

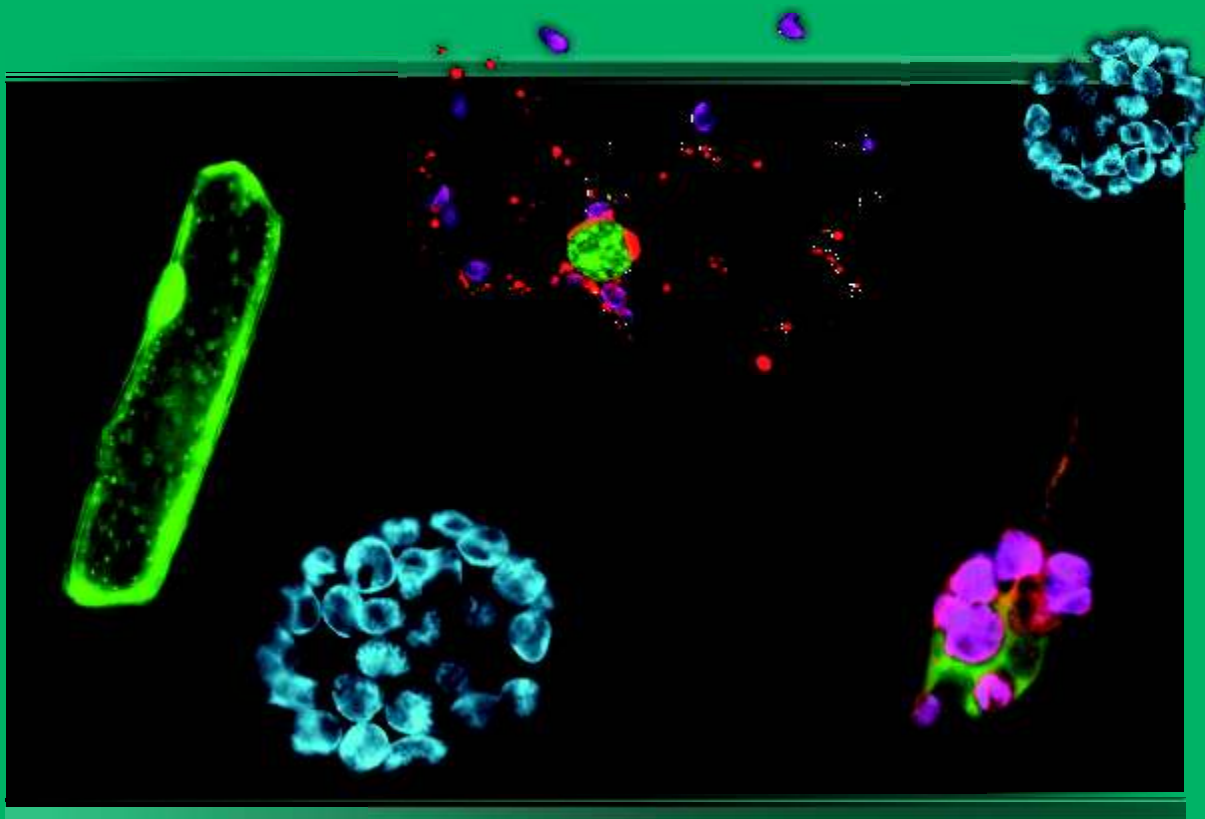
Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II

Editores:

Gabriela Levitus, Viviana Echenique,
Clara Rubinstein, Esteban Hopp y Luis Mroginski

ArgenBio 

Consejo Argentino para la Información
y el Desarrollo de la Biotecnología



■ Ediciones

Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria



Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II

Editores:

Dra. Gabriela Levitus,
Dra. Viviana Echenique,
Dra. Clara Rubinstein,
Dr. Esteban Hopp
Ing. Agr. Luis Mroginski.

Índice

Prefacio	6
Agradecimientos	7
Lista de Autores	7
Prólogo a la Primera Edición. Dr. Francisco García Olmedo	11
Prólogo a la Segunda Edición. Dr. Francisco García Olmedo	11
 Parte I: Herramientas Básicas	 15
 Capítulo 1: Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales. Luis Mroginski, Pedro Sansberro y Eduardo Flaschland	 17
Capítulo 2: Morfogénesis. Silvia Radice	26
Capítulo 3: La citogenética molecular e inmunocitogenética en el estudio de los genomas vegetales. Guillermo Seijo, Graciela I. Lavia, Germán Robledo, Aveliano Fernández y Viviana G. Solís Neffa.	34
Capítulo 4: Herramientas básicas de ingeniería genética. Ingrid Garbus, Marisa Gómez y Viviana Echenique.	47
Capítulo 5: Marcadores moleculares. María Carolina Martínez, Marcelo Helguera y Alicia Carrera.	70
Capítulo 6: Construcción de mapas de ligamiento genético, localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres de interés en plantas. Gerardo D. L. Cervigni, Juan Pablo A. Ortiz y Sergio E. Feingold.	86
Capítulo 7: Genómica. Viviana Echenique, Juan P. Selva, Mauro Meier, Pablo Roncallo y Gustavo Schrauf.	100
Capítulo 8: Transcriptómica. Silvina Pessino y Silvina Felitti.	121
Capítulo 9: Proteómica. Paula Casati y María F. Drincovich	136
Capítulo 10: Metabolómica. Fernando Carrari, Telma E. Scarpeci, Luciano A. Abriata, Alejandro J. Vila y Estela M. Valle.	146
Capítulo 11: Metagenómica. O. Mario Aguilar y Daniel H. Grasso.	157
Capítulo 12: Bioinformática aplicada a la biotecnología vegetal. Norma Paniego, Ruth Heinz, Paula Fernández, Verónica Lia, Corina Fusari.	170
 Parte II: Métodos para generar y analizar diversidad	 183
 Capítulo 1: Polinización y fertilización in vitro. Susana Cardone, Gladys Pérez Camargo y Aurora Picca.	 185
Capítulo 2: Hibridación somática. Pablo Polci y Pablo Friedrich.	197

Capítulo 3: Epigenética y evolución. Ricardo W. Masuelli y Carlos F. Marfil	211
Capítulo 4. Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING. Alberto Prina, Alejandra Landau, María Gabriela Pacheco y Esteban Hopp	217
Capítulo 5: Variación somaclonal. Susana Cardone, Sofía Olmos y Viviana Echenique.	229
Capítulo 6: Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal. Marina L. Díaz, Diego C. Zappacosta, Pascual M. Franzone y Raúl D. Ríos	243
Capítulo 7: Usos del silenciamiento génico para el análisis funcional de genes candidatos. Cecilia Vázquez Rovere, Ariel Bazzini, Cecilia Rodríguez, Natalia Almasia y Sebastián Asurmendi ..	259
Capítulo 8: Análisis de experimentos biológicos. Sofía Olmos, Miguel DiRenzo, Mercedes Ibáñez, Nélica Winzer	271
Capítulo 9: Métodos multivariados para estimar variabilidad genética. Nélica Winzer, Miguel DiRenzo, Sofía Olmos y Mercedes Ibáñez.	283
 Parte III: Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal	295
 Capítulo 1: Obtención de plantas doblehaploides. Pablo Polci, Verónica Conti y Rubén Miranda y Nicolás Gear.	297
Capítulo 2: Aplicaciones de los marcadores moleculares. Alicia Carrera, Gabriela Tranquilli, Antonio Garayalde y Marcelo Helguera.	311
Capítulo 3: Marcadores moleculares y mejoramiento genético de cultivos. Carlos Sala, Mariano Bulos, Analía Fresco y Emiliano Altieri.	325
Capítulo 4: Identificación y registro de variedades. Ana Laura Vicario, Marcelo Labarta y María Alicia Loray	339
 Parte IV: Métodos de propagación y conservación de germoplasma	351
 Capítulo 1: Micropropagación. Sofía Olmos, Gabriela Luciani y Ernestina Galdeano	353
Capítulo 2: Semilla sintética. Hebe Rey y Luis Mroginski	363
Capítulo 3: Conservación de germoplasma in vitro. Adriana Scocchi y Hebe Rey.	369
 Parte V: Ejemplos de aplicaciones de la biotecnología vegetal	377
 Capítulo 1: Aportes de la citogenética al estudio de genomas vegetales. Lidia Poggio, Graciela González, María Rosa Ferrari, Ana María García, Arturo Wulff, Eduardo Greizerstein, Pablo Tomas y Gustavo Schrauf.	379
Capítulo 2: Mejoramiento de plantas forrajeras en la era genómica. Germán Spangenberg, Mauro Meier y Viviana Echenique	389
Capítulo 3: Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura. Silvana C. Pessino y Juan Pablo A. Ortiz	403
Capítulo 4: Avances de la biotecnología en cultivos ornamentales. Alejandro S. Escandón, Pablo A. Marinangeli y Mariana Pérez de la Torre.	421

Capítulo 5: Aplicación de la biotecnología en la mejora y conservación de especies forestales. Susana Marcucci Poltri, Leonardo Gallo, Noga Zelener, Susana Torales, Sandra Sharry	435
Capítulo 6: Técnicas de ingeniería genética para conferir resistencia a virus en plantas. Mariana del Vas, Ana Julia Distéfano, Cecilia Vázquez-Rovere, Esteban H. Hopp.	447
Capítulo 7: Obtención de plantas resistentes a enfermedades bacterianas. Adrián Vojnov, Mercedes Rivero y Diego Zappacosta	457
Capítulo 8: Aproximaciones biotecnológicas para un manejo sustentable del estrés fúngico en la agricultura. Juan Carlos Díaz Ricci; Ursula Tonello; Gustavo Martínez-Zamora; Sergio Salazar; Nadia Chalfoun; Gabriel Vellicce; Carlos Grellet; Paula Filippone; Alicia Mamani; Marta Ontivero y Atilio Pedro Castagnaro.	467
Capítulo 9: Utilización de cultivos de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades. Vilma Conci.	481
Capítulo 10: Obtención de plantas resistentes a insectos. Dalia Lewi y Clara Rubinstein	495
Capítulo 11: Aplicaciones biotecnológicas al manejo de malezas. Germán Ferrari y Julio E. DeLucchi.	507
Capítulo 12: Obtención de plantas tolerantes a distintos tipos de estreses abióticos. Florencia del Viso, Andrea F. Puebla, Néstor Carrillo y Raquel L. Chan	519
Capítulo 13: Manipulación genética del metabolismo secundario en plantas. Alicia Zelada, María Binaghi	529
Capítulo 14: Mejoras de calidad en alimentos. Clara Rubinstein, Gabriela Levitus	539
Capítulo 15: Fitorremediación. María Eugenia Segretín, Paula Bey y Alejandro Mentaberry	545
Capítulo 16: Plantas como biorreactores. Fernando Bravo Almonacid, Sonia Wirth, María Eugenia Segretin, Mauro Morgenfeld, Ezequiel Matías Lentz.	559
 Parte VI: Manejo responsable de la tecnología	 569
 Capítulo 1: Criterios científicos para la evaluación de la bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados. Clara Rubinstein	 571
Capítulo 2: Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados - Marcos Regulatorios. Moisés Burachik	583
Capítulo 3: Flujo génico y su posible impacto ambiental. Mónica Poverene, Soledad Ureta y Agustina Gutiérrez.	595
Capítulo 4: Detección de OGM en la cadena agroalimentaria. Florencia Longo y Ana Vicario.	603
Capítulo 5: Manejo integrado de plagas – Programa de Refugios. Viviana Confalonieri y Cecilia Roca.	613
Capítulo 6: Resistencia de malezas a herbicidas: evolución y estrategias de manejo. Daniel Tuesca, Luisa Nisensohn, Mario R. Sabbatini, Guillermo Chantre.	621
 Parte VII: Biotecnología y sociedad	 631
 Capítulo 1: La transformación tecnológica y los nuevos desafíos. Carmen Vicién.	 633

Capítulo 2: Adopción de los cultivos genéticamente modificados en Argentina y en el mundo. Gabriela Levitus	639
Capítulo 3: Biotecnología en la mira: el problema de la percepción. Valeria Durand	643

PREFACIO

En oportunidad de la Primera Edición de “Biotecnología y Mejoramiento Vegetal”, nos habíamos propuesto responder a la necesidad de un texto en idioma español, dirigido a docentes y estudiantes de los cursos de Agronomía y de otras formaciones relacionadas con las tecnologías aplicadas al mejoramiento vegetal, así como brindar un recurso de información general y consulta para no especialistas. Esta Segunda Edición, intenta actualizar, profundizar y extender estas temáticas, atendiendo a la rápida evolución en este campo del conocimiento.

En el contexto de los principios básicos del mejoramiento, es decir, generar variabilidad genética y seleccionar características deseables, las tecnologías evolucionan rápidamente y, del mismo modo, se acelera la transferencia del conocimiento básico a las aplicaciones. Esta edición intenta reflejar este proceso dinámico y aportar información actualizada con ejemplos de aplicaciones al mejoramiento de diferentes especies vegetales.

En este trabajo se han reunido las contribuciones de investigadores y especialistas en diferentes campos relacionados con el mejoramiento. En las secciones dedicadas a las herramientas básicas, se ha hecho foco en las técnicas de cultivo de tejidos y micropropagación que se utilizan en sí mismas para generar variabilidad, conservar germoplasma, producir clones libres de enfermedades o como paso obligado en la construcción de plantas transgénicas. En la sección que se ocupa de las aplicaciones de estas técnicas a casos específicos, se brindan ejemplos de mejoramiento logrado en diferentes especies.

La tecnologías “ómicas” (genómica, transcriptómica, metabolómica) constituyen una de las herramientas más importantes en el mejoramiento, por la potencialidad que presentan, tanto en el campo de la investigación básica, en el mapeo de genes y la identificación de marcadores moleculares, como en la identificación de funciones y redes regulatorias que influyen en las características que se desean mejorar: resistencia a enfermedades y plagas, rendimiento, calidad nutricional y respuestas a diferentes tipos de estrés ambiental, entre otras.

Es claro que dentro de las tecnologías de mejoramiento, la transgénesis o transformación genética es una de las herramientas más versátiles y poderosas, ya que permite resolver problemas que por vía del mejoramiento convencional no sería posible enfrentar. En esta edición se presentan numerosos ejemplos de transgénesis para la obtención de cultivos tolerantes a estrés biótico y abiótico, a plagas y enfermedades o con mejoras en su calidad nutricional.

Desde 1996, cuando se cultivaron por primera vez, la superficie mundial de cultivos transgénicos aumentó 80 veces, alcanzando las 134 millones de hectáreas en 2009. Según el último informe del ISAAA (Servicio Internacional para las Adquisiciones Agrobiotecnológicas) estas hectáreas fueron cultivadas por 14 millones de agricultores de 25 países, siendo Argentina uno de los líderes en adopción, con el 16% del área global.

Por otro lado, es importante notar que se han establecido sistemas de control a nivel internacional para regular el desarrollo y la aplicación de la ingeniería genética al mejoramiento de organismos vivos (conocidos como organismos genéticamente modificados u OGMs). Si bien éstos no se limitan a plantas, en este trabajo se presentan sólo los aspectos regulatorios y de bioseguridad relacionados con los cultivos transgénicos.

Esperamos que esta nueva edición constituya una herramienta útil y accesible para docentes, estudiantes y profesionales que se dedican y se dedicarán a la noble tarea de mejorar la agricultura.

Los Editores

AGRADECIMIENTOS

A todos y cada uno de los 141 autores, en su mayoría investigadores y profesionales de instituciones argentinas, que han contribuido con sus aportes.

Al Dr. Francisco García Olmedo, reconocido investigador y catedrático español, por regalarnos también el prólogo de esta segunda edición.

Al Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio), por auspiciar la publicación del libro.

A los revisores, colegas y personal de apoyo, por sus valiosas contribuciones para concretar este proyecto.

Los Editores

El uso de fuentes y nombres comerciales en este documento es sólo para fines de identificación y no implica ningún aval ni recomendación. Además, los contenidos u opiniones expresadas en esta publicación son de exclusiva responsabilidad de los autores.

LISTAS DE AUTORES (por orden alfabético)

Abriata	Luciano A.	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Aguilar	O. Mario	IBBM, Facultad de Ciencias Exactas, UNLP
Almasia	Natalia	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Altieri	Emiliano	Nidera Semillas
Asurmendi	Sebastián	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Bazzini	Ariel	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Bey	Paula	INGEBI, CONICET
Binaghi	María	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
Bravo Almonacid	Fernando	INGEBI, CONICET
Bulos	Mariano	Nidera Semillas
Burachik	Moisés	Dir. de Biotecnología, Min. de Agricultura, Ganadería y Pesca
Cardone	Susana	Facultad de Agronomía, UBA
Carrari	Fernando	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Carrera	Alicia	Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur
Carrillo	Néstor	IBR - Facultad de Cs Bioquímicas y Farmaceuticas, UNR
Casati	Paula	CEFOBI, Universidad Nacional de Rosario
Castagnaro	Atilio Pedro	EEAOC, Tucumán
Cervigni	Gerardo D.	CEFOBI, Universidad Nacional de Rosario
Chalfoun	Nadia	INSIBIO, CONICET, Universidad Nacional de Tucumán
Chan	Raquel L.	Universidad Nacional del Litoral
Chantre	Guillermo	CERZOS, CONICET, Universidad del Sur
Conci	Vilma	INTA – IFFIVE
Confalonieri	Viviana	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA)
Conti	Verónica	INTA-EEA Bordenave
del Vas	Mariana	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
del Viso	Florencia	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Delucchi	Julio E.	Monsanto Argentina

Díaz	Marina L.	CERZOS, CONICET, Universidad del Sur
Díaz Ricci	Juan Carlos	INSIBIO, CONICET, Universidad Nacional de Tucumán
DiRienzo	Miguel	Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de Córdoba
Distéfano	Ana Julia	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Drincovich	María F.	CEFOBI, Universidad Nacional de Rosario
Durand	Valeria	Ketchum Argentina - ArgenBio
Echenique	Viviana	Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur
Escandón	Alejandro S.	Instituto de Floricultura, INTA Castelar
Feingold	Sergio E.	INTA - EEA Balcarce
Felitti	Silvina	Universidad Nacional de Rosario
Fernández	Aveliano	Fac. Cs Exactas y Naturales y Agrimensura UNNE IBONE
Fernández	Paula	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Ferrari	Germán	Monsanto Argentina
Ferrari	María Rosa	Universidad Nacional de Buenos Aires
Filippone	Paula	EEAOC, Tucumán
Flaschland	Eduardo	Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) – IBONE
Franzone	Pascual M.	IGEAF INTA Castelar
Fresco	Analía	Nidera Semillas
Friedrich	Pablo	Universidad Nacional del Sur
Fusari	Corina	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Galdeano	Ernestina	Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) – IBONE
Gallo	Leonardo	INTA - EEA Bariloche
Garayalde	Antonio	CERZOS, CONICET, Universidad Nacional del Sur
Garbus	Ingrid	CERZOS, CONICET, Universidad Nacional del Sur
García	Ana María	Facultad de Agronomía, UBA
García Olmedo	Francisco	Universidad Politécnica de Madrid
Gear	Nicolás	Syngenta
Gómez	Marisa	CERZOS, CONICET, Universidad Nacional del Sur
González	Graciela	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
Grasso	Daniel H.	Instituto de Suelos, INTA Castelar
Greizerstein	Eduardo	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales UBA
Grellet	Carlos	INSIBIO, CONICET, Universidad Nacional de Tucumán
Gutiérrez	Agustina	Universidad Nacional del Sur
Heinz	Ruth	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Helguera	Marcelo	INTA EEA Marcos Juárez
Hopp	Esteban	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Ibáñez	Mercedes	Universidad Nacional de Río Cuarto
Labarta	Marcelo	Instituto Nacional de Semillas – INASE
Landau	Alejandra	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Lavia	Graciela I.	Fac. de Cs Exactas y Naturales y Agrimensura UNNE, IBONE
Lentz	Ezequiel M.	INGEBI, CONICET
Levitus	Gabriela	ArgenBio
Lewi	Dalia	IGEAF INTA Castelar
Lia	Verónica	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Longo	Florencia	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Loray	María Alicia	Dirección de Calidad - INASE
Luciani	Gabriela	CERZOS, CONICET, Universidad Nacional del Sur
Mamani	Alicia	INSIBIO, CONICET, Universidad Nacional de Tucumán
Marcucci Poltri	Susana	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Marfil	Carlos F.	INTA - EEA Mendoza
Marinangeli	Pablo A.	CERZOS, CONICET, Universidad Nacional del Sur
Martínez	Ma. Carolina	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar

Martínez-Zamora	Gustavo	INSIBIO, CONICET, Universidad Nacional de Tucumán
Masuelli	Ricardo W.	INTA - EEA Mendoza
Meier	Mauro	CERZOS, CONICET, Universidad Nacional del Sur
Mentaberry	Alejandro	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
Miranda	Rubén	Asociación Cooperativas Argentinas (ACA), Univ. del Sur
Morgenfeld	Mauro	INGEBI, CONICET
Mroginski	Luis	Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) – IBONE
Nisensohn	Luisa	Universidad Nacional de Rosario
Olmos	Sofía	Laboratorio de Biotecnología, INTA Pergamino
Ontivero	Marta	INSIBIO, CONICET, Universidad Nacional de Tucumán
Ortiz	Juan Pablo	Facultad de Ciencias Agrarias, UNR
Pacheco	Ma. Gabriela	IGEAF INTA Castelar
Paniego	Norma	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Pérez Camargo	Gladys	Facultad de Agronomía, UBA
Pérez de la Torre	Mariana	Instituto de Floricultura, INTA Castelar
Pessino	Silvina C.	Facultad de Ciencias Agrarias, UNR
Picca	Aurora	Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur
Poggio	Lidia	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
Polci	Pablo	Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur
Poverene	Mónica	Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur
Prina	Alberto	IGEAF INTA Castelar
Puebla	Andrea F.	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Radice	Silvia	INTA Castelar
Rey	Hebe	Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) - IBONE
Ríos	Raúl D.	IGEAF INTA Castelar
Rivero	Mercedes	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
Robledo	Germán	Fac. de Cs Exactas y Naturales y Agrimensura UNNE, IBONE
Roca	Cecilia	Dow Agrosiences
Rodríguez	Cecilia	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar
Roncallo	Pablo	CERZOS, CONICET
Rubinstein	Clara	Monsanto Argentina – ILSI
Sabbatini	Mario R.	CERZOS, CONICET, Universidad Nacional del Sur
Sala	Carlos	Nidera Semillas
Salazar	Sergio	INSIBIO, CONICET, Universidad Nacional de Tucumán
Sansberro	Pedro	Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) - IBONE
Scarpeci	Telma E.	IBR - Facultad de Cs Bioquímicas y Farmaceuticas, UNR
Schrauf	Gustavo	Facultad de Agronomía, UBA
Scocchi	Adriana	Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) - IBONE
Segretin	Ma. Eugenia	INGEBI, CONICET
Seijo	Guillermo	Fac. de Cs Exactas y Naturales y Agrimensura UNNE, IBONE
Selva	Juan P.	CERZOS, CONICET, Universidad Nacional del Sur
Sharry	Sandra	Facultad de Agronomía, Universidad Nacional de La Plata
Solís Neffa	Viviana G.	Facultad de Ciencias Agrarias (UNNE) – IBONE
Spangenberg	Germán	Victorian Department of Primary Industries (DPI)
Tomas	Pablo	FCA, Universidad Nacional del Litoral
Tonello	Ursula	INSIBIO, CONICET, Universidad Nacional de Tucumán
Torales	Susana	IRB, INTA Castelar
Tranquilli	Gabriela	IRB, INTA Castelar
Tuesca	Daniel	Facultad de Ciencias Agrarias, UNR
Ureta	Soledad	CERZOS, CONICET, Universidad Nacional del Sur
Valle	Estela M.	IBR - Facultad de Cs Bioquímicas y Farmaceuticas, UNR
Vázquez Rovere	Cecilia	Instituto de Biotecnología, INTA Castelar

Vellicce	Gabriel	EEAOC, Tucumán
Vicario	Ana Laura	Dirección de Calidad – INASE
Vicién	Carmen	Facultad de Agronomía, UBA
Vila	Alejandro J.	IBR - Facultad de Cs Bioquímicas y Farmaceuticas, UNR
Vojnov	Adrián	Fundación Pablo Cassará
Winzer	Nélida	Universidad Nacional del Sur
Wirth	Sonia	INGEBI, CONICET
Wulff	Arturo	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
Zappacosta	Diego C.	Departamento de Agronomía, Universidad Nacional del Sur
Zelada	Alicia	Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, UBA
Zelener	Noga	IRB, INTA Castelar

PRÓLOGOS

Prólogo a la primera edición

Recientemente, un periodista, que compartía una ensalada con un biólogo, exclamó: ¡Si yo sólo aspiro a que la lechuga que yo tenga que consumir no tenga genes! Cuando el biólogo le explicó que al comer ésta no había más opción que engullir unos 25.000 genes del genoma de *Lactuca sativa* y varios miles de genes adicionales correspondientes a los genomas de los microorganismos que habitual y cómodamente habitan en la superficie de las turgentes hojas, el periodista quedó atónito.

Según un eurobarómetro de hace unos meses, más de dos tercios de los europeos estaban en contra de los alimentos transgénicos. Sin embargo, en la misma encuesta se incluía una aseveración - los tomates normales no tienen genes, los transgénicos sí - frente a la que también más de dos tercios de los encuestados se mostraban de acuerdo o confesaban su ignorancia. Es una lástima que dicho eurobarómetro no registrara la proporción correspondiente al encabezamiento “no saben, pero sí contestan”, aunque es fácil colegir que dicha fracción era alta y en extremo vergonzante.

Los avances del conocimiento biológico y de la biotecnología destacan en el panorama científico-técnico de este fin de siglo y han impregnado las más diversas vertientes de nuestra vida cotidiana sin que se haya aceptado que un mínimo de estos conocimientos debería formar parte integral de la cultura general. La ignorancia de los hechos básicos relativos a nuestra herencia genética o a nuestra alimentación se considera incluso de buen tono. Esto se refleja de entrada en el caos semántico que se ha creado en torno a la biotecnología, del que hay que culpar no sólo a la ignorancia del ciudadano sino también a la torpeza de los científicos y a la dictadura de los medios de comunicación. Es preciso despejar este caos si queremos entendernos a partir de la ciencia, y no a sus espaldas.

Términos tales como organismos genéticamente modificados (OGMs), alimentos transgénicos, ingeniería genética, ADN recombinante, transferencia génica, clonación, alimentos naturales, mejora genética e, incluso, biotecnología, han invadido nuestro lenguaje cotidiano sin orden ni concierto. A estas alturas empieza a ser difícil normalizar la situación, pero tratemos de contribuir a ello.

La definición de biotecnología abarca a todas las tecnologías mediadas por un ser vivo o por partes de él, sean éstas células o enzimas aisladas. Bajo esta definición se incluyen desde la propia agricultura, inventada hace diez milenios, y la fabricación de las veinticuatro clases de cerveza mesopotámica, que tanto gustaban a Nabucodonosor, hasta la última forma de producir

insulina humana. No es apropiado, por tanto, usar el término de forma restringida para referirse exclusivamente a los últimos avances basados en la biología molecular. Para esto último resulta más adecuado el uso de la expresión “biotecnología molecular”.

Prácticamente la totalidad de lo que ponemos en nuestra mesa ha sido genéticamente modificado. La domesticación de plantas y animales supuso una alteración muy drástica de sus genomas y la mejora genética subsiguiente ha ido añadiendo modificaciones extensas y sustanciales. Lo importante es la naturaleza de los cambios introducidos y no los métodos empleados para ello. De hecho, la ingeniería genética es sólo uno de esos métodos - una modalidad más de mejora genética - y sólo sirve para modificar uno o pocos genes de forma muy selectiva. No serviría para obtener razas de perro tan distintas - en su tamaño, morfología y temperamento - como el Chihuahua y el Pit Bull Terrier, que en cambio han surgido de la mano del hombre gracias a los métodos genéticos más tradicionales. En consecuencia, resulta absurdo denominar OGMs sólo a los productos de la ingeniería genética para contraponerlos a los supuestamente “naturales”.

Casi nada de lo que ponemos en nuestra mesa es natural, hasta el punto que la mayoría de los organismos de los que derivamos nuestro alimento han perdido su capacidad de sobrevivir por sí mismos en la naturaleza. Es más, para llegar a nuestra mesa han debido sufrir alteraciones genéticas que les priven de infinidad de sustancias naturales que son tóxicas o inhibitorias para el ser humano. Una variedad moderna, modificada por ingeniería genética, está tan lejos de ser natural como las que la precedieron. ¡Por fortuna! Ya que es obvio que natural no es sinónimo de inocuo.

Se consideran organismos transgénicos aquellos cuyo genoma ha sido alterado por ingeniería genética o, si se prefiere, por sastrería genética, ya que las operaciones fundamentales de esta vía experimental consisten en cortar y coser (unir) piezas de ADN. Un gen es un tramo de ADN (una secuencia construida con las bases A, T, G, C) que, en general, determina una proteína (una secuencia de aminoácidos), de acuerdo con las equivalencias plasmadas en la clave genética. Mediante la nueva tecnología se puede alterar un genoma por la adición de uno o varios (pocos) genes que previamente no formaban parte de él o por la inutilización de uno o varios genes entre los ya existentes. Estas operaciones se hacen para conferir caracteres deseables y para eliminar caracteres indeseables del organismo, respectivamente, objetivos que no difieren de los de la mejora genética tradicional.

En lo que difieren la vieja y la nueva tecnología es en el repertorio génico que se puede manejar - genes de la misma especie, en el caso de la vieja, y de cualquier especie, en el de la nueva - y en el modo de introducir y transferir la modificación genética, por vía sexual o por adición exógena (transformación), respectivamente. Los organismos modificados por transformación se suelen denominar transgénicos. Llamar transgénicos a los alimentos derivados de dichos organismos resulta menos apropiado porque, como dice el refrán, “degradado es todo gen que entra por boca de cristiano”. Es absurdo llamar transgénico al azúcar procedente de una remolacha transgénica, ya que es un producto químico puro, esencialmente indistinguible del aislado de la remolacha normal o de la caña de azúcar.

Con acertado criterio, los editores de esta obra han adoptado un tratamiento integral de todos los métodos, objetivos y logros de la alteración genética de las plantas con fines prácticos. Faltan en nuestro idioma obras que acerquen con rigor a una parte tan importante de nuestra cultura general. Las adaptaciones a los nuevos avances de textos preexistentes, hechas a menudo por un único autor, suelen adolecer de falta de familiaridad con la nueva tecnología. De aquí que la aproximación adoptada en esta obra, según la cual cada capítulo está a cargo de verdaderos especialistas, sea la más apropiada en la actualidad.

Dr. Francisco García Olmedo, 2004

Prólogo a la segunda edición

La buena fortuna de un libro lleva aparejada la esclavitud de su autor o autores, que quedan encadenados a la necesidad de mantenerlo vivo en sucesivas ediciones. Estamos ante la segunda edición de “Biotecnología y Mejoramiento Vegetal”, un texto que, hace seis años, supuso una espléndida y afortunada aportación a la recensión de un área tecno-científica en vigorosa ebullición y de gran relevancia práctica. La necesidad de esta edición surge de múltiples circunstancias, entre las que cabe resaltar el enorme avance del conocimiento que ha tenido lugar, la redefinición de los retos entonces planteados y la aparición de otros nuevos que han diversificado los objetivos prácticos de la disciplina. Además, entre la aparición de la primera edición y la de esta segunda, ha ocurrido una crisis alimentaria significativa que no es separable de otras, tales como la económica, la climática o la energética.

Según todos los indicios, la crisis alimentaria va a ser duradera y obedece a factores múltiples: la subida del precio del petróleo, el bajo nivel de reservas, la especulación, el incremento de la población y del consumo per capita, el desvío de una parte sustancial de la producción agraria hacia la fabricación de biocombustibles, la disminución de los rendimientos por el estrés debido al cambio climático y la falta de inversión en innovación agropecuaria. Parece como si el éxito relativo de las últimas décadas hubiera hecho bajar la guardia.

En particular, la tasa de crecimiento de la producción de alimentos ha ido por detrás de la del crecimiento de la población durante la última década, justo el tipo de comportamiento relativo que propuso Malthus hace más de dos siglos. En el último medio siglo, ha sido la mejora genética la que ha tenido el protagonismo técnico en la derrota de la amenaza maltusiana, ya que la superficie de suelo laborable apenas ha crecido. En la actualidad, se ha adquirido de pronto conciencia de que no se sabe bien cómo se va a conseguir el aumento de la producción de alimentos en un 70-100 % para el año 2050, necesidad que se considera mínima para alimentar una población proyectada de unos 9.000 millones de seres humanos que, además, tendrán una demanda per cápita significativamente superior a la actual. Si se quiere lograr dicho objetivo, habremos de ser aún más eficaces en las próximas décadas de lo que lo hemos sido en las precedentes.

Por supuesto, las respuestas a los retos planteados ni han sido ni serán exclusivamente técnicas, pero todas las estrategias posibles han tenido y tendrán un importante componente técnico y es sobre este componente sobre el que se centra el libro que ahora se reedita.

El cambio climático está alterando los estreses bióticos y abióticos a que deben hacer frente las cosechas, lo que hace prioritaria la investigación básica y aplicada tanto en el esclarecimiento de los mecanismos involucrados como en la adaptación de las cosechas tradicionales a las nuevas condiciones, así como el desarrollo de nuevas cosechas que sean más apropiadas para condiciones extremas.

La crisis energética ha impulsado un nuevo interés por los biocombustibles, en los que se han centrado algunas esperanzas infundadas que han dado lugar a la formulación de objetivos políticos que pueden tener consecuencias perjudiciales para la alimentación mundial. Así por ejemplo, los objetivos declarados para fechas próximas, tanto por lo EEUU como por la UE, están determinando una competencia por el suelo agrícola de la generación de biocombustibles con la producción de alimentos que no puede sino encarecer significativamente los alimentos y aumentar el número de hambrientos en el mundo, así como contribuir a la destrucción de bosque tropical. Por otra parte, La búsqueda de especies y variedades aptas para la producción de biocombustibles plantea retos formidables a la investigación de su agronomía y a su mejora convencional y biotecnológica.

Es en el escenario que a grandes rasgos acabamos de esbozar, donde la presente edición de “Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II” manifiesta su pleno potencial y debe alcanzar su máxima funcionalidad.

Dr. Francisco García Olmedo, 2010

PARTE I

Herramientas básicas

I - CAPÍTULO 1

Establecimiento de cultivos de tejidos vegetales

Luis Mroginski, Pedro Sansberro y
Eduardo Flaschland

1 Introducción

El cultivo de tejidos —en su acepción amplia— puede ser definido como un conjunto muy heterogéneo de técnicas que presentan en común el hecho de que un explante (una parte separada del vegetal que pueden ser protoplastos —células desprovistas de pared celular— células, tejidos u órganos) se cultiva asépticamente en un medio artificial de composición química definida y se incuba en condiciones ambientales controladas. La imprecisión de esta definición puede generar muchas polémicas, pero es actualmente aceptada. Generalmente es común dividir las técnicas del cultivo de tejidos en dos grandes grupos: a) cultivos en medios semisólidos y b) cultivos en medios líquidos, los que a su vez pueden ser agitados (mediante el empleo de agitadores de uso continuo) o estacionarios. También es frecuente dividir al cultivo de tejidos atendiendo a los niveles de complejidad en cultivo de órganos, cultivos celulares y cultivo de protoplastos. Para el establecimiento de los cultivos utilizando cualquiera de los sistemas es necesario tener en cuenta algunos aspectos generales comunes relacionados con el explante, la asepsia, el medio de cultivo y las condiciones de incubación. La discusión de estos aspectos constituye el objetivo de este capítulo. Adicionalmente se incluye el tema de la aclimatación de las plantas regeneradas *in vitro*, que es de gran importancia en la mayoría de las aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura.

2 Explante

Varios factores deben ser tenidos en cuenta en la elección del explante apropiado para el establecimiento de los cultivos *in vitro*, entre ellos:

1. Objetivo del cultivo: si bien es difícil tratar de clasificar las aplicaciones que se persiguen con el cultivo de tejidos, se podría esquematizarlas en aplicaciones para:

- *Estudios básicos.* En este caso, los explantes cultivados pueden ser diversos. Si lo único que se quiere lograr es un sistema de callos para estudiar algún proceso fisiológico, se puede cultivar cualquier órgano, tejido o célula viva. En este caso —en que lo único que se busca es la inducción de callos— lo ideal es cultivar explantes jóvenes, derivados de semillas en germinación, donde se obtienen respuestas rápidas y, en general, hay menores problemas de contaminación con microorganismos. A veces se hace uso del cultivo de tejidos porque representa un sistema experimental que simplifica la complejidad generada por los fenómenos de correlación entre las distintas partes que normalmente están presentes en una planta entera. El explante que se usará estará condicionado por lo que se quiere estudiar. Un buen ejemplo lo constituye el cultivo de ovarios fecundados del tomate para estudiar los requerimientos nutricionales durante el crecimiento de los frutos. Asimismo, el cultivo de óvulos ha sido muy útil para estudiar aspectos relacionados con la formación de las fibras en algodón. El cultivo de discos de tallos brindó una valiosa ayuda para estudiar la rizogénesis *in vitro*.

