

**Transformación vegetal con genes
de la biosíntesis de poliaminas regulados
por un promotor inducible por estrés.
Su potencial aplicación biotecnológica
a variedades nacionales de arroz**

**Vegetal transformation with genes from the
biosynthesis of polyamines regulated by a stress-
induced promoter; its potential biotechnical
application to Colombian varieties of rice**

*Analía Alet¹, Alejandro Chaves², Vanina Fracaroli³, Diego Sánchez⁴,
Oscar A. Ruiz⁵ y Santiago Maiale⁶*

Recibido: mayo 9 de 2008

Aprobado: mayo 21 de 2008

El origen: *las poliaminas*

Las poliaminas están ampliamente distribuidas en todos los organismos y existen numerosas evidencias que las relacionan con un gran número de procesos biológicos esenciales (Galston y Sawhney, 1990; Slocum y Flores, 1991). Se ha visto que las poliaminas más comunes: putrescina, espermidina y espermina, regulan “finamente”

1 Licenciada en Biotecnología. Becaria de la Comisión de Investigaciones Científicas del Gobierno de la Provincia de Buenos Aires. IIB-INTECH, Chascomús, Buenos Aires, Argentina. analia_alet@intech.gov.ar.

2 Estudiante de Genética. IIB-INTECH, Chascomús, Buenos Aires, Argentina. janote358@hotmail.com

3 Licenciada en Química. IIB-INTECH, Chascomús, Buenos Aires, Argentina. vfracaroli@yahoo.com.ar

4 Dr. MPIMP, Golm, Alemania. sanchez@mpimp-golm.mpg.de

5 Dr. IIB-INTECH, Chascomús, Buenos Aires, Argentina. ruiz@intech.gov.ar

6 Ingeniero Agrónomo. Dr. IIB-INTECH, Chascomús, Buenos Aires, Argentina; PMGA FCAYF UNLP. smaiale@intech.gov.ar



la síntesis de proteínas y de ARN (Tabor y Tabor, 1985), que poseen un rol en el inicio y el control de la división celular (Serafini-Fracassini, 1991), y que afectan los patrones de la diferenciación celular y la morfogénesis en plantas (Smith, 1985; Evans y Malmberg, 1989; Galston y Flores, 1991). De particular interés es su capacidad de “secuestrar” radicales libres (Cohen, 1998; Flores, 1991), de modular la apertura estomática (Liu et al., 2000) y su potencial rol como osmolito compatible (Nuccio *et al.*, 1999). Con excepción de *Arabidopsis thaliana*, en plantas, la putrescina es el producto de la actividad de dos enzimas, la ornitina descarboxilasa (ODC; EC 4.1.1.17) y la arginina descarboxilasa (ADC; EC 4.1.1.19). Esta diamina es, a su vez, la precursora de las poliaminas “superiores” (espermidina y espermina), las cuales constituyen el producto de dos enzimas denominadas espermidina y espermina sintasas, respectivamente (Spd Syn; EC 2.5.1.16 y Spm Syn; EC 2.5.1.22). Cabe destacar que la enzima ADC es clave en la biosíntesis de estas poliaminas bajo condiciones de estrés (Ruiz *et al.*, 2000).

A pesar de estudios intensivos, el rol de las poliaminas en la fisiología de las plantas aún no está claro (Galston y Sawhney, 1990; Slocum y Flores, 1991; Tiburcio *et al.*, 1997). Si bien los cambios más dramáticos en poliaminas en estrés abiótico moderado han sido un significativo incremento en los niveles de putrescina (Galston y Sawhney, 1990; Flores 1991), todas las poliaminas poseerían distintos roles fisiológicos en la respuesta de las plantas a estas condiciones (Boucherau *et al.*, 1999). Al respecto, recientemente se ha demostrado que la acumulación de poliaminas superiores está relacionada con el estrés salino prolongado (Maiale et ál., 2004; Sánchez *et al.*, 2005). Por su parte, los estreses que conducen a un incremento en el título de putrescina incluyen deficiencia de K⁺, nutrición por amonio, exposición a pH bajos, estrés osmótico, toxicidad por Cd y SO₂, anaerobiosis, radiación UV-B (Galston y Sawhney, 1990; Flores, 1991), tratamiento con atrazina (Zheleva *et al.*, 1994), estrés por ozono (Langebartels *et al.*, 1991), e infección por patógenos (Torrighiani *et al.*, 1997).

