

ACR2 en Fabaceae: una enzima clave para la fitorremediación de suelos contaminados con metales pesados

ACR2 in Fabaceae: a key enzyme for phytoremediation of soils contaminated with heavy metals

Luciano Antonio Juárez Díaz¹, Sergio Daniel López Gonzales¹, Melina Del Real Monroy¹, Mauricio Nahuam Chávez-Avilés², César Díaz Pérez³ y Lenin Sánchez Calderón^{1*}

¹Universidad Autónoma de Zacatecas, ²Instituto Tecnológico Superior de Ciudad Hidalgo, ³Universidad de Guanajuato
leninsanc@uaz.edu.mx¹

Resumen

Los metales pesados (MPs) son tóxicos para la mayoría de los organismos, provocan alteraciones en procesos fisiológicos y bioquímicos que pueden llegar a producir la muerte. En las plantas la respuesta al As puede ser desde la resistencia hasta toxicidad y dependerán de la especie, el genotipo, el estado fenológico. *Lupinus campestris* es una especie que crece en suelos contaminados con desechos mineros y comparado con el resto de plantas que crecen en esos suelos, es una de las especies que genera mayor biomasa y presenta mayor número de individuos, además, *in vitro* puede crecer en concentraciones de 300 μ M As sin mostrar señales drásticas de toxicidad y bioacumula As. Dichas características la hacen una planta candidata para su uso en la fitoextracción de As. Sin embargo, no transloca el As al sistema de brotes, por lo cual no es fácil cosechar la biomasa donde se acumula el As. El objetivo de este trabajo fue el amplificar el gen *LcACR2* y clonarlo en un vector codificante de hpRNA para el silenciamiento postranscripcional. Con la finalidad de generar posteriormente plantas transgénicas de *L. campestris* que acumulen As en el sistema de brotes debida al silenciamiento del gen *LcACR2*.

Abstract

Heavy metals (HMs) are toxic to most organisms, causing alterations in physiological and biochemical processes that can lead to death. In plants, the response to As can range from resistance to toxicity, and it will depend on the species, genotype and phenological stage. *Lupinus campestris* is a specie that grows in soils contaminated with mining waste, and compared to the rest of the plants that grow in these soils, it is one of the species that generates greater biomass and presents a greater number of individuals, moreover, *in vitro* it can grow in concentrations of 300 mM As without showing drastic signs of toxicity and bioaccumulates As. These characteristics make it a candidate plant for use in As phytoextraction. However, it does not translocate As to the shoot system, so it is not easy to harvest the biomass where As accumulates. The aim of this work was to amplify the *LcACR2* gene and clone it into a hpRNA encoding vector for post-transcriptional silencing to subsequently generate transgenic plants of *L. campestris* that accumulate As in the shoot system due to silencing of the *LcACR2* gene.

Key words: Arsenic. Arsenate reductase. Gene silencing. Heavy metals. Lupinus.

Introducción

Se entiende por metales pesados (MPs) a aquellos metales y metaloides con una densidad mayor a 5 g/cm³ (Appenroth, 2010; Rascio & Navari-Izzo, 2011) y que son tóxicos en concentraciones del orden micromolar (μM). El arsénico (As) es un MP componente de más de 200 minerales, se encuentra en formas como sulfuros, óxidos, arseniatos As(V), arsenitos As(III) y arseniuros (As³⁻). El As se encuentra en asociación con otros depósitos de metales pesados como plomo (Pb), níquel (Ni), zinc (Zn), mercurio (Hg), cobalto (Co), plata (Ag), oro (Au), entre otros. Los procesos naturales como la disolución tanto oxidativa como reductora de compuestos que contienen arsénico en minerales promueven la distribución del arsénico en el ambiente, además, se calcula que las actividades antropogénicas aportan anualmente entre 52.000 a 112.000 toneladas de arsénico al ambiente (Bali & Sidhu, 2021).