- *Obtención de plantas con sanidad controlada.* Es muy común la utilización del cultivo de tejidos para la obtención de plantas libres de virus (ver VIII.-9). El explante ideal para ello es el meristema (dependiendo de la especie, de 0,2-0,5mm de longitud) consistente del domo y de un par de primordios foliares.

- *Micropropagación.* En este caso dependerá del sistema que se quiere utilizar. Si lo que se quiere explotar es la brotación de meristemas, los ápices terminales y los segmentos uninodales de ramas jóvenes constituyen excelentes explantes. En este caso el cultivador de tejidos debe conocer perfectamente la biología de la reproducción de la planta para aprovechar aquellos explantes que en forma natural son propágulos. En cambio, si se pretende micropropagar mediante el empleo de semillas sintéticas (ver Parte IV, capítulo 2) el explante original deberá posibilitar la inducción

de la embriogénesis somática. En este caso, la utilización de embriones zigóticos inmaduros u hojas, suelen ser frecuentes como explantes.

- **Obtención de híbridos interespecíficos.** Una de las primeras aplicaciones del cultivo de tejidos en la agricultura lo constituyó su empleo como ayuda para la obtención de híbridos derivados de cruzamientos interespecíficos, donde se produce el aborto temprano de embriones. En estos casos, el explante cultivado es el embrión cigótico en estadios tempranos de su desarrollo. Con la misma finalidad también se utilizan ovarios u óvulos fecundados.

- **Obtención de plantas de semillas con embriones rudimentarios.** Para esta finalidad los explantes pueden ser semillas (por ej. orquídeas) o bien, se aíslan los embriones en un estado temprano de desarrollo («corazón») como en el caso de yerba mate o de algunas variedades de duraznero.

- **Obtención de plantas haploides** (considerando como haploide a un esporofito que contiene el complemento gamético de cromosomas). En este caso, los explantes más utilizados son las anteras, aunque también pueden emplearse microsporas aisladas, óvulos y ovarios no fertilizados.

- **Inducción de variación somaclonal.** En este caso se pueden utilizar varios explantes, pero si la finalidad de su utilización es la aplicación en planes de mejoramiento genético de plantas, los explantes utilizados deben posibilitar la regeneración de plantas enteras.

- **Producción y/o conversión de sustancias útiles.** Se puede utilizar una gran variedad de explantes. Los de raíces suelen ser muy utilizados.

- **Obtención de híbridos somáticos.** Para esta finalidad se recurre a la fusión de protoplastos. En la mayoría de los casos se aíslan los protoplastos de mesófilos de hojas y de suspensiones celulares.

- **Conservación e intercambio de germoplasma.** Los meristemas son los explantes preferidos para el desarrollo de sistemas de conservación a mediano y largo plazo (crioconservación con nitrógeno líquido) y para el intercambio de material genético.

- **Establecimiento de suspensiones celulares.** En este caso se recomienda iniciar los cultivos a partir de explantes extraídos de semillas en germinación (hipocótilo, epicótilo, cotiledones, raíces).

2. Posibilidad de contaminación con microorganismos. De ser posible, se deben cultivar explantes de plantas donantes que crecen en condiciones de invernadero, con ello se reduce sustancialmente las tasas de contaminación. Por otra parte, es recomendable evitar el uso de «explantes sucios» (raíces, rizomas) que provienen de plantas crecidas en macetas o en el campo, dado que en la mayoría de los casos no es posible conseguir una buena desinfección de los mismos.

3. Edad fisiológica. Este es un aspecto de gran influencia en la morfogénesis. Como regla general se puede decir que cuando más joven e indiferenciado se encuentre el explante a cultivar, mejor será su respuesta *in vitro*. Es por ello que los meristemas apicales y axilares son ampliamente usados en numerosas especies. En el caso de la micropropagación de plantas leñosas, la edad del explante es un factor crítico. Si los tejidos son jóvenes, la micropropagación tiene mayores posibilidades de ser exitosa que con tejidos maduros. Este hecho genera la necesidad de realizar tratamientos de rejuvenecimiento de las plantas donantes de explantes.

4. Tamaño. En general, cuanto más grande sea el explante mayores serán las posibilidades de inducir la proliferación de callos o la regeneración directa de órganos. Sin embargo, a mayor tamaño de explante también son mayores las probabilidades de que los cultivos se contaminen con microorganismos. También es necesario tener en cuenta que existe un tamaño mínimo del explante, que depende de la especie y del material vegetal, por debajo del cual no es fácil lograr el establecimiento de los cultivos. Los explantes muy pequeños suelen requerir del empleo de medios más complejos o de los denominados medios acondicionados.

5. Época del año. Es un factor que suelen tener mucha importancia en la micropropagación y que generalmente está asociado al

grado de dormición que presentan ciertos explantes (yemas, por ejemplo) y también con la posibilidad de mayor o menor proliferación de microorganismos.

3 Asepsia

Uno de los principales problemas que se presentan cuando se tratan de establecer los cultivos es el de la contaminación de los mismos con diversos tipos de microorganismos (hongos, levaduras, bacterias, fitoplasmas, virus). El ambiente generado por explante-medio de cultivo-condiciones físicas de incubación es altamente propicio para la proliferación de muchos de estos microorganismos que pueden provocar la destrucción de los cultivos. Es difícil cuantificar el impacto de estas pérdidas, pero en promedio, en laboratorios dedicados a la micropropagación se lo puede estimar en alrededor del 10%. En el mejor de los casos, estos microorganismos no destruyen los cultivos pero compiten con el explante por los nutrientes del medio de cultivo o bien lo modifican. Es muy difícil conseguir cultivos estrictamente asépticos dado que en la mayoría de los casos es altamente probable que los mismos contengan virus y fitoplasmas, por lo que en la práctica, cuando se refiere a cultivos asépticos, en general se quiere significar que son cultivos donde no se produce la proliferación de hongos y bacterias.

Dos son las fuentes de contaminaciones: a) microorganismos presentes en el interior o en la superficie de los explantes y b) fallas en los procedimientos de cultivo en el laboratorio. La correcta detección de estas fuentes y del tipo de microorganismo son aspectos importantes para el éxito de los cultivos, pues por un lado ayuda a determinar la fuente de contaminación y por otro lado, ayuda a la planificación de los procedimientos para controlarlos. Varios géneros de bacterias (*Pseudomonas*, *Xanthomonas*, *Erwinia*, *Enterobacter*, *Agrobacterium*, *Bacillus*, *Micrococcus*, *Staphylococcus*, *Lactobacillus*, *Mycobacterium*, *Corynebacterium*) y de hongos filamentosos (*Aspergillus*, *Penicilium*, *Fusarium*, *Alternaria*, *Cladosporium* y *Neurospora*) están frecuentemente en los cultivos. Es conveniente inspeccionar visualmen-

te —con la ayuda de un microscopio estereoscópico— los cultivos en forma periódica (por lo menos semanalmente). También se pueden realizar pruebas con medios de cultivo diferenciales y «test» bioquímicos específicos.

Para evitar y/o minimizar las contaminaciones de los cultivos con microorganismos es necesario:

1) Conocer el material vegetal con que se trabaja y los posibles contaminantes específicos.

2) Realizar una adecuada preparación de la planta dadora de explantes, cultivándola preferentemente en invernaderos tratadas con productos químicos que eliminen patógenos y eventuales microorganismos endófitos.

3) Proceder a la desinfección superficial de los explantes mediante el uso de compuestos químicos con el objeto de eliminar los microorganismos con el menor daño posible para el explante. Si bien no es posible recomendar un procedimiento general, se puede señalar que el procedimiento más popularizado consiste en una doble desinfección mediante la inmersión de los explantes en etanol (70%v/v) durante 20-60 segundos seguido de hipoclorito de sodio 1 -3%, contenido en el agua de lavandina comercial, durante 3 a 30 minutos, dependiendo de la naturaleza del explante. Algunos procedimientos se basan en el empleo de únicamente etanol o de hipoclorito de sodio. Finalmente, es necesario eliminar los restos de estos productos mediante varios lavados con agua destilada estéril.

En este último punto hay que aconsejar que se utilice agua destilada estéril de reciente preparación, dado que está demostrado que el almacenaje prolongado del agua estéril puede ser la causa de contaminaciones con bacterias. Es aconsejable realizar estas operaciones de desinfección superficial en una cámara de transferencia con aire estéril. En lugar del hipoclorito de sodio se puede utilizar hipoclorito de calcio (6 -12 %) o el cloruro de mercurio (0,1%- 1,5%). Es preciso recomendar extrema cautela con el empleo de este último compuesto, dado que es altamente tóxico y además no es removido con facilidad del explante.

En los casos en que no se utilice etanol, la adición de agentes tensoactivos junto con el desinfectante es una práctica recomendada. Entre los más usados figuran Tween-20 (0,01 – 0.1%) o unas gotas de Triton. El lavado previo de los explantes con agua corriente y detergentes, ayuda a una mejor desinfección. La inmersión de los explantes en soluciones conteniendo sustancias antibióticas y /o antimicóticas (gentamicina, sulfato de estreptomicina, ampicilina, tetraciclina, carbenicilina, sulfato de gentamicina, pentacloronitrobenzoceno, rifampicina, anfotericina B, benomil, carbendazim) puede ser de utilidad, pero deben ser utilizados en casos excepcionales. Estos productos tienen el inconveniente de que alteran la composición de los medios de cultivo y además pueden ser metabolizados por los explantes.

Últimamente han aparecido soluciones biocidas que matan bacterias y hongos, previenen la germinación de esporas y a altas concentraciones pueden eliminar contaminaciones de microorganismos endófitos. Uno de estos compuestos es el PPM (Plant Preservative Mixture). Otro ejemplo es el denominado G-1, un compuesto derivado de los furfural de la caña de azúcar. Este compuesto, químicamente: 1-(5-bromofur-2-il)-2-bromo-2-nitroeteno fue desarrollado en la Universidad Central de las Villas (Cuba) y tiene efecto bactericida y fungicida de amplio espectro.

En los casos en que se utilicen plántulas crecidas *in vitro* como plantas donantes de explantes, es necesario desinfectar las semillas para su cultivo y germinación y luego es aconsejable desinfectar también las plántulas resultantes.

En algunos materiales vegetales se utiliza la preincubación de los explantes mediante lo cual éstos son desinfectados suavemente y precultivados durante 24 horas en un medio conteniendo sacarosa, y finalmente son desinfectados nuevamente y cultivados.

4) Emplear medios e instrumentos de cultivo esterilizados, es decir, liberados completamente de cualquier microorganismo vivo o esporas. Para la esterilización, en la mayoría de los casos se hace uso del calor en sus diversas formas: llama directa, calor húmedo (en forma de vapor abierto o bajo presión), calor seco (aire caliente). Se pueden usar hornos a mi-

croondas. El agua caliente también puede ser usada. En el caso de sustancias termolábiles, la esterilización se puede hacer mediante filtración a través de filtros bacteriológicos.

No es posible recomendar ningún sistema de esterilización dado que la exitosa destrucción de los microorganismos depende de múltiples factores entre los que interesan el tamaño del recipiente, el tiempo de esterilización y la naturaleza de la sustancia a esterilizar. Sin embargo, se pueden dar algunas sugerencias:

- La esterilización en estufas mediante calor seco (aire caliente) es recomendable para esterilizar recipientes de vidrios secos (pipetas, cápsulas de Petri, tubos). En estos casos, 2-4 horas en estufas a 180-200 °C brindan excelentes resultados.

- La esterilización con calor húmedo con vapor bajo presión (en autoclave o en una «olla a presión»). Es el procedimiento más empleado para la esterilización de los medios de cultivo (salvo, como se indicó más arriba, para aquellos que posean componentes termolábiles). En este caso, lo más común es usar una presión de 1.46 kg.cm⁻² durante 20 minutos, con lo que prácticamente se destruyen todas las formas de vida. Es importante que en todos los puntos del autoclave se alcance dicha temperatura, para lo cual hay disponibles cintas detectoras colorimétricas.

5) Cultivar los explantes en una cámara de transferencia con aire estéril («gabinete de flujo laminar»), localizada en un ambiente limpio y no expuesta a corrientes de aire. De no disponer este equipamiento, se pueden sustituir con cuartos esterilizados previamente con luz ultravioleta (nunca exponerse a la luz UV en forma directa). La mesada de trabajo y las paredes del gabinete deben ser desinfectadas previamente con etanol al 70%. De la misma manera deben ser desinfectados exteriormente todos los recipientes (conteniendo medios de cultivo, agua, etc.) que ingresen en el área del aire estéril.

Los operarios constituyen frecuentemente una importante fuente primaria de contaminación, porque es recomendable que, antes de comenzar a trabajar laven sus manos y antebrazos con abundante agua y jabón y se des-

infecten con etanol al 70 %. La utilización de guardapolvos, guantes y máscaras protectoras de la boca y de la nariz, así como los gorros protectores de los cabellos, ayudan a reducir sensiblemente los niveles de contaminación.

Los instrumentos de trabajo (pinzas, pipetas, tijeras, agujas, cápsulas de Petri) deben ser esterilizados antes de su uso. Muchos de estos instrumentos pueden ser colocados en etanol al 95% y, antes de ser usados, se deben flamear cuidadosamente en la llama de un mechero. También es necesario flamear la boca de los recipientes que contienen los medios de cultivo antes y después de cultivar el explante.

6) Incubar los cultivos en cámaras o cuartos de cultivo, cerrados, libres de corrientes de aire y bien higienizados. En lo posible se debe restringir la circulación de personas, y los recipientes con cultivos contaminados deben ser rápidamente eliminados de este sector. Es conveniente que antes del lavado, estos cultivos sean esterilizados.

4 Medios de cultivo

Un medio de cultivo puede ser definido como una formulación de sales inorgánicas y compuestos orgánicos requeridos para la nutrición y manipulación de los cultivos. Existen numerosas formulaciones, cada una de las cuales comprende entre 6 y 40 compuestos. Para dar una idea de la cantidad de formulaciones disponibles, George y col., luego de revisar más de 3.000 trabajos científicos describen en dos tomos (casi 1.000 páginas en total) más de 2.000 medios de cultivo. También dos empresas multinacionales ofrecen para la venta más de 60 medios cada una, listos para su utilización especialmente en la micropropagación comercial de plantas. En la Tabla 1 se presentan tres medios que son muy usados en la actualidad.

Básicamente, los medios de cultivo se componen de compuestos que suministran:

- Una fuente de carbono
- Nutrientes minerales
- Sustancias vitamínicas
- Sustancias reguladoras del crecimiento
- Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos)

Tabla 1: Composición de tres medios básicos usados en el cultivo in vitro de tejidos.

Compuestos	Medio básico ¹		
	MS	N6	B5
NH ₄ NO ₃	1.650	-----	-----
KNO ₃	1.900	2.830	2.500
KH ₂ PO ₄	170	400	-----
CaCl ₂ ·2H ₂ O	440	166	150
(NH ₄) ₂ SO ₄	-----	463	134
MgSO ₄ ·7H ₂ O	370	185	250
NaH ₂ PO ₄ ·4H ₂ O	-----	-----	150
KI	0,83	0,80	0,75
MnSO ₄ ·H ₂ O	-----	-----	10,00
H ₃ BO ₃	6,20	1,60	3,00
MnSO ₄ ·4H ₂ O	22,30	4,40	-----
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	8,60	1,50	2,00
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	0,25	-----	0,25
CuSO ₄ ·5H ₂ O	0,025	-----	0,025
FeSO ₄ ·7H ₂ O	27,80	27,85	27,80
Na ₂ EDTA	37,30	37,25	37,30
CoCl ₂ ·6H ₂ O	0,025	-----	0,025
Glicina	2,00	2,00	-----
Tiamina -HCl	0,10	1,00	10,00
Piridoxina -HCl	0,50	0,50	1,00
Ácido Nicotínico	1,00	0,50	0,50
Mioinositol	100,00	-----	100,00
Sacarosa	30.000,00	50.000,00	20.000,00
PH	5,7	5,8	5,5

¹⁾ Composición en mg·L⁻¹.

MS = Medio de Murashige y Skoog (Physiol. Plant. 15: 473 - 97. 1962)

N6 = Medio de Chu, C.C., Wang, C.C., Sun, C.S., Hsu, C., Yin, K.C., y Chu, C. (Sci. Sinica 18: 659- 668. 1975)

B5 = Medio de Gamborg, O.L., Miller, R.A. y Ojima, K. (Exp. Cell Res. 50: 151 - 158. 1968)

• Otros compuestos.

Fuente de carbono: Prácticamente todos los cultivos son heterótrofos (comparativamente unos pocos son autótrofos) y por ende necesitan del suministro de una fuente de carbono. La sacarosa, en concentraciones de 2 al 5%, es el azúcar más utilizado. En algunos medios se la reemplaza por glucosa. En casos particulares se cita el empleo de maltosa o galactosa. También myo-inositol (100 mg/L) suele ser incorporado a los medios resultando un mejor crecimiento de los cultivos.

Nutrientes minerales: Los medios de cultivo deben suministrar los mismos macro y micronutrientes que son esenciales para el crecimiento de las plantas enteras. En general se destacan las concentraciones relativamente

altas de nitrógeno y potasio. El nitrógeno es suministrado en forma de amonio y/o nitrato. También se pueden utilizar urea, glutamina y caseína hidrolizada. Es fundamental que el hierro sea incorporado juntamente con un agente quelante (Na₂EDTA), lo que lo hace disponible es un amplio rango de pH.

Sustancias vitamínicas: De todas las que comúnmente se incorporan a los medios, pareciera que la tiamina es la única realmente imprescindible para el buen crecimiento de los cultivos.

Sustancias reguladoras del crecimiento: En la mayoría de los casos los medios utilizados para el establecimiento de los cultivos contienen auxinas (ANA, 2,4-D, AIA, AIB, NOA, Dicamba, Picloram) y/o citocininas (BA, KIN, ZEA, 2iP, Thidiazurón). Las giberelinas (especialmente GA₃) son requeridas en algunas ocasiones para el cultivo de meristemas o para la elongación de brotes. El ABA, es usado en algunos casos.

Agente gelificante (en el caso de medios semisólidos): El agar (entre 0,6 y 1%) es el compuesto más utilizado. También pueden emplearse «Agargel» (0,40-0,60%), «Transfargel» (2,0-2,60%), «Phytigel» (0,25- 0,40%), agarosa (0,80-0,90%) y «Gelrite» (0,10-0,20%).

Otros compuestos: Muchas sustancias, de variada composición química, suelen ser adicionadas a los medios básicos. Además de la glicina, otros aminoácidos se pueden agregar a los medios. Es el caso de L-tirosina, asparagina y cisteína, aunque hay que tener presente que en dosis altas pueden inhibir el crecimiento de los cultivos. El carbón activado (0,1 a 5%) suele ser incorporado al medio, dado que es probable que absorba metabolitos tóxicos para los cultivos.

En algunos medios se incorporan ácidos orgánicos como el málico, el cítrico, el pirúvico y el succínico y es frecuente el empleo de L-glutamina y de caseína hidrolizada. Aún hoy se siguen utilizando ciertos componentes de composición química no bien definida como el

agua de coco (5 a 15%), jugo de tomate y puré de banana. También en ocasiones es necesaria la incorporación de agentes antioxidantes (L-cisteína, ácido ascórbico, polivinilpirrolidona) para prevenir el ennegrecimiento tisular causado por la oxidación de polifenoles presentes en los explantes. Este ennegrecimiento puede causar la muerte de los mismos.

La preparación de los medios de cultivo puede llevarse a cabo de diferentes maneras, en «lecturas recomendadas» se citan manuales de laboratorio donde se describen detalladamente este punto.

5. Condiciones ambientales para la incubación.

La incubación de los cultivos se debe llevar a cabo en condiciones controladas. Por lo menos en lo que se refiere a temperatura, calidad e intensidad de luz, fotoperíodo, humedad atmosférica e higiene. Estas condiciones se logran con el empleo de cámaras climatizadas o cuartos especialmente preparados con aire acondicionado (frío-calor) y una buena y uniforme circulación de aire en el interior y dotados de un buen sistema de alarma para cortar la iluminación en caso de no funcionar el aire acondicionado. En general, los cultivos son incubados a temperatura constante de 25-28 °C, con ciclo de luz/oscuridad de 16/8 horas. La luz es generalmente provista por lámparas fluorescentes del tipo «luz día» con una irradiancia de entre 50 y 200 μmol m⁻²s⁻¹. La humedad atmosférica debe ser elevada (80- 90%).

6 Aclimatación de las plantas regeneradas *in vitro*.

Durante el período de incubación, los cultivos son expuestos a condiciones ambientales disímiles al ambiente externo. La atmósfera interna se caracteriza por presentar una considerable variación diurna en la concentración de CO₂, humedad relativa elevada, temperatura constante e intensidad lumínica baja. A su vez, el medio de cultivo compuesto por concentraciones elevadas de azúcares (en aquellos sistemas heterótrofos y semiautótrofos de micropropagación), sales y reguladores del crecimiento,

sumado a la ausencia de microorganismos, generan anomalías morfológicas, anatómicas y fisiológicas que las plantas deberán corregir cuando son transferidas al ambiente externo. Este período de adaptación al nuevo hábitat es llamado *fase o etapa de aclimatación*. La estrategia a implementarse durante el mencionado ciclo deberá contemplar el control minucioso de los parámetros ambientales (humedad, temperatura y luz) de tal manera que permita disminuir la deshidratación y, al mismo tiempo, estimular la fotosíntesis con el objeto de generar un rápido crecimiento de los plantines.

El retraso en el desarrollo de la cutícula y la escasa funcionalidad del aparato estomático que presentan las hojas de la mayoría de las especies cultivadas *in vitro*, determinan una alta tasa de transpiración que puede ocasionar la muerte por deshidratación. El control de este proceso fisiológico es de vital importancia durante la aclimatación, teniendo en cuenta que la disminución de la transpiración será gradual y dependerá de la rehabilitación de los estomas, así como también del desarrollo de la cutícula. El equipamiento necesario estará sujeto a la especie, pudiendo utilizarse desde túneles de polietileno para plantas que posean un elevado control de la transpiración (por ej. *Malus pumila* o *Agave tequilana*) o bien, a través del empleo de cámaras climatizadas (Fig.1) equipadas con sensores que permiten un descenso paulatino de la humedad relativa. En algunos casos puede resultar necesaria la aplicación exógena de ABA (hormona involucrada en el control del cierre de los estomas) o bien, el empleo de sustancias antitranspirantes que forman una capa semipermeable en la superficie de la hoja. En este último caso deberán tomarse algunas precauciones debido a que pueden observarse reacciones de fitotoxicidad.

Resulta imprescindible evitar la exposición a temperaturas extremas tanto en la fase aérea como en el sustrato. Mediante el empleo de extractores y/o acondicionadores de aire combinados con un sistema de niebla, es posible establecer la temperatura de la fase gaseosa entre los 25 y 30 °C durante la estación estival, mientras que en la época invernal es necesario, a veces, el empleo de mantas térmicas o serpentinas, sea de agua o aire caliente a nivel

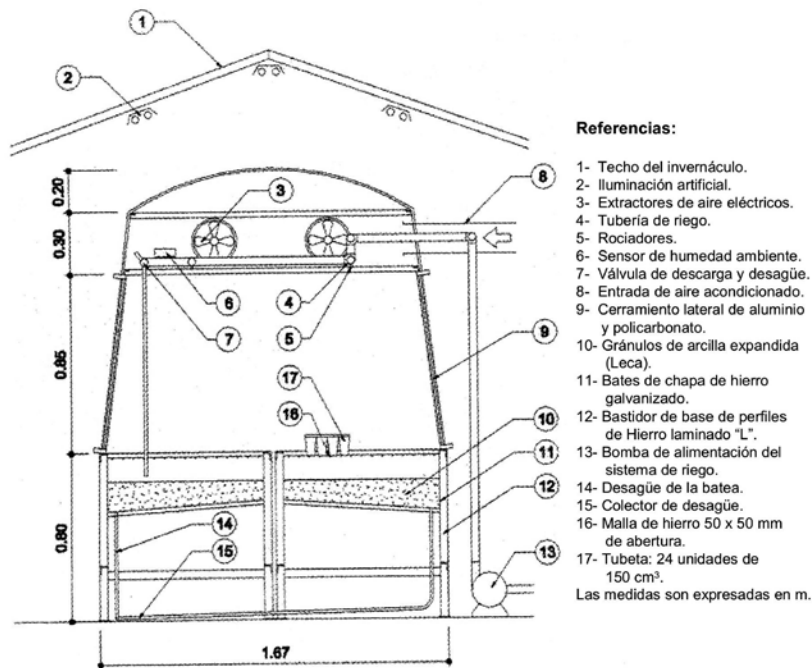
del sustrato, para mantener la temperatura por encima de los 18-20 °C.

Sin lugar a dudas, la opción más económica es el empleo de la luz natural, disminuyendo su irradiancia (20-50%) mediante el agregado de mallas de sombreado («saram»). No obstante, en aquellas latitudes donde el nivel medio de luz natural es bajo y los días son cortos durante una parte considerable del año, la luz artificial puede ser aplicada como complemento de la luz natural. Las lámparas tubulares fluorescentes del tipo «luz día» son empleadas en horticultura para prolongar el fotoperíodo. Asimismo, las lámparas tubulares de sodio alta presión presentan una distribución espectral de la energía adecuada para estimular fotosíntesis y se emplean para tal fin en una amplia variedad de cultivos.

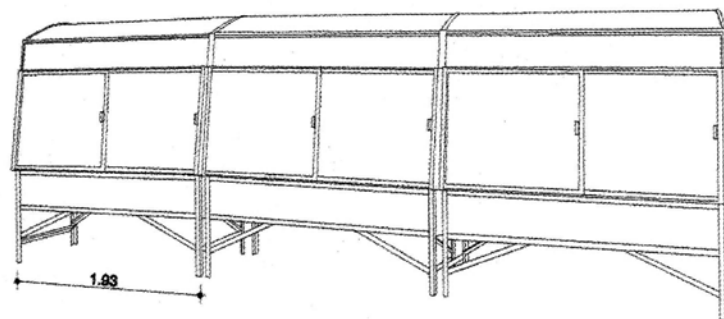
Otro aspecto importante a tener en cuenta lo constituye la elección del sustrato, siendo el adecuado aquel que permita el normal crecimiento y desarrollo de las raíces. Se puede emplear: arena, perlita, turba, vermiculita, o mezclas de ellos, teniendo la precaución de realizar una esterilización previa. Es conveniente el agregado de fertilizantes, sea a través del sustrato (fertilizantes de liberación controlada) o bien mediante el sistema de riego (fertilizantes solubles); empleándose proporciones ricas en fósforo (N-P-K: 9-45-15) y potasio (N-P-K: 4-25-35) que favorecerán el desarrollo radicular y la rusticación de las plantas.

En todo momento deberá realizarse un riguroso control fitosanitario empleándose antibióticos, fungicidas e insecticidas de uso universal.

En la Figura 1, se detalla un modelo de cámara de aclimatación diseñada por los autores y empleada por el Laboratorio de Cultivo de Tejidos del Instituto de Botánica del Nordeste. Básicamente, está compuesta por una fase aérea construida en aluminio y policarbonato alveolar (9) y un recipiente o batea (11) que contiene gránulos de arcilla expandida a fin de facilitar el drenaje. Mediante el agregado de arena u otro sustrato adecuado, esta cámara puede ser utilizada tanto para el enraizamiento *ex vitro* de los brotes obtenidos en la etapa de multiplicación, así como también, para el enraizamiento convencional (a «raíz desnuda») de estacas de tallos u hojas.



A - Corte transversal.



B - Vista exterior.

La humedad relativa de la fase aérea es controlada por un sensor (6) ubicado por encima de la tubería de riego (4). El sistema humidificador está compuesto por picos tipo «fog» y es alimentado por una bomba de bajo caudal y alta presión (13). Con el propósito de evitar el goteo que pudiese ocasionar el agua remanente en las cañerías, el sistema consta de una válvula solenoide de descarga y desagüe (7). La fase gaseosa es renovada en forma intermitente mediante el empleo de extractores ubicados en ambos extremos de la cámara (3) los que, conjuntamente, introducen o extraen aire, generando un movimiento masal.

Debido a la latitud geográfica en que se encuentra, la cámara está equipada con un acondicionador de aire (3000 frigorías) para evitar situaciones de estrés térmico en época estival.

A su vez, y dado que la mayoría de las especies estudiadas son originarias de climas tropicales y subtropicales, el sistema cuenta con mantas térmicas que son colocadas por debajo de los tubetes, manteniendo la temperatura del sustrato durante el invierno. En este último caso se agrega un material aislante entre la leca (10) y la malla de hierro (16) de tal manera de dirigir el calor hacia la fase aérea.

7. Agradecimientos.

Los autores agradecen al Ing. Pablo A. Luna por la planificación digital de la cámara de aclimatación. A la Secretaría General de Ciencia y Técnica (UNNE) y al Establecimiento La Cachuera por el aporte financiero recibido para construir la misma.

8. Lecturas Recomendadas

- GEORGE, E.F.; D.J.M. PUTTOCK y H.J. GEORGE. 1987. Plant Culture Media . Vol. 1 (Formulations and Uses). Exegetics Limited. England. 567 pág.
- GEORGE, E.F.; D.J.M. PUTTOCK y H.J. GEORGE. 1988. Plant Culture Media . Vol. 2 (Commentary and analysis). Exegetics Limited. England. 420 pág.
- HURTADO, D.V. y MERINO, M.E. 1991. Cultivo de Tejidos Vegetales. Ed.Trillas. México. 232 pág.
- PÉREZ PONCE, J.N. 1998. Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología. Instituto de Biología de Plantas.Santa Clara. Cuba. 390 pág.
- POSPOSILOVA, J.; I. TICHA, P. KADLECEK, D. HASEL, S. PLZAKOVA. 1999. Acclimatization of micropropagated plants to ex vitro conditions. Biologia Plantarum 42: 481-497.
- ROCA, W.M. y L.A. MROGINSKI. 1993 (segunda edición). Cultivo de tejidos en la Agricultura: Fundamentos y aplicaciones. CIAT. Cali, Colombia, 970 pág.
- TORRES, A.C.; L.A. CALDAS y J.A. BUSO. 1998. Cultura de Tecidos e Transformacao Genética de Plantas. (Vol.1) Embrapa. Brasil.509 pág.
- TORRES, A.C.; L.A. CALDAS, y J.A. BUSO. 1999. Cultura de Tecidos e Transformacao Genética de Plantas. (Vol.2) Embrapa. Brasil.355 pág.

I - CAPÍTULO 2

Morfogénesis

Silvia Radice

1.- Introducción

La *embriogénesis somática* y la *organogénesis* son dos procesos morfogénicos muy frecuentes en el cultivo *in vitro* de especies vegetales. La embriogénesis somática es el proceso por el cual se obtiene una estructura similar a un embrión cigótico sin que medie la fertilización de las gametas, mientras que por organogénesis pueden obtenerse tallos, raíces o flores. Estos órganos son inducidos a partir de una célula o de un grupo de células que, según las condiciones de cultivo, tienen la propiedad de mantenerse en activa división.

Esta totipotencialidad celular fue enunciada por Haberlandt en 1902, quien propuso la teoría de que todas las células vegetales tienen la capacidad de regenerar plantas completas. Haberlandt no llegó a demostrar su hipótesis debido a que no pudo lograr la división celular. Los medios de cultivo que empleaba no incluían reguladores del crecimiento debido a que esos compuestos eran aún desconocidos. Los avances en el cultivo de tejidos vegetales fueron muy lentos en sus inicios. En 1934, White pudo mantener, en forma ilimitada, el crecimiento de raíces en medios líquidos a partir de ápices de tomate. Al mismo tiempo se identificó el ácido indol acético (AIA), que permitió el mantenimiento indefinido de callos de zanahoria y tabaco *in vitro*. Posteriormente se descubrió el efecto de la leche de coco como estimulante de la formación de callo sobre el cultivo de embriones de *Datura stramonium*. En 1948 Skoog y Tsui, trabajando con cultivos de callo de tabaco, demostraron la existencia de una regulación química en la parte aérea y en la raíz. Trabajos posteriores en callos de la misma especie, con el agregado de cinetina, la primera citocinina descubierta, permitieron demostrar que la diferenciación de brotes, raíces o de ambos, era regulada por el balance de auxinas/citocininas.

2.- Tipos de morfogénesis. Definiciones

En condiciones de cultivo *in vitro*, las células somáticas pueden regenerar embriones (Fig 1) o brotes, raíces y/o flores (Fig 2) como respuesta a un determinado estímulo. La regeneración es un proceso que comprende diferentes fases que se suceden de manera similar para los tres tipos de morfogénesis citadas. De Klerk y colaboradores, en 1997, denominaron a estas diferentes fases como *adquisición de la competencia*; fase de *inducción* y fase de *realización*.

En la primera fase, las células no responden al estímulo organogénico pero adquieren esa competencia durante una fase de desdiferenciación. En la segunda fase o fase de inducción, las células son receptivas al estímulo morfogénico y hay una relación directa con el tipo, concentración y combinación de reguladores del crecimiento agregados al medio de cultivo y el órgano a desarrollar. En la fase de realización, la célula sufre las sucesivas divisiones para formar el órgano determinado.

A partir de la siembra *in vitro* de diferentes explantes relativamente grandes y en condiciones de cultivo adecuadas, puede inducirse la formación de nuevos órganos de manera directa, sin la formación de callo. Si la formación es de brotes, raíces o flores se denomina *organogénesis directa*. Si en cambio se induce la formación de embriones somáticos, este proceso se denominará *embriogénesis directa* (Figs. 1 y 3). Si por el contrario, a partir de la siembra de un explante *in vitro* se observa la proliferación de células en forma desordenada y sin ninguna función predeterminada, se iniciará la producción de *callos* o *suspensiones celulares* (Figs. 2 A y 3). La diferenciación de órganos a partir de callos, denominada *morfogénesis indirecta*, estará condicionada a la previa formación de los *meristemoides*. *Morfogénesis directa* o *indirecta* fueron términos propuestos por Hicks en 1980.

3.- Histología de la morfogénesis

Después de 48 horas de realizada la siembra del explante en el medio de cultivo adecuado,

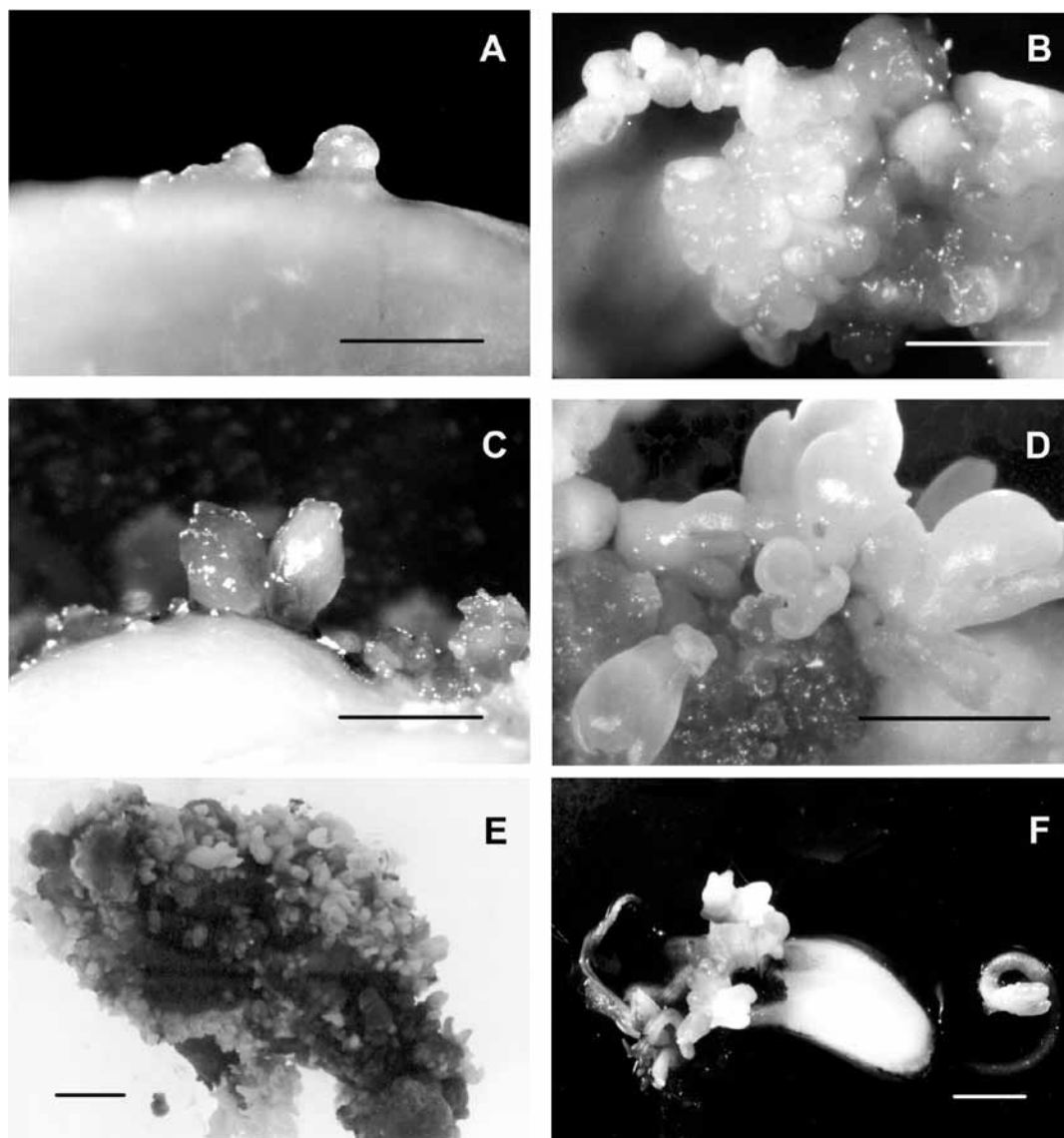


Figura 1: A-F embriogénesis somática obtenida por cultivo *in vitro*. **A-C-E**, embriogénesis somática en diferentes fases de crecimiento observada en *Codiaeum variegatum* (L) Blume cultivado en MS + 1 mg l⁻¹ de BAP. **B-D-F**, embriogénesis somática obtenida en diversos cultivares de *Prunus sp* a partir de embriones zigóticos inmaduros cultivados en MS + 0,1 mg l⁻¹ de ANA + 1 mg l⁻¹ de Kin con una previa inducción en MS + 2 mg l⁻¹ de 2,4-D. Las reglillas representan 5 mm.

a partir de una célula epidérmica o del mesófilo foliar, como ocurre en las coníferas, se suceden una serie de divisiones mitóticas. Así se pueden observar, a través del estudio histológico, pequeñas masas de células que contienen citoplasma denso y grandes nucleolos. Este conjunto de células, agrupadas a modo de esferas, fueron denominadas *meristemoides* por Torrey en 1966, y son responsables de la dife-

renciación de los nuevos órganos. Este tipo de meristema puede iniciarse en forma directa, a partir de células diferenciadas pertenecientes a un explante cultivado *in vitro*, o indirectamente, a partir de una célula o grupo de células diferenciadas que promueven la proliferación celular (Fig 4 A). Su evolución determinará el crecimiento de un órgano, por ejemplo una yema adventicia (Fig 4 B).

