

27. Agroalimentos

La expresión de una flavodoxina cianobacteriana en plástidos de tomate incrementa el índice de cosecha y la tolerancia a estrés oxidativo.

Arce, Rocío C.; Mayta, Martín L.; Pagani, Constanza E.; Zurbriggen, Matías D.; Valle, Estela M.; Zanol, María I.; Carrillo, Néstor

arce@ibr-conicet.gov.ar; carrillo@ibr-conicet.gov.ar

Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas

Universidad Nacional de Rosario

Resumen

En un futuro no lejano, la humanidad deberá afrontar el aumento de la población junto al límite de la tierra cultivable, el estrés ambiental y el cambio climático, del cual ya somos parte. La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) estima que, para abastecer a la población mundial estimada en el año 2050, la producción de alimentos deberá crecer en torno a un 70%. Esta alta demanda exige el avance en la investigación de nuevas tecnologías que incrementen el índice de cosecha de los cultivos. En particular, el tomate (*Solanum lycopersicum*) es un fruto muy consumido a nivel mundial. Su importancia radica en su alto contenido de vitaminas al igual que antioxidantes.

Debido a esto, en este proyecto nos propusimos generar plantas de tomate transgénicas que sobre-expresen la proteína cianobacteriana flavodoxina (Fld), y evaluar si éstas manifiestan mejoras agrícolas y tolerancia frente a estrés oxidativo, tal como fue demostrado en tabaco.

Los resultados obtenidos demostraron una mejora en el índice de cosecha del cultivo. Las plantas que expresan Fld en cloroplastos tienen una menor expansión foliar, mayor cantidad de frutos, aunque de menor tamaño en comparación con la línea salvaje. Además, estas plantas demostraron una tolerancia aumentada frente a estrés oxidativo. Estos resultados generan interés en el estudio de la expresión de Fld en el desarrollo del fruto y cómo esta proteína afecta la expansión celular.

Palabras clave: *Solanum* - Cloroplasto - Flavodoxina - Fruto - Rendimiento - Estrés

1. Introducción

Los rendimientos actuales de los cultivos no podrán satisfacer las futuras demandas de alimentos, forraje y combustible. Sumado a esta problemática, el futuro enfrenta un alto crecimiento de la población, el cambio climático, la tierra cultivable limitada y una biosfera frágil. Por lo tanto, existe una necesidad urgente de desarrollar enfoques innovadores para acelerar la mejora de los cultivos y hacer que sus resultados sean más predecibles, revolucionando la productividad agrícola (Council for Agricultural Science and Technology (CAST), 2017).

Estudios realizados sobre los 8 cultivos más importantes a escala planetaria, comparando los rendimientos promedio con los rendimientos máximos registrados históricamente (obtenidos bajo condiciones óptimas de crecimiento), muestran que el rendimiento promedio es apenas 20-40% del rendimiento máximo (Buchanan et al, 2000), indicando que existe amplio margen para incrementar la producción de alimentos sin aumentar la superficie cultivada. Esta es una cuestión estratégica en nuestro país, y el presente proyecto se inserta en ese contexto.

Para hacer frente a tales situaciones hostiles, las plantas han desarrollado a lo largo de la evolución mecanismos de tolerancia constitutivos e inducibles. Estas

respuestas implican la expresión, regulada en tiempo y espacio, de un gran número de genes. Estudios de escala genómica permitieron identificar numerosos componentes de la respuesta, así como la naturaleza global de ésta (Vinocur and Altman, 2005). Cada estrés genera una respuesta única, pero todas se organizan a la manera de una cascada génica, con etapas ordenadas de modo jerárquico en procesos que van desde la detección del estrés, transmisión de señales y regulación transcripcional hasta la expresión de genes efectores. Esta complejidad ha hecho que si bien muchos genes vinculados a la tolerancia han sido descubiertos, sólo unos pocos han sido evaluados a campo, y con resultados variables (Krishna, 2010).