La problemática de los promotores

El clonado de los genes implicados en la biosíntesis de las poliaminas ha permitido la obtención de plantas transgénicas en diferentes especies vegetales, como el tabaco y la papa, demostrando que es posible la manipulación genética de su metabolismo. Existe un gran número de publicaciones y revisiones que indican el éxito de esta estrategia (Malmberg *et al.*, 1998; Kumar *et al.*, 1997; Galston *et al.*, 1997). Sin embargo, en el caso de plantas donde el gen utilizado se encuentra bajo el control de un promotor constitutivo (CaMV35S), con frecuencia se han reportado alteraciones fenotípicas relacionadas con cambios en los niveles de poliaminas; ejemplos al respecto constituyen la clorosis, la necrosis y la inhibición del crecimiento en plantas de tabaco transformadas con la ADC de avena (Masgrau *et al.*, 1997). Debido a su gran interés, tanto en aplicaciones biotecnológicas y terapéuticas como en investigación básica de fisiología vegetal, se están desarrollando diversos sistemas de expresión génica inducible. Una de las características más importantes que deben poseer los sistemas de control de la expresión génica en plantas transgénicas es la necesidad de que el agente utilizado para la regulación de la expresión de un promotor quimérico no tenga efectos pleiotrópicos sobre otros genes endógenos de las plantas tratadas (Gatz, 1997). Un ejemplo de este tipo de sistema de control de la expresión génica en plantas transgénicas es el sistema TetR-represor (Gatz y Quail, 1988). Al respecto, nuestro

grupo entiende que en las investigaciones o potenciales aplicaciones biotecnológicas que impliquen una respuesta o adaptación al estrés se requiere preferentemente hacer uso de un tipo de promotor más específico que se induzca sólo bajo estas condiciones. Al respecto, es conocido que el gen RD29A responde en forma paradigmática a diferentes condiciones de estrés, aunque su función fisiológica aún no es totalmente conocida. El promotor RD29A presenta al menos dos tipos de elementos reguladores cis. Uno de ellos, denominado DRE, se activa en la respuesta rápida de RD29A a estrés por bajas temperaturas, deshidratación, y alta concentración de sal por medio de vías ácido abscísico-independiente (ABA-independiente), y otro denominado ABRE (ABA Responding Element), el cual responde a vías de señalización ABA-dependiente. Este último se encuentra involucrado en la segunda inducción (más tardía) de RD29A luego de la acumulación de ABA bajo deshidratación y altas concentraciones de sal. Sin embargo, la interacción entre las vías de señalización ABA-independiente y ABA-dependiente es necesaria para obtener la respuesta de RD29A a ABA endógeno (Narusaka *et al.*, 2003).

Trabajo previo referente a este proyecto

En nuestro laboratorio hemos desarrollado plantas transgénicas de *A. thaliana* con el promotor inducible por estrés conocido como RD29A. En un paso previo se obtuvieron vectores binarios en los cuales se colocó bajo control de este promotor el gen reportero GUS (RD29A-gus) o el gen que codifica para la arginina descarboxilasa de avena (RD29A-oat ADC).

Las líneas transgénicas RD29A-oat ADC seleccionadas no presentaron fenotipos tóxicos pero sí actividad arginina descarboxilasa inducible por ABA, frío y estrés salino, correlacionado con la acumulación inducible de putrescina. Así mismo, las plantas transgénicas presentaron un mejor desempeño ante el estrés por congelamiento, fenómeno que se correlaciona fisiológicamente con la acumulación de esta diamina, tal cual ha sido reportado en las líneas no transformadas y aclimatadas al frío (Alet *et al.*, 2004). Recientemente se cruzaron las líneas de *A. thaliana* RD29A-gus y RD29A-oat ADC a fin de obtener una doble transgénica que permita evaluar la inducción del promotor frente a una actividad ADC inducida. Actualmente nos encontramos realizando la primera selección de estas dobles transgénicas.

Aproximaciones tecnológicas para el futuro uso de esta herramienta

Para aprovechar esta nueva herramienta como tecnología agropecuaria, se aunaron esfuerzos con el Programa Arroz de la Facultad de Ciencias Agrarias y Forestales de La Plata (FCAYF). Este programa viene realizando contribuciones en el mejoramiento vegetal de esta gramínea desde 1945. Uno de sus objetivos prioritarios constituye la generación de líneas de alto rendimiento y calidad que se adapten a condiciones de estrés características de su región de influencia inmediata. Dentro de éstas, resulta particularmente importante el estrés provocado por bajas temperaturas.