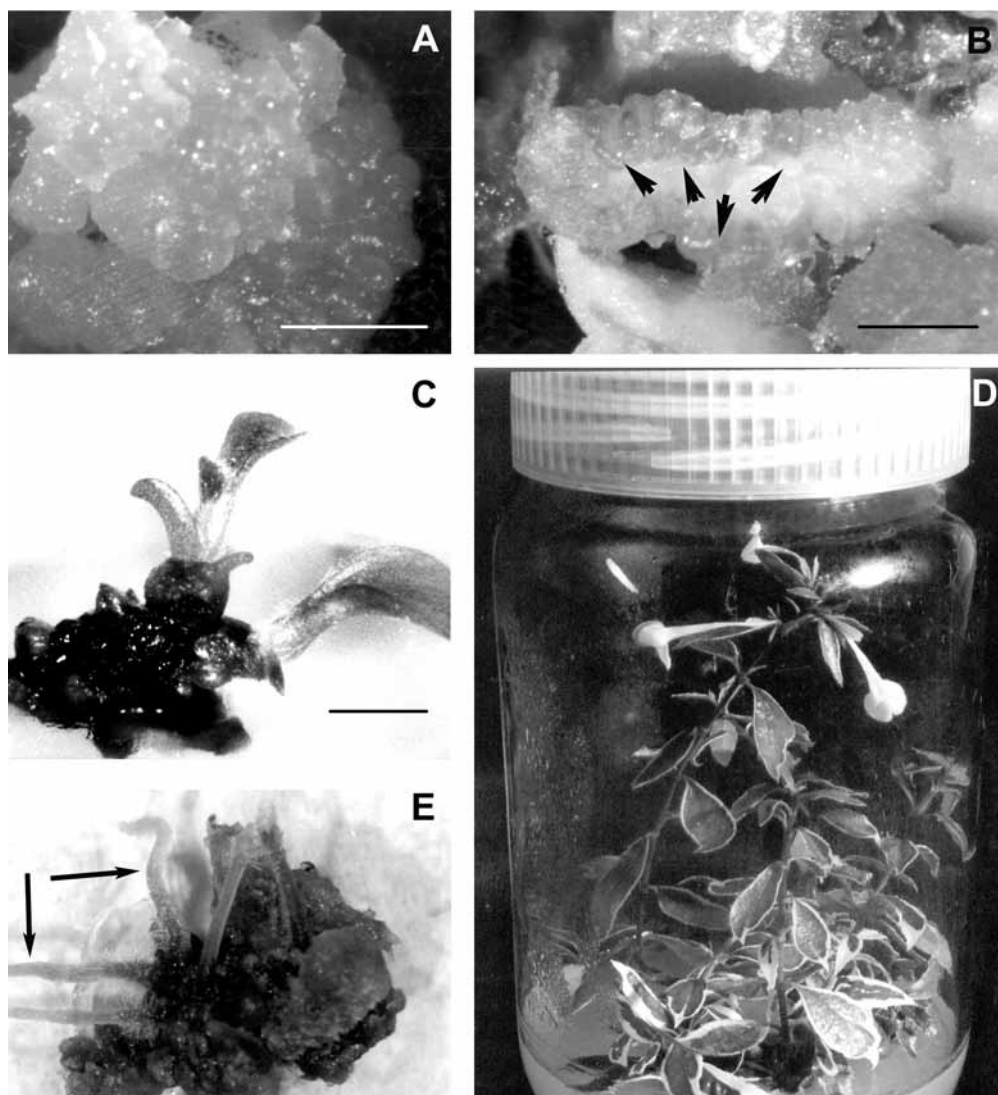


Figura 2: A-E Organogénesis somática obtenida por cultivo *in vitro*. **A**, callo organogénico obtenido en *Abelia sp.* (André) Rehder cultivada en MS + 1 mg l⁻¹ de picloran. **B**, Inicio de brotes (flechas) en hojas crecidas *in vitro* de "Crimson Gold" (*Prunus persica* L.) cultivadas en MS + 0,1 mg l⁻¹ de ANA + 1 mg l⁻¹ de Kin. **C**, Brotes de *Gerbera jamesonii* Bolus obtenidos a partir del cultivo de capítulos florales en MS 0,05 mg l⁻¹ de IBA + 0,75 mg l⁻¹ de BAP + 0,1 mg l⁻¹ de GA₃. **D**, brotes florecidos *in vitro* de *Abelia sp.* (André) Rehder cultivados en MS + 1 mg l⁻¹ de BAP. **E**, raíces (flechas) crecidas de callo de *Abelia sp.* (André) Rehder cultivadas en inducidas en MS + 1 mg l⁻¹ de 2iP, previamente inducidas con 1 mg l⁻¹ de picloran. Las reglillas representan 5 mm

Las células embriogénicas son similares a las células meristemáticas debido a que no son demasiado voluminosas, tienen gran cantidad de ribosomas, citoplasma denso, un nucleolo agrandado y pequeños granos de almidón. Estas células, que en general se agrupan, pueden variar en tamaño y número. Dentro de un gru-

po de células embriogénicas, el desarrollo de las mismas no está sincronizado. Estas células son capaces de dividirse o de transformarse en embriones según las condiciones del medio de cultivo. Aquellas células que no desarrollan proembriones comienzan el proceso de diferenciación, es decir se vacuolizan, disminuye

el volumen de núcleo y nucleolo y desaparecen los gránulos de almidón.

Las experiencias demuestran que las células embriogénicas se desarrollan sólo cuando se modifican las condiciones de cultivo. En general, cuando se reducen las cantidades de auxina y citocinina o se elimina la auxina.

Las células embriogénicas desarrollan como embriones cuando las condiciones experimentales permiten que estas expresen su potencial. Pueden ocurrir dos condiciones ontogénicas diferentes, es decir que el origen de los embriones sea unicelular o pluricelular.

En el caso de iniciarse a partir de una célula, la misma se aísla de las demás por una importante modificación en su pared celular, en particular por la gelificación de la laminilla media. Esta célula, rodeada por un polisacárido mucilagi-

noso, sufre divisiones polarizadas formando un embrión globular. Previo a esta polarización se deposita almidón, luego se forma la epidermis y adquiere simetría bilateral. Sucesivamente se observa el crecimiento de uno o más cotiledones, el desarrollo de los tejidos provasculares, la iniciación de los ápices radicales y de tallo y una progresiva acumulación de almidón, lípidos y proteínas.

En el caso de un origen multicelular de los embriones somáticos pueden observarse diversos patrones. Los embriones somáticos se forman a partir de grupos de células epidérmicas y subepidérmicas (Fig 4 C). Este tipo de ontogenia de origen multicelular se llama comúnmente *budding* o *embriogénesis adventicia*. Estas células pequeñas tienen una alta relación núcleo/citoplasma, citoplasma denso y un nucleolo vo-

luminoso que se tiñe fuertemente. Se diferencian de las células embriogénicas por la falta de sustancias de reserva, por su delgada pared celular y su frecuente división celular. Estas estructuras se denominan proembriones globulares (Fig 1 A, B). En una etapa posterior desarrollan una epidermis, un tejido provascular, acumulan material de reserva y se polarizan. Estas estructuras globulares desarrollan cotiledones y se transforman en embriones somáticos que presentan ápices caulinar y radicular.

Para una misma especie puede ocurrir uno u otro tipo de inicio según las condiciones de cultivo. El desarrollo de un embrión somático de origen unicelular es comparable a la de un embrión cigótico. En dicotiledóneas, la etapa *globular* es seguida por una etapa *corazón* que se corresponde con la adquisición de la simetría bilateral: desarrollo de la epidermis,

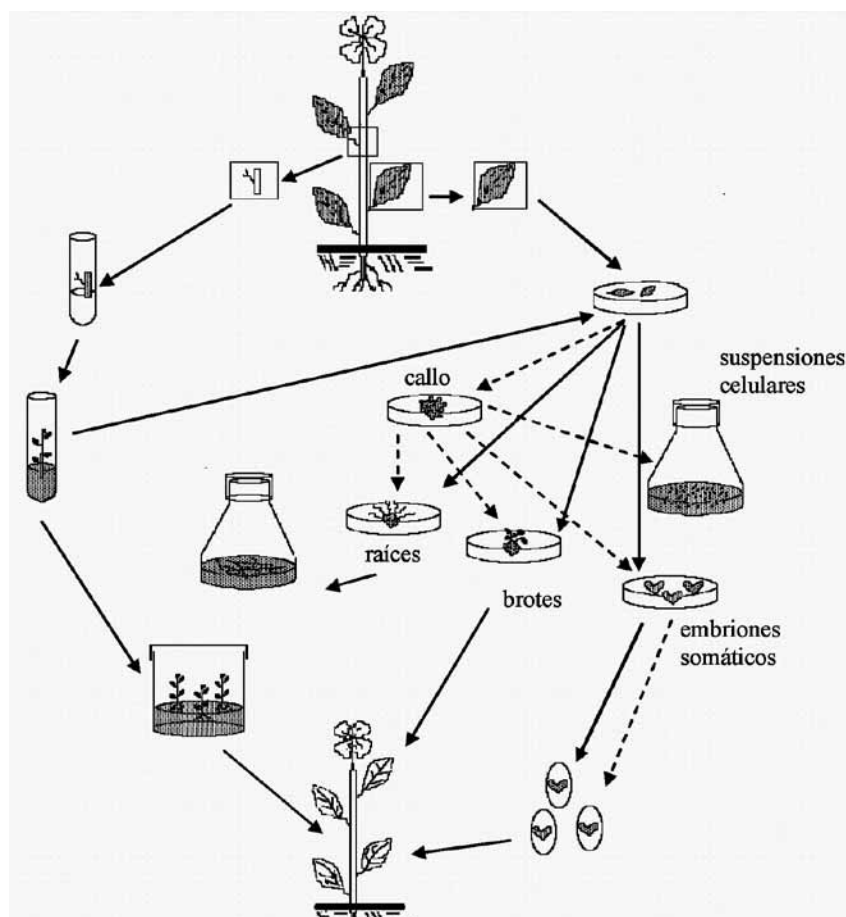


Fig. 3: Esquema de los diferentes procesos morfogénicos obtenidos a partir de la siembra *in vitro* de diferentes explantes. Las líneas continuas expresan organogénesis o embriogénesis directa mientras que las líneas quebradas indican que la morfogénesis se obtiene por vía indirecta.

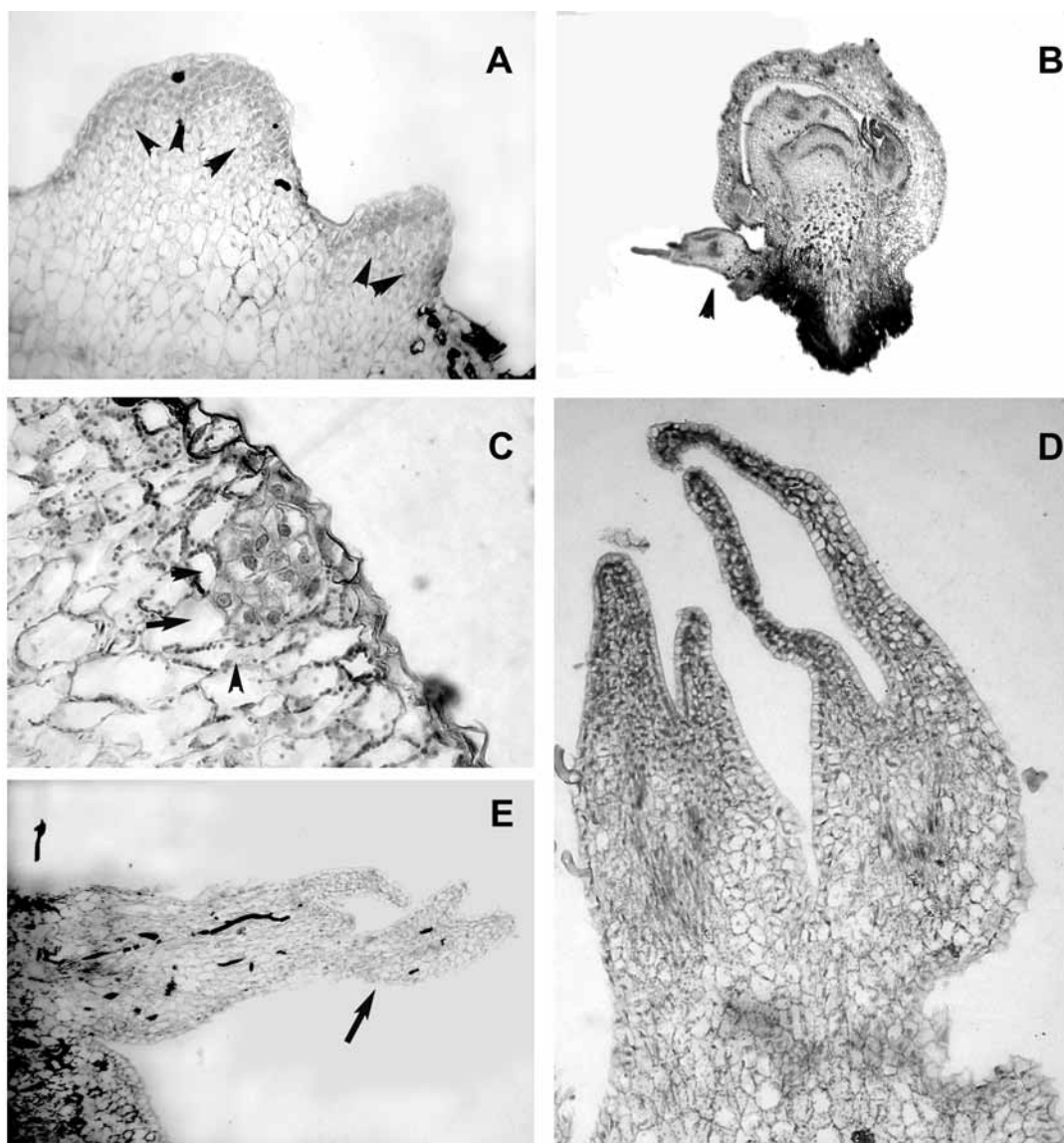


Figura 4: A-E Cortes histológicos de diferentes explantes cultivados *in vitro*. **A**, meristemoides (flechas) observados en cultivo de *Silybum marianum* L. en MS + 1 mg l⁻¹ de AIA + 5 mg l⁻¹ de BAP 10 x. **B**, yemas adventicias (flechas) en ápices de *Fragaria x ananassa* Duch. cultivados en Boxus + 0,1 mg l⁻¹ de IBA + 0.5 mg l⁻¹ de BAP + 0,1 mg l⁻¹ de GA₃ 4 x. **C**, grupo de células embriogénicas (flechas) en *Codiaeum variegatum* (L) Blume cultivados en 1 mg l⁻¹ de tidiazurón. 20 x. **D**, embriones somáticos en *Codiaeum variegatum* (L) Blume cultivados en 1 mg l⁻¹ de tidiazurón 10 x. **E**, embriogénesis secundaria en *Codiaeum variegatum* (L) Blume cultivados en 1 mg l⁻¹ de tidiazurón 10 x.

de los estratos procambiales y de manera sucesiva el desarrollo del ápice radical. El ápice de tallo se desarrolla más tarde, durante la etapa *cotiledonar*. En los embriones somáticos de algunas especies hay una etapa intermedia entre la globular y corazón llamada *oblonga*, que corresponde a la individualización del ápice de

la raíz y al procambium en respuesta a la elongación axial del embrión somático debido al transporte de auxinas (Fig 1 C).

Los embriones de origen multicelular obtenidos por *budding* muestran la misma ontogenia que los cigóticos, como así también la producción de sustancias de reserva.

Sin el seguimiento histológico detallado, la formación del embrión somático sólo puede ser confirmada por la germinación (Fig 1 F). Sin embargo, debido al bajo porcentaje de embriones que llegan a esta etapa, esta tarea es casi imprescindible para una correcta evaluación de las respuestas encontradas con los diversos medios de cultivo empleados.

Comparados con los embriones cigóticos de la misma especie, los embriones somáticos frecuentemente desarrollan de manera anormal o son inmaduros. La anomalía más frecuentemente encontrada es la formación doble o triple del sistema vascular, causada por la pobre polarización del transporte de auxinas. También se puede encontrar un contenido excesivamente alto, reducido o ausente de las reservas de almidón y/o proteicas, que el meristema apical o radical no estén desarrollados o que la embriogénesis sea repetitiva o secundaria (Fig 4 E).

La falta del meristema apical o una escasa deposición de sustancias lipoproteicas en los embriones somáticos de algunas especies no debe ser tomada como una anomalía. Esto puede ser un síntoma de inmadurez debido a la rápida formación de los mismos. En este caso una etapa intermedia que permita la maduración de las estructuras formadas permitirá incrementar el porcentaje de embriones somáticos capaces de germinar.

4.- Factores que afectan los procesos morfogénicos

Los cuatro principales factores que condicionan la obtención y el crecimiento de nuevos órganos *in vitro* son:

4.1.- el genotipo

4.2.- las condiciones químicas seleccionadas para realizar el cultivo.

4.3.- las condiciones físicas seleccionadas para realizar el cultivo.

4.4.- el explante.

4.1.- El genotipo es un factor determinante en todos los procesos morfogénicos, desde la capacidad del explante para su establecimiento en condiciones *in vitro* a la proliferación de callo, o la diferenciación y crecimiento de nuevos órga-

nos. Por esta causa, no es posible generalizar metodologías o protocolos de trabajo debido a que los medios de cultivo, así como las condiciones de cultivo seleccionados, deben ser específicos para cada situación en particular. Un ejemplo de ello es el protocolo empleado por Stamp and Meredith en diferentes cultivares de *Vitis vinifera*. En cuatro de ellos fue posible la obtención de embriones somáticos a partir de embriones cigóticos, pero estos resultados no se repitieron con el cultivar "Pinot Noir".

4.2.- Varios son los compuestos químicos que influyen en los patrones morfogénicos *in vitro* dentro de los cuales podemos considerar:

4.2.1.- la composición salina del medio de cultivo. La composición salina más empleada para inducir la formación de callo, la organogénesis directa o indirecta en la mayoría de las especies vegetales, es la de Murashige & Skoog (1962) (MS). Sin embargo, existen otras formulaciones diseñadas para inducir determinados patrones morfogénicos. Existe además una estrecha relación entre la composición hormonal del explante y la concentración de reguladores del crecimiento agregada al medio de cultivo.

4.2.2.- reguladores del crecimiento. Estos compuestos pueden promover la morfogénesis aún cuando la concentración salina no sea la adecuada. En condiciones óptimas de cultivo pueden aumentar significativamente la diferenciación de órganos. Para la inducción de embriones somáticos en muchas especies vegetales es necesario el agregado de auxinas, como ocurre en *Tilia spp*. Sin embargo para otras, como es el caso del crotón (*Codiaeum variegatum*), es suficiente con el agregado de thidiazurón. El genotipo y el tipo y concentración de reguladores del crecimiento empleados están estrechamente relacionados.

4.2.3.- antibióticos. En procesos de transformación con *Agrobacterium tumefaciens* es muy común el agregado de antibióticos del tipo cefotaxime; kanamicina y carbenicilina para la eliminación de la bacteria. En explantes de hoja de diferentes cultivares de *Malus domestica* se encontró que 250 mg L⁻¹ de cefotaxime aumentan significativamente la regeneración de brotes mientras que 500 mg L⁻¹ de carbenicilina promueven la formación de callo y la

kanamicina inhibe los procesos morfogénicos.

4.2.4.- *carbón activado*. En general se usa para adsorber compuestos tóxicos de la micro atmósfera gaseosa o el exceso de reguladores del crecimiento presentes en el medio de cultivo pero E.K. Pettersson y su equipo de colaboradores de la Swedish University of Agriculture, demostraron que puede promover la embriogénesis somática debido a la incorporación de ciertos compuestos al medio de cultivo por difusión.

4.2.5.- *agar*. Otro aspecto importante a tener en cuenta es la consistencia del medio de cultivo. Puede emplearse como semi-sólido o líquido. El agente gelificante más utilizado en el cultivo *in vitro* es el agar, extraído de diversas algas marinas. Las diferentes calidades existentes en el mercado modifican la expresión morfogénica debido a que pueden contener sustancias inhibitorias o promotoras del crecimiento. Tal es el caso del cultivo de hojas de *Actinidia chilensis* (en medio de MS con el agregado de 0,1 mg/L de AIA + 1 mg/L de BAP) cuya respuesta morfogénica varió según el tipo de agar utilizado. Cuando el gelificante empleado fue Chubut-agar, de producción nacional, se observó una gran diferenciación de yemas adventicias, mientras que con el agregado de agar SIGMA[®] sólo se indujo la proliferación de callo.

En caso de seleccionar medios de cultivo líquidos, la respuesta morfogénica observada varía de manera considerable. El cultivo líquido es imprescindible cuando se busca promover la morfogénesis indirecta a través de suspensiones celulares. Para ello es necesario cultivar los callos en medio líquido con agitación para permitir que las células se disgreguen y puedan diferenciar raíces, brotes o embriones somáticos en forma aislada.

La elección de un medio de cultivo líquido o sólido depende, además, de la especie con la que se trabaja. En *Cymbidium*, por ejemplo, se ha observado que el empleo de medio líquido promueve una mayor diferenciación de protocormos respecto del mismo gelificado. A su vez, este proceso puede mantenerse durante varios subcultivos, mientras que en medio de cultivo gelificado se observó que los protocormos tienden a formar tallos.

4.2.6.- *atmósfera gaseosa*. Es un factor determinante en los procesos morfogénicos y esta con-

dicionada por el tipo y tamaño del envase seleccionado para el cultivo, así como también por el sistema de cobertura del mismo. Las tapas usadas en cultivo *in vitro* varían desde el tapón de algodón; papel de aluminio; película de resinite transparente o tapas rígidas de polipropileno. El intercambio gaseoso es diferente para cada tipo de tapa, en consecuencia la atmósfera interna también sufrirá variaciones.

En condiciones *in vivo* la atmósfera contiene 78 % de nitrógeno; 21 % de oxígeno y 0,035 % de dióxido de carbono. En cultivos *in vitro* se han registrado además, etileno y otros compuestos hidrocarbonados.

El nivel de oxígeno disponible para el explante condiciona el crecimiento y los procesos morfogénicos. En general se necesita una buena aireación para obtener cualquier tipo de proceso morfogénico. En alfalfa se puede obtener un buen incremento de material a partir de suspensiones celulares embriogénicas cuando la solución se satura con 70% de oxígeno. Por el contrario, una tensión de oxígeno del 5 % estimula la producción de plantas a partir de anteras de tabaco.

La concentración de dióxido de carbono (CO₂) en la atmósfera gaseosa *in vitro* varía según la respiración y la actividad fotosintética de las plantas. En condiciones de oscuridad, el CO₂ incrementa mientras que en condiciones de luz, disminuye. En trabajos realizados con *Ficus lyrata* se han encontrado concentraciones variables, entre 0,5 % y 8,5 %, según el tipo de sello o tapa empleados. Concentraciones superiores al 1 %, que son generalmente tóxicas en condiciones *in vivo*, probablemente no fueron limitantes para la actividad fotosintética.

La presencia de etileno en condiciones *in vitro* promueve diversas respuestas. Su acumulación tiene efectos inhibitorios sobre el cultivo de células, callos y anteras, La cantidad de etileno producida *in vitro* varía con la especie, el tipo de explante, la concentración de citocininas en el medio de cultivo, el tipo de agar utilizado y con la luz. Una forma de incorporar etileno al envase de cultivo es a través de la esterilización del material de disección realizada con el material embebido en alcohol y flameado con mechero Bunsen. En muchos casos el etileno actúa como promotor de la morfogénesis pero luego es inhibitorio del crecimiento de los órganos diferenciados

4.3.- Entre las condiciones físicas podemos mencionar los efectos de la temperatura, la humedad relativa y la luz.

4.3.1.- La *temperatura* de incubación de los cultivos es un factor importante a tener en cuenta. Si bien en condiciones naturales las plantas experimentan diferencias térmicas durante el día y la noche, las temperaturas *in vitro* se mantienen casi estables. Es importante señalar que cuanto más se asemejen las condiciones *in vitro* a las óptimas de crecimiento de la especie estudiada, mayor será la respuesta obtenida. En cultivos de hojas de *Streptocarpus x hybridus* sometidos a diferentes temperaturas se observó que la regeneración mayor de brotes se producía a 12 °C mientras que por encima de los 30 °C, prácticamente no se observó diferenciación.

4.3.2.- La *humedad relativa* (HR), como medida de la cantidad de vapor de agua contenida en la atmósfera gaseosa, es otro de los parámetros físicos a tener en cuenta. La HR dependerá del sello o cobertura del envase empleado. Si este cierre es hermético, la humedad interior será del 100 %. Si en cambio existe la posibilidad de un intercambio gaseoso la humedad interna puede descender a niveles cercanos al 50 %. Este importante descenso de la HR puede promover una pérdida veloz de agua del medio de cultivo variando la concentración de sus compuestos hasta llegar a niveles tóxicos (Debergh, comunicación personal).

4.3.3.- La *luz* suministrada a los cultivos debe ser evaluada en cuanto a la calidad, intensidad y período de suministro. La respuesta morfogénica de un explante puede variar según si se le proporciona luz o no. Para estimular la formación de callo, es común que se prefiera la oscuridad. El suministro de luz favorece la diferenciación de órganos.

4.4.- Tal como ya se señaló anteriormente, los procesos morfogénicos dependen del genotipo, pero a esto debe sumarse el efecto del explante seleccionado. El tratamiento de la planta madre, las condiciones físicas y fisiológicas en las que ésta se encuentre y el sector del cual se tome el explante determinarán a su vez la respuesta morfogénica en condiciones *in vitro*. Un ejemplo muy interesante es la diferente respuesta morfogénica observada en hojas de *Camellia japonica*

cultivadas en un mismo medio de cultivo, según la porción de la lámina utilizada (Pedroso y Pais, 1993). Estos investigadores cultivaron estas hojas *in vitro* durante seis semanas previa inmersión del explante en una solución de IBA (1 mg l⁻¹) durante 20 minutos (Fig 5).

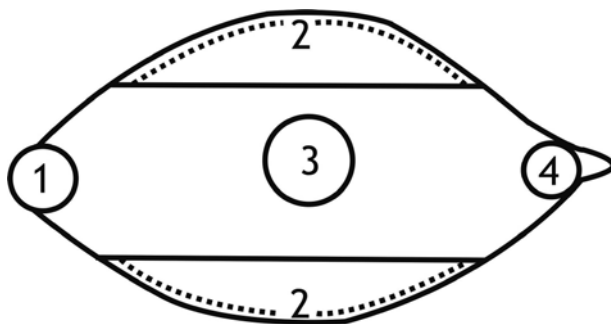


Figura. 5: Esquema de las diferentes respuestas morfogénicas obtenidas después de seis semanas de cultivo *in vitro* de hojas de *Camellia japonica* L. según la porción de la lámina. 1, callo organogénico. 2 embriogénesis somática directa. 3, regeneración directa de raíces. 4, callo organogénico.

Lecturas recomendadas

- Buddendorf-Joosten J.M.C. and Woltering E.J. 1994. Components of the gaseous environment and their effects on plant growth and development in vitro. *Plant Growth Regulation* 15: 1-16.
- De Klerk G.J., Arnholdt-Schmitt B., Lieberei R. and Neumann K.H. 1997. Regeneration of roots, shoots and embryos: physiological, biochemical and molecular aspects. *Biologia Plantarum* 39 (1): 53-66.
- George E. 1993. *Plant propagation by tissue culture Part 1 The technology*. Butler and Tanner Ltd (ed). Gran Bretaña. 1361pp.
- Hicks G.S. 1980. Patterns of organ development in plant tissue culture and the problem of organ determination. *Bot. Rev.* 46: 1-23.
- Williams E.G. and Maheswaran G. 1986. Somatic embryogenic factors influencing coordinated behavior of cells as an embryogenic group. *Ann. Bot.* 57: 443-597.

I - CAPÍTULO 3

La citogenética molecular e inmunocitogenética en el estudio de los genomas vegetales

Guillermo Seijo; Graciela I. Lavia;
Germán Robledo; Aveliano Fernández;
Viviana G. Solís Neffa

1 Introducción

La comprensión de la organización de los genomas lograda a través del análisis citogenético ha tenido un gran impacto en la evaluación y utilización de la biodiversidad, así como en el mejoramiento genético y la ingeniería genética, en particular, desde el desarrollo de las técnicas de citogenética molecular. El empleo sondas de ADN y de anticuerpos conjugados con fluorocromos en un número creciente de especies vegetales ha permitido, entre otros logros, la localización de secuencias específicas, la identificación de cromosomas particulares, el estudio del origen y la estructura de los genomas de híbridos y poliploides, la comparación de regiones genómicas homólogas, el estudio del comportamiento cromosómico y el análisis de la expresión génica. Por ello, las técnicas de hibridación *in situ* (ISH) e inmunocitogenética constituyen actualmente herramientas indispensables para la comprensión de la organización y la expresión del genoma de las plantas.

En este capítulo se describen, en primera instancia, algunos de los criterios empleados tradicionalmente para la caracterización cariotípica y, posteriormente, se presentan los principios y las aplicaciones de diferentes técnicas de hibridación *in situ* de ácidos nucleicos y de inmunodetección de modificaciones epigenéticas de nucleótidos e histonas.

2 Citogenética clásica

La caracterización cromosómica de especies o variedades de plantas se inicia con la descripción del **cariotipo** a través del análisis del **número**, el **tamaño** y la **forma** de los cromosomas que presentan (**complemento cro-**

mosómico). Esta caracterización se realiza en **metafase mitótica** debido a que, en esta fase, los cromosomas han alcanzado su máximo grado de condensación y sus límites están perfectamente definidos. Para este análisis generalmente se emplean tejidos meristemáticos porque presentan un alto **índice mitótico** (i.e. la razón entre el número de células en división y el número total de células observadas). Los órganos (ápices radicales o caulinares, óvulos, etc.) son pre-tratados con diversas sustancias que inhiben la formación del huso mitótico (colchicina, 8-hidroxiquinoleína, paclosol, etc.) a los efectos de acumular metafases, dispersar los cromosomas en el citoplasma y producir una mayor condensación de los mismos. Los materiales se fijan y luego se tiñen con colorantes nucleares (fucsina básica, orceína, carmín, giemsa, etc.). Finalmente, se confeccionan los preparados por macerado y aplastado ("squash") del material sobre un portaobjetos. Con estos métodos de tinción, los cromosomas metafásicos observados con un microscopio óptico aparecen uniformemente teñidos, excepto en el **centrómero** (constricción primaria) y en algunas constricciones menores (secundarias).

Mediante la observación microscópica se determina el **número cromosómico somático (2n)** y, a través del análisis de microfotografías o dibujos de metafases con cromosomas bien definidos y separados (Fig. 1A), se establecen los cariotipos. Para ello, se analiza la **morfología** de los cromosomas determinando la **posición del centrómero** y la **longitud** de los **brazos corto (bc)** y **largo (bl)**, así como la **longitud total (lt)** de cada cromosoma. A partir de estas medidas, se calcula el **índice centromérico** [$IC = (bc / lt) \times 100$], según el cual los cromosomas se clasifican en cuatro tipos morfológicos: **metacéntricos (m, IC = 50 - 37,5)**, **submetacéntricos (sm, IC = 37,5 - 25)**, **subtelocéntricos (st, IC = 25-12,5)**, **acrocentricos (t, IC = 12,5 - 0)** y **telocéntricos (T, IC = 0)**. Otro aspecto a considerar para caracterizar morfológicamente a los cromosomas es la presencia y la posición de las constricciones secundarias, así como la presencia y el tipo de **satélites**. En general, las primeras corresponden a **regiones organizadoras de los nu-**

cleolos (NORs) y los últimos a las porciones cromosómicas distales delimitadas por la constricción secundaria y el telómero de los brazos que los portan. Los cromosomas que presentan satélites se denominan **cromosomas SAT** (Fig. 1A, E y F).

