 $\mu\text{g mL}^{-1}$ e incubados en luz (fotoperíodo 14 hs, 118 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ PAR) y 27±2 °C. Cada 2 semanas, los explantes fueron subcultivados a medios selectivos frescos a fin de mantener la presión de selección y evitar la proliferación bacteriana. La Fig. 1 muestra el protocolo de transformación y tiempo requerido para cada etapa.

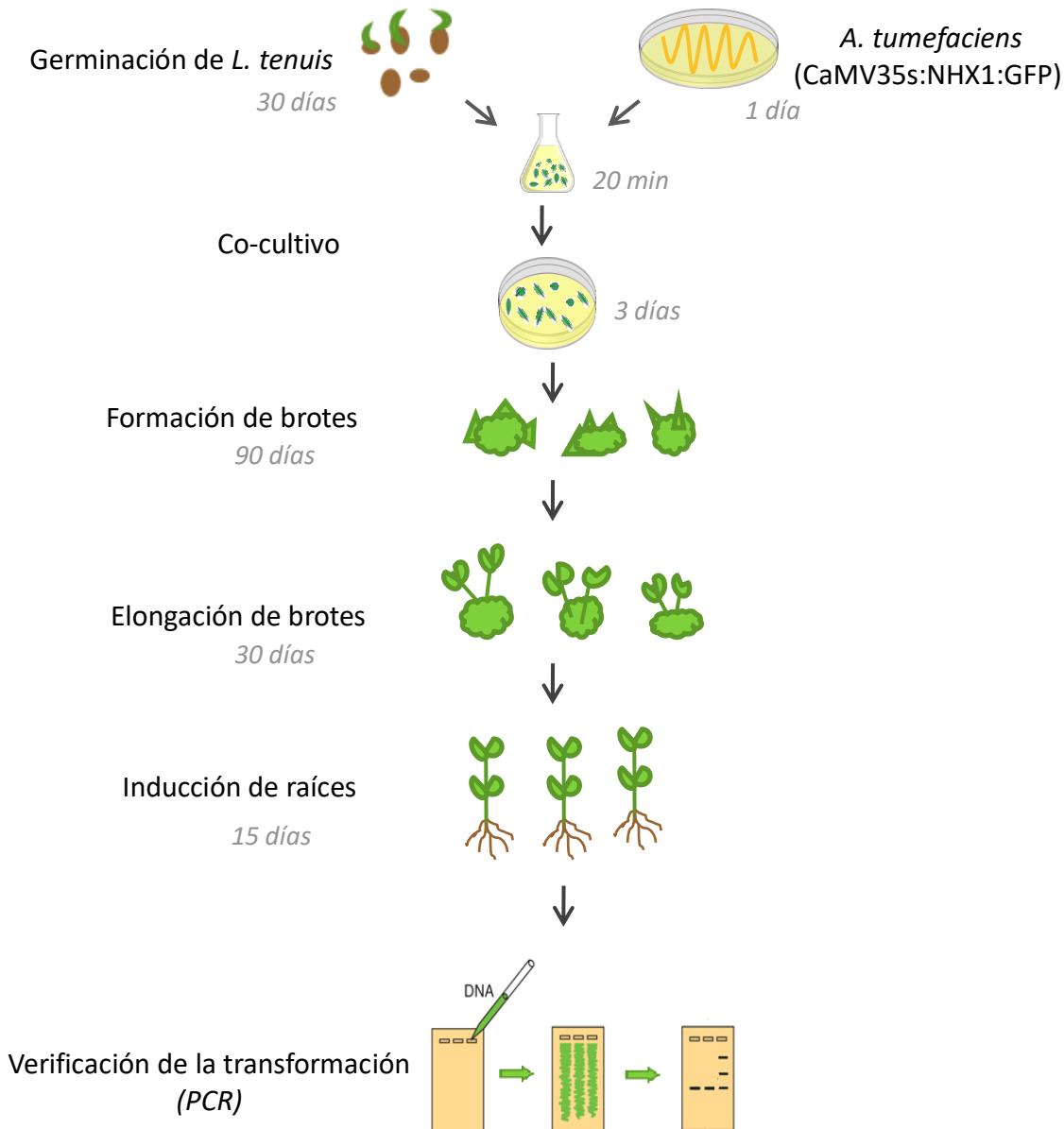
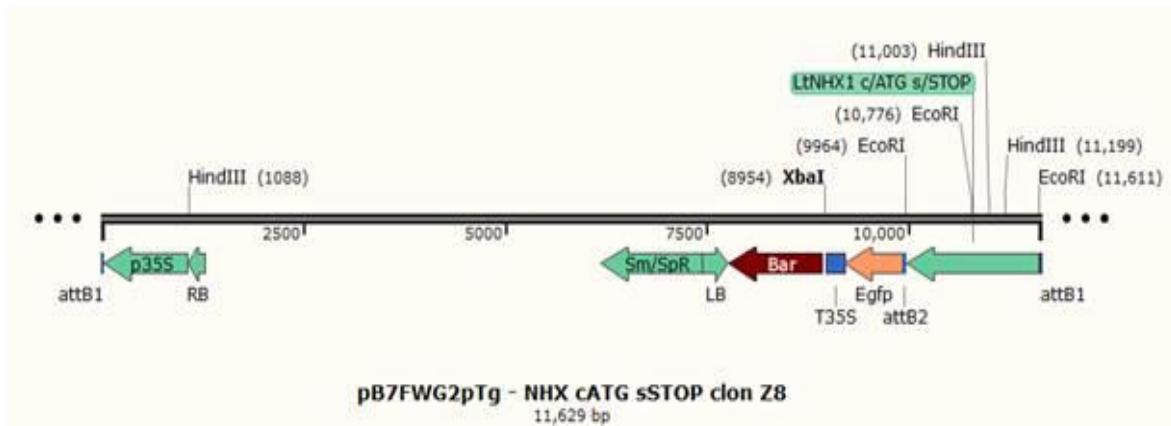