El As es de gran preocupación ambiental debido a que es tóxico para los organismos, es recalcitrante y tiende a bioacumularse y a biomagnificarse (Rascio & Navari-Izzo, 2011). Dependiendo de las propiedades fisicoquímicas del suelo (el pH, materia orgánica y microorganismos), el As puede estar solubilizado y biodisponible para las plantas (Chuan et al., 1996; Kwiatkowska, 2006). En las plantas las respuestas al As pueden ser de resistencia, tolerancia o toxicidad, lo que dependerán de la especie, el genotipo, el estado fenológico y la asociación con microorganismos (Rascio & Navari-Izzo, 2011).

La enzima ACR2 y su papel en la resistencia a As(V) en plantas

La toxicidad provocada por el As(V) y la forma reducida más tóxica As(III), alteran la morfología, fisiología y metabolismo de la planta. A nivel morfológico se puede ver afectada la longitud y biomasa del sistema radical y del sistema de brotes. Hay cambios drásticos en los procesos fisiológicos como la fotosíntesis (contenido de clorofila y la tasa fotosintética) y la homeostasis hídrica (la conductancia estomática, la tasa de transpiración, el contenido relativo de agua de la hoja). Además, en los tejidos de la planta, el metabolismo de azúcares, los lípidos de la membrana, la generación y acumulación de especies reactivas de oxígeno (ROS) se modifican, comprometiendo integridad de la misma (Bali & Sidhu, 2021). Sin embargo, las plantas que crecen en lugares contaminados con MPs, cuentan con adaptaciones que les permiten sobrevivir en este tipo condiciones (Rascio & Navari-Izzo, 2011). Una de las adaptaciones ante el estrés causado por As(V), cuando se encuentra en el citoplasma de las células de la raíz, es reducirlo a su forma As(III) mediante la enzima arseniato reductasa 2 (ACR2), para después formar complejos con otras proteínas (fitoquelatinas o metalotioneínas) y acumular estos complejos en la vacuola o excluirlo (Ghori et al., 2019), evitando la translocación del As al sistema de brotes, mitigando su toxicidad dentro de la planta (Nabi et al., 2021).

La enzima ACR2 es importante para la resistencia y acumulación de As en plantas (Preetha et al., 2023). Se ha reportado que las plantas transgénicas *Nicotiana tabacum* transformadas con el gen ACR2 de *Arabidopsis thaliana* (AtACR2) presentaron una mayor capacidad de acumular de As en sus raíces (2400 μg/g de pesos seco) y resistencia a mayores de concentraciones de As (200 μM) comparadas con las plantas de tabaco silvestre (Nahar et al., 2017). Además, se ha visto que el silenciamiento del gen AtACR2 en *A. thaliana* generó la acumulación As(V) en los brotes (350-500 ppm). Lo anterior sugiere que ACR2 tiene potencial biotecnológico para la generación de organismos genéticamente modificados útiles para la fitorremediación en suelos contaminados con As (Del Moral & Rozzell, 2005).

Lupinus campestris

El género *Lupinus* pertenecen a la familia de las leguminosas (Fabaceae). La mayoría de las especies que forman este género son parte de la vegetación secundaria la cuál coloniza áreas que han sufrido un disturbio ya sea de origen natural o humano (Del Moral & Rozzell, 2005). En los distritos mineros del país existen vastas áreas donde los ecosistemas han sido afectados drásticamente por las minas y sus desechos. Es una de estas zonas ubicada en el Estado de Zacatecas donde los desechos mineros han cubierto el suelo y han terminado con la vegetación nativa, se ha reportado que *Lupinus campestris* se encuentra proliferando (Salas-Luévano et al., 2009). En este sitio perturbado, de entre las especies que conforman la vegetación secundaria, *L. campestris* es una de las plantas que genera mayor biomasa y presenta mayor número de individuos. Además, en análisis *in vitro* se ha encontrado que puede crecer en concentraciones de 300 μM As sin mostrar señales drásticas de toxicidad y presenta un factor de bioacumulación de 1.7 a 2.4 por lo que es una planta hiperacumuladora de As. Dado lo anterior *L. campestris* es una planta que pudiera ser útil para la fitorremediación de As. Sin embargo, *L. campestris* tiene la desventaja de que el As no se transloca y se mantiene en el sistema radical (Ortiz-Luevano, 2014).