Por medio de técnicas tradicionales se han generado líneas de arroz de diferentes características, entre las que se destacan actualmente Don Ignacio y Nutriar. Estas líneas demostraron alto rendimiento y calidad en condiciones no estresantes de





crecimiento y, además, en el caso de Nutriar, un alto contenido proteico. Estas dos variedades difieren en su origen, debido a que Don Ignacio es una típica variedad de ecotipo índico, mientras que Nutriar proviene de cruzamientos en los que intervienen tanto ecotipos índicos como japónicos. Debido a ello es de esperar una diferente capacidad de regenerar plantas verdes y fértiles en presencia de medios de diferentes composiciones, como los utilizados tradicionalmente en el cultivo de tejidos. Además, si bien en los ecotipos japónicos la transformación y la regeneración han sido puestas a punto en un número importante de líneas, en los arroces índicos todavía no hay un consenso generalizado sobre la composición de los medios de cultivo necesarios. Además, en el caso de nuestro país, muchas de las líneas de desarrollo nacional poseen cruzamientos entre ambos ecotipos dificultando aun más la puesta a punto de los protocolos de transformación. Por todo esto, entendemos muy importante la optimización de las condiciones específicas de transformación para cada variedad.

A fin de realizar esta tarea nos encontramos ensayando distintos protocolos de transformación de arroz con base en similares descritos en la literatura por Kumria y Rajam (2002), los cuales son específicos para líneas índicas. Esto constituye un paso previo a la evaluación de posibles modificaciones para adecuarlas a la línea Nutriar. Al momento de redactar esta nota ya fueron probados numerosos protocolos cuyo objetivo constituye la generación de callos y regeneración a plantas de la línea Don Ignacio. Estos ensayos han tenido resultados satisfactorios haciendo uso de *Agrobacterium tumefaciens*, transformado con los vectores RD29A-gus y RD29A-oatADC. Tales vectores han demostrado un perfil y grado de expresión significativo en sistemas heterólogos bajo nuestras condiciones de estrés (Chiesa *et al.*, 2004), describiendo un perfil similar al observado en el sistema homólogo por otros autores (Yamaguchi-Shinozaki y Shinozaki, 1993). Los callos seleccionados por tolerancia al agente selectivo (paromomicina) se repican en medios de cultivo conteniendo los reguladores del crecimiento kinetina y ácido naftalen-acético hasta la regeneración de plantas. Las líneas obtenidas se encuentran actualmente bajo evaluación bioquímica y molecular.

Finalmente, es nuestro propósito llevar a cabo autofecundaciones y selección hasta la obtención de líneas homocigotas, y posteriormente someter a dichas líneas transgénicas a pruebas de comparación fenotípica y de tipo de grano, contenido de amilosa, temperatura de gelatinización y contenido proteico según técnicas estándares utilizadas de rutina por el personal del Programa Arroz de la FCAYF (Bezus *et al.*, 2002) a fin de validar la no alteración de las propiedades originales de los cultivares utilizados. En el caso de comprobarse alteraciones significativas tanto en el fenotipo como en las características de los granos, se procederá a realizar retrocruzas y selección con la variedad original para eliminar toda la variación somaclonal producto del proceso de cultivo *in vitro*.

Perspectivas

De este proyecto se espera lograr el punto de partida para la transformación de arroz en forma eficiente buscando aprovechar las posibilidades de aplicación biotecnológica que se han abierto en función del secuenciamiento del genoma de *Oryza sativa* y del gran incremento en el número de promotores homólogos con expresión

tejido-específico que se disponen en la actualidad. Así mismo, nuestro proyecto tiende a la formación de recursos humanos idóneos en el manejo de las técnicas de transformación génica de gramíneas y, a través de la misma, evaluar la función de putativos genes asociados a los mecanismos de tolerancia, con el deseo de contribuir aportando a la identificación y el análisis de novedosos descriptores para la mejora vegetal.