Fig. 1. Esquema representativo del procedimiento y tiempo requerido para cada etapa del protocolo de regeneración/transformación de *L. tenuis*.

Se trabajó con *A. tumefaciens* (strain GV3101 pMP90) contenido el vector binario **p35S:NHX1:GFP**, descripto en la Fig. 2; secuencia del anti-transportador NHX1 tomado de *L. tenuis* bajo el control del promotor constitutivo CaMV35s y la secuencia del gen reportero GFP que codifica para la proteína verde fluorescente y, como marcador selectivo se utilizó el gen *bar* (resistencia al herbicida bialaphos, el cual contiene glufosinato que es inhibidor de la glutamina sintetasa). El vector binario fue construido en el INTA Castelar y cedido gentilmente por la Ing Agr. Agostina Affinito.



(B izq - NOSter - Bar - NOSpro - 35Ster - Egfp - LtNHX1 - p35S - B der)

Fig. 2. Representación esquemática del vector binario (Programa SnapGene Viewer).

Verificación de las plantas transgénicas.

Las plantas resistentes al glufosinato de amonio 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). El material genético fue analizado mediante PCR utilizando oligonucleótidos específicos para el vector binario con los genes NHX R (5'-gtggaccaacatccact - 3') y 35s F (5' - gacgtaaggatgacgcaca - 3'). El análisis de PCR se realizó en un volumen de reacción de 20 µl contenido: 10 ng ADN genómico, 1 µM de cada primer + 1,5 mM MgCl₂, 200 µM dNTPs y 0,5 U de Taq polimerasa (buffer de polimerasa 10 mM Tris-Cl, pH: 9). La amplificación se realizó utilizando 30 ciclos de 94 °C x 1 min, 58 °C x 45 s y 72 °C x 1 min, seguido por 5 min a 72 °C. Los fragmentos amplificados del ADN genómico fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa (1%). Finalmente, las plantas que contenían el gen de interés (“plantas transgénicas”) fueron clonadas mediante el cultivo *in vitro* de segmentos uninodales, en un medio de multiplicación (MS + BA 2,5 µM), y luego enraizadas (pretratamiento con solución acuosa de ácido indolbutírico 100 mg L⁻¹).