Una estrategia para la fitorremediación



La contaminación por As plantea un gran desafío ambiental debido a su toxicidad y persistencia, en este contexto, el uso de plantas que se encuentran creciendo en suelos metalíferos es una oportunidad para desarrollar herramientas biotecnológicas para la fitoextracción de este MP. Sin embargo, gran parte de estas especies entre ellas *L. campestris* no son capaces de acumular el As en su sistema de brotes haciendo difícil el proceso de fitoextracción. Como se mencionó anteriormente el silenciamiento AtACR2, aumento la translocación del As en plantas transgénicas de *A. thaliana*. Por lo que el abatir la expresión de ACR2 mediante la ingeniería genética podría mejorar la capacidad de *L. Campestris* para translocar el As.

El presente estudio tuvo como objetivo establecer las bases para predecir la presencia y función del gen ACR2 en *L. campestris* (*LcACR2*) y construir un vector para posteriormente silenciar el gen ACR2 en ésta planta. Para ello, se descargaron secuencias de proteínas similares de especies de la familia Fabaceae a partir de bases de datos genómicas, se emplearon herramientas bioinformáticas, como bases de datos, programas de alineamiento múltiple de secuencias, y softwares para la predicción de estructura y función proteica, se diseñaron oligonucleótidos específicos dirigidos a la región codificante de ACR2 en *L. campestris* y se clono el fragmento en un vector para el silenciamiento de *LcACR2*. De este modo, este trabajo presenta evidencia de la funcionalidad del gen ACR2 en Fabaceae y la construcción de un vector codificante de hpRNA para el silenciamiento postranscripcional de ACR2, que podrá ser utilizado para transformar genéticamente a *L. campestris* para su en la fitoextracción de As.

Metodología

Filogenia molecular de la proteína ACR2

Para predecir la presencia y función del gen ACR2 en *L. campestris* (*LcACR2*), se llevó a cabo una búsqueda con el programa BLASTp (Altschul, 1997) de proteínas similares a la enzima ACR2 de *A. thaliana* (AtACR2; número de acceso: NP_568119). Con las secuencias se llevó a cabo un alineamiento múltiple de secuencias (AMS) mediante el algoritmo MUSCLE en el programa MEGA XI (Tamura et al., 2021). El AMS fue depurado con el programa TrimAl (Capella-Gutiérrez et al., 2009). Para la reconstrucción del árbol filogenético se utilizó el método de máxima verosimilitud con un Bootstrap de 1000 repeticiones usando el programa MEGA XI. Se efectuó un análisis de dominios mediante el servidor Conserved Domain Search (CDD SEARCH) (Wang et al., 2023). Con el servidor ConSurf se verificó la conservación de las secuencias entre AtACR2 y LcACR2 (Yariv et al., 2023).