Referencias bibliográficas

- Alet, A. I.; Sánchez D. H.; Ruiz, O. A. 2003. XXXIX SAIB Annual Meeting. Biocell – Supplement I 27: 146.
- Alet, A. I.; Sánchez, D. H.; Ruiz, O. A. 2004. XXV Reunión Argentina de Fisiología Vegetal (SAFV).
- Bezus, R.; Vidal, A.; Asenjo, C. A. 2002. VII Reunião Nacional de Pesquisa de Arroz-RENAPA, 47.
- Bouchereau, A.; Aziz, A.; Lerher, F.; Martin-Tanguy, J. 1999. Polyamines and environmental challenges: recent developments. *Plant Sci.* 140: 103-125.
- Chiesa, M. A.; Ruiz, O. A.; Sánchez, D. H. 2004. **Lotus hairy roots expressing inducible arginine decarboxylase activity.** *Biotechnol. Letters* 26: 729-733.
- Cohen, S. 1998. A guide to polyamines. Oxford University Press.
- Evans, P. T.; y Malmberg, R. L. 1989. Do Polyamines Have Roles in Plant Development? *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 40: 235-269.
- Flores, H. E. 1991. Biochemistry and physiology of polyamines in plants. Slocum, R. D. y Flores, H. E. (eds.) (p. 213-227). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Galston, A. W.; Flores H. E. 1991. "Biochemistry and physiology of polyamines in plants" Slocum, R. D. y Flores, H. E. (eds.) (p. 175-185). Boca Raton, FL: CRC Press.
- Galston, A. W.; Sawhney, R. K. 1990. Polyamines in plant physiology. *Plant Physiol.* 94: 406-410.
- Galston, A. W.; Kaur-Sawhney, R.; Altabella, T.; Tiburcio, A. F. 1997. Plant polyamines in reproductive activity and response to abiotic stress. *Botanical Acta* 110: 197-207.
- Gatz, C. 1997. Chemical Control of Gene Expression. *Ann. Rev. Plant Physiol. Plant. Mol. Biol.* 48: 89-108.
- Gatz, C.; Quail, P. 1988. Tn10-Encoded tet Repressor Can Regulate an Operator-Containing Plant Promoter. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 1394-1397.
- Kumar, A.; Altabella, T.; Taylor, M.; Tiburcio, A. M. 1997. Recent advances in polyamine research. *Trends Plant Sci.* 2: 124-130.
- Kumria R.; Rajam, M. V. 2002. **Alteration in polyamine titres during Agrobacterium-mediated transformation of indica rice with ornithine decarboxylase gene affects plant regeneration potential.** *Plant Sci.* 162: 769-777.
- Liu, K.; Fu, H.; Bei, Q.; Luan, S. 2000. Inward potassium channel in guard cells as a target for polyamine regulation of stomatal movements. *Plant Physiol.* 124: 1315-1326.
- Langebartels, C.; Kerner, K.; Leonardi, S.; Schraudner, M.; Trost, M.; Heller, W.; Sandermann, H. Jr. 1991. Biochemical Plant Responses to Ozone : I. Differential Induction of Polyamine and Ethylene Biosynthesis in Tobacco. *Plant Physiol.* 95: 882-889.
- Maiale, S.; Sánchez, D. H.; Guirado, A.; Vidal, A.; Ruiz, O. A. 2004. Spermine accumulation under salt stress. *Journal of Plant Physiology* 161: 35-42.





- Malmberg, R. L.; Watson, M. B.; Galloway, G. L.; Yu, W. 1998. Molecular genetic analyses of plant polyamines. *Critical Rev Plant Sci.* 17: 199-224.
- Masgrau, C.; Altabella, T.; Farrás, R.; Flores, D.; Thompson, A. J.; Besford, R. T.; Tiburcio, A. F. 1997. Inducible over-expression of oat arginine decarboxylase in transgenic tobacco plants. *Plant J.* 11: 465-473.
- Narusaka, Y.; Nakashima, K.; Shinwari, Z.; Sacuma, Y.; Furihata, T.; Abe *et al.* 2003. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of Arabidopsis rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J.* 34: 137-148.
- Nuccio, M. L.; Rhodes, D.; McNeil, S. D.; Scott, D.; Hanson, A. D. 1999. Metabolic engineering of plants for osmotic stress resistance. *Curr. Opin. Plant Biol.* 2: 128-134.
- Ruiz, O. A.; Bortolotti, C.; Tiburcio, A. F.; Altabella, T. 2000. Molecular forms of arginine decarboxylase in oat leaves. *Physiol Plant.* 108: 370-375.
- Sánchez, D. H.; Cuevas, J. C.; Chiesa, M. A.; Ruiz, O. A. 2005. Free spermidine and spermine content in *Lotus glaber* under long-term salt stress. *Plant Science* 2: 541-546.
- Serafini-Fracassini, D. 1991. Cell cycle-dependent changes in plant polyamine metabolism. In RD Slocum, HE Flores, eds, *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 159-173.
- Slocum, R. D.; Flores, H. E. 1991. *Biochemistry and Physiology of Polyamines in Plants*. Boca Raton, FL: CRC Press.
- Smith, T. A. 1985. Polyamines. *Annu. Rev. Plant Physiol.* 36: 117-143.
- Tabor, C. W.; Tabor, H. 1985. Polyamines in microorganisms. *Microbiol. Rev.* 49: 81-99.
- Tiburcio, A. F.; Altabella, T.; Borrell, A.; Masgrau, C. 1997. Polyamine metabolism and its regulation. *Physiol. Plant* 100: 664-674.
- Torrigiani, P.; Rabiti, A. L.; Bortolotti, C.; Betti, L.; Marani, F.; Canova, A.; Bagni, N. 1997. Polyamine synthesis and accumulation in the hypersensitive response to TMV in *Nicotiana tabacum*. *New Phytol.* 135: 467-473.
- Yamaguchi-Shinozaki, K.; Shinozaki, K. 1993. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. *Mol. Gen. Genetics* 236: 331-340.
- Zheleva, D.; Tsonev, T.; Sergiev, I.; Karanov, E. 1994. Protective effect of exogenous polyamines against atrazine in pea plants. *J. Plant Growth Regul.* 13: 203-211.