Diseño experimental y análisis estadístico

Los experimentos se realizaron en diseños completamente aleatorizados. Se cultivaron 12 explantes por tratamiento, repitiéndose el experimento 3 veces. Los tratamientos fueron distribuidos azarosamente en la cámara de crecimiento. Los resultados fueron expresados por el valor promedio de las repeticiones, incluyéndose su desvío estándar. La tasa de regeneración se expresa como el porcentaje promedio de las hojas que diferenciaron brotes del número total de explantes cultivados. La eficiencia de transformación se expresa como el porcentaje de las plantas que fueron transformadas con respecto al total de plantas obtenidas y verificadas mediante PCR (Aoki *et al.*, 2002).

Objetivo Específico II: Analizar la localización subcelular del gen *LtNHX1* en plantas transformadas mediante la detección del gen reportero GFP (proteína verde fluorescente).

Para la localización subcelular del anti-transportador NHX1 se tomaron muestras de hojas de las líneas transgénicas de *L. tenuis*, para detectar los lugares de fusión de la proteína verde fluorescente (GFP), mediante la detección de imágenes de la GFP con un microscopio invertido confocal Leica SP5 AOBS del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar. Las hojas fueron plasmolizadas con una solución de manitol 0,8 M durante 30 min con el fin de separar y diferenciar la membrana plasmática de la membrana vacuolar. La fluorescencia de GFP forma una imagen utilizando la línea de excitación de 488 nm y la emisión es detectada a 522 nm (Guo *et al.*, 2013).

7. RESULTADOS

Transcurridos 60 días de cultivo, $54 \pm 13\%$ de los explantes tratados con vectores portadores de CaMVs35S:NHX1:GFP brindaron de 2 a 5 yemas adventicias primarias/explante (Fig. 3A). Posteriormente, a los 90 días de cultivo, la presión de selección del glufosinato de amonio se incrementó observándose $44 \pm 5\%$ de regeneración/selección con un promedio de $2,5 \pm 1,5$ yemas adventicias /explante, 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 (Fig. 3A). Las yemas adventicias (37 brotes totales) se aislaron y fueron transferidas a un medio fresco desprovisto de reguladores de crecimiento a fin de estimular su elongación. Seguidamente los brotes resultantes fueron aislados y enraizados, obteniéndose 28 plantas, para la posterior verificación de la transgénesis mediante el uso de la técnica de PCR (Fig. 3B).

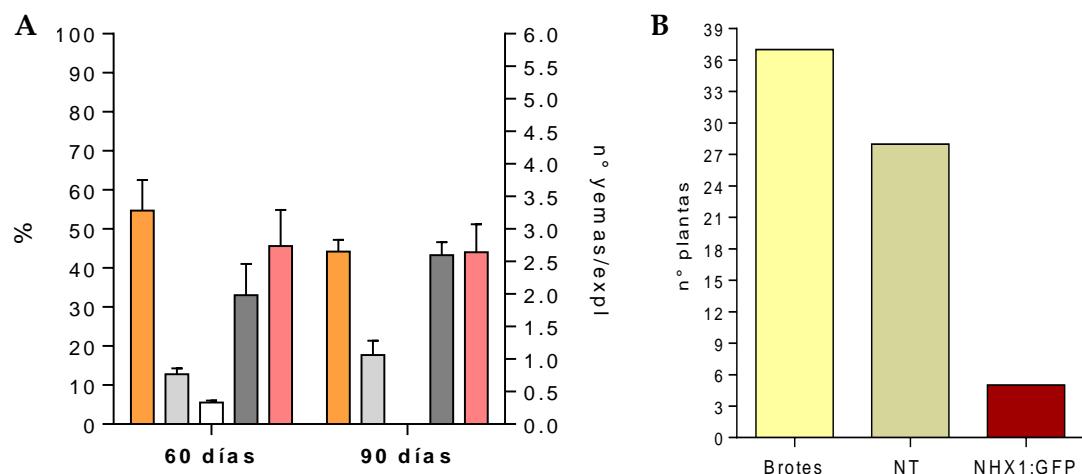


Fig. 3. A: Efecto del medio de regeneración y selección con glufosinato de amonio a los 60 y 90 días luego del inicio del ensayo. % de regeneración/selección de explantes (barras color naranja).% infección (barras color gris claro). % Sin Respuesta (barra color blanco). % formación de callos (barras color gris oscuro). N° yemas por explante (barras color rosado). **B:** Número de brotes totales del ensayo completo, número final de plantas obtenidas luego de 90-120 días del inicio del ensayo (NT) y número de plantas transformadas con la construcción CaMVs35S:NHX1:GFP.