Los microorganismos fotosintéticos de los que las plantas derivan (algas y cianobacterias) enfrentan desafíos equivalentes en sus correspondientes hábitats. Sin embargo, sus respuestas difieren sustancialmente: son unigénicas, rápidas, e incluyen la sustitución de blancos sensibles al estrés por alternativas isofuncionales y resistentes. Esta estrategia permite restablecer las vías productivas perturbadas por el estrés, y en particular el balance redox del proceso fotosintético, el cual ha sido identificado como un punto de intervención clave que afecta de manera decisiva la viabilidad del organismo estresado. Aunque muchos de

estos genes y sus correspondientes productos han desaparecido de las plantas (Pierella y col.; 2015), hemos demostrado que la introducción de una flavodoxina (Fld) cianobacteriana en cloroplastos resulta en la generación de plantas transgénicas con tolerancia aumentada a múltiples fuentes de estrés ambiental, por mecanismos muy semejantes a los que tienen lugar en los microorganismos originarios (Tognetti y col., 2002, 2006; Zurbriggen y col., 2008). Esta observación no solo abre una perspectiva tecnológica completamente nueva para el desarrollo de cultivos tolerantes a estrés, sino que representa una herramienta biológica muy potente para investigar el rol jugado por el metabolismo redox plastídico en procesos biológicos como morfogénesis, senescencia, estrés biótico y nutrición (Pierella y col., 2015; Lodeyro y col., 2012).

El tomate es una dicotiledónea herbácea, anual, perteneciente a la familia *Solanaceae*, relacionada con la papa, tabaco, pimiento y berenjena. Se cultiva en todo el mundo por su fruto comestible que posee escaso contenido calórico, pero es rico en vitaminas y carotenoides, principalmente licopeno, de reconocidas propiedades antioxidantes que protegen al aparato gástrico y epitelial. Se han seleccionado por el hombre cultivares que producen frutos de distintas características y con desarrollo optimizado para distintas

condiciones de crecimiento. Posee gran importancia económica y se comercializa para el consumo humano como tomate fresco o procesado en diversas variantes (Gebhardt y Thomas, 2002; Kosco, 2007; Peralta y Spooner, 2007).

2. Objetivos

- Evaluar el crecimiento y desarrollo de plantas de tomate (*Solanum lycopersicum* L. cv *Money Maker*) que acumulan Fld en plástidos (líneas *Slpfld*) y en citosol (líneas *Slcfld*) y de líneas salvajes (WT) en condiciones control y ante estrés oxidativo.
- Realizar un estudio fenotípico, fisiológico y bioquímico de las distintas líneas transgénicas.
- Analizar el rendimiento en condiciones control.

3. Materiales y Métodos

3.1. Material vegetal

Las plantas de tomate fueron transformadas con el gen de Fld de *Anabaena* PCC7119 en el laboratorio del Dr. Mohammad-Reza Hajirezaei (Leibniz-Institut für Pflanzengenetik und Kulturpflanzenforschung, IPK Gatersleben, Alemania). Se utilizaron los protocolos descritos en Rocha-Sosa y col. (1989). Se verificó la transformación de las plantas por

medio de reacciones de PCR. Las plántulas regenerantes primarias fueron trasplantadas a tierra para su crecimiento. Se efectuaron 2 rondas sucesivas de autofecundación y selección de segregantes. Se obtuvieron finalmente distintas líneas transgénicas homocigotas para el carácter introducido, que acumulan Fld en plástidos (líneas *Slpfd*) y citosol (líneas *Slcfd*).

3.2. Condiciones de crecimiento de plantas

Las plantas fueron crecidas en cámara de cultivo a una intensidad lumínica de 200 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ y un fotoperíodo de 16/8 h de luz/oscuridad. La temperatura fue regulada en 28/23 °C y la humedad relativa ambiental se mantuvo entre 40 % y 90 % durante el ciclo luz/oscuridad. El riego fue realizado con agua día por medio.

3.3. Detección de proteínas

Se realizó un análisis de extractos proteicos a partir de aproximadamente 100 mg de tejido foliar mediante la separación de proteínas solubles por electroforesis en gel de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes reductoras (SDS-PAGE) y transferencia e inmunodetección de proteínas en membranas de nitrocelulosa (Western blot) utilizando anticuerpos específicos contra la proteína Fld.