Para la confección del cariotipo los cromosomas del complemento se ordenan según su morfología (de metacéntricos a submetacéntricos, subteloecéntricos, acrocéntricos y telocén-

tricos) y, dentro de cada tipo, según su tamaño (de mayor a menor) ubicando los centrómeros alineados a una misma altura y los brazos cortos hacia arriba. En las plantas diploides (Fig. 1C y E) y alopoliploides, el cariotipo se compone de **pares** de cromosomas homólogos; mientras que en las autopoliploides (Fig. 1D y F) se compone de **grupos** de tres o más cromosomas de acuerdo con el nivel de ploidía. El orden que ocupa en el cariotipo cada par o

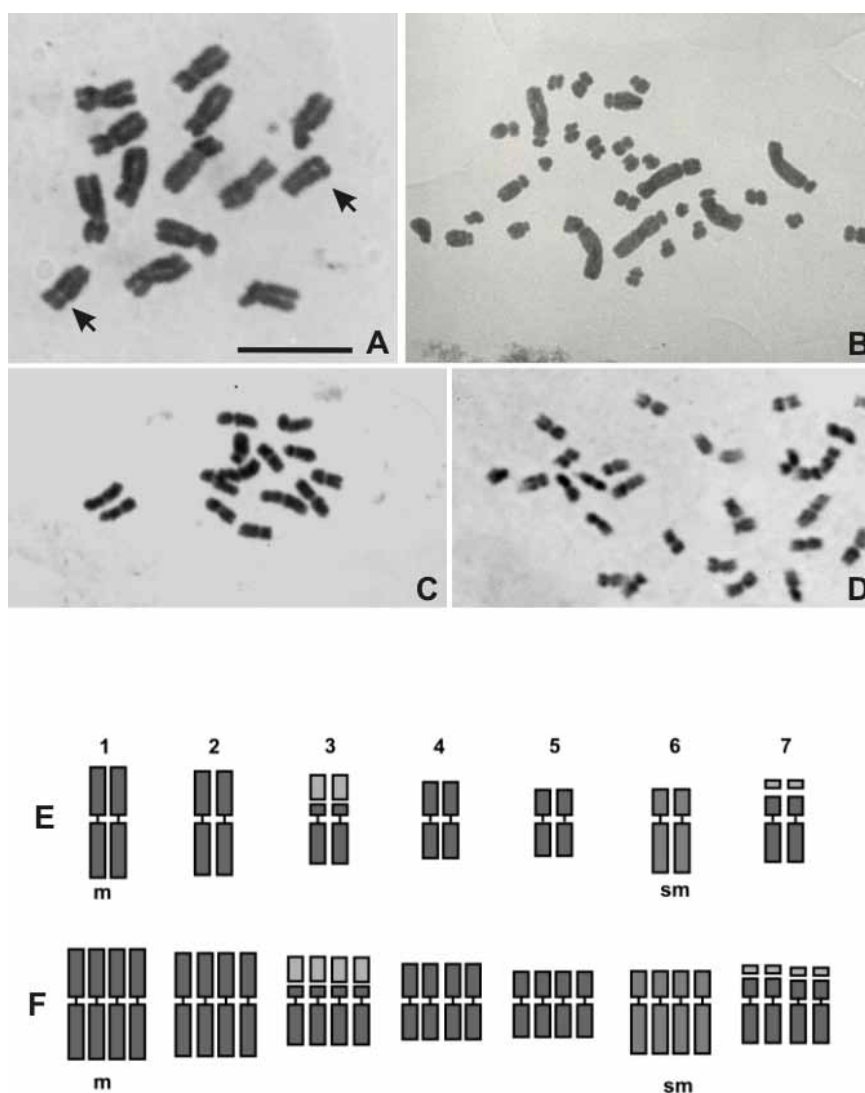


FIGURA 1. A-D: Metafasas mitóticas teñidas con coloración de Feulgen. **A:** *Lathyrus macropus*, $2n = 2x = 14$, las flechas señalan los satélites de los cromosomas SAT. **B:** *Oziroë argentinensis* [citada en Fernández y Daviña (1991) como *Fortunatia biflora*], $2n = 2x = 30$, con un cariotipo asimétrico. **C y D:** *Turnera sidoides* subsp. *pinnatifida*, **C:** citotipo diploide, $2n = 2x = 14$ y **D:** citotipo tetraploide, $2n = 4x = 28$. **E-F:** Idiogramas de los citotipos diploide y tetraploide de *Turnera sidoides* subsp. *pinnatifida* ilustrados en C y D, respectivamente. En gris se representan los satélites de los cromosomas SAT. La barra representa 10 micras en A y B, 5 micras en C y D y 2,5 micras en E y F.

grupo de cromosomas se indica mediante un número y, mediante una letra, el tipo cromosómico al que pertenece de acuerdo a su morfología. La representación gráfica del cariotipo se denomina **idiograma** (Fig. 1E y F). La composición de un complemento cromosómico también se puede expresar mediante una **fórmula cariotípica**, en la que se indica el número de cada tipo morfológico de cromosomas que presenta el material analizado (ej. 16 m + 10 sm + 2 st + 2 t). Entre los parámetros cuantitativos más utilizados para caracterizar los cariotipos se encuentra el **grado de asimetría** que presentan los mismos. Para ello, se emplean **categorías o índices de asimetría cromosómica** que consideran las diferencias de tamaño entre los cromosomas del cariotipo (**asimetría intercromosómica**), y las diferencias morfológicas de los cromosomas derivadas de la proporción entre sus brazos (**asimetría intracromosómica**). Un **cariotipo simétrico** es aquel cuyos cromosomas son aproximadamente del mismo tamaño y en su mayoría metacéntricos, mientras que uno **asimétrico** es aquel que presenta cromosomas de diferentes tamaños y predominantemente submetacéntricos, acrocéntricos o telocéntricos (Fig. 1B). La información obtenida a partir del análisis de los cariotipos permite identificar cromosomas, clasificar los cariotipos, realizar análisis comparativos entre grupos de especies más o menos relacionadas e inferir sus tendencias evolutivas. Asimismo, permite detectar las anomalías numéricas y estructurales en los complementos cromosómicos de células o individuos.

En numerosos grupos de plantas, la identificación de los diferentes pares de homólogos del cariotipo puede resultar engorrosa debido a que presentan cromosomas con morfología muy similar. En estos casos, la aplicación de determinados tratamientos en combinación con diferentes tipos de tinción, puede revelar regiones cromosómicas con condensación o composición cromatínica diferencial (**bandas**), generando marcadores cromosómicos adicionales. Así, el tratamiento de los cromosomas con un álcali y la posterior tinción con Giemsa revela regiones de **heterocromatina constitutiva**, mientras que la impregnación argéntica (bandeo Ag-NOR) revela las **NORs activas**

(Fig. 2A). Además, pueden utilizarse diversos fluorocromos que tienen la capacidad de intercalarse preferentemente en regiones del ADN con una composición de bases particular. Por ejemplo, las regiones ricas en adenina y timina son reveladas con DAPI (4',6-diamidino-2-fenilindol diclorhidrato) o quinacrina, mientras que las ricas en guanina y citosina lo son con CMA₃ (cromomicina A₃). Las bandas pueden ser de tamaño e intensidad diferentes y presentar una distribución particular sobre los cromosomas de un complemento generando un **patrón de bandeo** característico (Fig. 2B). Estas técnicas de **bandeo cromosómico** han permitido, en muchos casos, la identificación inequívoca de cromosomas homólogos, la caracterización de genomas así como el seguimiento de cromosomas o bloques cromosómicos en híbridos y líneas de introgresión.

La diferenciación lineal de los cromosomas por técnicas de bandeo no siempre es evidente en todos los grupos de plantas y, aún en aquellas especies que presentan buenos patrones de bandas, a menudo no se cuenta con un número significativo de marcadores como para integrar los mapas de ligamiento con los mapas físicos. La posibilidad de posicionar secuencias particulares sobre los cromosomas y, de esta forma, generar un gran número de marcadores cromosómicos ha sido posible gracias al desarrollo de las técnicas de **hibridación in situ**, cuyo uso se ha generalizado a partir del desarrollo de sistemas de marcado y de detección de sondas no radiactivas.

3 Hibridación in situ fluorescente (FISH)

Esta técnica se basa en reacciones de reconocimiento y asociación de bases entre un segmento del ADN cromosómico (**secuencia blanco**) y una secuencia complementaria marcada (**sonda**). La misma se aplica a preparaciones de células somáticas o germinales, previamente incubadas con enzimas (celulasa, pectinasa y citohelicasa) que remueven las paredes celulares. Las preparaciones son tratadas con ARNasa A para evitar hibridaciones inespecíficas de la sonda con ARNs y, posteriormente, son permeabilizadas mediante la incubación con proteasas. Las sondas pueden

ser **marcadas** con nucleótidos unidos a haptenos (digoxigenina, biotina, etc.) o a fluorocromos (Cy3, Cy5, etc.) por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), por una transferasa terminal o por medio de la actividad exonucleotídica y de la subsiguiente polimerización realizadas por la ADN pol I a partir de escisiones simples causadas por una ADNasa (**nick translation**). La sonda marcada, componiendo una mezcla de hibridación que contiene formamida y ADN bloqueante (entre otros componentes) es colocada sobre las preparaciones cromosómicas, para luego realizar una **desnaturalización** conjunta del ADN de los cromosomas y de la sonda, a temperaturas que varían entre 70 °C y 90 °C durante unos 10 minutos. Posteriormente, los preparados son incubados a 37 °C durante al menos 1 hora (normalmente toda la noche) a fin de inducir la **hibridación**. En este paso, la sonda y la secuencia cromosómica complementaria al blanco compiten entre sí, pero debido a la alta concentración de la primera y a su menor tamaño, bajo condiciones óptimas, la sonda hibrida en todos los sitios complementarios a lo largo de los cromosomas. En el caso de las sondas marcadas con haptenos, la detección de los sitios de hibridación se realiza mediante una o dos rondas de anticuerpos conjugados con fluorocromos. Los preparados se analizan con microscopios de epifluorescencia utilizando filtros específicos para cada fluorocromo, registrando la **presencia**, el **tamaño** y el **número de señales fluorescentes** por complemento. Normalmente, se obtiene una microfotografía monocromática por cada sonda utilizada y una del complemento cromosómico teñido con DAPI o yoduro de propidio. Estas microfotografías son superpuestas e integradas en una sola imagen. El posicionamiento relativo de las señales con respecto al centrómero, los telómeros u otros marcadores cromosómicos permite mapear con precisión cada sonda sobre el complemento cromosómico y representarlas en un idiograma. A diferencia de la citogenética clásica, la identificación de cromosomas o de segmentos cromosómicos particulares usando sondas de FISH es independiente de la morfología cromosómica y, por lo tanto, es posible reconocerlos en diferentes estados del ciclo celular.

Desde el desarrollo inicial de la técnica de FISH, se han mejorado sustancialmente tanto la **sensibilidad** (i.e. el tamaño mínimo de una secuencia que puede ser detectada bajo el microscopio) como el **poder de resolución espacial** (i.e. la distancia física mínima a la que dos secuencias pueden ser identificadas como independientes). Bajo condiciones óptimas de hibridación y de detección, la sensibilidad de esta técnica depende de la **accesibilidad** de la sonda a la región complementaria sobre el ADN. La misma, a su vez, está determinada por el **grado de condensación** de la cromatina. El éxito de FISH se debe a las indudables ventajas que ofrece frente a las técnicas clásicas para identificar homologías y, sobre todo, a la posibilidad de contar con una amplia batería de sondas disponibles de acuerdo con la naturaleza de la secuencia blanco que se quiera detectar.

En general, se pueden utilizar sondas de ADN de **copia única**, **moderadamente repetitivo** o **altamente repetitivo**. Las secuencias repetitivas pueden ser **conservadas** o **variables** y estar dispuestas en **tándem** (i.e. una copia está seguida de otra en arreglos de decenas a miles de copias formando un locus definido) o **dispersas** (i.e. las repeticiones pueden estar dispuestas a lo largo de una región cromosómica, de algunos cromosomas o de todo el complemento). Entre las secuencias repetitivas, las sondas de los **genes ribosomales** (ADNr) **45S** y **5S** son las empleadas con mayor frecuencia para la generación de marcadores cromosómicos por FISH. Esto es debido a que son secuencias altamente conservadas y a que presentan una disposición en tándem que facilita la detección de los *loci*. Los mismos pueden estar presentes en más de un sitio por complemento cromosómico, proporcionando marcadores útiles para la identificación de cromosomas y para realizar comparaciones cariotípicas (Fig. 2C). Otra de las sondas de secuencias conservadas y repetidas en tándem que se emplean habitualmente en experimentos de FISH son las **teloméricas** (Fig. 2D). Las mismas son utilizadas tanto para establecer con precisión los límites cromosómicos como para revelar inversiones que comprenden los segmentos cromosómicos distales y la ocurrencia de fusiones

cromosómicas. Las sondas de **secuencias no conservadas repetidas en tándem** son muy útiles para el desarrollo de marcadores específicos de cromosomas y de complementos cro-

mosómicos; mientras que las de **secuencias repetidas dispersas** lo son para definir regiones cromosómicas o genomas, en particular, para identificar los genomas parentales en los

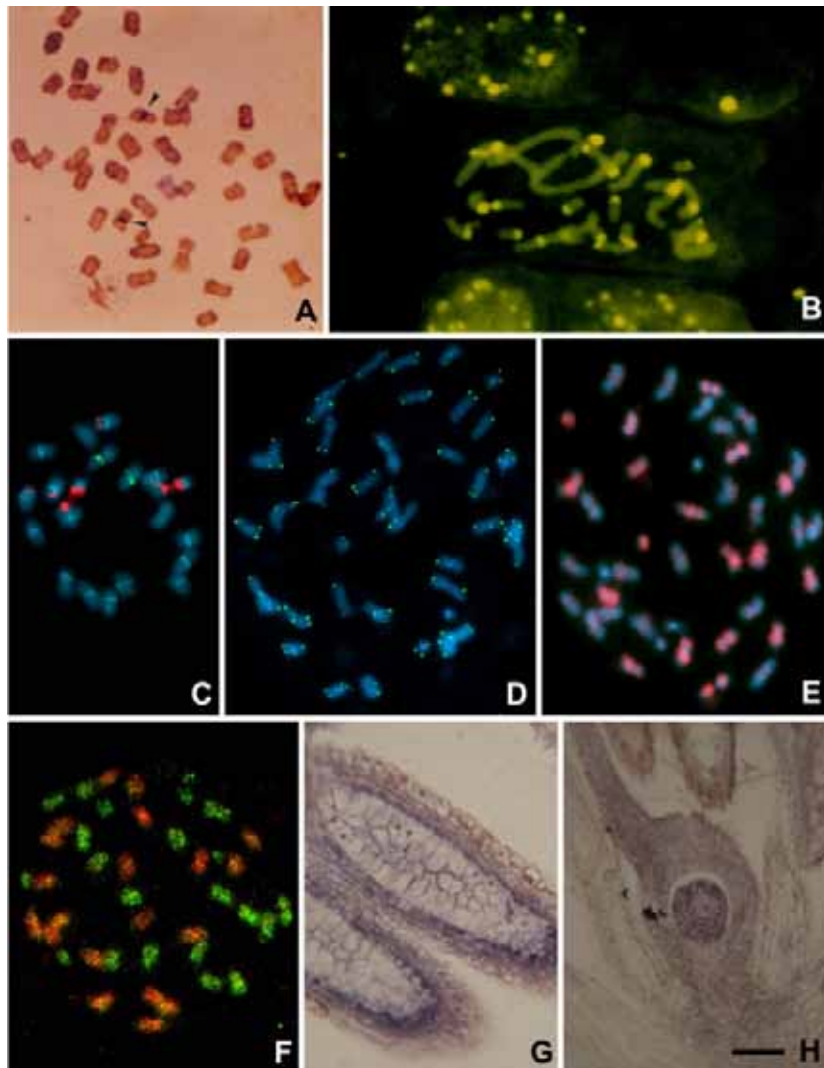


FIGURA 2. **A:** Bando Ag-NOR en una metafase de *Arachis hypogaea* donde se identifican las regiones organizadoras del nucleolo en marrón oscuro (flechas). **B:** bando con quinacrina que distingue las regiones heterocromáticas ricas en AT (en amarillo intenso) de las regiones eucromáticas (amarillo pálido) en los cromosomas prometafásicos de *Oziroe argentensis*. **C:** FISH doble en una metafase de *A. batizocoi* en donde se localizan los genes ribosomales 5S (en verde) y 45S (en rojo), la contratinción realizada con DAPI diferencia bandas heterocromáticas centroméricas ricas en AT (en blanco) de las porciones cromosómicas eucromáticas (en azul). **D:** FISH que revela las regiones teloméricas (verde) de *A. hypogaea*. **E:** FISH que revela la distribución preferencial de un retroelemento en el genoma A de *A. hypogaea*. **F:** GISH doble sobre una metafase de *A. hypogaea* utilizando como sondas ADN genómico de *A. ipaensis* (rojo) y de *A. duranensis* (verde) que demuestra la constitución alopoliploide del cultígeno y las especies diploides progenitoras más probables. **G y H:** ARN-FISH en antera y ovario de *Paspalum notatum* utilizando como sonda un ARN marcado de expresión diferencial y tejido-específica en plantas apomícticas pero no sexuales. La intensidad del color violeta indica cantidades relativas del ARN analizado presente en los diferentes tejidos de plantas apomícticas. La barra representa 5 micras en A, C-F, 10 micras en B, 200 micras en G y 100 micras en H.

híbridos interespecíficos y en los alopoliploides (Fig. 2E). Ambos tipos de secuencias repetidas pueden mostrar diferencias notorias en los motivos que las componen, así como en su abundancia y distribución, aún entre especies estrechamente emparentadas. El análisis del conjunto de las secuencias repetitivas constituye una herramienta excelente, en sí misma o como complemento de otras técnicas, para la identificación de cromosomas y genomas, el estudio de la arquitectura nuclear y los análisis filogenéticos. También nos permiten realizar estudios detallados de aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas, hacer inferencias sobre los mecanismos involucrados en la evolución cromosómica y realizar el seguimiento de cromosomas o regiones particulares en las sucesivas generaciones de los programas de mejoramiento. Las sondas de **secuencias únicas** hibridan con el ADN cromosómico correspondiente a un locus específico. A diferencia de las secuencias repetidas que pueden ser localizadas fácilmente por FISH, la detección de las secuencias únicas es más laboriosa debido a que, por lo general, las regiones codificantes de los genes presentan longitudes menores que las detectables por FISH convencional (10 kb). El empleo de grandes bloques de ADN genómico clonado en vectores, como los cromosomas artificiales de bacterias (**BACs**), en combinación con FISH (**BAC-FISH**), constituye un método efectivo para el mapeo físico de secuencias únicas de ADN. Sin embargo, el ADN repetitivo presente en las regiones no codificantes de los insertos muchas veces genera patrones de señales dispersas o inespecíficas (background). A pesar de esta dificultad, hasta el momento, BAC-FISH constituye una de las mejores técnicas para correlacionar los mapas genéticos con los físicos, ya que se pueden desarrollar sondas específicas para cada cromosoma o locus en particular.

4 Hibridación in situ genómica (GISH)

Esta técnica se utiliza para identificar los diferentes genomas presentes en un organismo híbrido o alopoliploide. Aunque aplica todos los principios de FISH, difiere de ésta porque las sondas que utiliza están constituidas por **ADN**

genómico total y no por un fragmento de ADN de secuencia conocida. El ADN utilizado para construir estas sondas es extraído mediante protocolos estándares y luego es marcado por nick translation o por amplificaciones al azar usando cebadores cortos (random priming). El éxito de GISH depende del grado de diferenciación que presenten los genomas que se pretende analizar. Por lo general, las secuencias codificantes de los genomas de dos especies más o menos relacionadas no varían substancialmente entre sí, por lo tanto, la hibridación diferencial de las sondas en GISH está determinada principalmente por el grado de divergencia del componente repetitivo de los genomas en cuestión. En la medida en que los dos genomas presenten más secuencias en común, mayor será la dificultad para distinguirlos. Una estrategia para mejorar la capacidad discriminante de esta técnica consiste en realizar un **GISH simple** utilizando ADN de un genoma marcado (sonda) junto con una determinada proporción de ADN sin marcar del genoma que no se va a detectar (**sonda fría**). En cambio, cuando la diferencia entre las secuencias de los genomas considerados es alta se puede utilizar **GISH doble o triple**, colocando sobre el preparado mezclas equimolares de las sondas marcadas diferencialmente para cada uno de los genomas que se quiere distinguir en una metafase. Las regiones cromosómicas que hibridan con una sola sonda se visualizan con el color original del fluorocromo, mientras que las que presentan complementariedad con dos o más sondas presentan colores intermedios.

Entre las diferentes aplicaciones de GISH, se destaca el estudio de la **composición genómica** de los **alopoliploides** y de los **híbridos naturales o artificiales**. En estos casos, la técnica se basa en la hibridación del ADN genómico marcado de los probables ancestros o progenitores sobre las preparaciones cromosómicas del material en estudio. La hibridación diferencial de las sondas con sólo un subgrupo de cromosomas en una metafase constituye una clara evidencia de que el material estudiado está compuesto por diferentes genomas. **Mediante el empleo de GISH** se han determinado los progenitores probables de algunas especies alopoliploides cultivadas como el ta-

baco, la avena, el trigo y el maní (Fig. 2F). Otra de las ventajas de analizar los híbridos y los alopoliploides con GISH doble o múltiple, consiste en la capacidad que ofrece esta técnica para **detectar translocaciones intergenómicas, las que pueden pasar inadvertidas con los métodos convencionales de análisis genómico. Aplicado a células meióticas, GISH proporciona un método preciso para el análisis de los apareamientos cromosómicos que ocurren en los genomas híbridos. El estudio de la capacidad de los cromosomas de aparearse en meiosis es el procedimiento utilizado tradicionalmente para establecer las relaciones genómicas entre diferentes especies. Sin embargo, en muchas configuraciones metafásicas resulta difícil distinguir los apareamientos ocurridos entre cromosomas homólogos de aquellos ocurridos entre cromosomas homeólogos (i.e. parcialmente homólogos). Mediante GISH es posible “pintar” los cromosomas y, de este modo, determinar el origen genómico de los cromosomas apareados y no apareados, tanto en profase como en metafase de la meiosis I.** La técnica de GISH también constituye una herramienta irremplazable para el desarrollo de programas de mejoramiento vegetal que involucran hibridaciones interespecíficas o intergenéricas ya que permite: 1) confirmar el origen híbrido de la progenie, 2) determinar el origen de los cromosomas en las distintas generaciones, en particular, cuando los híbridos F_1 muestran inestabilidad cromosómica tal como la eliminación cromosómica uniparental, 3) identificar bivalentes interparentales en la meiosis de los híbridos F_1 sexuales y 4) comprobar si los cromosomas recombinantes son transmitidos a las siguientes generaciones. Esta técnica también ha sido utilizada para detectar regiones cromatínicas introgresantes, especialmente aquellas que portan caracteres agronómicos de interés. Un ejemplo de ello es el análisis de una línea élite de cebada introgresada con *Hordeum bulbosum* resistente a roya. Mediante una combinación de GISH y FISH se pudo determinar la localización de los fragmentos cromosómicos de *H. bulbosum* introgresados en el complemento cromosómico de cebada que le conferirían dicha resistencia.

5 Mapeo por amplificación directa de secuencias de interés por PCR in situ (PRINS)

La técnica de PRINS (“primed *in situ*”) es considerada como una alternativa a ISH para la detección de ciertos tipos de secuencias de ácidos nucleicos. Esta técnica involucra la extensión de cebadores diseñados para las secuencias blanco por medio de la *Taq* polimerasa. Durante la extensión, se incorporan nucleótidos marcados con fluorocromos o haptenos a fin de permitir la localización física de las secuencias en forma directa o indirecta mediante protocolos adicionales de detección. Comparada con FISH convencional, PRINS ofrece algunas ventajas tales como: 1) el empleo de cebadores diseñados a partir de un mínimo de información de la secuencia blanco, 2) dichos cebadores pueden hibridar con secuencias de ADN más fácil y rápidamente que las sondas (de mayor tamaño) usadas en FISH, aún en cromatina compacta, 3) no requiere el marcado de sondas y 4) los cebadores pueden ser extendidos aún dentro de las secuencias adyacentes (a diferencia de FISH que depende de una secuencia específica), reforzando la intensidad de la señal para una secuencia corta. Mediante PRINS se han localizado secuencias repetitivas en tándem (secuencias teloméricas, elementos móviles y ADN_r) en cromosomas de leguminosas (*Vicia faba* y *Pisum sativum*) y de gramíneas (*Hordeum vulgare*, *Avena sativa* y *Lolium multiflorum*). Todos los *loci* encontrados fueron coincidentes con los hallados por FISH. Los resultados demuestran que la técnica de PRINS es apropiada para la localización rápida de repeticiones en tándem sobre cromosomas vegetales cuando la distancia entre los cebadores es pequeña (1 kb) y los blancos son largos (100 – 500 kb). Sin embargo, no se obtienen buenas señales cuando las secuencias repetidas están muy separadas entre sí, como ocurre con el gen de la vicilina. Este gen está repetido muchas veces en el genoma de *Vicia faba*, pero cada copia está separada por una distancia mayor de 12 kb. En estos casos, el empleo de FISH resulta más adecuado dado que se obtienen mejores señales. Por otra parte, PRINS no ha presentado ventajas con respecto a FISH convencional para la detección

de secuencias simples en la mayoría de los casos, aún utilizando PRINS cíclico que involucra de 5 a 10 ciclos de amplificación. Una de las mayores desventajas de PRINS es el alto grado de aparición de señales inespecíficas, probablemente debido a la incorporación de nucleótidos marcados en los extremos 3'OH libres que resultan de roturas espontáneas de los cromosomas durante el procesamiento del material. Estas incorporaciones indeseables pueden disminuirse mediante el tratamiento con ligasa o incorporando 2', 3' - dideoxinucleótidos (ddNTP) antes de PRINS.

En síntesis, esta técnica es útil para la detección rápida de repeticiones en tándem grandes, pero no constituye una alternativa a FISH para la detección de genes de copia simple o para el pintado de los cromosomas en plantas mediante el uso de un cóctel de cebadores cromosoma-específicos.

6 FISH de alta resolución

Bajo este concepto se agrupan una serie de técnicas que, utilizando los mismos principios de FISH convencional, permiten hacer hibridaciones sobre cromosomas profásicos o aún sobre núcleos interfásicos. Estas estrategias permiten aumentar tanto la resolución como la sensibilidad de la detección.

- **FISH sobre cromosomas poco condensados:** consiste en el análisis de cromosomas meióticos en paquitene o de cromosomas mitóticos extendidos.

La técnica de **cromosomas paquiténicos** se aplica a células madres del polen fijadas en etanol : ácido acético (3:1) y tratadas con una mezcla de enzimas (celulasa, pectinasa y citohelicasa) que digieren la calosa de las paredes celulares. En general, los cromosomas paquiténicos vegetales son de 7 a 40 veces más largos que aquellos de metafases mitóticas, están compuestos por cuatro hebras de ADN (iguales en los homocigotos), son más accesibles a las sondas (debido a que tienen una estructura cromatínica menos condensada) y presentan marcadores cromosómicos particulares (bloques heterocromáticos y knobs) que permiten individualizarlos con facilidad. Estas

características hacen que los cromosomas paquiténicos constituyan el material de elección para los estudios de FISH de alta resolución, en particular, para identificar secuencias blanco de alrededor de 10 kb y resolver dos *loci* separados por menos de 100 kb.

Por otra parte, la técnica de FISH sobre **cromosomas mitóticos extendidos** utiliza cromosomas metafásicos seleccionados por **citometría de flujo** a partir de meristemas radicales sincronizados. El estiramiento de los cromosomas se realiza mediante una digestión moderada con proteinasa K, antes de la fijación con etanol-ácido acético (3:1). Mediante este procedimiento, se pueden obtener cromosomas con una longitud de 10 a 100 veces mayor que la original. Esto permite aumentar la resolución de los arreglos de secuencias génicas y repetidas sobre los cromosomas, sin perder la información sobre la orientación relativa con respecto al centrómero y los telómeros. Esta técnica posee una resolución similar a la que utiliza cromosomas paquiténicos y es muy útil en aquellas especies en las que la obtención de buenos preparados meióticos es dificultosa o en aquellas que poseen cromosomas paquiténicos difíciles de resolver.

- **FISH en núcleos interfásicos:** esta técnica se aplica a núcleos en cortes de tejidos así como a núcleos aislados, y permite incrementar tanto la sensibilidad como la resolución de FISH.

Para el análisis de los **núcleos en tejidos**, los órganos de la planta se fijan con formaldehído o glutaraldehído (este último en baja proporción ya que puede inducir autofluorescencia), luego se cortan con micrótopo y los cortes se montan directamente sobre un portaobjetos. Debido a que la sonda necesita penetrar en el tejido para alcanzar el interior del núcleo, se realizan diversos pre-tratamientos tendientes a incrementar la permeabilidad de los tejidos y, además, se emplean como sondas fragmentos marcados cuyo tamaño no supera los 100-500 pb. El análisis de las hibridaciones se realiza con un microscopio confocal, debido a que este tipo de microscopio permite visualizar las estructuras mediante la reconstrucción tridimensional de las secciones ópticas de la muestra.

Para el análisis de **núcleos aislados**, los tejidos se disgregan en un buffer de estabilización apropiado y la fracción de interés se obtiene por centrifugación y tamizado en mallas con diferentes diámetros de poro. Los núcleos aislados se colocan directamente sobre un portaobjetos y se secan al aire y deshidratan en serie alcohólica. Este procedimiento, que también puede ser aplicado a suspensiones celulares, no presenta mayores problemas de permeabilidad para las sondas. Las regiones de hibridación de las sondas sobre las secuencias de copia simple se observan como señales individuales dentro del núcleo (dos señales en los núcleos diploides), cada una de ellas correspondiente a cada uno de los cromosomas homólogos.

Mediante estas técnicas también se ha estudiado la organización y la disposición de los centrómeros, de los telómeros y de los cromosomas en núcleos interfásicos de diferentes órganos y tejidos de trigo, arroz, tabaco y *Arabidopsis thaliana*. En particular, las mismas resultan muy útiles para el análisis de los cambios que se producen durante el ciclo celular en las diferentes estructuras cromosómicas dependientes de secuencias. También se emplean para el mapeo de secuencias separadas por distancias menores a 500-1000 kb, ya que en los cromosomas metafásicos las señales de las sondas separadas por estas distancias se superponen.

- **FISH en fibras de ADN extendidas (fiber-FISH):** se basa en la hibridación de las sondas sobre fibras extendidas de ADN. Esta técnica involucra los siguientes pasos: 1) se aíslan los núcleos por medio de mallas de nylon de diferentes diámetros de poro, 2) se deposita un pequeño volumen de la suspensión de núcleos en uno de los extremos de un portaobjetos tratado con poli-L-lisina (este compuesto reduce al mínimo la aparición de señales inespecíficas y favorece la extensión de las fibras de ADN), 3) se agrega un buffer de lisis y se realiza la extensión usando un cubreobjetos de manera similar a como se hace un frotis de sangre, y 4) sobre estos extendidos se realizan las hibridaciones siguiendo el protocolo convencional de FISH. Normalmente, se realizan dos o tres

rondas de amplificación con anticuerpos para obtener una buena intensidad de las señales. La principal ventaja de fiber-FISH frente a FISH en núcleos interfásicos es que se logra una mayor sensibilidad (200 pb) y una resolución a nivel genómico de 1 kb. Esta técnica es de gran utilidad para analizar clones solapantes, detectar rearrreglos cromosómicos pequeños, determinar distancias físicas entre genes y su orientación, medir tamaños de *loci* y acelerar el clonado posicional. Sin embargo, su utilidad para el mapeo de secuencias es limitada debido a que sólo permite establecer posiciones relativas, perdiendo la orientación real de las sondas con respecto al centrómero y a los telómeros. Una variante de esta técnica es el empleo de **cromatina estirada**, un procedimiento que involucra la extensión de las fibras cromatínicas sin remover las proteínas, la que resulta muy útil para examinar las interacciones ADN-proteínas.

7 Mapas cromosómicos

Estos mapas constituyen una herramienta fundamental para integrar los mapas físicos (basados en el ordenamiento de secuencias y el armado de contiguos) y los mapas genéticos (derivados de los análisis de ligamiento). Los mapas cromosómicos permiten posicionar genes y/o marcadores ligados a éstos, con respecto a marcadores estructurales propios de los cromosomas (por ejemplo, centrómeros, telómeros, bandas heterocromáticas y constricciones secundarias) o a otros marcadores cromosómicos desarrollados por FISH. Esta integración facilita el mapeo y el aislamiento de genes particulares por métodos convencionales y son indispensables para el aislamiento de secuencias por microdissección y microclonado.

Para el clonado posicional de secuencias es importante tener una estimación precisa de la razón kb/cM existente en la región del locus de interés. Esto posibilita la conversión de las distancias genéticas establecidas entre los marcadores y el gen en estudio en distancias físicas. En general, se ha observado que la distancia entre loci en los mapas genéticos (y no el orden) puede diferir mucho de la distancia establecida en los mapas físicos. Los estudios

de los nódulos de recombinación en complejos sinaptonémicos han revelado que la discrepancia entre los mapas físicos y genéticos es el resultado de la distribución no al azar de los eventos de crossing-over a lo largo de los cromosomas. En este marco, el desarrollo de los mapas cromosómicos ha cobrado importancia debido a que, dependiendo de las regiones cromosómicas que se analicen y a la frecuencia de recombinación propia de cada una, los mapas genéticos pueden ser mejores o peores estimadores de las distancias físicas reales.

Por tal motivo, en varias especies modelo se ha puesto especial énfasis en el desarrollo de marcadores cromosómicos por las técnicas de ISH (principalmente BAC-FISH, y Fiber FISH) para poder integrar los grupos de ligamiento genético con cromosomas, y para relacionar las estimaciones de distancia por recombinación con la distancia física real (Ver capítulo de Genómica).

8 Análisis de la expresión génica en tejidos por ARN-ISH

Los protocolos de ISH de ARN resultan apropiados para describir los patrones temporales y espaciales de expresión de un determinado gen a nivel celular o subcelular. En los organismos multicelulares, ISH constituye un complemento de los análisis de northern blotting, RT-PCR y microarrays, en los que la extracción de ARN de los tejidos resulta invariablemente en la pérdida de información espacial. Asimismo, si bien los microarrays constituyen una de las técnicas más poderosas para analizar la expresión de muchos genes simultáneamente, con frecuencia los resultados que se obtienen deben ser verificados por métodos independientes tales como ISH. El análisis de la expresión génica por ISH generalmente se efectúa sobre cortes de tejido, aunque también puede realizarse sobre órganos enteros ("whole-mount ISH", ISH-WISH). La técnica se basa en la utilización de una sonda (generalmente cDNA) marcada con haptenos que se hibridará directamente sobre los cortes de tejido. Las detecciones se realizan con anticuerpos conjugados con fosfatasas alcalinas o con fluorocromos.

Para aquellos casos en los que el ARNm a

detectar está poco representado en las muestras, se pueden utilizar protocolos que amplifican la señal mediante el precipitado enzimático de tiramida sobre los sitios blancos (TSA, Tyramide Signal Amplification). La aplicación de TSA en los protocolos estándares de ISH, consiste en una detección inicial de la sonda marcada con anticuerpos o estreptavidina conjugados con una peroxidasa (por ejemplo la de rábano picante, horseradish peroxidase o HRP). Posteriormente, se agrega al preparado tiramida conjugada con algún hapteno o fluorocromo, la cual es precipitada masivamente por la HRP y unida en forma covalente al sitio de detección inicial. El sistema resultante es detectado mediante anticuerpos conjugados con fosfatasas alcalinas (para detecciones cromogénicas estándares) o directamente con microscopía de epifluorescencia. Debido a que la tiramida adicionada sólo se deposita en las regiones próximas a la enzima, se logra aumentar significativamente la sensibilidad sin perder resolución. La principal limitante de ARN-ISH radica en que, generalmente, se puede analizar una sola sonda por cada hibridación. No obstante, esta técnica se ha utilizado para comparar los niveles y sitios de expresión de secuencias en numerosas especies de plantas. Uno ejemplo de ello, es el análisis espacial de transcritos expresados diferencialmente en plantas con reproducción sexual y apomíticas de *Paspalum notatum* (Fig 2 G y H).

9 FISH cuantitativo para estimar la expresión génica (QUISH)

A diferencia de la técnica de ARN-FISH, que utiliza anticuerpos sobre cortes de tejidos para la detección de la expresión génica, QUISH se basa en la hibridación de oligonucleótidos gen-específicos marcados con fluorocromos directamente sobre porciones de tejidos u órganos enteros, combinada con el análisis de secciones ópticas realizadas con un microscopio láser confocal de barrido. De este modo, se logra mejorar notablemente la calidad de los resultados debido a que se eliminan los pasos que generan artefactos e impiden realizar una cuantificación precisa. La característica clave de QUISH es la cuantificación de la expresión

génica utilizando como estándar a los genes de mantenimiento celular (genes “housekeeping”, GAPDH y 18S ARNr). El empleo de este estándar permite corregir la variación de la razón citoplasma/vacuola en los diferentes tipos celulares, los efectos ópticos de los tejidos y las señales no específicas. La naturaleza cuantitativa de esta técnica hace posible el análisis de la expresión génica en órganos, a nivel tisular o celular, independientemente de las diferencias debidas a la edad o a los tipos de tejidos. Este método es mas rápido que los métodos tradicionales y puede utilizarse para estudiar la localización celular de la expresión de uno o varios genes en un período relativamente corto de tiempo. Asimismo, con QUISH es posible investigar los cambios en los niveles de los transcritos durante la ontogenia o, en respuesta a cambios de las condiciones ambientales en diferentes líneas de plantas modelo.

10 Identificación de modificaciones cromatínicas por inmunocitogenética

La identidad celular está determinada por un programa nuclear establecido por un patrón complejo de interacciones entre el ADN y las proteínas. La organización del ADN en la cromatina regula la expresión y el mantenimiento de la información genética (replicación, reparación, recombinación y segregación) en forma dinámica. Las colas N-terminales de las histonas que conforman el núcleo de los nucleosomas están sujetas a diferentes modificaciones pos-traduccionales (acetilación, metilación, fosforilación, ubiquitinación, etc.) las que, conjuntamente con la metilación del ADN, controlan el empaquetamiento de los nucleosomas en arreglos de orden superior y proveen señales para diversos procesos celulares. Aunque las histonas y sus modificaciones son altamente conservadas, la distribución de las mismas en los cromosomas puede variar a lo largo de los procesos de diferenciación y del ciclo celular, así como dentro y entre grupos de eucariotas. Recientemente, se han producido grandes avances en el esclarecimiento del llamado código de las histonas y del intrincado mecanismo de regulación epigenética. La citogenética se encuentra en una posición privile-

giada para realizar estudios de este tipo ya que permite unir estructuras nucleares con características bioquímicas, tales como la actividad transcripcional, la replicación del ADN, las modificaciones de las histonas y la metilación del ADN mediante la inmunodetección de distintos blancos celulares con anticuerpos conjugados con fosfatasa alcalina o con fluorocromos. La preparación del material, la fijación, la digestión de las paredes celulósicas, la permeabilización y la incubación con anticuerpos se realizan de igual modo que en FISH, aunque se omiten los pasos de desnaturalización e hibridación. Las técnicas de inmunocitogenética se emplean para analizar la estructura cromatínica y la disposición de las diferentes moléculas que intervienen en las divisiones celulares. En particular, estas técnicas son útiles para estudiar la distribución de las modificaciones histónicas y la metilación del ADN en relación con la estructura cromatínica en cromosomas y núcleos durante el ciclo celular. Merecen especial mención aquellos análisis relacionados con las modificaciones que indican estructuras cromatínicas abiertas, con potencialidad de transcripción, y las que delimitan estructuras cromatínicas cerradas, con actividad transcripcional reprimida. El advenimiento de las técnicas de citogenética molecular y de inmunocitogenética ha permitido disectar progresivamente el núcleo a nivel de microscopía óptica. La detección individual de complejos proteicos y de secuencias de ARNs y ADN ha revelado la existencia de muchos compartimientos nucleares. Las variaciones en la arquitectura nuclear reflejan la relación existente entre la organización nuclear y la regulación génica. El análisis de dicha arquitectura incluye varios parámetros cuantitativos y cualitativos, tales como el tamaño y forma nuclear, el contenido relativo y la distribución de heterocromatina, los patrones generales de modificación cromatínica, la presencia de compartimientos nucleares (nucleolos, cromocentros, territorios cromosómicos y cuerpos nucleares) y la organización de los cromosomas en el núcleo (ie. la posición y la orientación de los cromosomas en el núcleo) y las diferencias en la condensación cromatínica a nivel local.