Finalmente, se obtuvieron 5 líneas transgénicas (Fig. 3B) de 36 explantes infectados con CaMV35S:NHX1:GFP, es decir que el 14% de los explantes regenerantes co-cultivados con las bacterias transformadas con la construcción NHX1:GFP brindaron plantas transgénicas portadoras del mencionado gen. La integración del gen fue confirmada a partir de secciones de hojas extraídas de las líneas transgénicas, mediante análisis de PCR, usando un conjunto de cebadores para *gfp*, obteniendo el producto de amplificación de 0,65 kb para las líneas transformadas (Fig. 4). Éstos resultados se corresponden con una eficiencia de transformación de 18% (Aoki *et al.*, 2002).

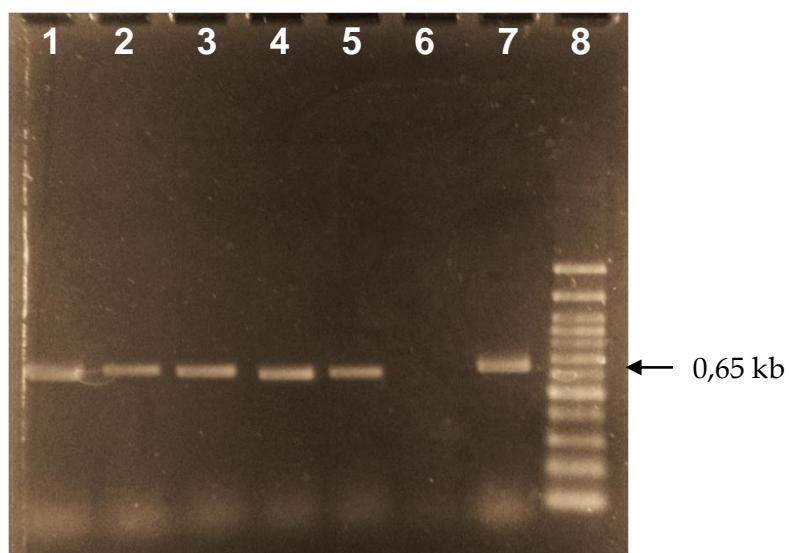


Fig. 4. Análisis de plantas de *L. tenuis* resistentes a glufosinato de amonio. Amplificación de 0.65 kb (PCR) utilizando oligonucleótidos específicos para el gen *gfp*. Líneas 1 a 5: plantas transformadas. Línea 6: planta no transformada. Línea 7: control positivo usando como molde el plásmido p35S:NHX1:GFP. Línea 8: marcador de peso molecular (CienMarker).

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, mediante el cultivo de segmentos uninodales, obteniéndose una tasa de micropropagación de 8 a 10 brotes por explante cultivados y un ulterior enraizamiento (Fig. 5). Este procedimiento permitió el escalado de la producción, con el fin de llevar a cabo la localización subcelular del gen *LtNHX1* mediante la detección del gen reportero GFP.