3.4. Determinación de pigmentos fotosintéticos

La determinación espectrofotométrica de clorofila *a* y *b*, y de carotenoides fue realizada de acuerdo con Lichtenthaler (1987) mediante extracción etanólica de discos foliares de cotiledones hasta su blanqueamiento total. Posteriormente se midió absorbancia en el extracto a 470, 648 y 664 nm. Se estimó el contenido de clorofila *a* y *b* y de carotenoides totales. Además, se realizó una medición de clorofila relativa al tejido foliar mediante la utilización de un MultispeQ conectado a la plataforma del equipo Photosynq.

3.5. Análisis microscópico de tejidos foliares

Se realizó la estimación del número y tamaño de células en hojas completamente expandidas del cuarto tallo secundario de plantas de 30 días de crecimiento después de su germinación. Se fijó y decoloró el tejido en 100 % (v/v) etanol. Luego se clarificó mediante el agregado de ácido láctico. El tamaño celular se midió usando el programa para análisis de imágenes Image-Pro Plus a partir de fotografías tomadas usando una lupa estereoscópica con aumento 115X acoplada a una cámara digital. Se contaron al menos 100 células de cuatro campos distintos de cada hoja.

3.6. Estrés oxidativo inducido por exposición al agente redox cíclico metilviológeno (MV)

El MV es un herbicida redox cíclico utilizado para generar EROs en los cloroplastos de plantas iluminadas (Rodríguez y col., 2007). Se desarrolló un protocolo que consistió en sumergir hojas en una solución de MV y 0,1 % (v/v) Tween-20 por un período de tiempo determinado y luego incubar a la planta bajo condiciones de iluminación para producir el estrés oxidativo.

3.7. Análisis de frutos

Las plantas fueron cosechadas a medida que el fruto se presentaba rojo y maduro hasta cumplidos los cuatro meses desde la fecha de siembra donde se procedió a la cosecha total. Se analizó la cantidad de frutos cosechados por línea, tamaño y rendimiento en condiciones control.

3.8. Análisis estadístico

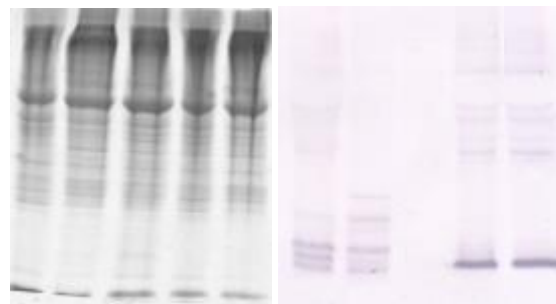
La significancia estadística de los datos experimentales se determinó, cuando fue posible, mediante el análisis de la variancia (ANOVA). Cuando no fue posible utilizar ANOVA por incumplimiento de los supuestos, se utilizó el análisis de la variancia no paramétrica de Kruskal-Wallis seguido del test de comparaciones múltiples de Tukey. En todos los ensayos las diferencias fueron consideradas

significativas a un nivel de probabilidad $p < 0,05$ o $p \leq 0,05$. Se empleó el software SigmaPlot 11.0 (Jandel Scientific).

4. Resultados y Discusión

Una vez obtenidas las líneas homocigotas de tomate, éstas fueron germinadas y crecidas en cámara de cultivo. Se procedió a extraer muestra de plantas de cuatro semanas y se realizó la extracción de proteínas solubles en hoja. Además, se detectó la expresión de la proteína Fld mediante ensayos de Western blot (Fig. 1).

Fig. 1: Expresión de Fld en plantas



transgénicas de tomate. Extractos solubles de tejido foliar de las líneas *Slpfd8-1*, *Slpfd60-4*, *WT*, *Slcfd10-5* y *Slcfd9-33* (orden de siembra de izquierda a derecha) fueron resueltos por SDS-PAGE en geles al 15 % (p/v) revelados para proteínas (izquierda) o western blot con anticuerpos contra Fld (derecha).

Se realizó la determinación de pigmentos en cotiledones y tejido foliar. Puede observarse que las líneas *Slpfd* presentan un mayor contenido de clorofila en comparación con las demás líneas (Fig. 2 y 3).