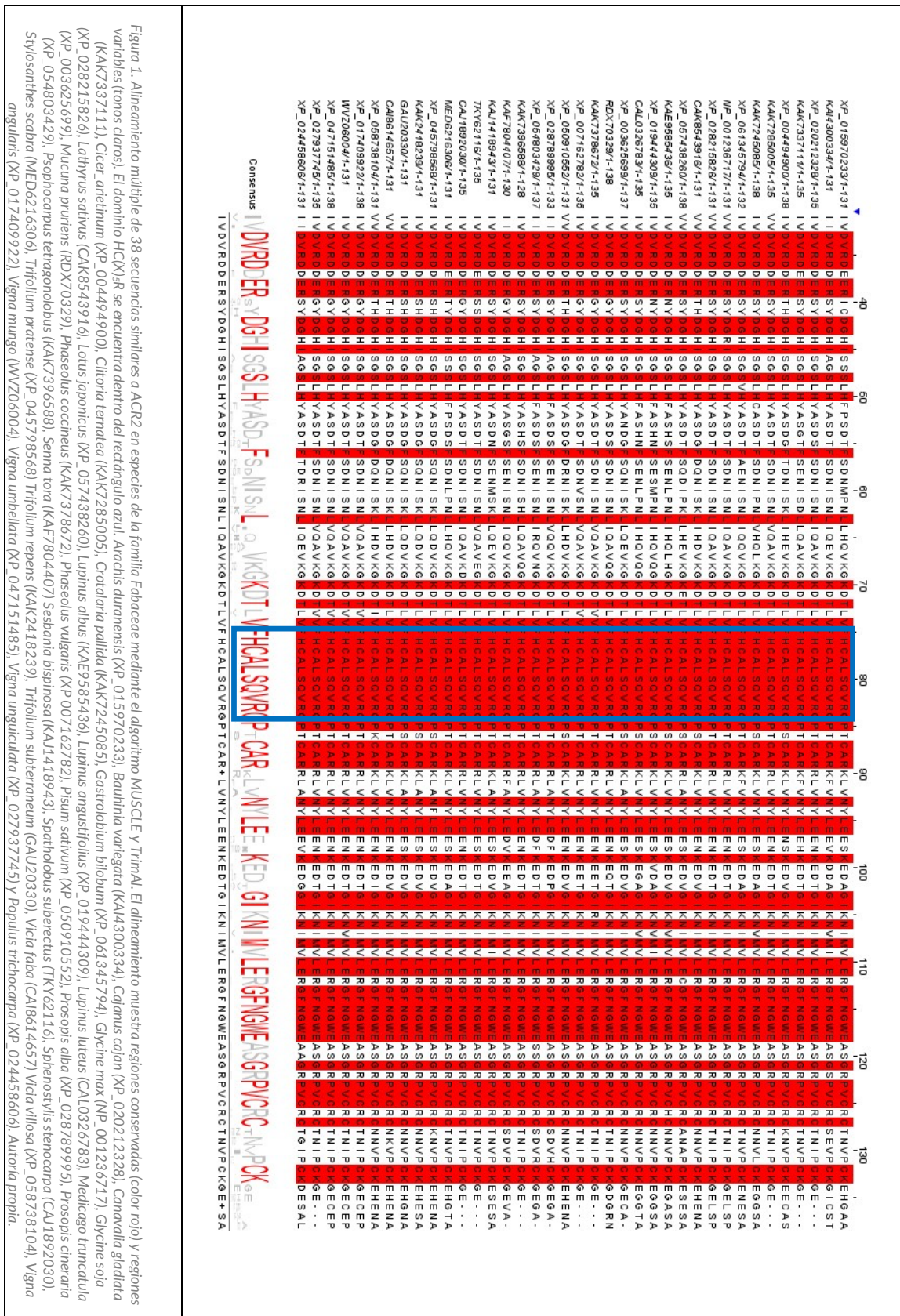
Material biológico y transformación

Para la construcción un vector para el silenciamiento postranscripcional el gen ACR2. A partir de plántulas de *L. campestris* en medios de cultivo adicionados con As(V) a 100 µM, se extrajo el RNA y se generó cDNA mediante el kit SuperScript First-Strand Synthesis Shystem® for RT-PCR (*Reverse transcription polymerase chain reaction*) de Invitrogen™. Para la clonación, se amplificó el fragmento del gen *LcACR2* y se siguieron los protocolos del kit BP y LR clonasa, como vector donador se empleó PDONR221 (ThermoFisher Scientific) y como vector destino el plásmido pHELLSGATE12. Para la transformación se utilizaron las células químicamente competentes de *E. coli* One® Shot OmniMAX 2 T1R (ThermoFisher Scientific) y DB2.1::pHELLSGATE12. Los oligonucleótidos se diseñaron a partir de las secuencias de los mRNA codificantes de ACR2 de *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius*.

Resultados y Discusión

Reconstrucción filogenética de la familia ACR2 de fabáceas

Para hacer la reconstrucción filogenética de la familia ACR2 en fabáceas primeramente se trabajó con 38 secuencias de proteínas similares a la enzima AtACR2 mediante una búsqueda con BLASTp. El grupo de secuencias se usó para hacer un AMS de proteínas pertenecientes a la familia Fabaceae con el algoritmo MUSCLE. Para garantizar un alineamiento de mejor calidad, lo cual es de vital importancia para obtener una filogenia representativa, se llevó a cabo una depuración del AMS usando el programa TrimAl. En la figura 1 se muestra el AMS donde se destacan las regiones conservadas en rojo. El sitio activo de las enzimas ACR2 presentan un dominio conservado HC(X)₅R (Bordo & Bork, 2002; Nahar et al., 2012), marcado en el recuadro azul, el cual se observó en todas las secuencias de la familia (Figura 1).