11 Análisis de la posición de la inserción de los transgenes

Diferentes ensayos han demostrado que la expresión de los transgenes puede variar significativamente entre especies diploides relacionadas, entre líneas transformadas independientes, y aún entre generaciones de las líneas transformadas. Los niveles de expresión de estas secuencias pueden ser afectados por diversos factores, entre ellos, la presencia de numerosas copias de la construcción en uno o varios *loci* y el contexto genómico en que se encuentran las copias. La técnica de FISH permite mapear los transgenes en cromosomas metafásicos, en núcleos interfásicos o en fibras extendidas de ADN y, a su vez, determinar el número de *loci* en que se encuentran los mismos. Para el mapeo se utiliza una sonda marcada correspondiente al transgen y otras sondas que permitan identificar los pares cromosómicos, un genoma o un subgenoma particular (en el caso de híbridos o alopoliploides). Uno de los ejemplos clásicos, en el cual se combinaron diferentes técnicas moleculares y citogenéticas para analizar los efectos del contexto genómico en la expresión de los transgenes fue realizado en tabaco. En el mismo se empleó FISH para mapear los transgenes sobre los cromosomas y GISH para identificar los genomas del alopoliploide. A partir de estos estudios, se ha demostrado que, en general, los transgenes con expresión estable están localizados en las proximidades de las regiones teloméricas y ricas en genes, mientras que los de expresión inestable se localizan en las regiones intercalares o paracentroméricas que son más pobres en genes. Por otra parte, la combinación de FISH con técnicas de inmunocitogenética permite analizar el contexto epigenético de la cromatina circundante a los transgenes y su relación con la expresión de los mismos.

Lecturas / sitios recomendados

Bennett M.D. 1995. The development and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant biosystematics. In: Brandham P.E. and Bennett M.D. (eds.). Kew Chromosome Conference IV. Royal Botanic Gardens, Kew, 1995. pp 167-183.

- Fernández A. and Daviña J.R. 1991. Heterochromatin and genome size in *Fortunatia* and *Camassia* (Hyacinthaceae). Kew Bulletin, **46**, 307-316.
- Fransz P.F., Alonso-Blanco C., Liharska T.B., Peeters A.J.M., Zabel P. and Jong J.H. 1996. High-resolution physical mapping in *Arabidopsis thaliana* and tomato by fluorescence *in situ* hybridization to extended DNA fibers. The Plant Journal, **9**, 421-430.
- Küper H., Ort Seib L., Sivaguru M., Hoekenga O.A. and Kochian L.V. 2007. A method for cellular localization of gene expression via quantitative *in situ* hybridization in plants. The Plant Journal, **50**, 159-175.
- Laspina N.V., Vega T., Seijo J.G., González A.M., Martelotto L.G., Stein J., Podio M., Ortiz J.P.A., Echenique V.C., Quarín C.L. and Pessino S.C. 2008. Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. Plant Molecular Biology, **67**, 615-628.
- Lavia G.I., Fernández A. and Seijo J.G. 2008. Cytogenetic and molecular evidences on the evolutionary relationships among *Arachis* species. In: Sharma A.K. and Sharma A. (eds.). Plant Genome: Biodiversity and Evolution. Volume 1E: Phanerogam-Angiosperm. Science Publishers, Enfield, NH, USA, 2008. pp 101-134.
- Moscone E.A., Matzke M.A. and Matzke A.J.M. 1996. The use of combined FISH/GISH in conjunction with DAPI counterstaining to identify chromosomes containing transgene inserts in amphidiploid tobacco. Chromosoma, **105**, 231-236.
- Robledo G., Lavia G.I. and Seijo G. 2009. Species relations among wild *Arachis* species with the A genome as revealed by FISH mapping of rDNA loci and heterochromatin detection. Theoretical and Applied Genetics, **118**, 1295-1307.
- Schwarzacher T. and Heslop-Harrison P. 2000. Practical *in situ* hybridization. BIOS Scientific Publishers, Oxford, 2000. pp. 203.
- Seijo J.G., Lavia G.I., Fernández A., Krapovickas A., Ducasse D. and Moscone E.A. 2004. Physical mapping of 5S and 18S-25S rRNA genes evidences that *Arachis duranensis* and *A. ipaensis* are the wild diploid species involved in the origin of *A. hypogaea* (Leguminosae). American Journal of Botany, **91**, 1294-1303.
- Seijo J.G., Lavia G.I., Fernández A., Krapovickas A., Ducasse D., Bertoli D.J. and Moscone E.A. 2007. Genomic relationships between the cultivated peanut (*Arachis hypogaea* - Leguminosae) and its close relatives revealed by double GISH. American Journal of Botany, **94**, 1963-1971.
- Solís Neffa V.G. and Fernández A. Karyotypic stu-

- dies in *Turnera sidoides* complex (Turneraceae, Leiocarpace). 2002. *American Journal of Botany*, 89, 551-558.
- Stein N., Ponelies N., Musket T., McMullen M. and Weber G. 1998. Chromosome micro-dissection and region-specific libraries from pachytene chromosomes of maize (*Zea mays* L.). *The Plant Journal*, 13, 281–289.
- Terkelsen C., Koch J., Kølvrå S., Hindkjær J., Pedersen S. and Bolund L. 1993. Repeated primed in situ labeling: formation and labeling of specific DNA sequences in chromosomes and nuclei. *Cytogenetics and Genome Research*, 63, 235-237.

I.-CAPÍTULO 4

Herramientas Básicas de Ingeniería Genética

Ingrid Garbus, Marisa Gómez
y Viviana Echenique

Introducción

Hasta principios de los años 70, el ADN era la molécula de la célula que planteaba más dificultades para su análisis bioquímico. Excesivamente larga y químicamente monótona, la secuencia de nucleótidos del DNA tan solo podía ser estudiada por caminos indirectos tales como la determinación de la secuencia de proteínas, o del RNA. Actualmente, es posible separar regiones determinadas del ADN, obtener cantidades ilimitadas de esos fragmentos y determinar incluso la secuencia de esos nucleótidos. Estos adelantos técnicos forman parte de la tecnología del ADN recombinante, de cuyo desarrollo han sido pilares fundamentales el conocimiento de las enzimas de restricción, el esclarecimiento de los procesos de

replicación y reparación de ADN así como de la replicación de virus y plásmidos y la síntesis química de secuencias de nucleótidos. De esta manera, puede decirse que la tecnología del ADN recombinante esta integrada por diversas estrategias metodológicas, muchas de las cuales son adaptaciones de procesos naturales de la genética microbiana que han sido estudiados y se conocen en profundidad.

LA CLONACIÓN MOLECULAR O CLONACIÓN DE GENES

La finalidad de la clonación molecular es la obtención de un determinado fragmento de ADN, que puede corresponder a un gen, inserto en un vector capaz de replicarse, pudiéndose posteriormente amplificar a varios millones de copias, por ejemplo para análisis de secuencia o para obtener grandes cantidades de un producto génico.

El desarrollo de la tecnología del ADN recombinante y la clonación molecular han aportado sofisticados procedimientos que permiten el aislamiento, purificación y replicación de fragmentos específicos de ADN. La clonación de segmentos de ADN, también llamada creación del ADN recombinante requiere esencialmente de las etapas que se enumeran a continuación (Fig. 1)

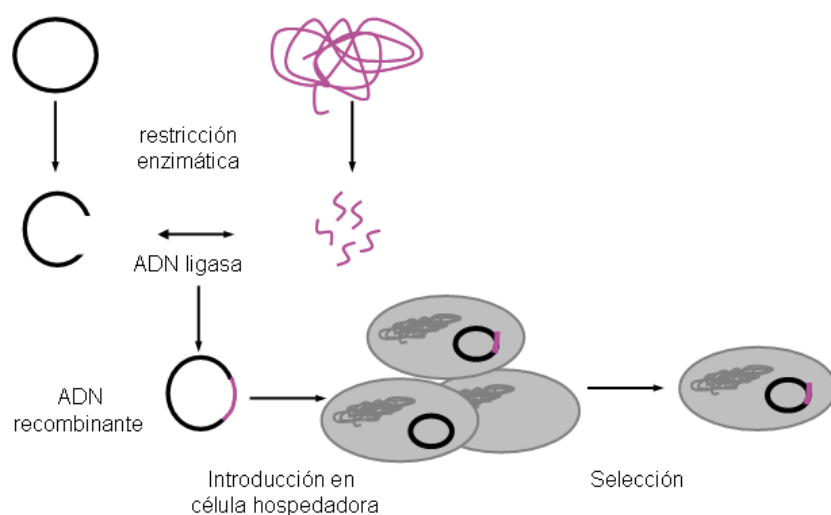


Figura 1. Etapas básicas en la clonación de un fragmento de ADN. En primer lugar el ADN a clonar y el vector (plásmido) se cortan con la misma enzima de restricción. Luego se ponen en contacto en presencia de la enzima ligasa para obtener una molécula de ADN recombinante que se introduce en bacterias que multiplicarán el plásmido junto con el fragmento de interés.

1. Obtención del ADN a clonar

Según la estrategia experimental involucrada, el ADN a clonar puede tener diferentes procedencias. Puede tratarse de ADN de origen genómico, de un producto de amplificación por PCR, provenir de la síntesis *in vitro*, a partir de una retrotranscripción (ADNc) tomando como molde el ARNm o de la síntesis *in vitro* de secuencias previamente definidas. Cuando el material de

partida es el ADN genómico, los fragmentos a ser clonados deben ser escindidos mediante el empleo de enzimas de restricción. En algunas situaciones, particularmente cuando se trata de la clonación de productos de PCR, los fragmentos deben ser aislados en función de su tamaño. Este aislamiento se lleva a cabo a través de electroforesis en geles de poliacrilamida o agarosa.

2. Elección del vector de clonación

Un vector de clonación es una molécula de ADN que vehiculizará al fragmento de interés y permitirá su amplificación, resultando de esta manera indispensable para la creación del ADN recombinante. Uno de los principales requisitos para que una molécula de ADN pueda actuar como vector, es la capacidad de autorreplicación que irá acompañada de la replicación del fragmento inserto. También es necesario que los vectores tengan un tamaño que permita su manipulación fuera de la célula. Los más pequeños se manipulan con mayor facilidad que las moléculas de ADN más grandes, que tienden a ser más frágiles. Los vectores de clonación más utilizados derivan del genoma viral o de plásmidos bacterianos. Los componentes esenciales de un vector de clonación son el origen de replicación, un gen marcador responsable de alguna característica fenotípica para la selección y al menos un sitio único de restricción.

3. Generación del ADN recombinante

El término ADN recombinante se emplea para hacer referencia al material genético a clonar unido al vector de clonación. Para su obtención es requisito contar con los dos fragmentos de ADN en forma pura, y ligarlos enzimáticamente por acción de la enzima ADN ligasa, en presencia de ATP.

4. Introducción del ADN recombinante en el organismo hospedador

Este proceso es realmente el verdadero evento de clonación, en el cual el ADN recombinante es “clonado” para producir varias

copias idénticas. Los organismos hospedadores utilizados en biología molecular deben contener toda la maquinaria genética para la amplificación del ADN recombinante. Puede tratarse de organismos procariotas (bacterias) o eucariotas (levaduras, células de mamíferos cultivadas). En el caso de la utilización de sistemas bacterianos, la introducción se realiza valiéndose de los procesos naturales de la genética microbiana o modificaciones específicas de los mismos. De estos métodos modificados, el más ampliamente utilizado es el de transformación en célula competente (ver vectores de clonación). Otra forma de introducir el ADN en la célula hospedadora, de elección para moléculas de ADN de gran tamaño, es el proceso de electroporación, que consiste en la creación de poros en la membrana celular inducida por descargas eléctricas que permiten la introducción del ADN. Los plásmidos híbridos, introducidos a través de alguno de estos procesos, continuarán replicándose en la célula hospedadora mientras ésta crezca y se divida, siempre que sea mantenida la presión de selección.

5. Identificación y selección de las células que contienen al ADN recombinante

En el esquema de transferencia del ADN recombinante al hospedador descrito anteriormente, se asume que durante la transformación, no todas las bacterias reciben una copia del vector híbrido. Es necesario seleccionar aquellas células que han incorporado el vector, a través de la utilización de marcadores génicos presentes en los vectores de clonación. Los más comúnmente empleados son los genes de resistencia a antibióticos y el fragmento funcional de *lac Z*, el gen de *E. coli* que codifica para la enzima β -galactosidasa (β -gal). Estos genes marcadores tienen insertado un sitio múltiple de restricción (polylinker), de manera que cuando los fragmentos de ADN son clonados en el polylinker del gen *lacZ*, anulan la actividad de la β -galactosidasa. Esta enzima hidroliza un compuesto químico denominado X-gal, y se libera un colorante azul relativamente insoluble. El X-gal se incorpora al medio de cultivo en placa de Petri donde desarrollarán las células hospedadoras del ADN recombinante. Si el ADN clo-

nado se insertó en el polylinker y desactivó la β -galactosidasa, no se producirá pigmento azul y las células formarán colonias que se verán blancas en la placa de Petri. Caso contrario las colonias de las células hospedadoras se verán de color azul. Cuando el marcador es un gen de resistencia a los antibióticos, las células se inoculan en medio agarificado que contiene el antibiótico cuya resistencia confiere el vector, de manera que sólo sobrevivirán aquellas células que lo contienen. Luego deberá buscarse específicamente aquellas células que poseen el fragmento de interés. Estos dos marcadores suelen ser utilizados en forma conjunta de manera que solo las colonias portadoras del vector crecerán en medio con antibiótico, y, paralelamente, las colonias que poseen el plásmido recombinante serán de color blanco.

Una vez obtenidas las colonias recombinantes los pasos a seguir incluyen la amplificación de la colonia en medio líquido con antibiótico, purificación del plásmido a partir de la suspensión de bacterias y comprobación de la presencia del inserto esperado. Para la detección del inserto, pueden utilizarse diversas estrategias. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se puede utilizar cuando la secuencia del fragmento clonado es conocida o para identificar la secuencia de los fragmentos clonados por amplificación con sondas complementarias a la secuencia terminal del vector. La hibridación molecular con una sonda específica marcada puede ser utilizada cuando se conoce la secuencia de interés y se dispone de dicha sonda. En otros casos, se realiza la selección en función del tamaño del inserto, para lo que el plásmido recombinante es digerido mediante enzimas de restricción y posteriormente se realiza una corrida electroforética en gel de agarosa.

HERRAMIENTAS Y PROCEDIMIENTOS IMPLICADOS.

A pesar de que la obtención de ADN recombinante pudo ser explicada a través de cinco pasos sencillos, es muy amplio el conjunto de herramientas y metodologías experimentales que están involucradas en su desarrollo. El objetivo de esta parte del capítulo es introducir

al lector en las herramientas metodológicas de biología molecular más ampliamente utilizadas.

1. VECTORES DE CLONACIÓN

Como hemos mencionado, un vector es una molécula de ADN a la que se unirá el fragmento de interés resultando en el ADN recombinante y, debido a su capacidad de autorreplicación, permitirá la amplificación del fragmento insertado. Los vectores de clonación de última generación son muy prácticos y sencillos de manejar. Incluyen un sitio múltiple de clonación o sitio de restricción múltiple ("polylinker") que es un segmento corto de ADN con sitios de restricción para varias enzimas diferentes, cada uno de ellos único para el vector (Fig. 2). Este sitio suele formar parte del marco abierto de lectura ("ORF") de un gen responsable de alguna característica fenotípica, por lo que resulta sencillo confirmar si tras la restricción se ha obtenido el plásmido híbrido, ya que la inclusión del inserto produce la pérdida de funcionalidad del gen mediante inactivación por inserción.

Existen diferentes tipos de vectores de clonación, entre los que se incluyen:

A) Plásmidos:

Son moléculas de ADN circular, de doble cadena, extracromosómicas, presentes en las bacterias, que poseen propiedades muy útiles como vectores de clonación, a saber:

1. Pequeño tamaño que hace sean fáciles de aislar y manipular.
2. Son circulares, lo que hace que el ADN sea más estable durante su aislamiento químico.
3. Su replicación transcurre independientemente del ADN nuclear en la célula bacteriana.
4. Existen múltiples copias en la célula, dependiendo del plásmido y de la especie hospedadora puede haber de varias a numerosas copias (por ej. 1000 a 3000 copias de pBR322 por célula).
5. La presencia de genes de resistencia a los antibióticos que actúan como marcadores seleccionables facilita la detección y selección de los clones que los contienen.

El tamaño de los insertos que se pueden clonar puede ser considerable, sin embargo si son

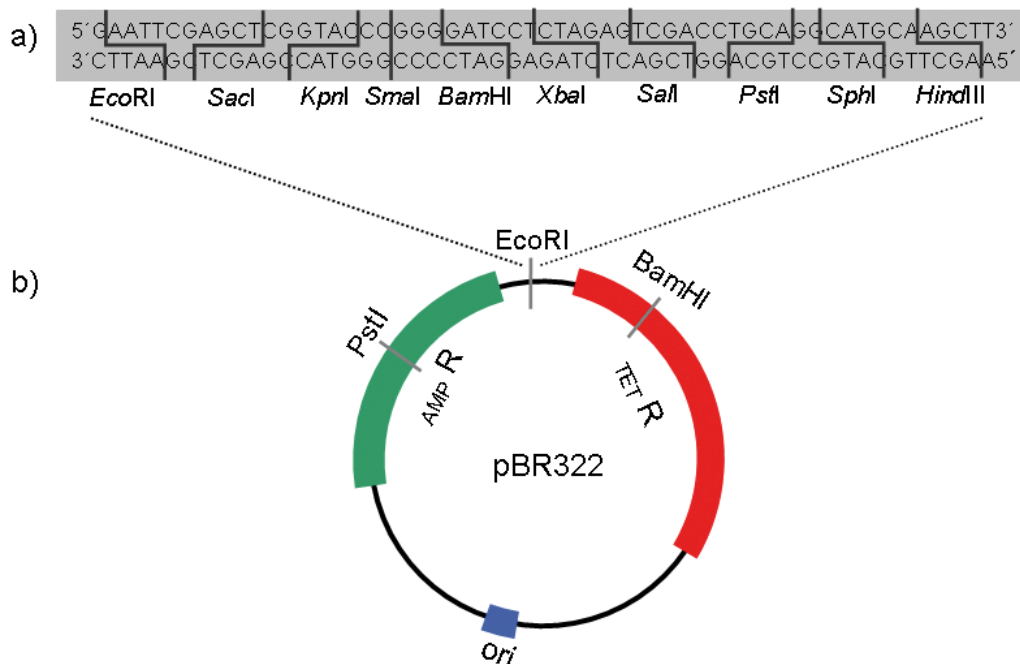


Figura 2. Elementos genéticos que constituyen un vector de clonación. a) Sitio de restricción múltiple que consiste en un corto segmento de ADN con varios sitios de restricción, cada uno de ellos único para el vector. b) representación esquemática del plásmido pBR322 con el origen de replicación (Ori) y los genes marcadores de resistencia a tetraciclina (TET^R) y ampicilina (AMP^R) que contienen los sitios de restricción de *Bam*HI y *Pst*II, respectivamente;

mayores de 10 kb, el plásmido se hace generalmente inestable.

Aunque en el ambiente natural los plásmidos conjugativos generalmente se transfieren por contacto célula a célula, los plásmidos vectores de clonación generalmente han sido modificados a fin de evitar su transferencia por conjugación y así lograr su contención biológica. Sin embargo, en el laboratorio es posible realizar la transferencia a la célula hospedadora por transformación, utilizando choque térmico en presencia de cloruro de calcio o mediante electroporación.

Aunque los primeros plásmidos utilizados existían en forma natural, los vectores de clonación actuales constituyen una generación posterior de vectores construidos *in vitro*, como el plásmido **pBR322** (Fig. 2). En este plásmido, el sitio de restricción de *Bam*HI está dentro del gen de resistencia a la tetraciclina, y el sitio para *Pst*II está dentro del gen de resistencia a la ampicilina. Si se inserta un fragmento de un ADN en uno de estos sitios, la resistencia al antibiótico conferida por el gen que contiene este sitio se pierde (inactivación por inserción). Por

tanto, cuando pBR322 es digerido con *Bam*HI y se liga a un ADN, y luego se aíslan los clones transformados, aquellos transformantes que posean resistencia a la tetraciclina y ampicilina no portan ningún ADN clonado. Aquellas células que continúan siendo resistentes a la ampicilina pero sensibles a la tetraciclina, contienen el plásmido con el fragmento del ADN clonado. Como la resistencia a la ampicilina y a la tetraciclina puede determinarse independientemente en placas con agar, resulta fácil aislar bacterias que contengan los clones deseados y eliminar las células que no los contengan.

B) Bacteriófagos o fagos:

Fago λ : se caracteriza por ser un fago especializado en la transducción (transducción especializada) por lo tanto este fago puede utilizarse también como vector de clonación para la recombinación *in vitro*. Es un vector de clonación particularmente útil porque:

1. Se conoce bien su estructura, genética molecular y funcionamiento

Puede insertar mayor cantidad de ADN que la mayoría de los plásmidos (entre 10 y 20 kb)

El ADN puede ser eficientemente empaquetado *in vitro* dentro de las partículas del fago

Las partículas del fago son mucho más eficientes en la infección de las células hospedadoras (**transfección**) que la transformación.

El fago λ tiene un mapa genético complejo. El tercio central del cromosoma, que contiene genes requeridos para la lisogenia pero no para el ciclo lítico, puede ser escindido por restricción y substituido por ADN foráneo (Fig 3a). El ADN recombinante resultante puede ser empaquetado en las cabezas del fago *in vitro*, pudiéndolas el fago inyectar en *E. coli*, que se replica produciendo colonias bacterianas que contienen los fragmentos a clonar.

Dado que el fago λ silvestre tiene excesiva cantidad de sitios de restricción, no es indicado como vector de clonación por lo que se han construido fagos λ modificados (Charon), en los cuales los sitios de restricción no deseados han sido modificados

Fago M13 es un fago filamentosos que contiene ADN monocatenario y se replica sin matar a su hospedador. Sin embargo, para poder usar M13 para la clonación es necesario disponer de una forma bicatenaria ya que las enzimas de restricción sólo trabajan sobre ADN bicatenario. El ADN bicatenario de M13 puede obtenerse de células infectadas, donde se encuentra en forma replicativa bicatenaria. La mayor parte del genoma del tipo silvestre contiene información genética esencial para la replicación. Sin embargo existe una pequeña región, llamada secuencia intergénica, que puede ser utilizada como sitio de clonación. Es posible clonar ADN de longitudes variables hasta 5kb sin afectar la viabilidad del fago. El ADN monocatenario de M13 y de sus vectores derivados, ha sido extremadamente útil para secuenciar ADN.

Tanto en el fago λ como el M13 se ha insertado como marcador el gen **lacZ**.

C) Cósmidos:

Son híbridos entre plásmidos y el fago λ y combinan las ventajas de ambos como vectores. Poseen la habilidad del plásmido para replicarse autónomamente en las células de *E.*

coli y la capacidad de empaquetamiento *in vitro* del cromosoma de λ y contienen el origen de replicación y los genes de resistencia a los antibióticos de su plásmido parental. Cos proviene de sitio cohesivo ("cohesive site") en referencia a la terminal de simple cadena de 12 bases complementaria en el cromosoma de λ maduro. El sitio cos es reconocido por el sistema de empaquetamiento de ADN de λ , haciendo cortes escalonados que originan los extremos cohesivos complementarios en el cromosoma maduro del fago. La principal ventaja de los cósmidos como vectores es su habilidad para insertar fragmentos de ADN de 35 a 45 kb.

D) Fásmidos (fagémidos):

Son vectores híbridos entre el fago M 13 y el plásmido pBR323 que contienen los orígenes de replicación de ambos. Normalmente la replicación depende del plásmido, pero cuando una célula que contiene un fásmid se infecta con un fago de tipo salvaje, el origen del fago es responsable de la replicación y se generan copias monocatenarias. Este ADN monocatenario es empaquetado en viriones y puede aislarse fácilmente y ser utilizado para secuenciar. Habitualmente los fásmidos pueden transportar de forma estable un fragmento de ADN clonado mayor que un vector típico derivado de M13.

E) Cromosomas artificiales:

A partir de la creación de proyectos de secuenciación de genomas completos se gesta la necesidad de obtener vectores que alberguen porciones de ADN de mayor tamaño para efectuar el análisis genómico y obtener mapas físicos de cromosomas. El *primer* sistema de clonado de grandes fragmentos de ADN fue informado en 1987 por Burke y colaboradores, los cromosomas artificiales de levaduras (**YACs**), minicromosomas con la capacidad de contener insertos de ADN de 200-500 kbp (Fig. 3b). Los YACs son vectores de DNA lineales que contienen los elementos esenciales de los cromosomas de la levadura, como por ejemplo el origen de replicación ARS (Autonomously Replicating Sequence). Introducidos en la célula de levadura, los YACs se replican y segregan junto con el complemento cromosómico

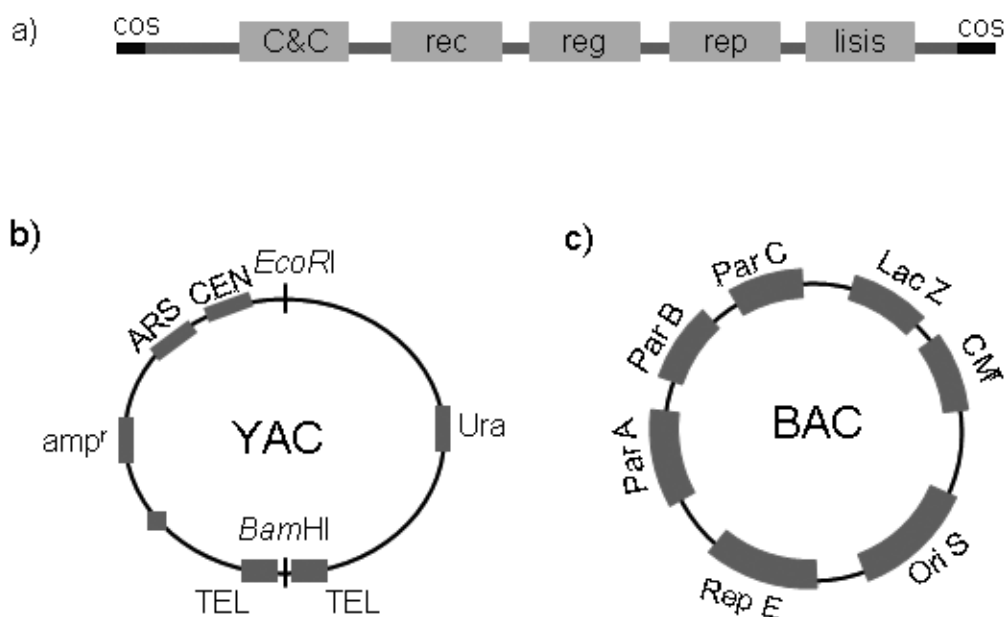


Figura 3. Vectores de clonación. Se muestran los elementos genéticos que constituyen los vectores de clonación. a) Fago lambda. El cromosoma se organiza de acuerdo con las proteínas codificadas por los genes: C&C: cabeza y cola, genes de proteínas de la cápside, de unión cabeza-cola y de estabilización y empaquetamiento de ADN, rec: genes de recombinación, proteínas para la integración y escisión del ADN del fago en el cromosoma de la bacteria hospedadora, reg: genes regulatorios, para el cambio entre los distintos ciclos del fago, rep: región de replicación, con el origen de replicación y los genes O y P, lisis: genes que posibilitan la lisis celular, b) Cromosoma artificial de levadura (YAC). ARS: origen de replicación, CEN: centrómero, TEL: telómeros, URA: gen marcador seleccionable para el desarrollo en medio con uracilo. Amp: gen marcador seleccionable en medio con ampicilina. El ADN es clonado en el sitio *Bam*HI. c) Cromosoma artificial de bacterias (BAC). Deriva del factor bacteriano F. Su esqueleto contiene regiones esenciales que le otorgan estabilidad y bajo número de copias en cada bacteria, *parA*, *parB* y *parC*. *oriS*: origen de replicación unidireccional. CM^r: gen marcador seleccionable en medio con cloranfenicol, *repE*: gen de proteína autoregulatoria esencial para la replicación desde *oriS*. pBeloBAC11, el vector BAC mas utilizado, tiene tres sitios únicos de clonado, *Hind*III, *Bam*HI y *Sph*I dentro del gen marcador *lacZ*.

habitual. El marcador seleccionable suele ser un gen de tipo silvestre que le confiere la capacidad prototrófica a la célula hospedadora. El mas comúnmente utilizado es URA3⁺, que confiere a las auxótrofos URA3⁻ la capacidad de desarrollarse en un medio de cultivo sin uracilo. Durante la meiosis los YACs se aparean con cualquier YAC homólogo presente, resultando en una alta frecuencia de recombinación entre los fragmentos clonados. Esta alta frecuencia de quimerismo lleva a predicciones inexactas en los mapas físicos moleculares y,

junto con la falta de familiaridad en el manejo de levaduras entre biólogos moleculares, limitaron el uso de los YACs. Para superar estas dificultades fueron desarrollados los cromosomas artificiales de bacterias (BACs) constituyen un sistema de clonación que mantiene un bajo número de copias en cada bacteria, garantizando una recombinación mínima entre diferentes fragmentos de ADN y son de sencilla manipulación. Los **BACs** se basan en el plásmido F de 7kb de *E. coli* y pueden llevar insertos de 300 kb aunque el promedio es de 100

kb (Fig. 3c). Contienen como elementos esenciales una copia del origen de replicación de *E. coli*, un marcador de selección que suele ser un gen de resistencia a antibióticos y un sistema de recombinación sitio-específico (*cre-lox*), cuyo rol consiste en forzar la circularización de grandes insertos. Los cromosomas artificiales derivados del fago P1 (**PACs**) permiten la clonación de fragmentos de 80-100 Kpb y, al igual que los BACs, presentan bajo grado de quimerismo. El fago P1 se replica primero como plásmido de bajo número de copias y luego como un largo segmento de ADN compuesto por múltiples copias de la secuencia repetida (concatemero), que es empaquetado en la cabeza del fago por un mecanismo similar al del fago lambda. Las propiedades de los clones PAC permiten la iniciación de empaquetamiento en las etapas de clonación, escisión de las secuencias de alto número de copias después de la infección bacteriana y la inducción de la replicación inmediatamente antes la amplificación del ADN. Utilizan al igual que los BACs el sistema *cre-lox*.

Introducción del vector en la célula hospedadora

En el caso de la utilización de sistemas bacterianos, la introducción del vector en la célula hospedadora se realiza valiéndose de los mecanismos naturales de la genética microbiana dado que en los procariotas existen mecanismos de intercambio genético, que permiten tanto la transferencia de genes como la recombinación del inserto, a través de uno de los siguientes procesos genéticos:

Transformación: es un proceso por cual el ADN libre del medio ambiente se incorpora en una célula receptora, trayendo aparejado un cambio genético. Una cadena de este ADN libre, llamado donador, es captada y puede transformar genéticamente la célula receptora por recombinación con una región homóloga del cromosoma. El movimiento de las moléculas de ADN a través de la membrana y dentro del citoplasma de la célula receptora es un proceso activo, que requiere energía. Las células que son capaces de tomar una molécula

de ADN y ser transformadas se denominan competentes. Estas células secretan el factor de competencia, que es una pequeña proteína que induce la síntesis de otras 8 a 10 nuevas proteínas requeridas para la transformación. La transformación es un proceso que ocurre sólo en algunas especies bacterianas.

Transducción: se refiere a la transferencia del ADN de una célula a otra por medio de un fago, denominación utilizada para los virus cuando se trata de hospedadores bacterianos. Esta transferencia de genes puede ocurrir de dos maneras:

a) **transducción generalizada:** una fracción del ADN celular, que puede proceder del cromosoma o del plásmido del hospedador, durante el ensamblaje del virus pasa a formar parte del ADN de la partícula vírica madura, reemplazando el genoma del fago. Una vez que son liberados, estos fagos anormales pueden pegarse a otras células y donar ADN, pero no dan lugar a lisogenia ni a lisis dado que no pueden replicarse independientemente por carecer de gran parte del ADN fágico. Si los genes del donador no sufren recombinación homóloga con el cromosoma de la bacteria de la célula receptora se perderán.

b) **transducción especializada (restringida):** ocurre sólo en algunos virus atemperados, es decir, aquellos que se integran en el genoma como parte de su ciclo biológico. En este mecanismo el ADN de una región específica del cromosoma del hospedador se integra directamente en el genoma del fago, reemplazando algunos de sus genes. El genoma fágico recombinante puede empaquetarse seguidamente en una cabeza de fago y el resto del fago puede ensamblarse normalmente. Este fago puede carecer de la capacidad de replicar, no obstante puede inyectar su ADN, que contiene además algunos genes de la célula receptora a una nueva célula receptora. Puede también ocurrir recombinación homóloga, sin embargo, como el ADN donador bacteriano está formando parte del genoma de un fago atemperado se presentan dos posibilidades: que el ADN se integre en el cromosoma del hospedador durante la lisogenización, o que el ADN se replique en el receptor como parte de

una infección lítica. En ambos casos, la partícula vírica transductora es normalmente defectiva como virus, ya que los genes víricos han sido reemplazados. Si bien no todos los fagos tienen la capacidad de transducir, ni todas las bacterias son transducibles, el fenómeno está lo suficientemente extendido como para asumir que desempeña un importante papel en las transferencias genéticas que se producen en la naturaleza.

Conjugación: mecanismo de transferencia genética mediada por un plásmido que requiere contacto de célula a célula. Ciertos plásmidos y transposones conjugativos confieren a sus células hospedadoras la capacidad de transferir ADN a otras células por conjugación. La conjugación requiere una célula donadora, que contiene un tipo particular de plásmido conjugativo, y una célula receptora que carece de él. El proceso de conjugación, presenta características diferenciales según se trate de bacterias Gram positivas o Gram negativas. En el primer caso, las células receptoras secretan un péptido de pequeño tamaño que provoca que la célula donadora sintetice un componente adhesivo en la superficie celular. El ADN plasmídico es posteriormente transferido desde el donador a la célula receptora adherida. Estos cruzamientos pueden tener lugar en medios líquidos. En el segundo caso, el plásmido codifica, entre otras proteínas, las subunidades de la proteína del pelo sexual, mediante el cual se realiza el contacto. El pelo constituye un puente de conjugación a través del cual pasa el ADN permitiendo el apareamiento específico. Durante la conjugación, pueden resultar movilizados otros elementos genéticos, como grandes bloques del cromosoma del hospedador u otros plásmidos.

Transposición conjugativa: es una conjugación independiente del plásmido, un tipo de conjugación facilitada por un transposón conjugativo, que pueden encontrarse tanto en el cromosoma como en los plásmidos. El contacto entre las bacterias donadora y receptora induce la escisión del transposón en el donador: en cada extremo del transposón (integrado), se producen un par de cortes alternos de modo que al escindirse una de las cadenas en

cada extremo del transposón porta con ella (generalmente) seis nucleótidos de la molécula hospedadora. (Estas secuencias terminales de simple cadena se denominan secuencias acoplantes). El transposón escindido se circulariza entonces como resultado del apareamiento de entre las secuencias acoplantes. Parece probable que sólo se transfiera una simple cadena al receptor, y que la cadena complementaria se sintetice, en el receptor, antes de la inserción.

Las estrategias de introducción de vectores en células hospedadoras utilizadas en las técnicas in vitro del ADN recombinante, han sido desarrolladas en base a modificaciones de estos procesos naturales de transferencia de material genético en procariotas.