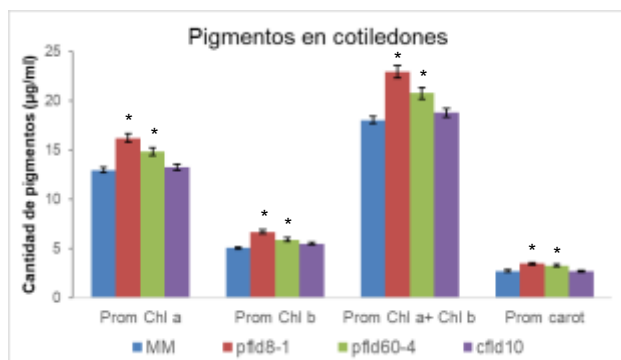


Fig. 2: Pigmentos en cotiledones. Se utilizaron entre 5-6 muestras biológicas \pm EE. Los asteriscos señalan diferencias significativas de las líneas respecto a la WT (Tukey, $\alpha = 0,05$; $p > 0,05$).

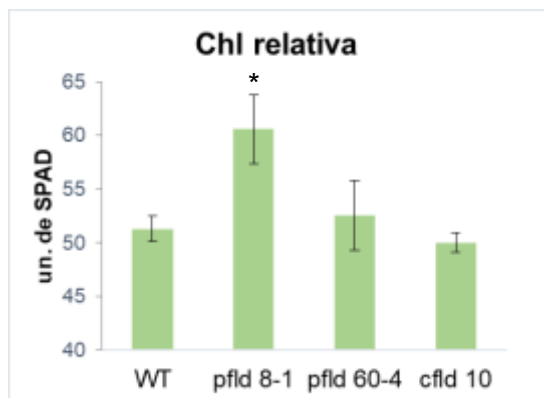


Fig. 3: Clorofila total relativa. Se utilizaron de 5-6 muestras biológicas \pm EE. El asterisco señala diferencias significativas de la línea respecto a la WT (Tukey, $\alpha = 0,05$; $p > 0,05$).

Además, se realizó una caracterización fenotípica de las distintas líneas. Se observó que las plantas *pflid* eran más pequeñas (Fig. 4), sugiriendo que la expresión de Fld en cloroplastos tendría algún efecto sobre el desarrollo de la planta y en particular, en las hojas.

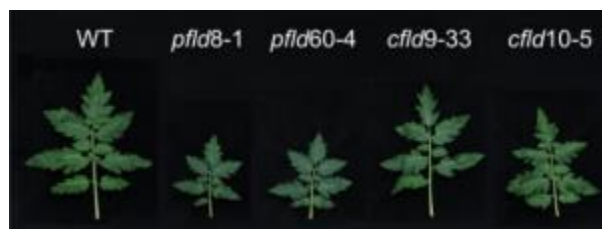


Fig. 4: Hojas del cuarto tallo secundario pertenecientes a plantas crecidas durante 4 semanas, cuyo tamaño corresponde al promedio para cada línea.

Cuando se analizaron las hojas a nivel microscópico, se pudo observar que las células de las plantas *pflid* son de menor tamaño (Fig. 5) y esto ocurre tanto en el parénquima en empalizada como en la epidermis (datos no mostrados).

Dado que un menor tamaño de células puede indicar un defecto en la proliferación o en la expansión se procedió a estimar el número de células en las hojas (Fig. 6). Dicho análisis mostró que éste no varía significativamente, por lo que se trata de una inhibición en la expansión celular, resultando así en un área total foliar menor en las líneas *pflid* (Fig. 7).

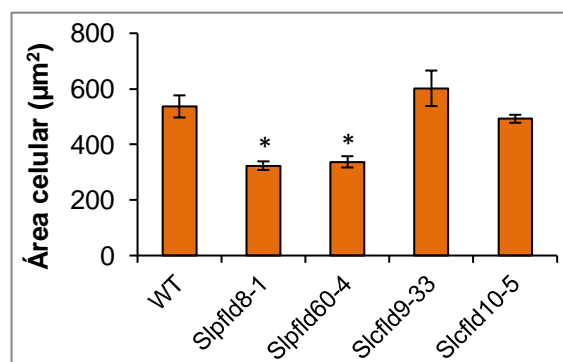


Fig. 5: Estimación del área celular. Se utilizaron de 3-9 muestras biológicas \pm EE. Los asteriscos señalan diferencias significativas de las líneas respecto a la WT (Tukey, $\alpha = 0,05$; $p > 0,05$).