Se construyó un árbol filogenético con el método de máxima verosimilitud con un bootstrap de 1000 repeticiones. La reconstrucción filogenética muestra un grupo (valor de Bootstrap del 99%) dentro del género *Lupinus* que incluye a *Lupinus luteus*, *Lupinus albus* y *Lupinus angustifolius* (Figura 2; rectángulo rojo). El alto grado de similitud entre las secuencias y las proteínas dentro de la familia Fabaceae, la presencia del motivo HC(X)₅R sugieren la conservación de la función dentro de la familia, y el agrupamiento de las secuencias en un grupo monofilético sugiere que la de la función de arsenato reductasa dentro del género *Lupinus* se ha conservado.

Búsqueda de las regiones funcionales de la familia ACR2

Para encontrar regiones conservadas que son importantes para la función de la enzima ACR2 y comprobar la presencia de los dominios en la familia ACR2 de fabáceas se llevó a cabo una búsqueda en el servidor CDD del NCBI. Se obtuvo que todas las secuencias tienen los dominios ACR2p (cd01531), propio de las As(V) reductasas, que abarca 110 residuos, y el dominio rodanasa (cl00125) que abarca 100 residuos (Figura 3). Esta información se tomó en cuenta para el diseño de los oligonucleótidos que flanquean los dominios ACR2p y rodanasa, de tal forma que estos dominios sean el blanco del silenciamiento.

Obtención de un vector de silenciamiento para el gen LcACR2

Para silenciar *LcACR2* en *L. campestris* y usarlas plantas transgénicas como una posible herramienta biotecnológica para la fitorremediación de suelos contaminados con As, se generó un vector que induce el silenciamiento postranscripcional de este gen. Con los oligonucleótidos diseñados para amplificar los dominios conservados de la familia ACR2, se generó un amplicón de 305 pares de bases pb del gen *LcACR2* a partir de cDNA obtenido de plántulas de *L. campestris* expuestas a As(V) (Figura 4A). Este fragmento fue clonado en el vector de entrada pDONR221 mediante la reacción BP (Figura 4B), y posteriormente subclonado en el vector de destino pHELLSGATE12 utilizando la reacción LR (Figura 4C). El vector con el fragmento de *LcACR2* codifica para un hpRNA para el silenciamiento de la expresión de *LcACR2*, el cual será de utilidad para corroborar la función del y generar plantas que ayuden para la fitorremediación de sitios contaminados con As.

Conclusiones

Se identificaron secuencias similares a ACR2 en especies de la familia Fabaceae, lo que sugiere la conservación de este gen. El análisis filogenético mostró un apoyo significativo (Bootstrap del 99%), lo que refuerza la robustez de este resultado. Asimismo, el alineamiento múltiple de secuencias entre las proteínas, indicó la conservación del motivo HC(X)₅R, esencial para la actividad enzimática relacionada con la detoxificación de As. A nivel funcional, el análisis por CDD confirmó la presencia de los dominios Acr2p (cd01531) y rodanasa (cl00125), lo que refuerza una predicción funcional similar a la reportada en *A. thaliana*. Finalmente se diseñó y construyó un vector codificante de horquilla de ARN (hpRNA) para el silenciamiento postranscripcional de ACR2. A corto plazo, dicho vector será usado para transformar genéticamente a *L. campestris* e inducir el silenciamiento de ACR2 para que esta planta sea capaz de translocar el As que toma del suelo hasta el sistema de brotes. A mediano plazo se usará a *L. campestris* genéticamente modificada para determinar su potencial como herramienta para la fitoextracción de As de suelos contaminados.

Agradecimientos



Este trabajo fue posible con los fondos provenientes de los proyectos: Convocatoria Institucional de Investigación Científica 2024 de la Universidad de Guanajuato, proyecto 064/2024. Ciencia Básica CB-2010-01 000000000156851 y UAZ-202138539. A la Dra. Gloria Guerrero Manríquez del Laboratorio de Bioquímica Molecular e Inmunología, y a la Dra. Rosa María Ramírez Santoyo y la Dra. Luz Elena Vidales Rodríguez del Laboratorio de Biología de Bacterias y Hongos por permitir el uso de sus equipos.