2. ENZIMAS UTILIZADAS EN LA GENERACIÓN DE ADN RECOMBINANTE

El requisito primordial para la clonación de un gen o segmento de ADN de interés es poder contar con dicho fragmento en forma individual, aislado desde su entorno génico. Para ello, la tecnología del ADN recombinante cuenta con una herramienta indispensable, las endonucleasas de restricción. Estas enzimas reconocen secuencias específicas de ADN de 4 a 8 bases de extensión y escinden los enlaces fosfodiéster del material genético en dichos sitios, denominados sitios de restricción. Para actuar como sustrato de estas enzimas, el ADN debe hallarse como doble hebra.

Son extraídas de organismos procarióticos, donde actúan como un mecanismo de defensa para degradar material genético extraño que entra en la célula, proveniente principalmente de fagos. Para diferenciar el ADN propio del extraño, las bacterias tienen la capacidad de metilar su propio ADN inmediatamente después de la replicación, haciéndolo de este modo irreconocible por las endonucleasas.

Las endonucleasas se nombran en relación a las bacterias de las que fueron aisladas por primera vez, considerando que la primera letra representa el género de la bacteria, las próximas dos indican la especie, una cuarta letra indica la cepa, y un número al final indica el orden en que fue identificada la enzima en esa cepa. Según este criterio, la enzima *EcoRI*, representa a la primer endonucleasa

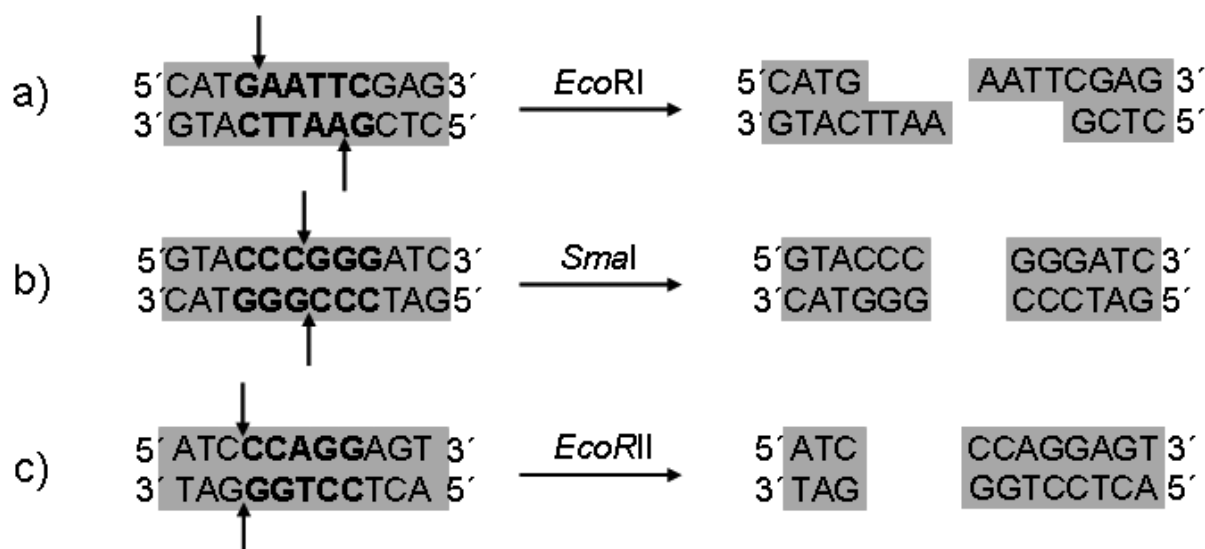


Figura 4. Corte del ADN por enzimas de restricción. Reconocimiento y escisión de secuencias palindrómicas originando: a) extremos cohesivos o b) extremos romos. En este caso puede utilizarse la enzima transferasa terminal para la incorporación de extremos cohesivos. c) reconocimiento y corte de secuencias no palindrómicas. Las flechas indican los sitios de corte mientras que las secuencias reconocidas se señalan en negrita.

aislada en el género *Escherichia*, especie *coli*, cepa RV 13. Se utiliza el término isozómeros para las enzimas que reconocen la misma secuencia de ADN pero han sido obtenidas de diferentes especies de bacterias.

Pueden diferenciarse tres tipos de enzimas de restricción. Las de tipo I y III escinden en sitios alejados de la secuencia de reconocimiento, requiriendo de ATP para realizar el traslado del sitio de reconocimiento al de acción y tienen actividad de restricción y metilación simultáneamente. En cambio, las de tipo II cortan en el sitio de reconocimiento, tienen actividad de restricción exclusivamente y reconocen secuencias palindrómicas (secuencias que se leen igual en ambas direcciones). Estas últimas son las utilizadas para el clonado de ADN, aunque tienen otras aplicaciones como las construcción de mapas de restricción de un plásmido o bacteriófago, fragmentación del ADN genómico para su separación por electroforesis con aplicación en técnicas como “Southern Blot” o fingerprinting o la generación de fragmentos para ser usados como sondas.

Las escisiones realizadas por las endonucleasas de tipo II, pueden resultar en extremos romos o cohesivos. En el primer caso, se producen cortes escalonados que crean colas cortas de cuatro bases de cadena simple en cada extremo del fragmento. Estas colas tienden a asociarse con una cadena complementaria por apareamiento de bases (Fig. 4a), a secuencias complementarias de otro fragmento con colas generadas por la misma enzima. Cuando se generan extremos romos, el ADN es clivado en el centro de la secuencia de reconocimiento, en el mismo punto en ambas cadenas, no quedando bases desapareadas en los extremos por lo que no presentan tendencia a unirse con otros fragmentos por complementariedad (Fig. 4b).

Aunque por su especificidad y versatilidad las endonucleasas de restricción son las enzimas las mas renombradas, la tecnología del ADN recombinante no sería factible sin la participación en el proceso de otras enzimas de roles diversos (Tabla 1).

Enzima	Acción	Aplicación
Endonucleasas de tipo II	Clivaje sitioespecífico del ADN	Generación de fragmentos de ADN
Ligasa de ADN	Unión de dos fragmentos de ADN con extremos romos, en presencia de ATP.	Forma enlaces covalentes entre el extremo 5' de una cadena polinucleotídica y el extremo 3' de otra cadena
Transcriptasa reversa	Síntesis de una hebra de ADNc utilizando como molde ARN.	Construcción de bibliotecas de cDNA. Amplificación por PCR
Polinucleotido kinasa	Incorporación de un grupo fosfato al extremo 5' de un polinucleótido.	Permite ligado con otro polinucleótido o incorporación de fosfato marcado.
Transferasa Terminal	Adición de colas homopoliméricas al extremo 3'OH de ADN doble hebra lineal	Genera extremos cohesivos oligo dT u oligo dA
Exonucleasa III	Remoción de nucleótidos del extremo 3' de un ADN doble hebra.	Expone los extremos 5'.
Exonucleasa del fago I	Remoción de nucleótidos del extremo 5' de ADN doble hebra.	Expone los extremos 3'.
Fosfatasa alcalina	Remoción de fosfatos terminales de extremos 5'	Impide autoligado de vectores. Permite la incorporación de fosfato 5' marcado.
Fragmento klenow	Fragmento de una enzima ADN polimerasa, con actividad DNA polimerasa y exonucleasa en dirección 3'→5'.	Genera extremos romos desde el extremo 3', por síntesis complementaria o clivaje de nucleótidos desapareados.

Tabla 1. Algunas enzimas utilizadas en la tecnología del ADN recombinante

3. SEPARACION DE FRAGMENTOS DE ADN: ELECTROFORESIS EN GEL

La electroforesis es una técnica que permite la separación de moléculas en función de su diferente movilidad en un campo eléctrico, siendo el parámetro esencial su diferencia en carga eléctrica. Sin embargo, determinados soportes como los geles de agarosa o poliacrilamida, ofrecen una resistencia notable al avance de las moléculas. Aunque el parámetro que rige el avance es la relación carga/masa, como en los ácidos nucleicos la carga eléctrica es proporcional a la longitud en nucleótidos, la relación carga/masa es la misma para todas las moléculas. Como resultado, el efecto de retardo del gel depende del tamaño molecular por lo que la electroforesis separa los fragmentos de ácido nucleico según su tamaño o longitud. La agarosa es un polisacárido, cuyas disolu-

ciones (0,5 - 2%) forman un gel semisólido al enfriarse, constituido por una matriz o trama tridimensional de fibras poliméricas, que retarda el paso de las moléculas de ácido nucleico a su través, en función de su tamaño. Los geles de poliacrilamida se forman por la polimerización de acrilamida y bis-acrilamida, catalizada por el agente oxidante persulfato de amonio y la amina terciaria TEMED como agente reductor. La variación de la concentración de acrilamida posibilita la modificación controlada el tamaño del poro. Estos geles presentan menor rango de separación que los geles de agarosa, pero mayor poder de resolución, pudiendo discriminar fragmentos de ADN con diferencia de tamaño de sólo una base. Se usan además para la separación y caracterización de proteínas.

Para establecer el tamaño de fragmentos separados se utilizan marcadores moleculares, que consisten en una mezcla de fragmentos de

ADN de tamaño conocido, a partir de los que se puede inferir el tamaño de la muestra analizada. Se establece una curva de calibrado en la que se consigue la linealidad graficando el tamaño en función de la inversa de la movilidad o el logaritmo del tamaño respecto de la movilidad.

Dentro de las aplicaciones más comunes de la electroforesis en gel en biología molecular, podemos mencionar chequeo de la amplificación de fragmentos de PCR, identificación de polimorfismos y la identificación de genes mediante el establecimiento de sus patrones de restricción.

4. HIBRIDACIÓN. ANÁLISIS MOLECULAR DE ADN, ARN Y PROTEÍNAS

La hibridación es la construcción artificial de un ácido nucleico bicatenario por apareamiento (emparejamiento) de bases complementarias de dos ácidos nucleicos monocatenarios. Para que exista la formación de híbridos estables debe haber un alto grado de complementariedad. Se define formalmente como sonda ("probe") a un fragmento determinado de ARN o ADN marcado química o radioactivamente, utilizado para localizar determinadas secuencias de ácidos nucleicos mediante hibridación.

A) Análisis de ADN por hibridaciones Southern Blot

Los procedimientos utilizados, para separar ácidos nucleicos y proteínas se rigen por el mismo principio, pero involucran algunas diferencias de técnicas debidas a las características particulares de cada clase de moléculas.

En 1975, E. M. Southern, publicó un nuevo procedimiento que permitió a los investigadores ubicar los genes y otras secuencias de ADN sobre fragmentos de restricción separados por electroforesis en gel. La principal característica de esta técnica es la transferencia de las moléculas de ADN que han sido digeridas por endonucleasas de restricción y separadas por electroforesis en gel a una membrana de nylon o nitrocelulosa. Esta transferencia se denomina Southern Blot, en honor al científico que desarrolló la técnica (Fig. 5). Para realizarla, el ADN es desnaturalizado (abierto en

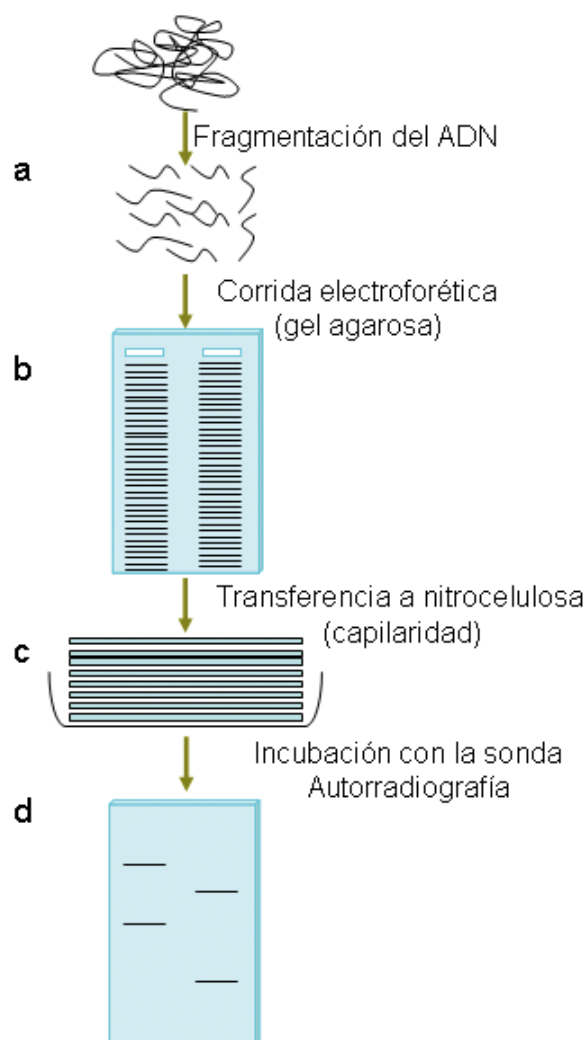


Figura 5. Método de hibridación de Southern. a) Es-cisión enzimática o mecánica del ADN; b) inclusión del ADN en el gel de agarosa y corrida electroforética; c) transferencia de las moléculas de ADN desde el gel de agarosa hacia un filtro de nitrocelulosa por capilaridad, previa desnaturalización del ADN; d) hibridación con la sonda monohebra, seguida de lavados y detección por autorradiografía.

sus dos cadenas), ya sea antes o durante la transferencia, mediante tratamiento alcalino. Una vez completada la transferencia, el ADN es inmovilizado sobre la membrana por exposición a elevada temperatura o a radiación UV. Una sonda de ADN conteniendo la secuencia de interés es entonces incubada con el ADN inmovilizado. La sonda sólo va a hibridar con moléculas de ADN que contienen la secuencia

de nucleótidos complementaria a su secuencia. El excedente de sonda no hibridada se elimina mediante repetidos lavados de la membrana. Las sondas pueden marcarse por diferentes métodos: con elementos radioactivos, o compuestos que producen color o luminiscencia, etc. Luego de la hibridación, la membrana se somete a diferentes procedimientos para poner en evidencia la sonda, de acuerdo al método con el que haya sido marcada.

B) Análisis de ARN por transferencia e hibridación: Northern Blot

De manera similar al tratamiento realizado con las moléculas de ADN, las moléculas de ARN también pueden ser separadas por electroforesis en geles de agarosa, transferidas a membranas y analizadas. La transferencia de ARN se denomina Northern blot, en reconocimiento al hecho de que el procedimiento es la imagen de espejo de la técnica Southern blot.

Ambos procedimientos son esencialmente idénticos. Sin embargo, las moléculas de ARN son muy sensibles a la degradación por enzimas ARNasas. Por lo tanto, se debe tener mucha precaución para evitar la contaminación de los materiales con estas enzimas. Además, la mayoría de las moléculas de ARN contienen estructuras secundarias (producidas por apareamiento complementario intracadenas), por lo tanto deben mantenerse desnaturalizadas durante la electroforesis para poder separarlas en base a su tamaño. La desnaturalización se provoca incorporando formaldehído u otro químico desnaturalizante a la solución tampón ("buffer") utilizada en la electroforesis. Después de la transferencia a la membrana apropiada, las moléculas de ARN pueden hibridar con sondas de ADN o ARN.

C) Análisis de proteínas por transferencia e inmunodetección o Western Blot

La electroforesis en gel de poliacrilamida es una herramienta muy importante para la separación y caracterización de proteínas. Debido a que muchas de las proteínas están compuestas por dos o más subunidades, las cadenas polipeptídicas individuales son separadas por electroforesis en presencia del detergente dodecil sulfato de sodio (SDS), que actúa como

agente desnaturalizante de las proteínas. Los polipéptidos separados por electroforesis también pueden ser transferidos del gel a una membrana de nitrocelulosa y pueden ser detectados utilizando anticuerpos específicos. Esta transferencia de proteínas se denomina Western blotting y se realiza utilizando una corriente eléctrica para trasladar las proteínas desde el gel a la superficie de la membrana. Después de la transferencia, la proteína de interés es identificada mediante la unión a un anticuerpo específico que está conjugado (marcado) ya sea con isótopos radioactivos, que permiten la detección por autoradiografía, o con enzimas que producen un producto visible cuando se adiciona el sustrato correspondiente.

5. AMPLIFICACION DEL ADN: REACCIÓN EN CADENA DE LA POLIMERASA (PCR)

La PCR constituye una tecnología poderosa que involucra la síntesis enzimática *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de ADN. La reacción se basa en la hibridación de un par de oligonucleótidos, diseñados en base a la secuencia de interés y sintetizados artificialmente, a la secuencia de ADN (Fig 6). Estos oligonucleótidos funcionan como iniciadores o cebadores ("*primers*") que delimitan la secuencia a ser amplificada. La primera etapa de la reacción involucra la desnaturalización del ADN de doble cadena, por elevación de la temperatura a 92-95°C. Posteriormente comienzan los ciclos de PCR, que comprenden: desnaturalización de la doble cadena, unión por complementariedad del cebador al ADN de simple hebra y replicación del ADN a partir del cebador, catalizada por la enzima *Taq* polimerasa. La temperatura de unión de los cebadores al ADN de cadena simple depende de la secuencia y tamaño del oligonucleótido, así como de la estrategia específica de trabajo, comprendiéndose en términos generales entre los 35-60°C. La fase de síntesis de ADN complementario se lleva a cabo a la temperatura óptima para que la *Taq* polimerasa realice la replicación a partir de cada extremo 3' de los cebadores. Se trata de una ADN polimerasa termo-resistente aislada de *Thermus aquaticus*, bacteria que vive en fuentes termales.

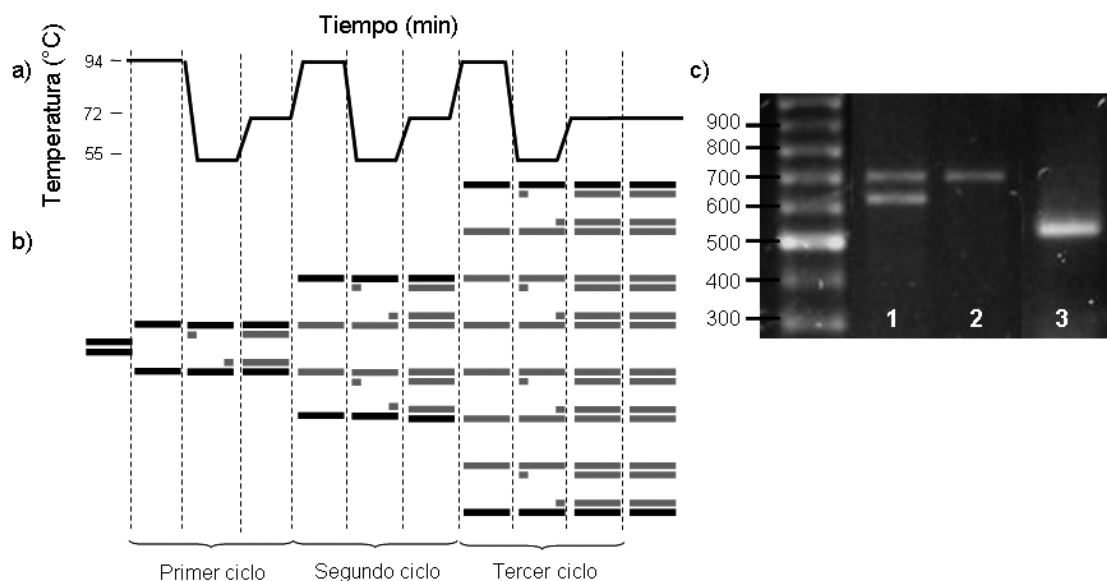


Figura 6. Reacción en cadena de la polimerasa (PCR). a) Representación de una reacción de PCR de tres ciclos. En cada ciclo se suceden tres etapas: i- desnaturalización por calor del ADN (94°C) para separar las hebras, ii- unión por complementariedad de los cebadores a las monohebras (en este ejemplo 55°C), iii- reacción de polimerización de por la enzima TAQ polimerasa, dando la hebra complementaria al molde de ADN (72°C); b) Comportamiento de una fragmento de ADN blanco de los cebadores, a través de los mencionados ciclos de PCR. En cada ciclo, se incrementa la cantidad de ADN blanco, siguiendo la relación 2^n , donde n es el número de ciclos. En el ejemplo, con tres ciclos de PCR, se obtienen 2^3 copias. c) Verificación de un producto de PCR sobre un gel de agarosa. En la calle de la izquierda se muestra el marcador de peso molecular. En la primera calle, se observan dos fragmentos de 700 y 650 pares de bases (bp), respectivamente, sugiriendo que el cebador ha encontrado complementariedad en más de un sitio en el genoma. Las calles 2 y 3 presentan banda única de 700 y 550 bp aproximadamente en cada caso.

Este ciclo es repetido por algunas decenas de veces y, como el producto de cada polimerización sirve como molde para el siguiente, en cada ciclo se duplica la cantidad de producto sintetizado. Es necesario tener en cuenta que, además de la enzima, los cebadores y el ADN de interés, para que se produzca la amplificación es necesaria la presencia de un medio tamponado y desoxinucleótidos (dNTPs) y cloruro de magnesio que actúa como cofactor de la enzima. El resultado de la reacción es un fragmento de ADN de doble cadena cuyos extremos corresponden a los extremos 5' de los *cebadores* y su tamaño a la distancia entre los mismos. A pesar de que se forman moléculas más largas a partir del molde original en cada ciclo, se acumulan solo a una tasa lineal y no contribuyen significativamente a la masa final de secuencia blanco.

Después de apenas 20 ciclos se logra más de un millón de veces la cantidad inicial de la secuencia de interés. Esta escala de amplificación permite, por lo tanto, iniciar el proceso con cantidades mínimas de ADN (del orden de pico o nanogramos) y terminar la reacción con grandes cantidades de una secuencia de interés. La versatilidad de esta reacción es enorme y la combinación de la PCR y la secuenciación constituye una poderosa herramienta para el análisis de genes.

Como hemos mencionado, la técnica de PCR es de suma utilidad para amplificar ADN a partir de fragmentos clonados en distintos vectores, donde los cebadores son complementarios a los sitios del vector que flanquean el fragmento inserto. La versatilidad de la PCR incluye la amplificación a partir de ADN de material embebido en parafina por varios años,

de material momificado, de restos fósiles, etc. Dentro de los usos mas frecuentes, podemos mencionar la detección de enfermedades genéticas, determinación del sexo en embriones humanos, clonación de genes, mutagénesis *in vitro* y mapeo y secuenciación de genomas.

A) RT-PCR

Se trata de una reacción de PCR, secundaria a la transcripción reversa del ARNm, catalizada por la enzima transcriptasa reversa (RT). Esta enzima es capaz de sintetizar ADN utilizando ARN como molde y forma parte de la batería enzimática de los retrovirus, virus de ARN que requieren la síntesis de ADN para ser integrados en el genoma del hospedador. El esquema general de la RT-PCR consiste en un primer paso de síntesis de ADN complementario (ADNc) de cadena simple tomando como molde el ARN. En esta etapa, llamada síntesis de la primera hebra (first strand synthesis) se utilizan cebadores que pueden ser específicos para el gen de interés, hexámeros de secuencia al azar u oligodT, según se busque sintetizar sólo el ADNc específico o los ADNc correspondientes a todos los ARNs del tejido en cuestión. Por lo tanto, mientras que el uso de primers específicos aumenta la especificidad, los otros dos tipos de cebadores maximizan el número de moléculas de ARNm que pueden ser analizadas en una muestra pequeña de ARN. El uso de hexámeros al azar, puede ocasionar distorsiones por exceso en el número de copias de un determinado ARNm, comparado con los cebadores específicos. La segunda etapa consiste en subsecuentes ciclos de PCR con los cebadores específicos para la secuencia de interés, lo que permite obtener cantidades apropiadas del ADN para diversas manipulaciones genéticas. Esta estrategia conjunta de retrotranscripción y PCR puede ser utilizada para el estudio de ARNm a nivel de una célula individual. Los principales alcances de esta técnica incluyen la determinación de la presencia o ausencia de un transcripto, estimación del nivel de expresión y para el clonado de ADNc sin la construcción de una genoteca.

La técnica de PCR por transcriptasa reversa es denominada como "RT-PCR", la cual desafortunadamente, puede ser confundida con la PCR de Tiempo Real, ya que ambas tienen la misma

sigla (RT- PCR). De lo expuesto es obvio, la necesidad de ser específicos en las denominaciones, sobre todo cuando se combinan ambas técnicas: "Real Time de RT – PCR"

B) PCR cuantitativa (qPCR) o PCR en tiempo real (RT-PCR).

Una variante de la PCR convencional que se basa en la detección y cuantificación simultánea de la fluorescencia emitida por los productos de PCR que se acumulan durante el proceso de amplificación. La PCR cuantitativa ofrece la posibilidad de detectar, en tiempo real, el nivel de amplificación de una secuencia de interés, con el objeto de estimar la cantidad de esa secuencia presente en la muestra original. En la PCR a tiempo real, los procesos de amplificación y detección se producen en el mismo vial cerrado, sin necesidad de ninguna acción posterior. Además, mediante detección por fluorescencia se puede medir durante la amplificación la cantidad de ADN sintetizado en cada momento, ya que la emisión de fluorescencia producida en la reacción es proporcional a la cantidad de ADN formado. Esto permite conocer y registrar en todo momento la cinética de la reacción de amplificación.

Los termocicladores para llevar a cabo la PCR a tiempo real incorporan un lector de fluorescencia y están diseñados para poder medir, en cualquier momento, la fluorescencia emitida en cada uno de los viales donde se realice la amplificación. Los sistemas de detección por fluorescencia empleados en la PCR a tiempo real pueden ser de dos tipos: agentes intercalantes y sondas específicas marcadas. Los agentes intercalantes son fluorocromos cuya emisión de fluorescencia aumenta notablemente cuando se unen a ADN de doble hélice. El más empleado en PCR a tiempo real es el SYBR Green I. El incremento de ADN en cada ciclo se refleja en un aumento proporcional de la fluorescencia emitida. Este sistema de detección es de fácil implementación y mas económico que el uso de sondas específicas. Sin embargo, presenta baja especificidad. El riesgo de amplificaciones inespecíficas puede disminuirse iniciando la reacción de PCR a temperaturas elevadas (hot-start PCR). Pueden utilizarse polimerasas recombinantes que funcionan después de ser activadas por temperatura o polimerasas unidas a anticuerpos que mantie-

nen bloqueado el centro activo de la enzima hasta que son desnaturalizados por calor. Además, la mayoría de los equipos de RT-PCR tienen la posibilidad de determinar el T_m de los fragmentos amplificados, que depende de su longitud y de la composición de sus bases, resultando característico de cada fragmento. Las sondas de secuencia específica, están marcadas con dos tipos de fluorocromos, un donador y un aceptor. Las más utilizadas son las sondas de hidrólisis, denominadas también sondas TaqMan que contienen un fluorocromo de extinción de fluorescencia (Q, quencher) unido en el extremo 3' y otro reportero (R) en el extremo 5'. Cuando se produce la extensión de la cadena de la sonda por acción de la Taq polimerasa, como resultado del clivaje del extintor por su actividad de exonucleasa es emitida la fluorescencia. La fluorescencia detectada durante cada ciclo de la PCR será proporcional a la cantidad de ADN que se está amplificando.

La confiabilidad de los resultados obtenidos mediante esta técnica requiere de la realización en paralelo una curva patrón en las mismas condiciones para conocer la cantidad total de ADN que se está amplificando.

Entre las principales aplicaciones de PCR en tiempo real, podemos mencionar:

Amplificación y detección de ADN o ARN específico en una muestra. Los blancos de detección pueden estar asociados a la presencia de agentes patógenos, resultando una herramienta de extrema utilidad para fines de diagnóstico clínico. En el caso del ARNm, debe ser previamente retrotranscrito a cDNA, mediante una transcriptasa reversa que posee actividad endo H, es decir, remueve el ARNm permitiendo que se forme la segunda hebra de ADN. También puede aplicarse al estudio de las variantes de "splicing" (corte y empalme de intrones) del ARNm.

Cuantificación del ADN o ARN diana en la muestra. Se puede cuantificar la concentración inicial de ADN (o ARN) diana en la muestra de manera muy sencilla, a través de la construcción de una curva de calibrado. El control de la amplificación como medida de la concentración en la muestra se obtiene en las fases iniciales de la reacción, en las que la concentración de los reactivos no es limitante y el efecto de la variabi-

lidad en la eficiencia de amplificación es menos importante.

C) Variantes de la qPCR

PCR múltiple: es una variante de la PCR cuantitativa en la que se amplifican simultáneamente dos o más secuencias blanco en una única reacción. Este análisis en simultáneo de varias secuencias optimiza el aprovechamiento de la muestra cuando se trata de materiales de disponibilidad limitada y ofrece la posibilidad de realizar controles internos, por ejemplo, la expresión de un gen constitutivo en ensayos de expresión. La PCR múltiple suele ser más complicada que la simple adición de varios cebadores a la PCR cuantitativa simple. Se requiere extremar los cuidados en cuanto al diseño específico de cebadores, sugiriéndose que tengan igual temperatura de fusión (meeting point, T_m), un contenido de GC del 45-60% y que carezcan de homología entre sí. La alta eficiencia de los cebadores en la PCR individual, no asegura el éxito en la PCR múltiple, pero aumenta considerablemente las posibilidades de obtenerlo. La combinación de fluoróforos a utilizar en los diferentes cebadores también debe elegirse de manera cuidadosa, para que no exista superposición entre los espectros absorción y emisión entre ellos.

Análisis de curvas de disociación. Se basa en la aplicación de un gradiente de temperaturas creciente después de la PCR para monitorizar la cinética de disociación de los fragmentos amplificados, pudiéndose establecer su T_m para comprobar su especificidad. También permite el análisis de mutaciones puntuales, usando una sonda complementaria con el ADN de tipo salvaje, que abarque la posición del polimorfismo. El híbrido formado entre sonda y ADN de tipo salvaje tendrá una estabilidad mayor que el formado entre la sonda y el ADN mutado, puesto que en este caso la complementariedad no es absoluta, reflejándose en una T_m superior. Adicionalmente, permite establecer además, de forma relativa, la cantidad de ADN de tipo salvaje y la de tipo mutado cuando ambos están presentes en la misma muestra.

En la Sección IX, Capítulo 4, se detalla más este punto y se aplica esta técnica para la detección de organismos genéticamente modificados (OGMs).

6. GENOTECAS

Una genoteca ("gene library") es una colección de fragmentos de ADN clonados que representan en su conjunto el ADN total de un organismo de interés o bien el ADNc, que representa el conjunto de genes que se están expresando en un órgano o tejido determinado o bajo una situación particular o momento de crecimiento o desarrollo. En el primer caso hablamos de una genoteca genómica, donde se encuentran todas las secuencias que se expresan y no se expresan en el organismo mientras que en el segundo se trata de una genoteca de ADNc, donde se encuentran solo las secuencias expresadas.

Estas genotecas consisten en una colección bacterias, conteniendo cada una un vector con el ADN inserto, dispuestas en pocillos. Las genotecas carecen de un catálogo a través del cual se pueda saber cuál es el clon que contiene una secuencia de interés, por lo que es necesario realizar un relevamiento de las colonias bacterianas. Para ello se utiliza una sonda de ADN complementaria a la secuencia o gen buscados, que puede ser conocida o deducirse a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína purificada.

Una de las principales dificultades en el clonado de ADN genómico es que algunas secuencias están representadas una sola vez en el genoma y es difícil hallarlas. Para superar esta limitación de la metodología, puede clonarse directamente el ADNc, ya que el número de copias del ARNm en el tejido correspondiente a un gen que se está expresando es más elevado. El problema se plantea cuando no se sabe en qué circunstancias o en qué tejido se expresa un gen en particular. Actualmente es posible clonar un ADNc a partir de mensajeros poco abundantes en la célula, con concentraciones de 1 a 2 moléculas por célula.

A) Genotecas de ADNc

El primer paso en la construcción de una genoteca de ADNc consiste en el aislamiento del ARN a partir del tejido o condición experimental planteada. Los cambios en la expresión génica asociados a la exposición a estímulos diversos, hacen necesaria la preservación del material

nitrógeno líquido para impedir cambios cuali o cuantitativos de la expresión. La susceptibilidad del ARN al clivaje por RNasas, requiere de cuidados especiales en el material del laboratorio a ser empleado en el aislamiento. A partir del ARN total es posible separar el ARNm, tomando ventaja de la característica cola de poliadeninas que posee en el extremo 3', mediante cromatografía de afinidad, utilizando columnas de celulosa que tienen ligados oligonucleótidos compuestos solo por desoxitimina-oligo(dT). Al pasar el ARN por la columna, el ARNm queda unido por complementariedad al oligo(dT), a través de la cola de poliA. Una vez separado del ARN total, el ARNm es eluido de la columna utilizando una solución tampón adecuada.

Estas colas de poliA también son utilizadas en el próximo paso de clonado, donde funcionan como sitio de unión de los cebadores oligo(dT), para la reacción catalizada por la enzima transcriptasa reversa. El producto de la reacción es un híbrido ARN-ADN. La principal limitación de esta técnica radica en que en los casos en los que el ADNc es muy largo, al comenzar en el extremo 3', muchas veces no llega la retrotranscripción al extremo 5'. Para subsanar esta dificultad, se utilizan primers al azar de 6 a 10 nucleótidos de longitud y están confeccionados de manera de representar muchas secuencias diferentes, por lo que la reacción comienza a partir de muchos sitios diferentes, no solo del extremo 3'. Cualquiera de estas estrategias conduce a la obtención de un híbrido ARN-ADN, a partir del cual mediante PCR, se obtiene ADN de doble cadena que puede clonarse en el vector apropiado.

Para obtener la segunda cadena, se desarrolló inicialmente un método que tomaba ventaja de una "vuelta" o "giro" que da la hebra recién sintetizada, como un efecto de cambio de rumbo de la transcriptasa reversa al llegar al final de la cadena de ARN. Este artefacto provee un cebador adecuado para la síntesis de la segunda cadena de ADN y puede eliminarse, una vez obtenida la segunda cadena, con una nucleasa S1, perdiéndose parte de la secuencia correspondiente al extremo 5' del mensajero.

Existe una segunda técnica, que presenta dos ventajas sobre la anterior. Una es que ge-

nera moléculas de ADNc más largas y la segunda es que contiene prácticamente toda la secuencia correspondiente al extremo 5'. Se basa en la utilización de la enzima RNasaH, que reconoce moléculas híbridas ARN-ADN y digiere la cadena de ARN dejando trozos pequeños que permanecen unidos a la *primera* cadena del ADNc y sirven como *primers* para la ADN polimerasa I, que usa el ADNc original como molde para sintetizar la hebra complementaria de ADN. Solo queda un pequeño segmento de ARN en el extremo 5'. La segunda cadena de ADN tiene algunos sectores no unidos que son sellados por una ligasa de ADN.

Estas moléculas de ADNc de doble cadena están listas ahora para ser insertadas en un vector, que puede ser un plásmido o un deriva-

do del fago. Para ello se utiliza la transferasa terminal, que adiciona colas de poliA o poliT, o se agregan adaptadores, que son sitios artificiales de reconocimiento de alguna enzima de restricción que se unen a los extremos de la secuencia. Se trata de oligonucleótidos artificiales (8-12 bp) que se unen al fragmento utilizando una ligasa de ADN y son cortados con la enzima de restricción apropiada (Fig. 7). Ambos procedimientos sirven para generar extremos cohesivos a fin de unir el fragmento al vector, que posee extremos cohesivos cortados por la misma enzima.