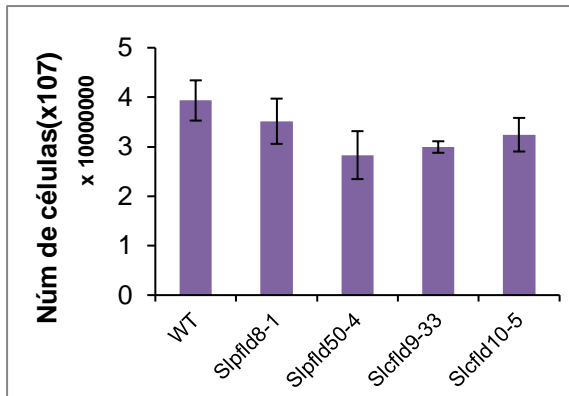


Fig. 6: Estimación del número de células en hoja. Se utilizaron de 3-9 muestras biológicas \pm EE. No se encontraron diferencias significativas.

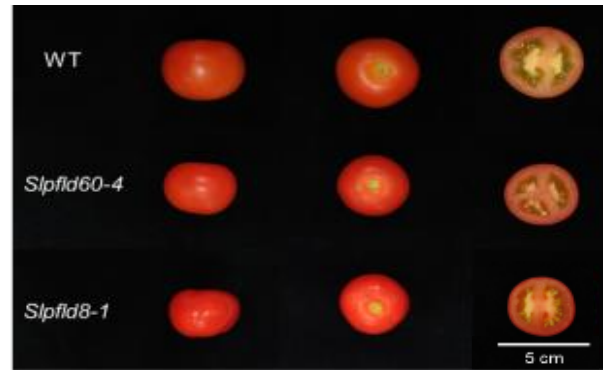


Fig. 8: Frutos rojos maduros. Frutos de tamaño cercano al promedio de los cosechados de cada línea.

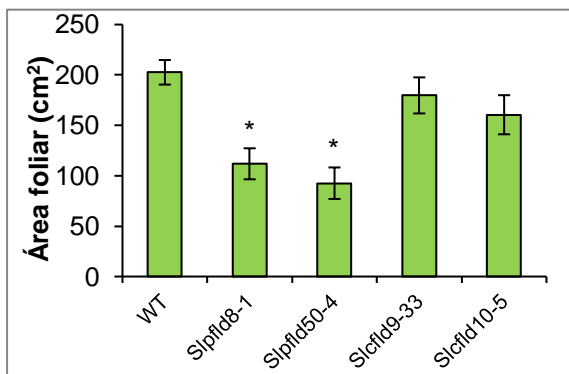


Fig. 7: Estimación del área foliar. Se utilizaron de 3-9 muestras biológicas \pm EE. Los asteriscos señalan diferencias significativas de las líneas respecto a la WT (Tukey, $\alpha = 0,05$; $p > 0,05$).

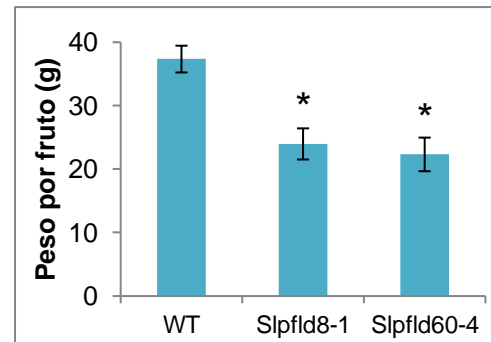


Fig. 9: Peso por fruto. Los datos son promedios de todos los tomates cosechados de 6-10 réplicas biológicas \pm EE. Los asteriscos señalan diferencias significativas de las líneas respecto a la WT (Tukey, $\alpha = 0,05$; $p > 0,05$).

