



PARTICIPACIÓN DEL ANTIPTER NA⁺/H⁺ NHX1 DE *Lotus tenuis* EN LA TOLERANCIA A LA SALINIDAD DE *Arabidopsis thaliana*

Aguilá, J.¹, M.A. Affinito¹, M.A. Maciel^{2,3}, M.L. Roldán⁴, I. Varea¹, A.H. Díaz Paleo⁴, F. Salgado⁵, L.P. Galván⁵, A. Andrés^{1,5}

¹Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA), Pergamino, Argentina; ²Instituto de Biología Subtropical (UNaM-CONICET), Posadas, Misiones; ³CITNOBA (CONICET-UNNOBA-UNSAaA), Pergamino, Argentina; ⁴EEA INTA Pergamino, Pergamino, Argentina; ⁵Universidad Nacional de San Antonio de Areco (UNSAaA), San Antonio de Areco, Argentina. E-mail: aguilajulieta@gmail.com.

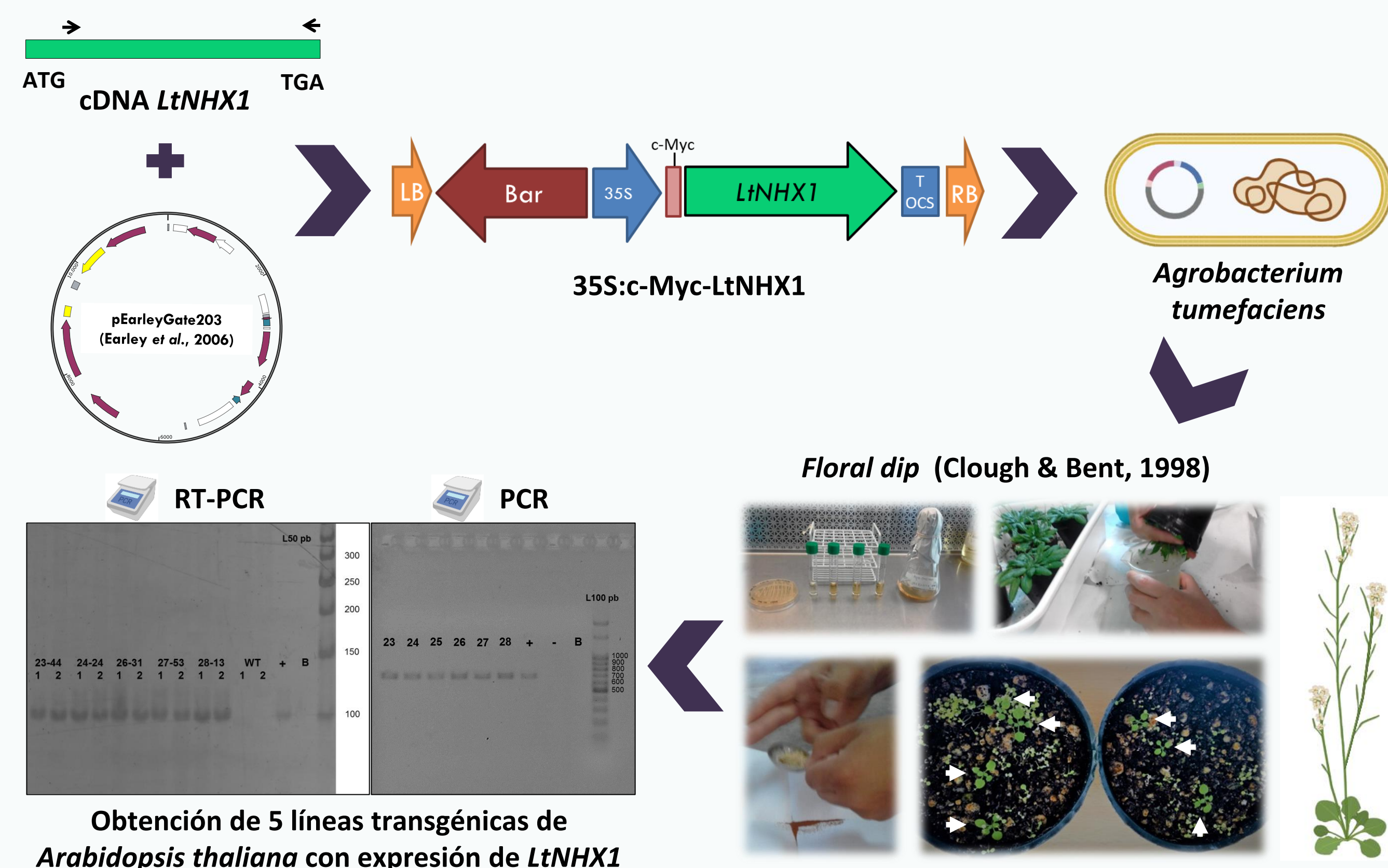
INTRODUCCIÓN

Lotus tenuis es una leguminosa forrajera perenne que se encuentra naturalizada en los campos bajos de la Pampa Deprimida y se considera una especie tolerante a la salinidad. La compartimentalización intracelular de Na⁺ en vacuolas mediante el antiporter NHX1 es una estrategia de las plantas para reducir la toxicidad iónica durante el estrés salino. Se conoce que la expresión modulada de *NHX1* es importante en la tolerancia a salinidad de diversas especies, y que su expresión constitutiva en plantas transgénicas incrementa la tolerancia (Agarwal *et al.*, 2012; Apse *et al.*, 1999).