Si se utilizan como vectores los plásmidos, se introducen en las células huésped (bacterias) por transformación. Si se eligen los fagos, son empaquetados *in vitro* para formar

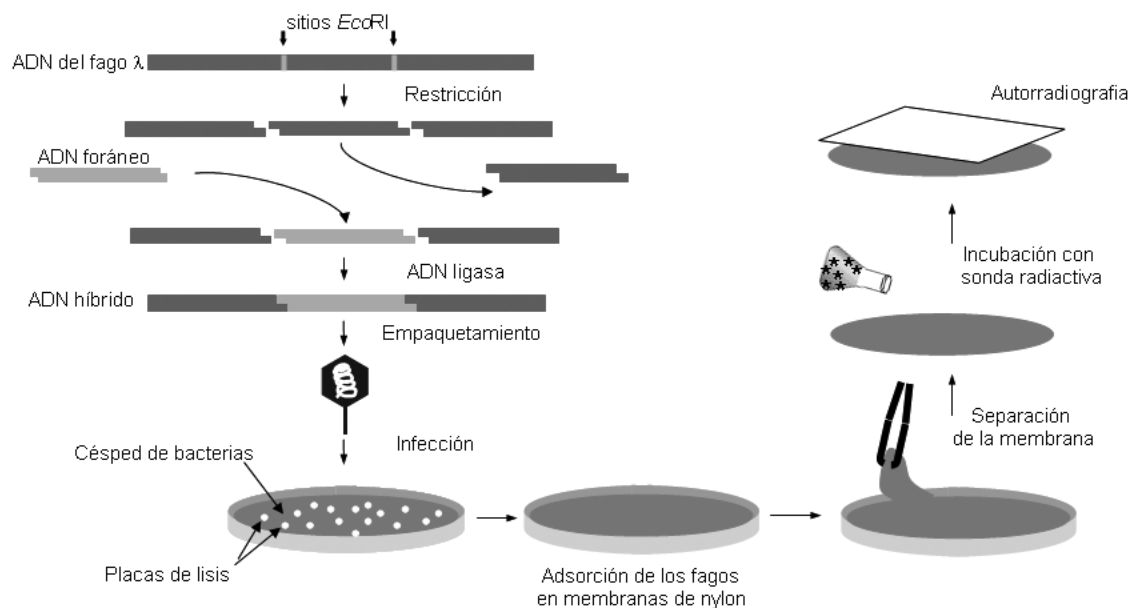


Figura 7. Clonado de ADNc de doble cadena en un fago. El ADN del fago contiene dos sitios de restricción *EcoRI*. El ADN de la región central no esencial del fago se reemplaza por ADN foráneo, uniendo los fragmentos del fago con el ADN a clonar a través de la enzima ADN ligasa. Es necesario previamente adicionar al ADNc adaptadores que llevan sitios *EcoRI*, para generar extremos cohesivos para acoplarse con el ADN del fago. Se genera así una serie de moléculas recombinantes dispuestas en tandem, flanqueadas por sitios cos. Este ADN recombinante se empaqueta formando partículas infecciosas del fago, que se utilizarán para infectar un césped de bacterias. Esto se visualizará como placas o calvas. Cada placa surge de una molécula recombinante individual, que se propaga ahora como un fago. Para la localización del gen de interés en la genoteca, es necesario hacer una copia de la placa en membrana de nylon, que luego será hibridada con una sonda para el gen marcada apropiadamente. Si la marcación es radiactiva, por ejemplo, será revelada por autorradiografía y el clon se identifica por comparación entre la marca de la membrana de nylon y la placa de bacterias.

partículas víricas, que introducirán su ADN en el hospedador apropiado por infección de un césped de bacterias crecido sobre la superficie de una placa de agar (Fig. 7). Si bien los vectores plasmídicos son más fáciles de manipular, las genotecas construidas en los fagos poseen fragmentos de mayor tamaño.

Como resultado del cultivo en placa (plaqueo) de la genoteca, se obtienen cientos de miles a un millón colonias bacterianas o de placas de fagos (zonas claras o de lisis resultado de la producción de partículas víricas), dependiendo del vector utilizado, cada una conteniendo un fragmento clonado, distribuidas sobre la placa de agar. A fin de realizar la búsqueda de un gen particular ("screening"), la genoteca es replicada en membranas de nylon o nitrocelulosa, de manera tal que el patrón de placas en la caja original se vea exactamente reproducido en la membrana de nylon o filtro (Fig. 7). La búsqueda se lleva a cabo por hibridación con una sonda de ácido nucleico, lo cual requiere un conocimiento previo de la secuencia de interés.

Elección de la sonda: En algunos casos, donde parte del gen ha sido clonado, este se utiliza para buscar las partes faltantes. Si se usa una sonda donde la homología es completa el "screening" puede realizarse en condiciones de alta rigurosidad (es decir, con lavados más fuertes, que tienden a despegar lo que se ha unido inespecíficamente). Si la sonda no es completamente homóloga el "screening" deberá realizarse a menores temperaturas y utilizando concentraciones salinas más elevadas en los lavados. Si no se tiene conocimiento previo de la secuencia puede construirse una sonda a partir de la secuencia de aminoácidos de la proteína. Cuando se utiliza esta estrategia, el tamaño mínimo de la sonda debe ser de 15 a 16 nucleótidos (que permite encontrar secuencias únicas en genotecas de ADNc eucarióticos. Generalmente se utilizan sondas de 17 a 20 nucleótidos (correspondientes a 6 aminoácidos contiguos). Otra consideración a tener en cuenta cuando se construye la sonda es que existe más de un codón o triplete para definir la mayoría de los aminoácidos (es lo que se conoce como la "degeneración" del código genético) por lo que un aminoácido puede estar especificado por hasta 6 codones diferentes.

Por ello, estas sondas oligonucleotídicas están constituidas por una mezcla de todas las combinaciones posibles. Una de ellas corresponderá a la secuencia correcta del gen buscado. El problema de esta estrategia es el elevado número de falsos positivos que pueden dar las secuencias adicionales. Una variante consiste en usar un menor número de oligonucleótidos o uno solo pero de mayor longitud (35-75 nucleótidos), eligiendo una región de la proteína que contenga el menor número posible de codones degenerados, utilizando el conocimiento de los codones más probables para la especie en estudio.

Existen otras técnicas para localizar genes en las genotecas de ADNc, como hibridación diferencial, si se trata de genes expresados en diferentes tejidos o la utilización de sondas de regiones conservadas en familias de proteínas para encontrar genes relacionados o bien la utilización de vectores de expresión.

B) Genotecas Genómicas

Una genoteca genómica puede obtenerse de cualquier tejido ya que todas las células de un organismo tienen la misma constitución genética. Se encuentran en ella, no solo las secuencias expresadas sino también las correspondientes secuencias regulatorias. Pueden utilizarse fagos como vectores, pero sucede que muchos de los genomas eucariotas son muy grandes, el de mamíferos por ejemplo contiene 3×10^9 pb de ADN. Si el promedio típico de inserto es de 15.000 pb, se necesitarán unos 200.000 fagos para contener el genoma completo. Para asegurar que todas las secuencias estén representadas al menos una vez, los cálculos estadísticos dicen que deberán analizarse aproximadamente de 1 a 2 millones de fagos.

Por este motivo, especialmente cuando se trata de genomas muy grandes, como es el caso del genoma humano o de varias especies vegetales y animales, se utilizan las genotecas de YACs o BACs.

Genotecas genómicas en cromosomas artificiales

La capacidad de clonar fragmentos de más de 100 kb es crucial para la **genómica estruc-**

tural, funcional y comparativa de organismos complejos. Las primeras genotecas genómicas fueron construidas utilizando como vectores los YACs, aunque por sus limitaciones se prefiere actualmente el uso BACs y PACs como vectores. Cuando se trata de genomas de plantas, pueden utilizarse como vectores los cromosomas artificiales de bacterias binarios (BIBACs), que presentan la ventaja adicional de pueden usarse directamente para transformar plantas utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

Para preparar una genoteca genómica el ADN es escindido con enzimas de restricción o mecánicamente al azar, si se desea evitar la presencia de fragmentos demasiado largos o cortos. Un paso crítico en el proceso es el aislamiento de moléculas intactas de ADN de elevado peso molecular, esencialmente ADN cromosómico. Para ello las células se embeben en bloques de agarosa de baja temperatura de gelificación y se tratan con enzimas y otros reactivos para separar el ADN de las proteínas celulares y del RNAs. La función del bloque de agarosa es proteger a las grandes moléculas, que, embebidas en esta matriz, se someten a la digestión con enzimas de restricción que realicen cortes poco frecuentes ("rare cutters"). La preparación de ADN de alta calidad en plantas es más complicada que la correspondiente para el caso de animales debido a la presencia de la pared celular, que dificulta el embebido en bloques de agarosa. Para superar esta dificultad se trabaja directamente con los núcleos aislados. Si se desea separar estos fragmentos por electroforesis, los bloques de agarosa conteniendo el DNA digerido pueden ser directamente embebidos en la matriz del gel que se correrá.

La cantidad de clones BACs que constituyen una genoteca, se relaciona con el tamaño del genoma, el tamaño promedio de los insertos y la cobertura genómica esperada. Considerando el tamaño de inserto promedio de los clones BACs, para cubrir cinco veces el genoma, una genoteca de BACs de la especie modelo *Arabidopsis thaliana*, cuyo genoma es pequeño, requerirá la obtención de 7.000 clones BACs, mientras que una de trigo candeal, cuyo genoma es dos ordenes de magnitud mayor, tendrá que estar compuesta por 500.000 clones.

Separación de grandes trozos de ADN: electroforesis de campo pulsátil. Las técnicas estándar de separación de ADN en geles de agarosa no son adecuadas para moléculas mayores de 10 kb. Esta limitación ha sido subsanada con la electroforesis de campo pulsátil, en la que el campo eléctrico en el gel de agarosa cambia periódicamente de orientación. De esta manera pueden separarse moléculas tan grandes como los cromosomas de levaduras (200 a 3000 kb) (ver VII.-1). La separación de las moléculas de este tamaño depende de su relativa facilidad o dificultad para reorientarse en respuesta a direcciones cambiantes de un campo eléctrico. Esta técnica puede utilizarse para hacer mapas físicos a gran escala.

Preparación de una genoteca de BACs.

Como todo proceso de clonación, consiste en la preparación del vector, aislamiento y digestión del ADN, selección de los fragmentos por tamaño, transformación de las bacterias y ensamblado de la genoteca.

El vector debe estar purificado, digerido y defosforilado (cuando se corta con una sola enzima, se eliminan los fosfatos terminales, para evitar la recircularización). La digestión del ADN es crítica para obtener fragmentos adecuados para clonar. Los fragmentos son seleccionados por electroforesis de campo pulsátil y se separan de la matriz de agarosa por digestión de la misma con agarasa o gelasa, o por elusión del ADN desde el gel. Esto permite construir genotecas con fragmentos de tamaños similares, de aproximadamente 150 kb.

Estas genotecas de grandes insertos son consideradas recursos de largo plazo para investigación genómica y deben ser mantenidas continuamente, especialmente cuando son utilizadas para proyectos de secuenciación y mapeo a gran escala. En general, cuando se va a construir una genoteca debe elegirse cuidadosamente el genotipo de la especie utilizada como fuente de ADN, el tipo de inserto, etc., dado que la misma puede utilizarse para varios propósitos.

En la Fig. 8 se esquematiza la búsqueda de un gen en una genoteca de BACs. Más detalles acerca del ensamblado de los distintos fragmentos clonados puede encontrarse en el capítulo correspondiente a genómica.

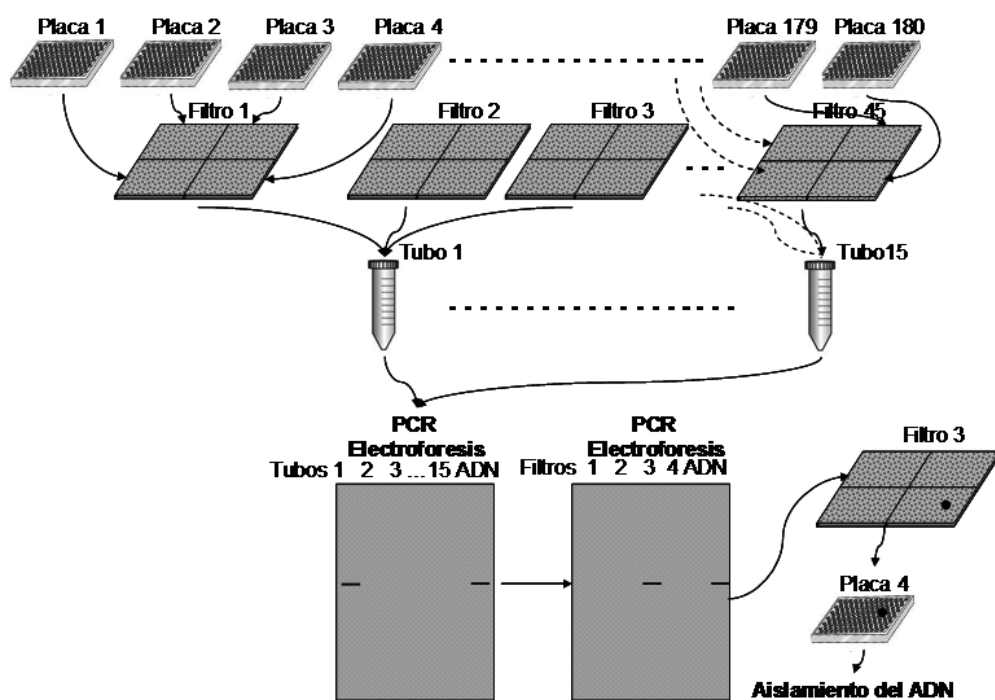


Figura 8. Búsqueda de un gen específico en una genoteca de BACs mediante PCR. Las 180 placas de cultivo, de 96 pocillos cada una, contienen un genoma vegetal completo. Estas placas se replican, agrupadas de a 4, en filtros o membranas. Se realiza luego una reacción de PCR con el cebador específico al ADN obtenido de un tubo que contiene los clones correspondientes a tres filtros, representando 12 placas, que fueron previamente agrupados. Como control positivo se utiliza el ADN vegetal total, también amplificado por PCR. La reacción se analiza sobre un gel de agarosa. Un resultado positivo indica la presencia del gen en el ADN genómico del vegetal y también en uno de los tubos, conteniendo el ADN de 12 placas de 96 pocillos, en la figura, corresponde al tubo 1, que contiene los clones de las placas 1, 2 y 3. Se realiza en mismo procedimiento con tubos que contienen los clones de cada placa. Cuando se chequean los conjuntos individuales se encuentra que el clon positivo pertenece al filtro 3. El producto de PCR se hibrida luego con este filtro y esto nos dará la posición exacta en la placa de 96 pocillos donde se encuentra el gen de interés.

C) Genotecas de cromosomas específicos o de segmentos de cromosomas

Cuando se busca un gen que se sabe está ubicado en un cromosoma específico simplifica mucho el trabajo hacer una genoteca de ese cromosoma solamente. Se trata de una técnica que permite separar cromosomas metafásicos teñidos con el colorante fluorescente Hoechst 33258 para regiones ricas en AT y cromomicina A, para regiones ricas en GC. Los cromosomas teñidos fluorescerán cuando se expongan a luz UV (de longitudes de onda de 361 y 363 nm (Hoechst 33258) o 458 nm (cromomicina A). Las cantidades y proporciones de colorantes varían para cada cromosoma y una computa-

dora reconoce el patrón fluorescente típico de cada cromosoma. Algunos cromosomas son muy similares por lo que no pueden ser separados. Se necesita un millón de cromosomas para hacer una genoteca. Equipos automáticos pueden hacer este trabajo en unas pocas horas.

También puede microdisectarse un cromosoma, tomando un segmento del mismo que tenga la región de interés. En principio se utilizó esta técnica para cromosomas grandes, fácilmente distinguibles por microscopía de contraste de fase. Actualmente, la combinación con PCR posibilita la aplicación de la técnica a cualquier cromosoma. Estos son teñidos con

Giemsa-tripsina y las bandas deseadas son cortadas con agujas de vidrio ultrafinas y clonadas. Cebadores posicionados en el vector permiten amplificar secuencias desconocidas. El ADN amplificado se clona en un vector apropiado y la localización cromosómica de cada clon se determina utilizando hibridación *in situ* (ver III.5)

7. SECUENCIACIÓN DEL ADN CLONADO

Una vez que se ha obtenido el clon con el fragmento de interés, el paso siguiente es secuenciarlo. La determinación de la secuencia puede realizarse por el método químico de Maxam y Gilbert o por el método enzimático de Sanger. El primero consiste en la utilización de compuestos que destruyen selectivamente una o dos de las bases que constituyen el ADN, partiendo de moléculas de ADN marcadas radiactivamente en un extremo. La destrucción no debe ser total, sino que en promedio cada molécula de ADN individual, debe ser clivada una vez. En función del compuesto químico utilizado y de las condiciones de reacción, se obtienen fragmentos de ADN hidrolizados a la altura de las bases G, A+G, T+C o C. Se generan fragmentos de distinto tamaño en función de la distancia de la base destruida al extremo marcado del fragmento a secuenciar. Los productos de las 4 reacciones se corren en un gel de poliacrilamida que es revelado por autorradiografía y la secuencia del fragmento queda determinada por el patrón de bandas.

El método de Sanger, se basa en la interrupción controlada de la replicación enzimática del ADN, añadiendo a la reacción de síntesis junto con los cuatro desoxinucleótidos, un 2',3'-di-desoxinucleótido (ddNTP) marcado. Los ddNTPs pueden ser incorporados al ADN por la ADN polimerasa pero interrumpe la síntesis de la cadena por carecer del OH en posición 3', necesario para la formación del enlace con la base siguiente. Se preparan cuatro reacciones con el ADN molde, el cebador, los cuatro dNTPs, y en cada una de ellas diferencialmente un ddNTP. Con la proporción ddNTP:dNTP adecuada, se generan fragmentos de distinta longitud, dependiendo de la distancia de la última base incorporada al extremo marcado del ADN. Estos fragmentos son separados en un gel de polia-

crilamida donde, mediante autorradiografía, se determina el patrón de bandas, que refleja la secuencia del ADN (Fig 9). Actualmente se utilizan digitalizadores de imágenes para la lectura de la autorradiografía.

Messing desarrolló una serie de vectores de clonado basados en el fago filamentoso M13, muy útiles para el secuenciado enzimático, con los que se utiliza un cebador universal que se posiciona en un lugar adyacente al sitio de policonado del vector. La ventaja es que solo una de las cadenas del vector es empaquetada en las cabezas del fago. Este ADN de simple cadena es ideal para utilizar con el método de Sanger. Actualmente se utilizan fasmidos. La adición de un "fago ayudante" ("helper phage") a las células que lo contienen, hace que el ADN del mismo, de simple cadena, sea replicado, empaquetado y extruido de la célula. Al ser de menor tamaño (aprox. 3000 bp) que M13 permite la inserción de fragmentos de ADN más largos.

Los proyectos de secuenciación genómica han requerido métodos de secuenciado más veloces y económicos. Para ello se ha desarrollado una técnica llamada Multiplex, que permite manejar mayor cantidad de muestras en menor tiempo. Se utilizan 20 vectores plasmídicos que permiten construir 20 genotecas diferentes a partir del mismo ADN. Cada vector lleva dos secuencias únicas que flanquean al sitio de clonado, que pueden ser usadas como etiquetas ("tags") para el ADN clonado y estarán presentes sobre cada fragmento a ser secuenciado. Se toma un clon de cada una de las genotecas plaqueadas (20 colonias) y se mezclan. Se hace crecer el cultivo, se aísla el ADN y se secuencian los plásmidos utilizando el método Maxam y Gilbert. Los productos de 12 conjuntos de reacciones de secuenciación se corren en un gel y se transfieren a una membrana de nylon. El filtro se hibrida secuencialmente (es decir, se despegue una sonda para luego hibridar con las siguientes y así sucesivamente), utilizando como sonda la etiqueta de cada uno de los 20 vectores. En cada caso se van leyendo las secuencias correspondientes a cada uno de los distintos vectores. De esta manera, una sola reacción produce datos de 20 clones a la vez.

Actualmente existen equipos robotizados que pueden llevar a cabo dos de las reacciones más limitantes en el proceso de secuen-

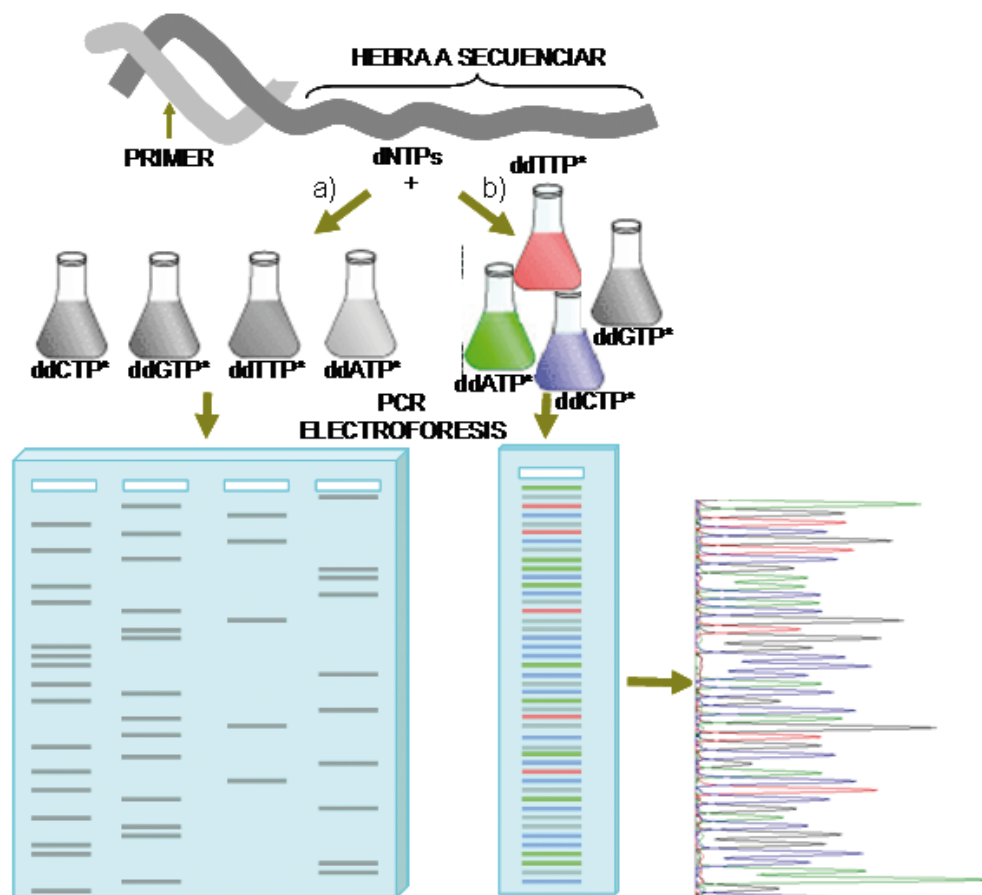


Figura 9. Esquema de la secuenciación de ADN por el método de didesoxinucleótidos, de manera a) manual, usando marcación radiactiva ó b) automática, utilizando ddNTPs que emiten color. Se representa a la hebra de ADN a secuenciar con el cebador unido por complementariedad. La reacción de síntesis del ADN complementario por la enzima ADN polimerasa (PCR) se desarrolla: a) en cuatro tubos individuales, cada uno con los cuatro desoxinucleótidos (dNTPs) y un didesoxinucleótido particular (ddNTP). En general, el dNTP marcado radiactivamente es dATP; ó b) en un único tubo, con cada ddNTP unido a un marcador fluorescente diferente. Luego, realiza la corrida electroforética en gel de poliacrilamida y la secuencia es leída desde la banda más corta (extremo 5') hacia el de mayor longitud (extremo 3') de manera: a) manual ó b) digital, luego de la excitación con láser y emisión de fluorescencia, obteniéndose un cromatograma.

ciado: la detección de las bandas de ADN y la traducción de un patrón de bandas en uno de secuencia. Estos equipos utilizan nucleótidos marcados con fluorocromos. Se utilizan 4 colorantes diferentes, que al ser excitados por láser emiten luz de diferente longitud de onda. Los colorantes pueden utilizarse para marcar el *primer* universal de secuenciación de M13 o cada uno de los 4 terminadores de cadena didesoxi. En este caso, cada mezcla de reacción con un terminador diferente se marca con un colorante diferente. Cuando la reacción es

completada los productos de las 4 reacciones se mezclan y se corren en una sola calle de un gel, en un secuenciador automático. A medida que los fragmentos pasan a través del láser, sus marcas fluorescentes se excitan y emiten luz que se detecta mediante un fotomultiplicador. Después de ser procesada por una computadora, la secuencia es mostrada como una serie de picos o cromatograma, donde cada uno de los 4 colores representa a un nucleótido diferente (rojo: timina, verde: adenina, negro: guanina y azul: citosina) (Fig. 9).

Lecturas Recomendadas

- Madigan M. T., Martinko J. M. and Parker J. 1999. Brock, Biología de los Microorganismos. Octava edición revisada. Prentice Hall Iberia. Madrid, España.
- Singleton P. 2004. Bacterias en Biología, Biotecnología y Medicina. 5ta Edición. Acribia.
- Sambrook J., Fritsch E. F. and Maniatis T. 1989. Molecular cloning: a laboratory manual, second edition, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor.
- Southern E. M. 1975 Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J. Mol. Biol., **98**, 503-517
- Fütterer J., Gisel A., Iglesias V., Kloti A., Kost B., Mittelsten Scheid O., Neuhaus G., Neuhaus-Url G., Schrott M., Shillito R., Spangenberg G. and Wang Z. Y. 1995. Standard Molecular Techniques for the Analysis of Transgenic Plants. En Gene Transfer to Plants. Potrykus Y, Spangenberg G (eds.) Springer Lab Manual.
- Watson J. D., Baker T. A., Bell S. P., Gann A., Levine M. and Losick Y. R. 2006. Biología Molecular del Gen. 5ª Edición, Ed. Médica Panamericana. Madrid.

I. CAPÍTULO 5.

Marcadores Moleculares

María Carolina Martínez, Marcelo Helguera, Alicia Carrera.

5.1. Introducción

Desde sus comienzos, el objetivo del mejoramiento vegetal ha sido seleccionar genotipos superiores a partir de la identificación de fenotipos superiores. El grado de éxito en este proceso depende de: i) el número de genes involucrados en el control genético del carácter (herencia monogénica o poligénica) y las relaciones interalélicas (dominancia o aditividad), ii) la influencia del ambiente, que se mide normalmente a través del parámetro heredabilidad. El proceso de caracterización y/o selección se vuelve más eficiente a través del uso de marcadores genéticos, definidos como caracteres que presentan polimorfismo o variabilidad experimentalmente detectable en individuos de una población segregante y un tipo de herencia predecible según las leyes de Mendel. Esta variación puede considerarse a diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos heredables significativos (marcador morfológico) hasta la variación de un solo nucleótido de ADN (marcador molecular). El marcador ideal debería ser altamente polimórfico (dentro y entre especies), de herencia mendeliana no epistática, insensible a los efectos ambientales, codominante (capaz de diferenciar individuos heterocigotas de homocigotas), de rápida identificación y simple análisis, y de detección en los estadios tempranos del desarrollo de la planta.

En la actualidad existe una gran variedad de marcadores genéticos y a lo largo de este capítulo desarrollaremos aquellos más frecuentemente utilizados en plantas. Para una mejor comprensión se propone clasificar los marcadores en las siguientes categorías: i) marcadores morfológicos, ii) marcadores bioquímicos, iii) marcadores moleculares, iv) marcadores funcionales o de expresión, vi) marcadores basados en SNPs.

5.2 Marcadores Morfológicos

Son características fenotípicas de sencilla

identificación visual tales como forma de hoja, pubescencia, color de fruto, etc. En todos los casos debe tratarse de caracteres de herencia monogénica y predecible según las leyes de Mendel. Muchos de ellos se convierten en importantes descriptores a la hora de inscribir nuevas variedades. Por ejemplo, alrededor de 50 caracteres de plántula, tallo, hoja, espiga, espiguilla y cariopse se utilizan para inscribir e identificar variedades de trigo en la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación de la Argentina. Este tipo de marcadores contribuyó significativamente al desarrollo teórico del concepto de ligamiento genético y a la construcción de los primeros mapas genéticos de plantas (como por ejemplo, en tomate y maíz). En el mejoramiento de girasol, los primeros híbridos se obtuvieron utilizando “color de hipocótilo” como marcador ligado al gen *ms* de androesterilidad; de este modo las plantas verdes que eran androestériles se utilizaban como líneas maternas y las plantas con antocianinas que eran fértiles se eliminaban del lote de producción al comienzo de su desarrollo.

Las principales limitaciones de los marcadores morfológicos son: i) se encuentran disponibles en un número restringido de especies vegetales, utilizadas como sistemas modelo para estudios genéticos, tales como el maíz, el tomate y la arveja, ii) bajo nivel de polimorfismo, iii) pueden producir alteraciones fenotípicas que dificultan el desarrollo de la planta (albinismo), iv) generalmente de herencia dominante y en algunos casos poligénica y, v) muchos de ellos se expresan en estadio de planta adulta, lo cual prolonga los tiempos de evaluación en los programas de mejoramiento.

Un enorme espectro de especies vegetales carece de información a este nivel. No obstante, los marcadores morfológicos permanecen como caracteres útiles en la identificación de materiales dado que representan un conjunto de genes que pueden ser evaluados con métodos sencillos y a bajo costo.

5.3 Marcadores Bioquímicos

Son polimorfismos presentes en ciertas proteínas detectados a través de técnicas bioquímicas. El desarrollo de los marcadores bioquí-

nicos produjo una revolución en los estudios genéticos en plantas, que hasta el momento habían contado con un limitado número de marcadores morfológicos. La técnica permitía incluir potencialmente a todas las especies de plantas. En esta parte del capítulo nos referiremos a las Isoenzimas y a las Proteínas de reserva.

5.3.1 Isoenzimas

Las isoenzimas se definen como diferentes formas moleculares de una enzima, que poseen una actividad catalítica común, es decir actúan sobre el mismo sustrato. Ciertos cambios en el ADN que codifica estas enzimas (mutaciones) pueden resultar en cambios en la composición de aminoácidos, originando proteínas con la misma actividad biológica pero con diferente carga neta y por lo tanto con diferentes velocidades de migración en un campo eléctrico. Estas diferencias determinan patrones característicos de migración electroforética de las formas iso-enzimáticas. Varios factores definen el patrón de bandas o zimograma: i) Número de genes que las codifican: la presencia de varios genes codificando para una misma enzima ha sido atribuida a procesos de duplicación génica y subsecuente divergencia a través de mutaciones diferentes en cada caso; ii) Estados alélicos: el proceso más simple de generación de nuevas formas enzimáticas es la mutación de un gen estructural, las variantes alélicas se denominan aloenzimas. Estos marcadores muestran codominancia (en un individuo diploide ambos alelos de un locus son expresados y visualizados). A modo de ejemplo, la enzima alcohol dehidrogenasa (ADH), puede comprender varios loci y alelos con denominación *Adh-1a*, *Adh-1b*, *Adh-2a*, *Adh-2b*, *Adh-2c*, etc.; iii) Estructura cuaternaria de los productos proteicos: la enzima funcional puede estar compuesta por un número variable de sub-unidades. En las formas más simples o monoméricas los individuos homocigotas presentan una banda y los heterocigotas simplemente la suma de ambas. Cuando la estructura cuaternaria se vuelve más compleja, encontramos enzimas activas compuestas por dímeros, tetrámeros, etc. En este caso el individuo heterocigota presenta bandas adicionales

no presentes en los homocigotas, que se generan por la combinación de sub-unidades codificadas por los distintos alelos o loci (Figura 1). Finalmente, iv) Compartimentalización subcelular: se encuentran formas enzimáticas localizadas en citoplasma, cloroplasto o mitocondria, codificadas todas por genes nucleares pero con diferentes velocidades de migración.

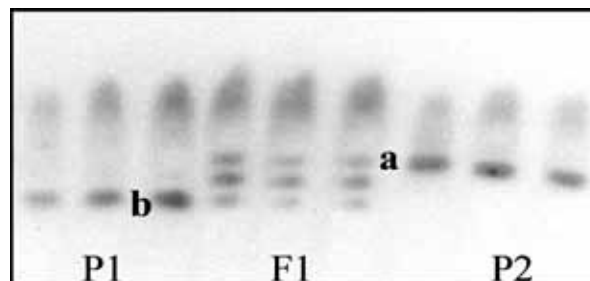


Figura 1.

Las isoenzimas se extraen por homogeneización del tejido (semilla, raíz, hoja) en condiciones no desnaturalizantes (que preservan la actividad catalítica de la enzima) y se analizan mediante electroforesis en un soporte sólido, generalmente almidón. El gel puede ser cortado en capas horizontales y cada una se destina a una solución de revelado específica que consta de un sustrato, un colorante y cofactores, disueltos en un buffer apropiado. La reacción que ocurre entre las enzimas presentes en el gel y el correspondiente sustrato generan productos coloreados que conforman el patrón de bandas. Las metodologías empleadas en la extracción y electroforesis son relativamente sencillas y rápidas y el equipamiento es de bajo costo.

Las isoenzimas han tenido un rol prominente en estudios de poblaciones vegetales para determinar variabilidad y estructura genética, sistemática y biología evolutiva así como en descripción de germoplasma e identificación de variedades. Su aplicación en la construcción de mapas se ha visto limitada por el número de marcadores isoenzimáticos disponibles (en general menor a 50), y por su reducido polimorfismo (2-4 alelos). Por otro lado, las formas enzimáticas extraídas de hoja o raíz (no así las de semilla) presentan variaciones en relación a

las condiciones ambientales de crecimiento y a la edad del tejido, lo cual afecta la reproducibilidad de los zimogramas. No obstante, estos loci representan importantes marcas de referencia para relacionar mapas obtenidos a partir de distintos marcadores de ADN.

5.3.2 Proteínas de reserva

Las proteínas de reserva son un grupo heterogéneo de proteínas presentes en la semilla de planta que tienen por función proveer energía al embrión en los primeros estadios de crecimiento. Estas proteínas han sido extensamente estudiadas en cereales y oleaginosas y se relacionan directamente con la calidad del grano.

Las proteínas de reserva se extraen mediante procedimientos sencillos a partir de las semillas y se separan mediante electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturalizantes (con detergentes). No se requiere detectar actividad enzimática, las proteínas se visualizan directamente por tinción con Azul de Coomassie evidenciándose los polimorfismos como diferencias en la movilidad electroforética.

En la mayoría de los cereales, estas proteínas están codificadas por varios genes relacio-

nados conformando familias. Varios estudios demuestran que durante la evolución de estos genes se han detectado duplicaciones, translocaciones, inserciones de elementos móviles, entre otros rearrreglos cromosómicos, que serían los responsables de generar un alto nivel de polimorfismo protéico entre y dentro de especies.

Por ejemplo, en el caso del trigo, las principales proteínas de reserva del grano se denominan gluteninas y gliadinas, estas proteínas son capaces de polimerizar durante el amasado de la harina formando una red denominada gluten de importancia fundamental en la elaboración de pan. Desde un punto de vista genético, las gluteninas se hayan codificadas en los loci *Glu-1* y *Glu-3* y las gliadinas en *Gli-1* y *Gli-2* pudiendo tener cada uno de estos loci 1, 2 o más genes; mutaciones en estos genes generan nuevas variantes alélicas. Numerosos estudios electroforéticos han revelado alto grado de polimorfismo en el número y la movilidad electroforética de estas proteínas y muchos de estos polimorfismos son utilizados como marcadores genéticos para mejorar la calidad panadera del trigo, principalmente en el caso de las gluteninas (Figura 2). Las gliadinas muestran patrones electroforéticos más complejos que las

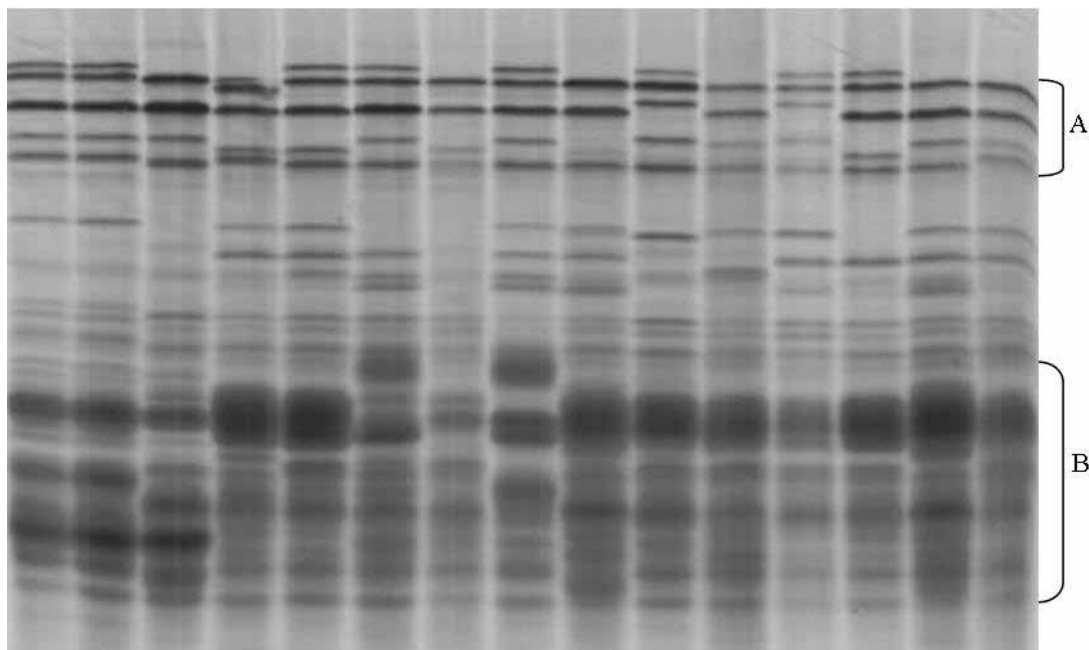


Figura 2.

gluteninas y han sido utilizadas en la descripción de germoplasma e identificación de variedades. Como en el caso de las isoenzimas, la aplicación de proteínas de reserva en la construcción de mapas genéticos es limitada por el número de marcadores genéticos disponibles, sin embargo estos loci representan importantes marcas de referencia, por ejemplo, para los cromosomas 1 y 6 de trigo, donde están presentes los principales genes de gluteninas y gliadinas.

Para más información sobre estructura, propiedades y rol de las proteínas de reserva en grano se recomienda la lectura de la revisión de Branlard et al. (2001).