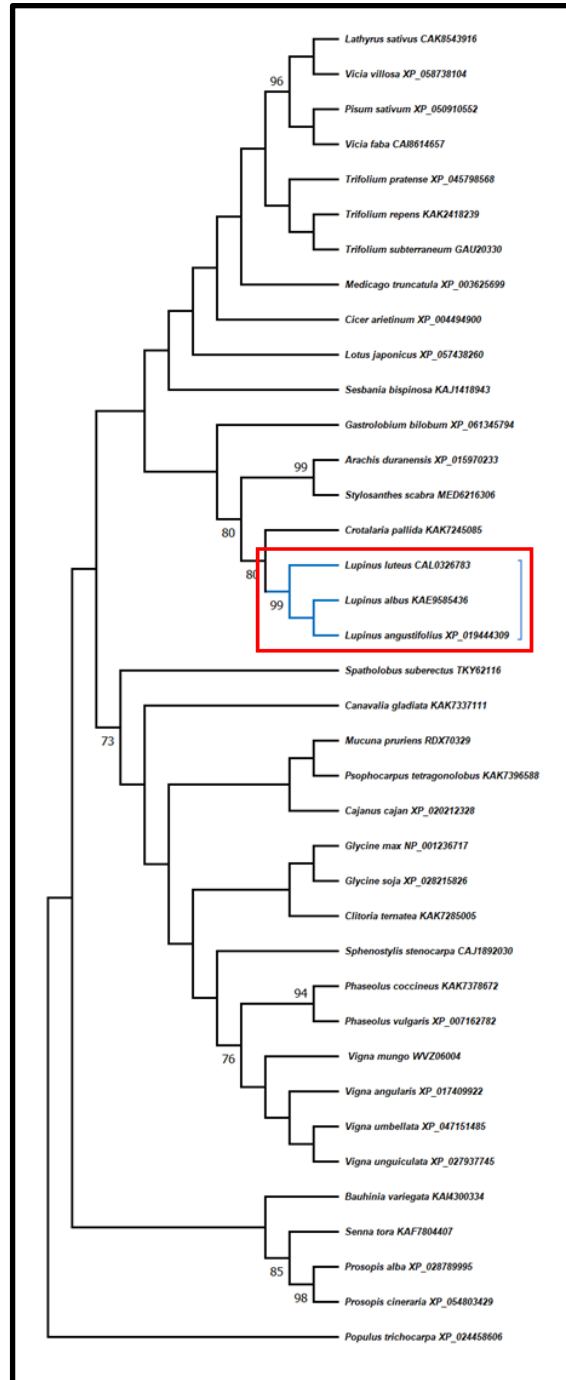


Figura 2. Reconstrucción filogenética por método de máxima verosimilitud con 38 secuencias de ACR2 de la familia Fabaceae y 1000 réplicas de Bootstrap. Se muestran valores de Bootstrap superiores a 70%. En recuadro rojo se encuentra el género *Lupinus* con un apoyo de Bootstrap del 99%. Autoría propia.