OBJETIVO

El objetivo de este trabajo fue estudiar los cambios en la tolerancia a la salinidad de la especie modelo *Arabidopsis thaliana* al expresar el gen *NHX1* de *L. tenuis* (*LtNHX1*) en forma constitutiva.

MATERIALES Y MÉTODOS



Ensayo de tolerancia a la salinidad

Genotipos: Col-0 (*wild-type*) y líneas 23-44, 24-24, 26-31, 27-53 y 28-13 (generación T3).

Tratamientos: 0 (control), 50, 100 mM NaCl durante 28 días, sin aclimatación al estrés.

Variables: Diámetro (D, cm), peso seco aéreo (PSA, mg), índices de tolerancia del D y PSA (ITD e ITPSA, calculados como el valor de cada planta en sal sobre la media del control), contenido de Na⁺ (μMoles g⁻¹ PS) en raíz y hoja por fotometría de llama.

Diseño: DCA – 4 repeticiones.

Análisis estadístico: ANOVA de 2 vías y test de comparaciones múltiples DGC.



RESULTADOS

Cuatro de las líneas transgénicas presentaron mayores índices de tolerancia (ITD e ITPSA) que Col 0 (Figura 1), pero no presentaron diferencias para las variables *per se* ($\alpha = 0,05$).