Las plantas fueron cosechadas manualmente a medida que los frutos se presentaban rojos y maduros hasta 4 meses desde la fecha de siembra donde se procedió a la cosecha total. Se realizó el registro del tamaño y peso promedio de cada fruto (Fig. 8 y 9), el número total de frutos cosechados (Fig. 10), la suma del peso de los mismo (Fig. 11) y el peso fresco de la parte aérea de la planta una vez finalizada la cosecha (Fig. 12).

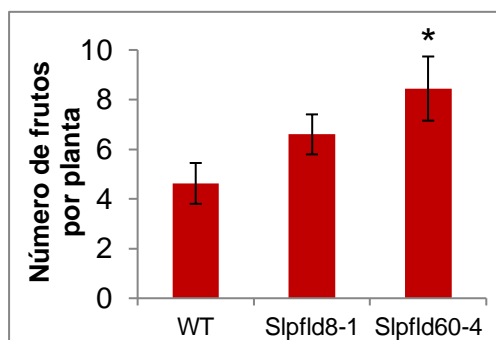


Fig. 10: Número de frutos por planta. Los datos son promedios de todos los frutos cosechados de 8-10 réplicas biológicas \pm EE. El asterisco señala diferencias significativas de la línea respecto a la WT (Tukey, $\alpha = 0,05$; $p > 0,05$).

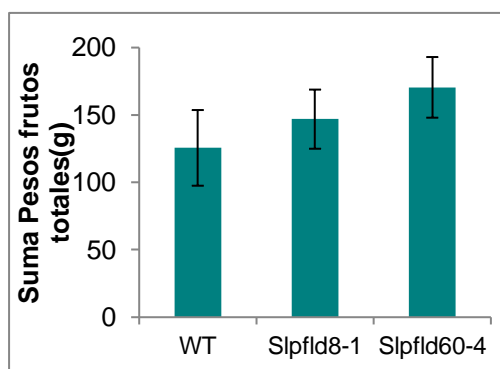


Fig. 11: Peso frutal total por planta. Los datos son promedios de todas las plantas y frutos cosechados de 8-10 réplicas biológicas \pm EE. No se encontraron diferencias significativas de las líneas respecto a la WT.

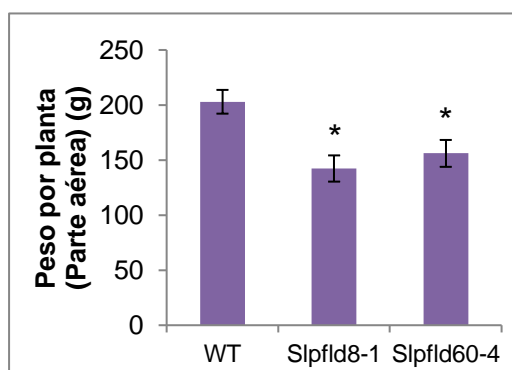
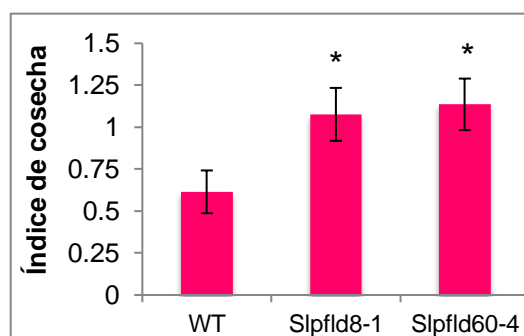


Fig. 12: Peso total de la parte aérea. Los datos son promedios de todas las plantas y frutos cosechados (8-10 réplicas biológicas) \pm EE. Los asteriscos señalan diferencias significativas de las líneas respecto a la WT (Tukey, $\alpha = 0,05$; $p > 0,05$).

Si bien las líneas transgénicas generan frutos de menor tamaño en comparación a la WT, producen una mayor cantidad. Al mismo tiempo, las plantas de las líneas *pflid* son más pequeñas, por lo cual el cálculo del índice de cosecha (suma de frutos cosechados/peso de la planta) resulta mayor en las líneas *pflid* (Fig. 13).