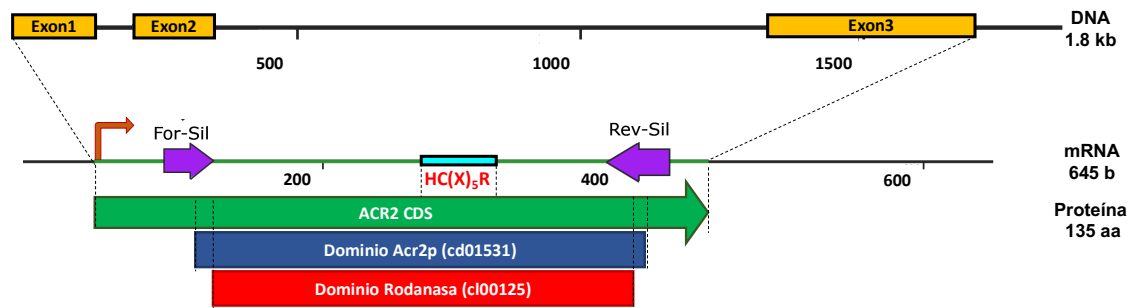


Figura 3. Estructura del gen LcACR2 y regiones conservadas de la proteína LcACR2. Se muestra la estructura del gen LcACR2, con una longitud total de 1.8 kb (No. de acceso: LOC109348364). En rectángulos amarillos se muestran las posiciones relativas de los exones. El mRNA de 645 nucleótidos (No. de acceso: XM_019588764.1). Se señalan el sitio de inicio de traducción (flecha naranja) y la localización de los oligonucleótidos usados para la clonación del fragmento de la región codificante (For-Sil y Rev-Sil; flechas moradas). Se muestra la secuencia de la enzima LcACR2 en flecha verde, la posición del motivo conservado HC(X)5R (cyan) y la ubicación de dos dominios importantes: el dominio Acr2p (cd01531) en recuadro azul y el dominio rodanasa (cl00125) en recuadro rojo. Autoría propia.

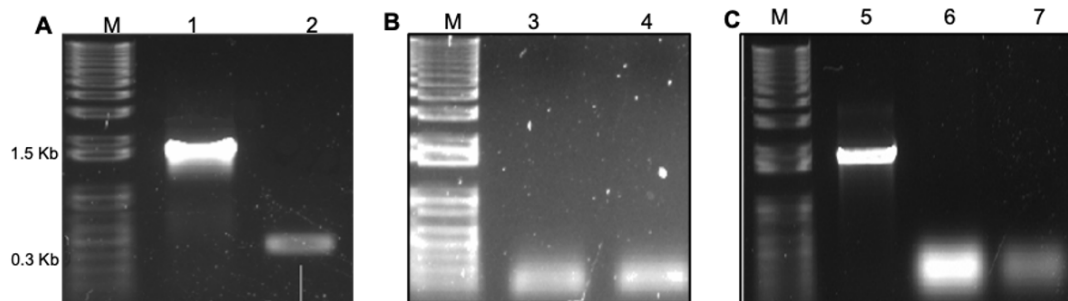


Figura 4. Clonación del fragmento del gen LcACR2. A) Amplificación del gen LcACR2 (fragmento de 350 pb) a partir de cDNA de plantas de *Lupinus campestris* cultivadas durante 6 días en medio MS 0.5X suplementado con 100 μ M de As(V). B) Amplificación del fragmento del gen LcACR2 en clones positivos obtenidos por reacción BP. C) Amplificación del gen LcACR2 en clones positivos generados mediante la reacción LR. M: marcador de tamaño molecular. 1 y 5: control positivo (amplificación del gen PHT1); 2: amplificación del fragmento de LcACR2; 3 y 4: clones positivos de la reacción BP; 6 y 7: clones positivos de la reacción LR. Autoría propia.