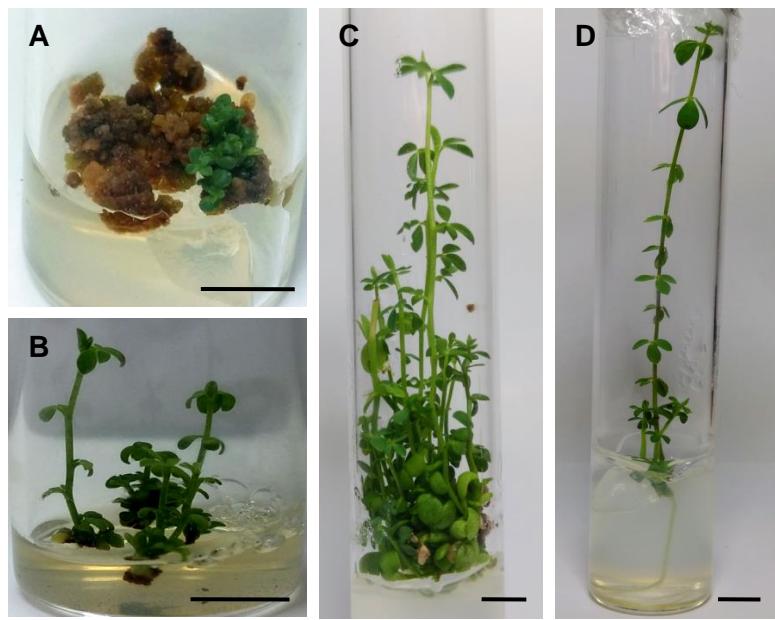


Fig. 5. Transformación genética mediada por *Agrobacterium tumefaciens* y obtención de plantas transgénicas de *Lotus tenuis*. **A:** Organogénesis directa de yemas adventicias a partir de explantes foliares inoculados con el agente vector e incubados en el medio de selección con glufosinato de amonio. **B:** Elongación de las yemas neoformadas resultantes en medios desprovistos de reguladores del crecimiento. **C:** Etapa de multiplicación. **D:** Rizogénesis directa, sin formación de callos. La barra indica 5 mm.

Cuando se expresó LtNHX1:GFP en las hojas se observó fluorescencia en membranas vacuolares y hebras transvacuolares de células epidérmicas deshidratadas (Fig. 6). Las células epidérmicas poseen vacuolas grandes. Además, se observaron estructuras esféricas que podrían ser “bulbs” o IVSP (estructuras esféricas intravacuolares) (Oda *et al.*, 2009; Segami *et al.*, 2014). Estas estructuras se originarían a partir de la adhesión de dos tonoplastos e invaginación, por lo que estarían formadas por una doble membrana vacuolar y su aparición podría deberse a la dimerización de GFP cuando se utiliza para marcar proteínas de dicha membrana (Segami *et al.*, 2014). Tales estructuras estarían confirmando la presencia del anti-transportador Na^+/H^+ , LtNHX1, en las membranas vacuolares. Por lo que probablemente cumpliría la función de la acumulación vacuolar de iones, necesaria para la regulación del volumen de las células y la detoxificación del Na^+ citosólico.