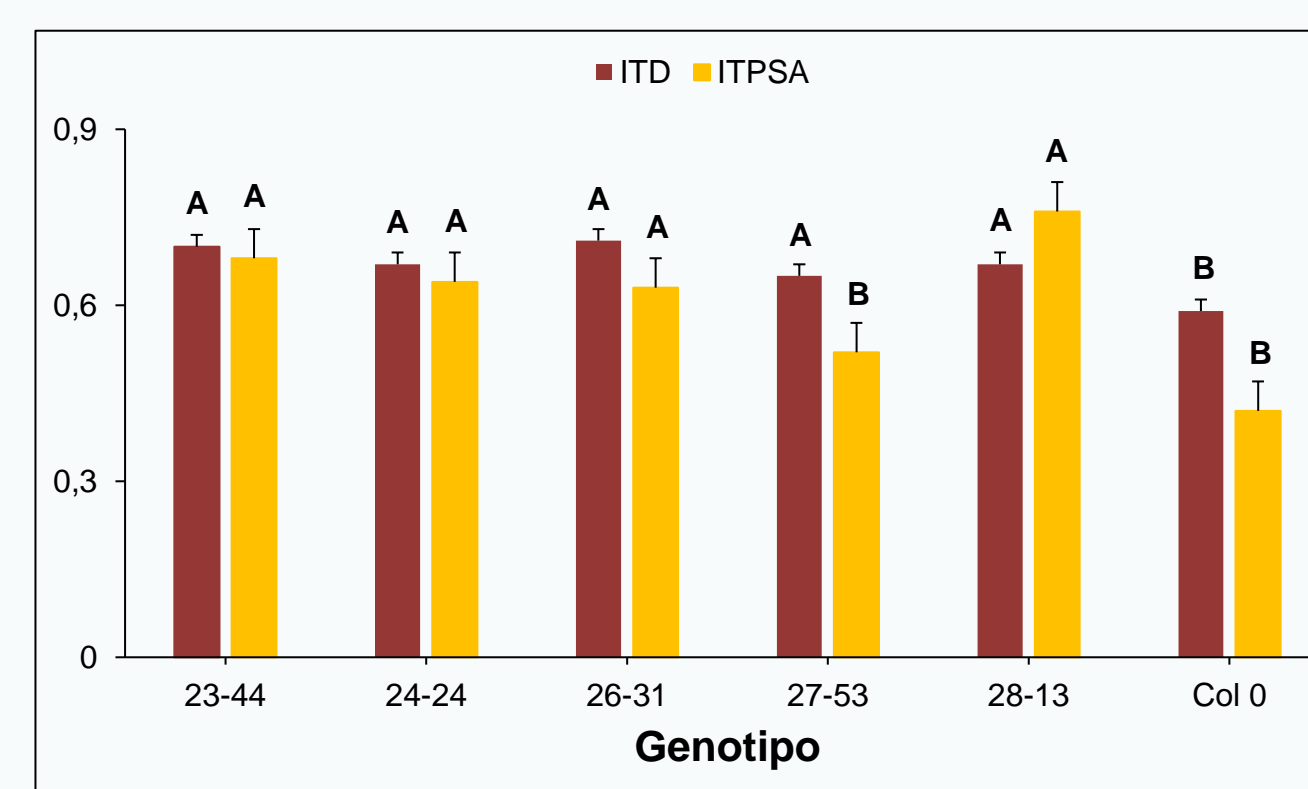


Figura 1. Índices de tolerancia promedio del diámetro (ITD) y peso seco aéreo (ITPSA) de las líneas transgénicas y la *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana* en 50 y 100 mM NaCl. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas entre genotipos según la prueba de comparaciones múltiples DGC ($p < 0,05$).

Se realizó un nuevo análisis comparativo entre una línea transgénica (28-13) y Col 0, con el fin de disminuir la dispersión de los datos. La línea 28-13 presentó mayor ITD e ITPSA (Figura 2A) y se encontró interacción genotipo*tratamiento para D y PSA, con mayores medias de 28-13 en 100 mM NaCl (Figuras 2B y 2C).