Fig. 13: Índice de cosecha. Los datos son



promedios de todas las plantas y frutos cosechados (8-9 réplicas biológicas) \pm EE. Los asteriscos señalan diferencias significativas de las líneas respecto a la WT (Tukey, $\alpha = 0,05$; $p > 0,05$).

Además de estos ensayos, se evaluó la tolerancia relativa de las distintas líneas transgénicas homocigotas frente al estrés oxidativo, mediante la utilización de MV (Fig. 14). Se utilizaron hojas completamente expandidas de plantas de 6 semanas que fueron sumergidas por 1 min en 100 μ M MV y expuestas a alta radiación lumínica durante 19 horas. Puede observarse que mientras la línea WT presenta un grado de lesión considerable, las líneas *Slpflid8-1* y *Slpflid60-4* se observan más saludables.



Fig. 14: Plantas transgénicas de tomate frente al estrés oxidativo. Tallos de líneas *pfl8-1* y *pfl60-4* y WT que fueron incubadas con MV y luego expuestas a una fuerte intensidad lumínica.

5. Conclusiones

La incorporación de Fld a plantas de tomate genera un resultado beneficioso en cuanto al rendimiento agronómico del cultivo, lo cual resulta en un atractivo biotecnológico.

Las plantas de tomate *pfl8-1* y *pfl60-4* presentan un menor tamaño que las plantas WT y *cfd* crecidas en las mismas condiciones, demostrado por un menor crecimiento foliar a cuatro semanas desde la fecha de siembra (Fig. 3) y menor peso de la parte aérea de la planta posterior a la fecha de cosecha (Fig. 12). Esto ha sido observado en otras especies como *Agrostis stolonifera* L. (una pastura usada como forrajera), *Arabidopsis thaliana* y *Nicotiana tabacum*, donde Fld también afecta el desarrollo foliar y produce hojas más pequeñas, por lo cual parece ser un efecto intrínseco de la expresión ectópica de esta proteína (Li y col., 2016; Mayta, 2017; Su y col., 2018).

Además, las plantas de tomate generaron un mayor número de frutos, aunque los mismos son más pequeños en comparación con la WT. Se ha demostrado que la biogénesis de cloroplastos está relacionada con el desarrollo del fruto donde los cloroplastos se convierten en cromoplastos durante la maduración, acumulando altas cantidades de compuestos antioxidantes liposolubles, como licopeno y β -caroteno que protegen el cromoplasto y a las células frutales (Cocaliadis y col., 2014). Existen muchos aspectos pendientes acerca de los mecanismos relacionados a este proceso que nos planteamos como futuras perspectivas de estudio. Además, el mayor índice de cosecha en plantas *pfl8-1* y *pfl60-4* genera una cuestión a dilucidar, en cuanto a establecer la relación de la expresión de Fld con el desarrollo y maduración del fruto.

6. Bibliografía

- Buchanan, B.B., Gruissem, W., Jones, L. (2000) Biochemistry and Molecular Biology of Plants (Rockville, MD, USA: ASP).
- Cocaliadis, M.M; Fernández-Muñoz, R.; Pons, C.; Orzaez, D. and Granell, A. (2014) Increasing tomato fruit quality by enhancing fruit chloroplast function. A double-edged sword? J Exp Bot. 65; 4589-98.
- Council for Agricultural Science and Technology (CAST). 2017. Plant Breeding

and Genetics—A paper in the series on The Need for Agricultural Innovation to Sustainably Feed the World by 2050. Issue Paper 57. CAST, Ames, Iowa.

- Gebhardt S. and Thomas R. (2002) Nutritive value of foods. Home and Garden Bulletin Vol 72: Nutrient Data Laboratory, Agricultural Research Service, Beltsville, Maryland, United States Department of Agriculture (USDA).

- Kosco S. (2007) Tomatoes and tomato products. In World Markets and Trade: Tomatoes. Office of Global Analysis, Foreign Agricultural Service, United States Department of Agriculture, USDA.

- Krishna, P.J. (2010) *ISB News Reports* (Vicksburg, VA), 04-10, pp. 4-6.