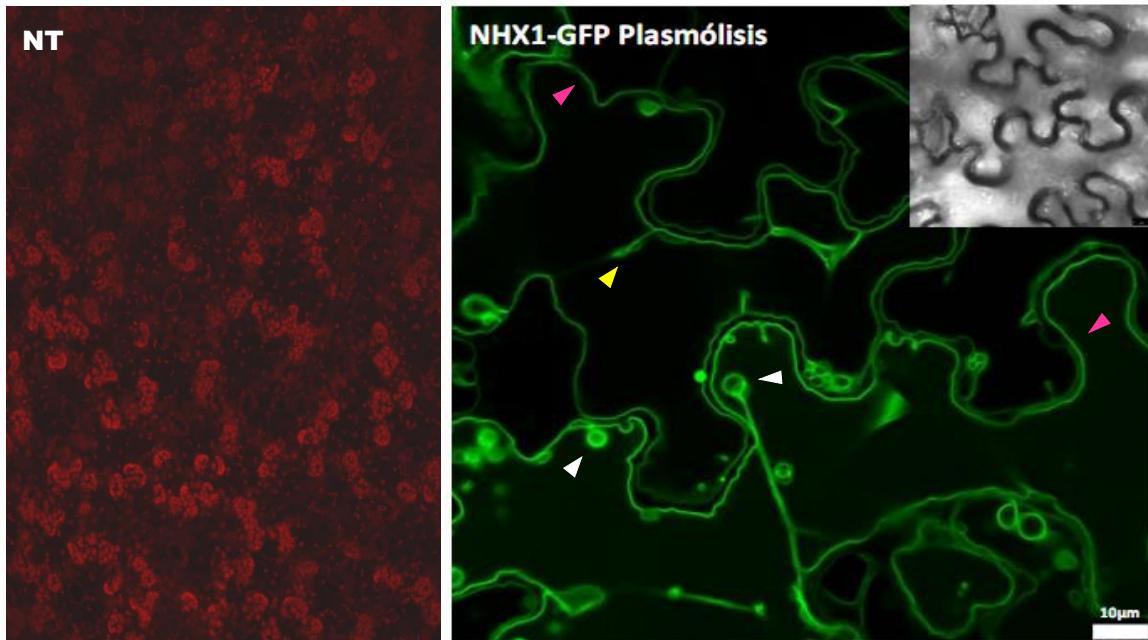


Fig. 6. Tejido foliar visto a través del microscopio invertido confocal Leica SP5 AOBS. Izq.) Células epidérmicas de hojas de *L. tenuis* no transformadas (NT, se distinguen cloroplastos). Der.) Localización de NHX1:GFP en células epidérmicas de hojas de *L. tenuis* transformadas luego de un tratamiento con Manitol 0.8M. Flechas rosadas: regiones en las que el tonoplast rodea organelas. Flecha amarilla: hebra transvacuolar. Flechas blancas: “bulbs”.

8. DISCUSIÓN Y CONCLUSIONES

En el marco del presente trabajo, se obtuvieron plantas transgénicas de *Lotus tenuis* que expresan CaMV35s:NHX1:GFP 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). Cabe destacar el hecho de que la mayoría de los procedimientos de transformación que han sido desarrollados en especies de *Lotus*, mediados por *Agrobacterium tumefaciens*, se basan en la aplicación de un sistema de regeneración indirecta, a través de la proliferación de células indiferenciadas o “callos” provenientes, ya sea de raíces, hipocótilos o cotiledones (Lohar *et al.*, 2001; Aoki *et al.*, 2002; Lombardi *et al.*, 2003) que predisponen a la ocurrencia de variaciones somaclonales u otras alteraciones genotípicas en el material clonado. Las plantas no presentaron diferencias fenotípicas respecto a sus pares no transformadas bajo condiciones óptimas de crecimiento.

Por su parte, la localización subcelular del anti-transportador *LtNHX1*, mediante el uso del gen reportero GFP, permitió localizar a dichas proteínas en las membranas vacuolares. La fluorescencia de la proteína GFP se observa en membranas, bulbs y hebras transvacuolares, las cuales se corresponden con diversas estructuras presentes en el tonoplast que estarían involucradas en diferentes procesos celulares. Las hebras transvacuolares, siempre unidas al citoesqueleto, son túneles

citoplasmáticos dentro de las vacuolas que estarían involucradas en la división celular y transporte de material hacia los meristemas. Los bulbs son estructuras esféricas dentro del lumen vacuolar, que sirven como depósitos de la membrana vacuolar en células jóvenes que permiten una expansión vacuolar mas rápida (Oda *et al.*, 2009). Tal localización confirma la presencia de *LtNHX1* en las vacuolas, sugiriendo que el transportador NHX1 de *L. tenuis* pertenece a la clase I, al igual que el antiporter NHX1 de *Arabidopsis* (Pardo *et al.*, 2006) y el NHX3 del tomate (Rodriguez Rosales *et al.*, 2008). Tales isoformas vacuolares estarían mediando la acumulación de Na⁺ y K⁺ dentro de las vacuolas, contribuyendo de esta manera a la regulación osmótica y a la turgencia celular, condición esencial para la expansión celular y en ciertas funciones fisiológicas relacionadas con el crecimiento y desarrollo de las plantas (Pardo *et al.*, 2006; Rodriguez Rosales *et al.*, 2008).

Perspectivas futuras:

Se prevé incrementar el número de líneas transgénicas con las construcciones CaMV35S:*LtNHX1*, con el objeto de sobreexpresar el gen, y por otro lado se realizará el silenciamiento génico postranscripcional del gen que codifica para NHX1.

A partir del material transgénico se realizarán estudios fisiológicos y bioquímicos a fin de determinar la funcionalidad del transgen.