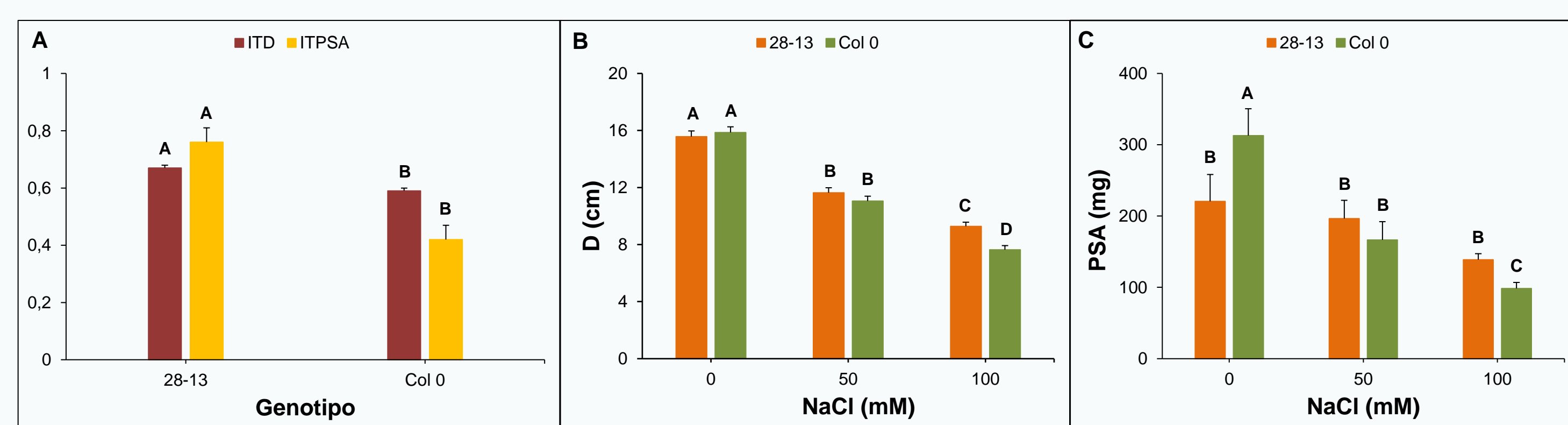


Figura 2. Comportamiento de la línea transgénica 28-13 y la *wild-type* (Col 0) de *A. thaliana* en el ensayo de tolerancia a la salinidad. A. Índices de tolerancia del diámetro y del peso seco aéreo. B. Diámetro de planta. C. Peso seco aéreo. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

Además, la línea transgénica acumuló más Na⁺ en hoja en 50 mM NaCl (Figura 3). Un incremento de Na⁺ en las células podría causar toxicidad iónica y conducir a una grave inhibición del crecimiento. Sin embargo, en este trabajo se observó un mejor crecimiento de las plantas transgénicas en comparación con las *wild-type* (Figura 1 y 2), lo que podría ser consecuencia de la compartimentalización del exceso de Na⁺ en las vacuolas mediada por el antiporter NHX1. De esta forma, disminuirían los niveles tóxicos del ion en el citoplasma de las células de las hojas, incrementando la tolerancia tisular en las plantas transgénicas bajo estrés salino (Apse *et al.*, 1999; Liu *et al.*, 2010; Munns *et al.*, 2016; Munns & Tester, 2008; Sahoo *et al.*, 2016).