- Li Z., Yuan S., Jia H., Gao F., Zhou M., Yuan N., Wu P., Hu Q., Sun D., Luo H. (2017) Ectopic expression of a cyanobacterial flavodoxin in creeping bentgrass impacts plant development and confers broad abiotic stress tolerance. *Plant Biotechnol J* 15, 433-446.

- Lichtenthaler H.K. (1987) Chlorophylls and carotenoids - pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* 148, 350-382.

- Lodeyro, A., Ceccoli, R., Pierella, J., Carrillo, N. (2012) The importance of flavodoxin for environmental stress tolerance in photosynthetic microorganisms and transgenic plants.

Mechanism, evolution and biotechnological potential. *FEBS Lett.* 586, 2917-2924.

- Mayta M. L. (2017) Evaluación del rol de las especies reactivas de oxígeno y de nitrógeno durante el crecimiento y la respuesta a estrés utilizando plantas transgénicas. Tesis Doctoral. Facultad de Ciencias Bioquímicas y Farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario, Argentina, pp. 60-65.

- Peralta I.E. y Spooner D.M. (2007) History, origin and early cultivation of tomato (*Solanaceae*). Genetic Improvement of Solanaceous Crops. (Razdan M.K. y Mattoo A.K. eds). Science Publishers, Enfield, USA, pp. 1-27.

- Pierella, J., Ceccoli, R., Graña, M., Romero, H., Carrillo, N. (2015) Environmental Selection Pressures Related to Iron Utilization Are Involved in the Loss of the Flavodoxin Gene from the Plant Genome. *Genome Biol. Evol.* 7, 750-767.

- Su J, Yang L, Zhu Q, Wu H, He Y, Liu Y, y col. (2018) Active photosynthetic inhibition mediated by MPK3/MPK6 is critical to effector-triggered immunity. *PLoS Biol* 16, e200412.

- Rocha-Sosa M., Sonnewald U., Frommer W., Stratmann M., Schell J. y Willmitzer L. (1989) Both developmental and metabolic signals activate the promoter of a class I patatin gene. *EMBO J* 8, 23-29.

- Rodríguez R.E., Lodeyro A., Poli H.O., Zurbriggen M., Peisker M., Palatnik J.F., Tognetti V.B., Tschiersch H., Hajirezaei M.R., Valle E.M. y Carrillo N. (2007) Transgenic tobacco plants overexpressing chloroplastic ferredoxinNADP(H) reductase display normal rates of photosynthesis and increased tolerance to oxidative stress. *Plant Physiol* 143, 639-649.
- Tognetti, V., Palatnik, J., Fillat, M., Valle, E., Carrillo, N. (2002) EU patent No 02801941.2-2405-GB0204612.
- Tognetti, V.B., Palatnik, J.F., Fillat, M.F., Melzer, M., Hajirezaei, M-R., Valle, E.M., Carrillo N. (2006) Functional Replacement of Ferredoxin by a Cyanobacterial Flavodoxin in Tobacco Confers Broad-Range Stress Tolerance. *Plant Cell*, 18, 2035-2050.
- Vinocur, B., Altman, A. (2005) Recent Advances in Engineering Plant Tolerance to Abiotic Stress: Achievements and Limitations. *Curr. Op. Biotech.* 16, 123-132.
- Zurbriggen, M., Tognetti, V.B., Fillat, M.F., Hajirezaei, M-R., Valle, E.M., Carrillo N. (2008) Combating stress with flavodoxin: a promising route for crop improvement. *Trends Biotechnol.* 26; 531-538.

7. Agradecimientos

Al laboratorio del Dr. Mohammad-Reza Hajirezaei (Leibniz-Institut für

Pflanzen-genetik und Kulturpflanzenforschung, IPK Gatersleben, Alemania).

8. Financiamiento

Subsidio PICT 2015-3828. ANPCyT. "Desarrollo de plantas transgénicas con tolerancia aumentada a estrés ambiental por expresión de proteínas de flavina-dihierrocianobacterianas en cloroplastos". Director: Dr. Néstor Carrillo.