Referencias

- Altschul, S. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: A new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Research*, 25(17), 3389-3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>
- Appenroth, K.-J. (2010). What are "heavy metals" in Plant Sciences? *Acta Physiologiae Plantarum*, 32(4), 615-619. <https://doi.org/10.1007/s11738-009-0455-4>
- Bali, A. S., & Sidhu, G. P. S. (2021). Arsenic acquisition, toxicity and tolerance in plants - From physiology to remediation: A review. *Chemosphere*, 283, 131050. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.131050>
- Bordo, D., & Bork, P. (2002). The rhodanese/Cdc25 phosphatase superfamily: Sequence-structure-function relations. *EMBO Reports*, 3(8), 741-746. <https://doi.org/10.1093/embo-reports/kvf150>
- Capella-Gutiérrez, S., Silla-Martínez, J. M., & Gabaldón, T. (2009). trimAl: A tool for automated alignment trimming in large-scale phylogenetic analyses. *Bioinformatics*, 25(15), 1972-1973. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btp348>
- Chuan, M. C., Shu, G. Y., & Liu, J. C. (1996). Solubility of heavy metals in a contaminated soil: Effects of redox potential and pH. *Water, Air, and Soil Pollution*, 90(3-4), 543-556. <https://doi.org/10.1007/BF00282668>
- Del Moral, R., & Rozzell, L. R. (2005). Long-term Effects of *Lupinus lepidus* on Vegetation Dynamics at Mount St. Helens. *Plant Ecology*, 181(2), 203-215. <https://doi.org/10.1007/s11258-005-6627-4>
- Ghori, N.-H., Ghori, T., Hayat, M. Q., Imadi, S. R., Gul, A., Altay, V., & Ozturk, M. (2019). Heavy metal stress and responses in plants. *International Journal of Environmental Science and Technology*, 16(3), 1807-1828. <https://doi.org/10.1007/s13762-019-02215-8>
- Kwiatkowska, J. (2006). The effect of organic amendments on the phytoavailability of heavy metals in polluted soil. *Ecohydrology & Hydrobiology*, 6(1-4), 181-186. [https://doi.org/10.1016/S1642-3593\(06\)70141-0](https://doi.org/10.1016/S1642-3593(06)70141-0)
- Nabi, A., Naeem, M., Aftab, T., Khan, M. M. A., & Ahmad, P. (2021). A comprehensive review of adaptations in plants under arsenic toxicity: Physiological, metabolic and molecular interventions. *Environmental Pollution*, 290, 118029. <https://doi.org/10.1016/j.envpol.2021.118029>
- Nahar, N., Rahman, A., Moś, M., Warzecha, T., Algerin, M., Ghosh, S., Johnson-Brousseau, S., & Mandal, A. (2012). In silico and in vivo studies of an *Arabidopsis thaliana* gene, ACR2, putatively involved in arsenic accumulation in plants. *Journal of Molecular Modeling*, 18(9), 4249-4262. <https://doi.org/10.1007/s00894-012-1419-y>
- Nahar, N., Rahman, A., Nawani, N. N., Ghosh, S., & Mandal, A. (2017). Phytoremediation of arsenic from the contaminated soil using transgenic tobacco plants expressing ACR2 gene of *Arabidopsis thaliana*. *Journal of Plant Physiology*, 218, 121-126. <https://doi.org/10.1016/j.jplph.2017.08.001>
- Ortiz-Luevano, R., Rodríguez Zapata, LC y Sánchez-Calderón, L (2014) Transformación genética de raíces de *Lupinus campestris* mediada por *Rhizobium rhizogenes*, como un modelo de estudio frente a estrés por arsénico. Licenciatura. Universidad Autónoma de Zacatecas, Zacatecas, México.
- Preetha, J. S. Y., Arun, M., Vidya, N., Kowsalya, K., Halka, J., & Ondrasek, G. (2023). Biotechnology Advances in Bioremediation of Arsenic: A Review. *Molecules*, 28(3), 1474. <https://doi.org/10.3390/molecules28031474>
- Rascio, N., & Navari-Izzo, F. (2011). Heavy metal hyperaccumulating plants: How and why do they do it? And what makes them so interesting? *Plant Science*, 180(2), 169-181. <https://doi.org/10.1016/j.plantsci.2010.08.016>
- Salas-Luévano, M. A., Manzanares-Acuña, E., Letechipía-de León, C., & Vega-Carrillo, H. R. (2009). Tolerant and hyperaccumulators autochthonous plant species from mine tailing disposal sites. *Asian J Exp Sci*, 23(1), 27-32. Recuperado de: <http://ajesjournal.com/PDFs/09-1/4.%20Tolerant%20and%20hyperaccumulators.pdf>.
- Tamura, K., Stecher, G., & Kumar, S. (2021). MEGA11: Molecular evolutionary genetics analysis version 11. *Molecular biology and evolution*, 38(7), 3022-3027. <https://doi.org/10.1093/molbev/msab120>
- Wang, J., Chitsaz, F., Derbyshire, M. K., Gonzales, N. R., Gwadz, M., Lu, S., Marchler, G. H., Song, J. S., Thanki, N., Yamashita, R. A., Yang, M., Zhang, D., Zheng, C., Lanczycki, C. J., & Marchler-Bauer, A. (2023). The conserved domain database in 2023. *Nucleic Acids Research*, 51(D1), D384-D388. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac1096>



Yariv, B., Yariv, E., Kessel, A., Masrati, G., Chorin, A. B., Martz, E., Mayrose, I., Pupko, T., & Ben - Tal, N. (2023). Using evolutionary data to make sense of macromolecules with a "face - lifted" ConSurf. *Protein Science*, 32(3), e4582. <https://doi.org/10.1002/pro.4582>