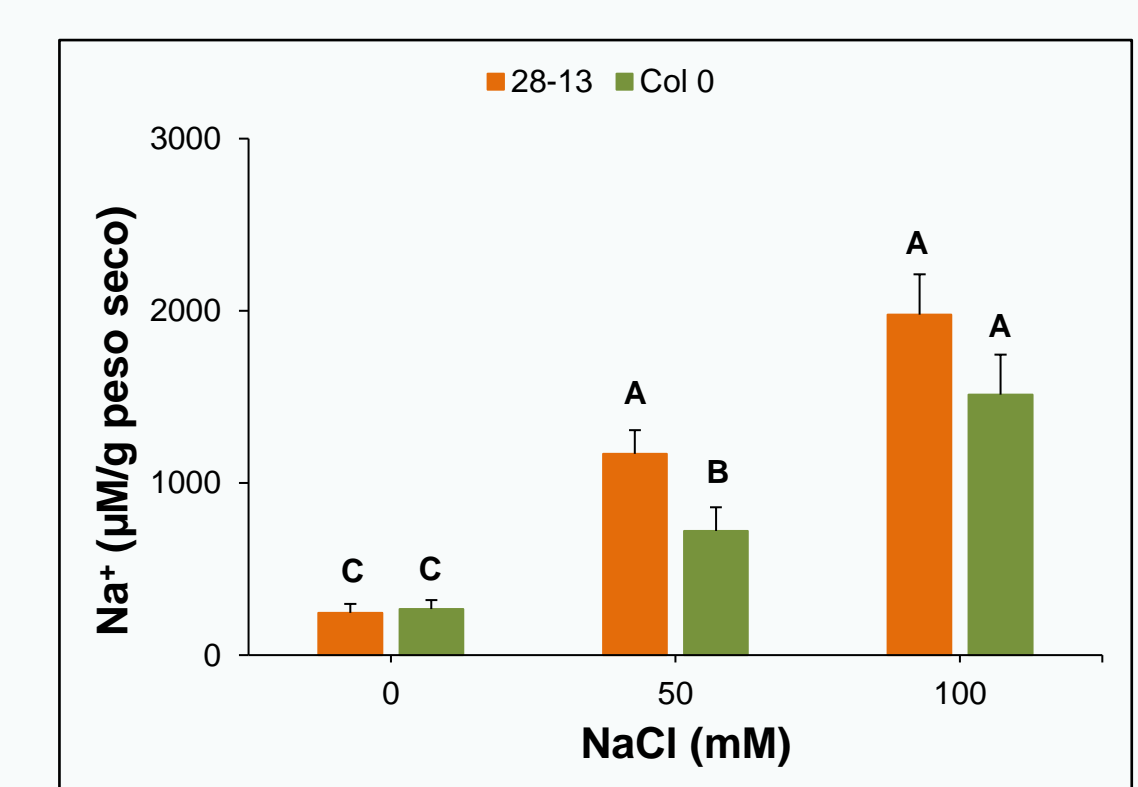


Figura 3. Contenido de Na⁺ en hoja de 28-13 y Col 0 en 0, 50 y 100 mM NaCl. Las barras indican medias y error estándar. Letras distintas indican diferencias significativas según la prueba DGC ($p < 0,05$).

CONCLUSIONES

La expresión constitutiva de *LtNHX1* incrementó la tolerancia a la salinidad de *A. thaliana* y el aumento de Na⁺ en hoja bajo condiciones salinas indicaría mayor actividad del antiporter NHX1.

En estudios previos, la sobreexpresión de *LtNHX1* había incrementado la tolerancia a la salinidad en etapa vegetativa de un genotipo transgénico de *L. tenuis* (Affinito *et al.*, 2021). En el presente trabajo, se confirmó el rol del antiporter NHX1 en la respuesta a dicho estrés abiótico en un sistema heterólogo como *Arabidopsis thaliana*.

BIBLIOGRAFÍA

- Affinito, M. A., Espasandín, F. D., Del Vas, M., Álvarez, M. Y., Andrés, A. N., Sansberro, P. A., & Díaz Paleo, A. H. (2021). Functional characterization and intracellular localization of a *Lotus tenuis* NHX antiporter. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC)*, 146(3), 565-576.
- Agarwal, P. K., Shukla, P. S., Gupta, K., & Jha, B. (2012). Bioengineering for salinity tolerance in plants: state of the art. *Molecular Biotechnology*, 54(1), 102-123.
- Apse, M. P., Aharon, G. S., Snedden, W. A., & Blumwald, E. (1999). Salt tolerance conferred by overexpression of a vacuolar Na⁺/H⁺ antiporter in *Arabidopsis*. *Science*, 285(5431), 1256-1258.
- Clough, S. J., & Bent, A. F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal*, 16(6), 735-743.
- Earley, K. W., Haag, J. R., Pontes, O., Opper, K., Juehne, T., Song, K., & Pikaard, C. S. (2006). Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics. *The Plant Journal*, 45(4), 616-629.
- Liu, P., Yang, G. D., Li, H., Zheng, C. C., & Wu, C. A. (2010). Overexpression of *NHX1s* in transgenic *Arabidopsis* enhances photoprotection capacity in high salinity and drought conditions. *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(1), 81-90.
- Munns, R., James, R. A., Gilliam, M., Flowers, T. J., & Colmer, T. D. (2016). Tissue tolerance: an essential but elusive trait for salt-tolerant crops. *Functional Plant Biology*, 43(12), 1103-1113.
- Munns, R., & Tester, M. (2008). Mechanisms of salinity tolerance. *Annual Review of Plant Biology*, 59, 651-681.
- Sahoo, D. P., Kumar, S., Mishra, S., Kobayashi, Y., Panda, S. K., & Sahoo, L. (2016). Enhanced salinity tolerance in transgenic mungbean overexpressing *Arabidopsis* antiporter (*NHX1*) gene. *Molecular Breeding*, 36(10), 1-15.