9. BIBLIOGRAFIA

- Affinito MA, Diaz Paleo A, Andrés A (2015). Expression of the vacuolar Na^+/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&congresos=yes&detalles=yes&congr_id=6066772.
- Aoki T, Kamizawa A, Ayabe S (2002). Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotic selection. *Plant Cell Report* 21: 238-243.
- Apse MP, Blumwald E (2007). Na^+ transport in plants. *FEBS Letter* 581: 2247-54.
- 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.
- Guo CJ, Zhao XL, Liu XM, Zhang LJ, Gu JT, Li XJ, Lu WJ, Xiao K (2013). Function of wheat phosphate transporter gene TaPHT2;1 in Pi translocation and plant growth regulation under replete and limited Pi supply conditions. *Planta* 237: 1163-1178.
- Kronzucker HJ, Britos DT (2011). Sodium transport in plants: a critical review. *New Phytologist* 189: 54-81.
- Lamz Piedra A, Gonzalez Cepero MC (2013). Salinity as a problem in agriculture: plant breeding an immediate solution. *Cultivos Tropicales* 34: 31-42.
- 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.
- Lohar D, Schuller K, Buzas D, Gresshoff P, Stiller J (2001). Transformation of *Lotus japonicus* using the herbicide resistance *bar* gene as a selectable marker. *Journal Experimental Botany* 52: 1697-1702.
- Lombardi P, Ercolano E, El Alaoui H, Chiurazzi M (2003). A new transformation-regeneration procedure in the model legume *Lotus japonicus*: root explants as a source of large numbers of cell susceptible to *Agrobacterium*-mediated transformation. *Plant Cell Report* 21: 771-777.
- 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 Na^+/H^+ antiporter gene in wheat, enhances salt stress tolerance in tobacco by improving related physiological processes. *Plant Physiology and Biochemistry* 76: 17-28.
- Munns R (2002). Comparative physiology of salt and water stress. *Plant, Cell and Environment* 25: 239-250.
- Munns R (2005). Genes and salt tolerance: bringing them together. *New Phytologist* 167: 645-663.
- 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.

- Oda Y, Higaki T, Hasezawa S, Kutsuna N (2009). New insights into plant vacuolar structure and dynamics. *Chapter 3. International Review of Cell and Molecular Biology* 277: 103-35.
- Pardo JM, Cubero B, Leidi EO, Quintero FJ (2006). Alkali cation exchangers: roles in cellular homeostasis and stress tolerance. *Journal of Experimental Botany* 57: 1181-1199.
- Rodríguez-Navarro A, Rubio F (2006). High-affinity potassium and sodium transport systems in plants. *Journal of Experimental Botany* 57: 1149-1160.
- Rodríguez Rosales MP, Jiang X, Gálvez Segovia FJ, Aranda MN, Cubero B, Venema K (2008). Overexpression of the tomato K⁺/H⁺ antiporter *LeNHX2* confers salt tolerance by improving potassium compartmentalization. *New Phytologist* 179: 366-377.
- Sakano K (1998). Revision of biochemical pH-Stat: Involvement of alternative pathway metabolisms. *Plant Cell. Physiology* 39: 467-473.
- Segami S, Makino S, Miyake A, Asaoka M, Maeshima M. (2014), Dynamics of vacuoles and H⁺-pyrophosphatase visualized by monomeric green fluorescent protein in *Arabidopsis*: Artifactual bulbs and native intravacuolar spherical structures. *The Plant Cell* 26: 3416-3434.
- Shimomura O, Johnson F, Saiga Y (1962). Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. *Journal of Cellular and Comparative Physiology* 59: 223-239
- Stewart CN Jr. (2001). The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Reporter* 20: 376-382.
- Taiz L, Zeiger E (2003). Plant physiology. 3^o edition. In: Sinauer Associates Inc. USA. 690 págs.
- Tester M, Davenport R (2003). Na⁺ tolerance and 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 O₂ transport to roots and expression of an NHX1-like gene contribute to regulation of Na⁺ transport. *Physiologia Plantarum* 139: 358-374.
- 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.
- 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 enhanced resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Report* 19: 639-646.
- 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, H.X., Blumwald, E., 2001. Transgenic salt-tolerant tomato plants accumulate salt in foliage but not in fruit. *Nature Biotechnology* 19: 765-768.