La principal ventaja de los marcadores bioquímicos es su fácil implementación en el laboratorio ya que involucran metodologías sencillas, rápidas y de bajo costo. Como desventajas se pueden citar: baja cobertura del genoma, dificultades en la interpretación de los resultados (principalmente para las Isoenzimas) y, en el caso de las proteínas de reserva, dado que muchos de los genes codificantes suelen estar estrechamente ligados (familias multigénicas), no se puede asumir independencia entre los loci.

5.4 Marcadores moleculares

Un marcador molecular es simplemente un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma (punto de referencia) cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o sin función conocida.

Con el advenimiento de las técnicas modernas de biología molecular (para más detalle ver I.- 4), surgieron diversos métodos de detección de polimorfismo genético directamente a nivel de ADN. En la actualidad, se puede obtener un número prácticamente ilimitado de marcadores en cualquier organismo vivo que permiten analizar la totalidad de la información genética (genoma) de un organismo.

Para describir los distintos tipos de marcadores moleculares, se seguirá una clasificación arbitraria en base a las metodologías que emplean para su detección. Todas estas técnicas parten, como primer paso, de extraer ADN genómico de la planta bajo estudio.

5.4.1 Marcadores basados en la hibridación del ADN

5.4.1.1 RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) o polimorfismo en la longitud de fragmentos de restricción (Botstein et al., 1980)

Son los marcadores moleculares más antiguos y aún son usados para algunas aplicaciones importantes como mapeo comparativo y estudios de sintenia entre especies (ver Parte III, Capítulo 2 "Aplicaciones de los Marcadores Moleculares").

Este marcador se basa en la comparación de perfiles de bandas generados a partir del ADN de distintos individuos por digestión con enzimas de restricción. Los fragmentos obtenidos se separan por su tamaño mediante electroforesis y se transfieren a una membrana donde son desnaturalizados y luego hibridados con una sonda. Esta sonda es un fragmento de ADN de cadena simple (de secuencia conocida o no) que está marcado radioactivamente. La sonda se unirá a aquellos fragmentos de restricción con secuencia complementaria a la misma (ver enzimas de restricción y método de *Southern Blot* en Parte I, Capítulo 4 "Herramientas básicas de Ingeniería Genética").

Para la visualización, la membrana se expone a una placa radiográfica. En cuanto a la sonda empleada esta puede ser genómica (con alta proporción de ADN no codificante, no perteneciente a ningún gen) o de ADNc (cuando proviene de un transcripto). También puede obtenerse a partir de ADN de organelas (mitocondrias o cloroplastos). Pueden emplearse sondas aisladas de especies relacionadas (por ejemplo, sondas aisladas de tomate pueden emplearse en papa y viceversa).

La variabilidad genética presente en el marcador molecular proviene de diferencias en la secuencia del ADN genómico debidas a mutaciones puntuales en los sitios de restricción, a duplicaciones, deleciones, inserciones, etc., que modifican la distancia entre pares de sitios de restricción generando fragmentos polimórficos (de diferentes tamaños) (Figura 3). Un locus RFLP está definido por la combinación de una enzima de restricción y una sonda. Individuos homocigotas poseen el mismo pa-



Figura 3.

trón de restricción en ambos cromosomas homólogos y por lo tanto producen una sola banda. Ejemplos de nomenclatura utilizada para loci RFLP son *XNpb136* de arroz o *Xpsr912-2A* de trigo, que hacen referencia al laboratorio de origen y a las sondas utilizadas.

Las ventajas de los RFLPs radican en que son altamente reproducibles, codominantes y multialélicos. Por otro lado, cuentan con las desventajas de ser muy laboriosos, difíciles de automatizar, se necesita disponer de las sondas para la especie en estudio y requieren de infraestructura adecuada para mantener las sondas y trabajar con radiactivo, lo que los hace relativamente costosos.

5.4.1.2 VNTR (Variable Number of Tandem Repeats) o repeticiones en tandem de número variable

Los VNTR, también conocidos como mini-

satélites, son repeticiones de secuencias de 9 a 100 pares de bases. El número de repeticiones es variable pero en general es menor a 1000. Existen dos formas de detectar los VNTR: por hibridación o por técnicas de PCR. En el primer caso, el ADN genómico es digerido con enzimas de restricción que reconocen sitios adyacentes a la región repetida. Los fragmentos se separan por electroforesis, se inmovilizan en una membrana y se detectan mediante sondas. La longitud de los fragmentos de restricción producidos en diferentes individuos varía de acuerdo al número de repeticiones del minisatélite. La diferencia básica entre RFLP y VNTR reside en el tipo de sonda utilizada. En la técnica de VNTR las sondas están constituidas por secuencias homólogas a las secuencias repetidas de los minisatélites, por lo tanto todos los loci hipervariables del genoma son detectados simultáneamente, mientras que en RFLP, las sondas son homólogas a secuencias únicas del genoma, detectando así uno o pocos loci cada vez. De esta manera, en el autorradiograma, al contrario del patrón simple de bandas obtenido por RFLP, para minisatélites se obtiene un perfil complejo de bandas múltiples. Los VNTR tienen la ventaja que además de explorar el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción en cada locus hipervariable, utilizan también el polimorfismo en el número y distribución de estos loci a lo largo del genoma, posibilitando así la visualización simultánea de diversas regiones del mismo. Las limitaciones para esta técnica, son las mismas descritas oportunamente para RFLP.

Los minisatélites también pueden ser detectados mediante la amplificación por PCR de los segmentos conteniendo diferente número de repeticiones, utilizando iniciadores o "primers" que flanqueen los VNTR y luego su visualización mediante electroforesis y tinción con bromuro de etidio. Esta opción se ha vuelto más frecuente con el aumento de información de secuencias en bases de datos que permiten el diseño de iniciadores flanqueantes a determinados minisatélites. Sin embargo estos marcadores han sido poco utilizados en plantas.

5.4.2 Marcadores basados en la amplificación arbitraria o semi arbitraria del ADN

5.4.2.1 RAPDs (*Random Amplified Polymorphic DNAs*) o ADN polimórfico amplificado aleatoriamente (Williams et al. 1990, Welsh y McClelland 1990)

La metodología de RAPD fue desarrollada de forma independiente por dos grupos de Estados Unidos. Un grupo la denominó RAPD y el otro AP-PCR (*Arbitrarily Primed-Polymerase Chain Reaction* o reacción en cadena de la polimerasa con iniciadores arbitrarios).

La técnica de RAPD es una variante de PCR que utiliza un solo oligonucleótido de 10 bp que hibrida al azar con el ADN en estudio. Para que se genere un fragmento RAPD es necesario que el oligonucleótido iniciador hibride en las dos cadenas del ADN en orientaciones opuestas suficientemente cercanas (menos de 3000 bp) como para permitir la amplificación. La secuencia del oligonucleótido es aleatoria al igual que los sitios de hibridación en el ADN, por lo tanto la secuencia amplificada es desconocida. El iniciador puede hibridar en distintos sitios del ADN sin necesidad de complementariedad exacta de bases, dado que la PCR se hace con temperaturas de unión del iniciador bajas, generando varios fragmentos que son resueltos mediante electroforesis y posterior tinción (Figura 4). Cada banda del patrón de amplificación es considerada un locus RAPD, definido por la secuencia del iniciador y el peso molecular. El polimorfismo que se observa en-

tre distintos individuos consiste en la presencia o ausencia de fragmentos de ADN amplificado debido a mutaciones en el sitio de reconocimiento del iniciador, deleciones, inserciones. Este marcador no permite diferenciar individuos heterocigotas, por lo que es un marcador dominante. Los marcadores RAPD están basados en una técnica sencilla, de bajo costo de implementación, automatizable y no radioactiva. A diferencia de los marcadores basados en PCR convencional no se requiere información nucleotídica previa para su desarrollo, se dispone de un número ilimitado de marcadores y el nivel de loci polimórficos es alto. La principal desventaja de esta técnica es su baja reproducibilidad entre laboratorios, en el sentido de que pequeñas modificaciones en la técnica como por ejemplo, concentración de ADN inicial, modelo de termociclador, origen de ADN Polimerasa termoestable, etc., pueden alterar el patrón de fragmentos de ADN generados por RAPD de una muestra.

Relacionados con los RAPDs encontramos a los marcadores DAF (*DNA Amplification Fingerprinting*) (Caetano Anollés et al. 1991) y AP-PCR (*Arbitrary Primed PCR*) (Welsh y McClelland 1990). DAF y AP-PCR son técnicas similares a RAPD. DAF involucra el uso de iniciadores arbitrarios de 5 pares de bases de longitud. Esto incrementa la probabilidad de apareamiento con el ADN molde respecto al

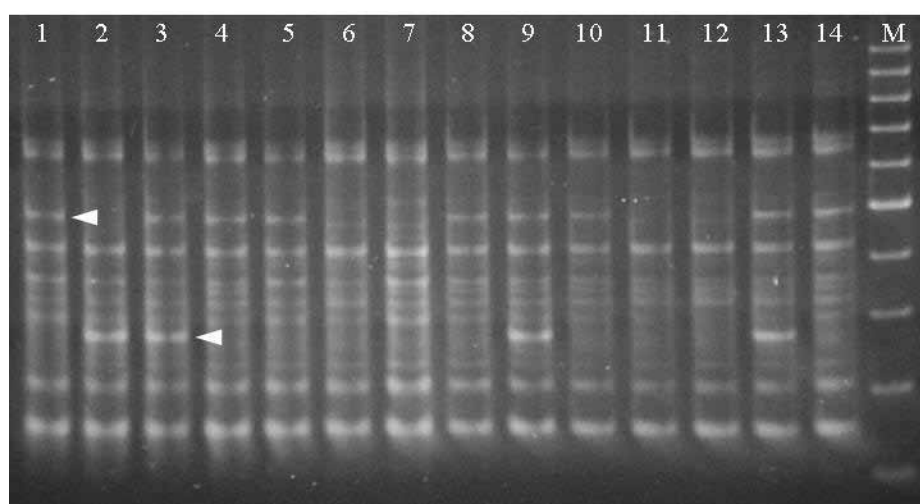


Figura 4.

RAPD y, por lo tanto, resulta en un perfil más complejo de bandas. La visualización se lleva a cabo por medio de geles de poliacrilamida teñidos con plata. AP-PCR utiliza iniciadores ligeramente más largos que la técnica anterior (aprox. 20 pares de bases). Los productos de amplificación son marcados radiactivamente y también pueden ser resueltos por electroforesis en geles de poliacrilamida. Las ventajas y limitaciones de estas técnicas son similares a las descriptas para los RAPD.

5.4.2.2 AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) o polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (Vos et al. 1995)

Los marcadores AFLP constituyen una herramienta poderosa de análisis del genoma dado que poseen un alto poder de detección de la variabilidad genética. El ensayo de AFLP combina la especificidad, resolución y poder de muestreo de la digestión con enzimas de restricción con la velocidad y practicidad de la detección de polimorfismos mediante PCR, sin necesidad de disponer de información previa del genoma a estudiar. Desde su desarrollo y divulgación esta técnica se utiliza ampliamente en el análisis de plantas.

Consiste esencialmente en cuatro etapas: i) el ADN genómico es cortado con dos enzimas de restricción. Generalmente una es de corte raro (ej. *EcoRI*), que reconoce de 6 a 8 pares de bases y otra es de corte frecuente (ej. *MseI*) que reconoce 4 pares de bases; ii) fragmentos de ADN doble cadena de 20 a 30 pares de bases llamados adaptadores se ligan en forma específica a los extremos de los fragmentos obtenidos en el paso anterior, generando así el molde para la amplificación posterior del ADN; iii) se amplifican selectivamente fragmentos por PCR. En esta etapa, se utilizan iniciadores de aproximadamente 20 nucleótidos que contienen una secuencia específica complementaria a la secuencia de los adaptadores y además, 1 a 3 nucleótidos selectivos adicionales de secuencia arbitraria en su extremo 3'. Dado que sólo una subpoblación de los fragmentos originales es amplificada, se obtiene un patrón de bandas que permite un registro adecuado. La amplificación descrita en iii) se realiza en dos etapas: una primera amplificación selecti-

va empleando un nucleótido arbitrario (amplificación +1 o preamplificación) y luego, este producto de amplificación obtenido es empleado como molde en una nueva amplificación empleando iniciadores que poseen 2 nucleótidos selectivos adicionales al anterior (amplificación +3 o amplificación final); iv) El análisis de los fragmentos así amplificados se realiza mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes. Si uno de los iniciadores empleados está marcado radiactivamente, se visualizará mediante autorradiografía, si uno de los iniciadores está marcado con un compuesto fluorescente, puede ser resuelto empleando un secuenciador automático. Alternativamente, se puede visualizar mediante tinción con nitrato de plata (Figura. 5).

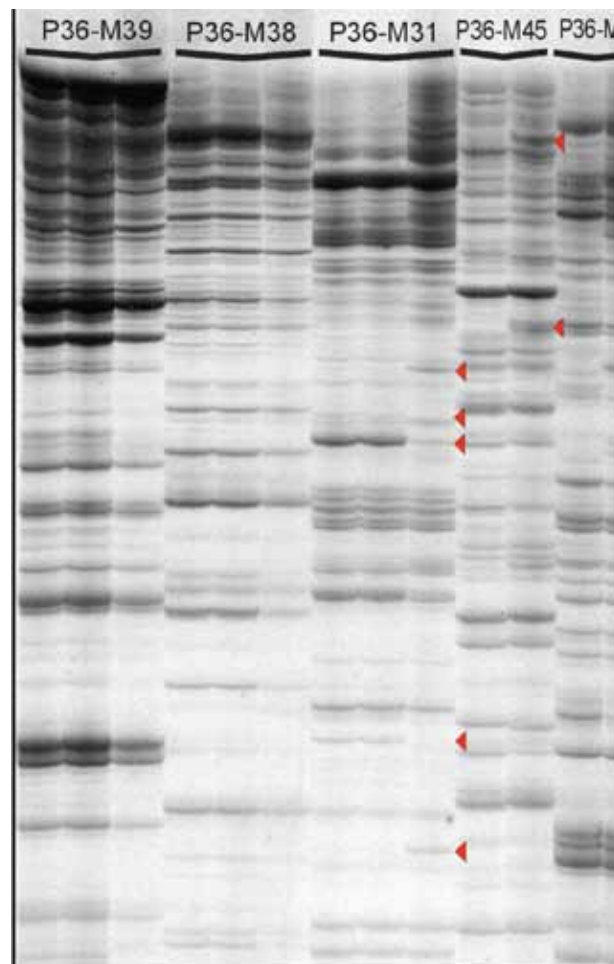


Figura 5.

La base genética del polimorfismo de AFLP es la ausencia o presencia de fragmentos amplificados de un tamaño determinado dado por mutaciones puntuales, inversiones, inserciones y deleciones que llevan a la pérdida o ganancia de un sitio de restricción o la alteración de la secuencia reconocida o amplificada por los iniciadores. Al igual que en los RAPDs, no es posible distinguir individuos heterocigotas por lo que se trata de un marcador dominante. Una banda AFLP se interpreta como un locus, definido por las dos enzimas de restricción, una combinación de primers que incluyen las bases selectivas (Ej. *EcoRI-ATC/MseI-AAG*) y un peso molecular.

Su implementación en laboratorio requiere de una infraestructura considerable, son relativamente laboriosos para su obtención y el costo es medio a alto. Estos marcadores presentan un alto poder de detección de la variabilidad genética, ya que se explora simultáneamente el polimorfismo de ausencia/presencia de sitios de restricción (como los RFLP) y la ocurrencia o no de amplificación a partir de secuencias arbitrarias (como los RAPDs). Es un marcador mucho más robusto que los RAPDs, ya que en la amplificación se utilizan oligonucleótidos más largos, que aumentan significativamente la especificidad de la reacción sin perder las ventajas de la amplificación de secuencias al azar (no requiere información previa de secuencia de ADN). Asimismo, se pueden emplear distintas enzimas de restricción e iniciadores selectivos, resultando en una ilimitada posibilidad de generar polimorfismos. Otra ventaja de los AFLPs es el número de fragmentos (marcadores) obtenidos por reacción y resueltos por electroforesis (oscila entre 30 - 50 contra los 4 - 10 de RAPDs).

Una variante de esta técnica es la llamada cDNA-AFLP que, en vez de ADN genómico, parte de ARN mensajero que es copiado a ADNc. Esta metodología es empleada en análisis de expresión diferencial de genes, estudios del transcriptoma y genómica funcional.

5.4.3. Marcadores moleculares basados en la amplificación sitio-específica del ADN

En contraste con los marcadores basados en la amplificación de secuencias arbitrarias, los

marcadores incluidos en la presente categoría requieren del diseño de iniciadores específicos para la amplificación de un locus en particular.

5.4.3.1 Microsatélites (Litt y Luty 1989)

Los microsatélites son regiones hipervariables del genoma que contienen arreglos de secuencias simples en tandem de mono, di, tri, tetra o pentanucleótidos que se repiten entre 10 y 100 veces. Los marcadores microsatélites, también denominados *Simple Sequence Length Polymorphism* (SSLP), *Simple Sequence Repeat Polymorphism* (SSRP), *Simple Sequence Repeats* (SSR) o *Sequence-Tagged Microsatellite Sites* (STMS) se encuentran distribuidos por todo el genoma de la mayoría de las especies eucariotas.

Los microsatélites se detectan mediante su amplificación por PCR usando iniciadores específicos de 20 a 30 pb de longitud que hibridan en la región que flanquea al tandem de repeticiones (microsatélite). Estos marcadores se resuelven por electroforesis en geles de poliacrilamida en condiciones desnaturizantes, mediante tinción con plata o por autoradiografía (en el caso de usar un iniciador marcado radioactivamente). Si se dispone de un secuenciador automático, se pueden resolver por tamaño en este equipo mediante el empleo de un iniciador marcado con un fluoróforo, posibilitando un análisis automatizado.

La base genética del polimorfismo detectado en microsatélites se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tandem y, consecuentemente, en el tamaño del microsatélite amplificado en individuos de una especie. Estas diferencias son originadas durante la replicación del ADN debido a fallas en la acción de la ADN polimerasa durante el copiado de una región repetida donde incorpora o elimina repeticiones. Otro mecanismo responsable de la variación es el entrecruzamiento desigual entre cromosomas homólogos. En este caso se generan alelos con diferencias mayores en el número de repeticiones.

El desarrollo de marcadores microsatélites requiere del conocimiento de las secuencias flanqueantes adecuadas para el diseño de los iniciadores específicos. Los primeros SSR se desarrollaron a través de un proceso ex-

perimental complejo que implicó la obtención de genotecas enriquecidas en microsatélites, secuenciación, diseño de iniciadores aptos para amplificar microsatélites por PCR y selección de loci con patrones de herencia simple. Actualmente, las secuencias flanqueantes pueden obtenerse a partir de las secuencias depositadas en las bases de datos (búsqueda *in silico*). El uso de programas informáticos especializados en la búsqueda de microsatélites ha revelado que existen secuencias con estas características formando parte de secuencias que se expresan (genes), denominándose SSR génicos o EST-SSRs. Aunque tendrían un nivel de polimorfismo menor, serían más fácilmente transferibles entre especies relacionadas.

Un locus SSR está definido por las secuencias de los iniciadores flanqueantes al microsatélite. Por el alto polimorfismo que suelen presentar por locus (multiallelismo) se los considera los marcadores ideales para el mejoramiento en especies autógamas como el trigo. Estos marcadores son codominantes (ambos alelos de un individuo heterocigota pueden ser visualizados), genoma-específicos y altamente polimórficos en comparación con los RFLPs y RAPDs. Su implementación en un laboratorio requiere de mayor infraestructura y presupuesto que los RAPDs, siendo semejantes en este aspecto a los AFLPs.

5.4.3.2 Otros marcadores basados en los microsatélites

Una de las limitaciones para la utilización de los marcadores microsatélites es la necesidad de conocer las regiones que flanquean a las repeticiones para poder desarrollar los iniciadores específicos. Así, se desarrollaron marcadores moleculares buscando explorar las repeticiones microsatélites sin necesidad de secuenciar el ADN. Entre esta clase de marcadores podemos encontrar:

MP-PCR (*Microsatellite-Primed PCR*): en el desarrollo de este marcador molecular, se utiliza un iniciador que contiene las repeticiones de un microsatélite específico para amplificar el ADN. En las regiones del ADN que poseen las dos secuencias inversamente orientadas de este microsatélite específico hibridará el iniciador y amplificará el fragmento de ADN lo-

calizado entre ellas. Conceptualmente, sería similar a RAPD empleando un iniciador con la secuencia repetida del microsatélite.

ISSR (*Inter-SSR amplification*): se basan en la amplificación por PCR empleando iniciadores que contienen en su secuencia repeticiones de di o trinucleótidos junto con 4 bases nucleotídicas determinadas en uno de sus extremos. Esto permite la amplificación parcial de todas las regiones (potencialmente) amplificadas por el marcador MP-PCR, descrito anteriormente, aumentando la reproducibilidad, que es una de las limitaciones del uso de los MP-PCR. Al tener en el iniciador esas 4 bases extras, a este tipo de marcador se lo conoce también como microsatélite anclado (AMP-PCR, *Anchored Microsatellite-Primed PCR*).

SAMPLE (*Selective Amplification of Microsatellite Polymorphic Loci*) o amplificación selectiva de loci microsatélites polimórficos. En esta metodología se amplifican loci microsatélites a partir de un iniciador arbitrario empleando dos técnicas: microsatélites y AFLP. Se realizan todas las etapas de AFLP, es decir, digestión con dos enzimas de restricción, ligación de adaptadores, preamplificación y amplificación selectiva del ADN. Sólo que en la amplificación selectiva final, se emplea el iniciador de AFLP con sus tres nucleótidos selectivos en combinación con un iniciador SAMPLE. Este iniciador, posee en su secuencia bases complementarias a un microsatélite. La banda polimórfica resultante de la amplificación del ADN con el marcador SAMPLE puede ser convertida en un marcador microsatélite convencional, a partir del clonado y secuenciación de la misma.

5.4.3.3. STS (*Sequence-Tagged Sites*) o sitios marcados por secuencias (Olson et al. 1989)

STS es un término general dado a un locus en particular definido por las secuencias de sus iniciadores específicos. Un STS puede ser generado para cualquier sitio del genoma siempre y cuando ese sitio (locus) pueda ser clonado y secuenciado. Un STS debe satisfacer dos condiciones: se debe conocer su secuencia, que permite diseñar iniciadores específicos que permitirán su amplificación por PCR, y tener una localización única en el cromosoma o

genoma estudiado. Estos marcadores son sumamente usados en mapeo físico detallado de genomas grandes para ensamblar, por ejemplo, clones de BAC entre sí.

Alternativamente, para una utilización más eficiente de marcadores moleculares en programas de mejoramiento existe la posibilidad de convertir marcadores complejos y costosos o inestables como RFLPs, AFLPs y RAPDs, en marcadores PCR alelo-específicos, que son económicos, robustos y de sencilla implementación en cualquier laboratorio de biología molecular (los marcadores PCR alelo-específicos también serían STS en el sentido de que se trata de una secuencia de ADN corta que identifica un locus específico del genoma y puede ser amplificada por PCR). La estrategia consiste en aislar el fragmento de ADN polimórfico del gel, se clona, se secuencia y se diseñan iniciadores específicos de alrededor de 20 pb, para amplificar por PCR dicho fragmento. Cuando se parte de un fragmento RAPD, el marcador derivado mediante este proceso ha sido descrito como SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*, Paran y Michelmore 1993).

El problema que enfrentan estas estrategias suele ser el bajo nivel de polimorfismo entre variedades de una misma especie (trigo, soja, etc), lo que disminuye las posibilidades de encontrar mutaciones útiles para desarrollar estos marcadores. De todos modos, existen antecedentes exitosos de desarrollo de marcadores de PCR alelo-específicos en trigo para caracteres de interés agronómico como pueden ser alelos de gluteninas, genes de resistencia a patógenos, genes vinculados a adaptación, etc.

Una segunda variante de los STS son los marcadores CAPS (*Cleavage Amplified Polymorphic Sequence*) o "secuencia polimórfica amplificada y clivada", (Konieczny y Ausubel 1993). En esta técnica, también conocida como RFLP-PCR, un fragmento de ADN es amplificado por PCR, luego digerido con enzimas de restricción y resuelto por electroforesis en agarosa o poliacrilamida. Este método aprovecha la capacidad que posee la técnica de PCR de amplificar segmentos específicos de ADN con la capacidad que poseen las enzimas de restricción de cortar el ADN en secuencias blanco de la enzima de restricción. La base genética del polimorfismo detectado por el marcador CAPS es la presencia/ausencia de sitios de restricción en la secuencia amplificada por PCR. Este marcador permite identificar individuos heterocigotas, por lo que se comporta como marcador codominante (Figura 6).

Los marcadores STS y sus variantes SCAR y CAPS, tienen la ventaja de requerir un ensayo metodológico sencillo y altamente reproducible por los que son fácilmente transferibles a otros laboratorios, permitiendo que sean muy usados en selección asistida por marcadores. Asimismo, según las características de su diseño, pueden ser codominantes y ser analizados en simultáneo varios loci STS en un mismo gel.

Actualmente, dada la disponibilidad de secuencias en base de datos es posible también diseñar marcadores STS directamente a partir de secuencias de interés (secuencias genómicas, secuencias ESTs, etc) evitándose de este modo el trabajo previo de secuenciación del STS.

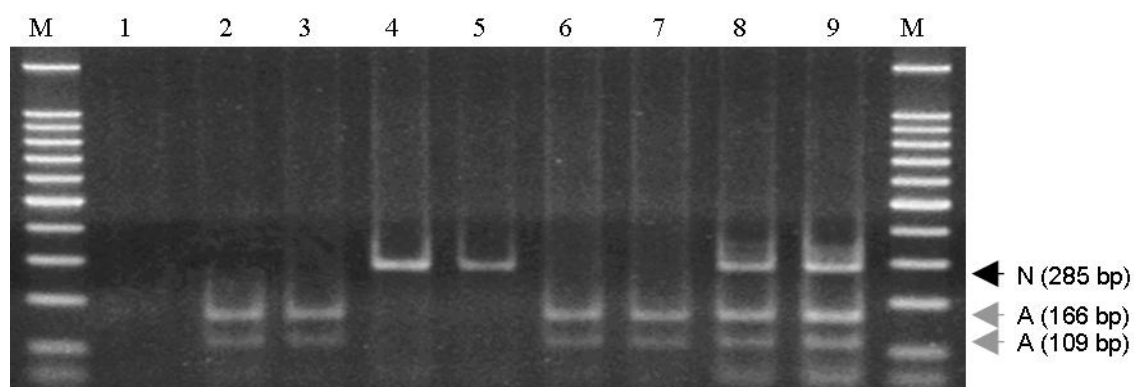


Figura 6.

5.5 Marcadores Funcionales o de Expresión

En la actualidad, las tecnologías de marcadores moleculares en plantas superiores han sufrido un cambio. Así, la mayoría de los marcadores descritos anteriormente derivan del ADN genómico, y por lo tanto pueden pertenecer a regiones transcritas y no transcritas del genoma. Estos marcadores basados en ADN derivado de cualquier región del genoma, han sido descritos como marcadores de ADN al azar (RDMs: *Random DNA Markers*). Sin embargo, durante los últimos años se ha observado una fuerte tendencia hacia el desarrollo de marcadores moleculares derivados de la región transcrita del genoma (genes). Esto ha sido posible gracias a la disponibilidad de un gran número de secuencias de clones de ADNc (ARNm transcrito a ADN empleando transcriptasa reversa, también conocidos como *Expressed Sequence Tags* o ESTs), en bases de datos públicas (TIGR, NCBI; EBI, etc., ver Parte I, Capítulo 12, Análisis informático de secuencias moleculares).

Los tipos de marcadores desarrollados a partir de la región expresada del genoma son numerosos, complejos y variados. Sólo se describirán en detalle aquellos marcadores más relevantes y que no fueron enunciados anteriormente, recomendándose la lectura de la revisión de Gupta y Rustgi (2004) para información adicional.

5.5.1 Marcadores COS (*Conserved Orthologue Set*)

Los marcadores COS representan genes funcionales conservados en un amplio rango de plantas dicotiledóneas. Inicialmente, estos marcadores fueron desarrollados a partir de la comparación de la secuencia genómica de *Arabidopsis* con la base de datos de ESTs de tomate. Se postula que estos marcadores podrán ser aplicados en el mapeo comparativo entre genomas emparentados y, por lo tanto, serán útiles para estudios taxonómicos y en la deducción de las relaciones filogenéticas.

5.5.2 Marcadores GTMs (*Gene Targeted Markers*)

Los GTMs se basan en polimorfismos dentro de genes, independientemente de si se conocen o no sus funciones. Estos marcadores se pueden desarrollar a partir de secuencias disponibles en las bases de datos (cDNA/EST/secuencias genómicas que representan genes) o a partir de genotecas de ADN genómico enriquecidas para secuencias de genes. Un ejemplo de GTMs son los Análogos a Genes de Resistencia (*Resistance Gene Analogs*, RGAs) que son marcadores basados en secuencias derivadas de genes de resistencia a patógenos. Las secuencias RGAs son útiles para la identificación de nuevos genes de resistencia a patógenos en plantas.

5.5.3 Marcadores Funcionales propiamente dichos (FM: *Functional Markers*)

El desarrollo reciente de varios proyectos de genómica estructural y funcional en especies cultivadas, ha generado un enorme caudal de información a nivel de secuencias y esto ha posibilitado el desarrollo de un nuevo tipo de marcadores denominados marcadores funcionales (FM). Estos marcadores derivan de motivos polimórficos (mutaciones) dentro de los genes, y estos polimorfismos afectan directamente la expresión fenotípica del carácter asociado al gen (Andersen y Lübberstedt 2003). Los FM reciben también el nombre de marcadores diagnósticos, marcadores de genes blanco o marcadores perfectos (*perfect markers*).

El desarrollo de FM requiere de secuencias alélicas de genes caracterizados funcionalmente, a partir de los cuales puedan identificarse motivos polimórficos funcionalmente responsables de afectar el fenotipo de la planta.

El primer paso en el desarrollo de FM es disponer de la secuencia de un gen con una función asignada. En *Arabidopsis*, menos del 10% de sus aproximadamente 25.000 genes han sido caracterizados funcionalmente. En otras especies, el número de secuencias caracterizadas funcionalmente es sustancialmente menor. Sin embargo, considerando la identidad de secuencias es posible asignar funciones putativas (probables) a un 30-50% de las secuencias expresadas (ESTs) en otras especies. Esta estrategia de considerar genes candidatos y las relaciones sinténicas (similitud) entre genomas

de plantas ha sido explotada exitosamente para identificar genes agrónomicamente importantes.

El segundo paso en el desarrollo de FM es la búsqueda de secuencias polimórficas o alelos del gen en cuestión. Para ello se deben analizar las secuencias del gen en más de un genotipo por especie. Las estrategias de desarrollo de marcadores funcionales varían desde la detección de polimorfismos de un solo nucleótido (SNPs), el descubrimiento en regiones génicas de secuencias tipo microsatélites (SSRs), la identificación de sitios de restricción que diferencien alelos (CAPs), la detección de inserciones y/o deleciones (InDels), las variaciones a nivel de secuencias que se pueden revelar empleando la metodología de conformación de ADN simple cadena en electroforesis parcialmente desnaturalizantes (SSCP), etc.

Posteriormente, se debe probar la existencia de variación fenotípica asociada al alelo en cuestión. Esto puede realizarse indirectamente, por estudios de asociación en poblaciones segregantes, o directamente, mediante la comparación de genotipos isogénicos generados por mutagénesis específica en la secuencia del gen mediante TILLING, *Targeting-Induced Local Lesions In Genomes* (McCallum et al., 2003), etc.

En varias aplicaciones, la gran ventaja que presentan los FM es su ligamiento completo con motivos (mutaciones) funcionales. En contraste con los marcadores tradicionales (distribuidos al azar en el genoma), los FM permiten: i) la aplicación confiable de marcadores en poblaciones sin necesidad de mapeo previo; ii) el uso de marcadores en poblaciones segregantes sin el riesgo de perder información debido a la recombinación; iii) una mejor representación de la variación genética en poblaciones naturales o de mejoramiento.

En general, los FM son útiles para: i) la fijación más eficiente de alelos en cualquier población segregante; ii) el análisis de alelos tanto en poblaciones naturales como de mejoramiento; iii) la combinación de alelos de FM que afectan idénticos o diferentes caracteres en mejoramiento de plantas; iv) la construcción de haplotipos de FM ligados.

En la actualidad se encuentran disponibles varios genes con potencial para el desarrollo

de FM sobre caracteres de importancia agrónómica, por ejemplo, altura de planta en cereales; tiempo de floración en maíz, requerimientos de vernalización en *Brassica* y trigo, tamaño de fruto en tomate, calidad de alimento en arroz; resistencia a enfermedades y respuesta a stress en varias especies, etc. Sin embargo, aún en especies modelo, sólo el 10% de los genes han sido caracterizados funcionalmente mientras que para especies no modelo, este número es probablemente menor al 5%.

Los FM derivan de estudios de asociación realizados en grandes colecciones de genotipos o de la comparación de líneas isogénicas, las cuales tienen un costo alto para su desarrollo, limitando el estudio inicial a uno o unos pocos fondos genéticos. Luego estos FM deben ser evaluados en otros fondos genéticos, con lo cual, para todo esto es necesario desarrollar un marco experimental, estadístico y bioinformático para la acumulación de datos y las evaluaciones a lo largo de diferentes estudios.

Teniendo en cuenta estos factores y el laborioso desarrollo de los FM, la generación de FM debería concentrarse en genes que confieran una variación fenotípica sustancial. Así, la selección de “genes claves” para caracteres de interés agrónómico será crucial y el paso limitante para el desarrollo de FM útiles.

5.5.4 Arreglos de ADN para estudios de expresión de genes

Los arreglos de ADN (*arrays*) permiten, entre otras cosas, analizar sistemáticamente el patrón de expresión génica de un organismo en escala genómica. De este modo, es posible examinar la expresión simultánea de cientos a miles de genes en varios estadios del desarrollo, en respuesta a diferentes condiciones ambientales y en tejidos específicos.

Los arreglos de ADN son soportes sólidos, comúnmente vidrio o *nylon*, en los cuales están fijadas de forma ordenada gran cantidad de secuencias de ADN de interés (marcadores). Estas secuencias pueden ser genes completos o parciales. El empleo de estos arreglos como herramienta para el estudio de expresión de genes a escala genómica sigue típicamente los siguientes pasos: i) la construcción del arreglo de ADN; ii) la preparación de sondas

(a partir de ARNm de las distintas situaciones a comparar); iii) la hibridización del arreglo; iv) la detección de la señal y análisis de los datos por herramientas computacionales apropiadas.

Existen diferentes sistemas de arreglos de ADN, dependiendo de la fuente de ADN de interés, naturaleza del soporte sólido y el sistema de detección de la hibridización. El sistema más simple es el que requiere menos inversión, comúnmente se lo llama macroarreglo (*macroarray*) y emplea una membrana de *nylon* como soporte en combinación con sondas radiactivas. El sistema más sofisticado utiliza láminas de vidrio y sondas fluorescentes y se lo llama microarreglo (*microarray*). Asimismo, en los macroarreglos se depositan centenas de secuencias de ADN mientras que en los microarreglos la densidad de secuencias es al menos un orden de magnitud mayor. Es importante destacar la existencia de distintos términos empleados para describir estos arreglos, de modo que *glass array*, *chips* de ADN y *biochips* son denominaciones usadas para los microarreglos sobre placas de vidrio, en cuanto que *nylon array* y *high density membranes* son para los macroarreglos sobre *nylon*.

En el área vegetal, la utilización de arreglos de ADN para el análisis de la expresión génica aumentó significativamente de la mano de los proyectos de secuenciación completa del genoma de *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa* (arroz) (para mas detalles ver Rensink y Buell, 2005).

Además de la contribución para el entendimiento de la expresión génica a gran escala, se vislumbra la posibilidad de emplear la técnica de arreglos de ADN en mejoramiento asistido por marcadores, *fingerprinting*, selección

de accesiones de germoplasma, desarrollo de plantas tolerantes a diferentes tipos de estrés, etc. Asimismo, la identificación de genes expresados diferencialmente, en especial aquellos cuya expresión no es abundante o están involucrados en cascadas de transducción de señales, ampliará enormemente los horizontes una vez que esos genes puedan ser empleados como marcadores para selección asistida (Galbraith, 2006).

5.6 Marcadores SNPs (Single Nucleotide Polymorphisms)

Si bien, son una clase particular de marcadores moleculares que podrían ser incluidos dentro del punto 5.4, se los decidió tratar aparte dado que los SNPs pueden derivar tanto de secuencias genómicas codificantes (que se expresan) como no codificantes.

Recientemente, de la mano de los proyectos de secuenciación de genomas enteros de plantas, una nueva clase de marcadores moleculares denominados SNPs (polimorfismo de un nucleótido), está siendo utilizada en distintos estudios genéticos. Estos marcadores se basan en la detección de polimorfismos resultantes de la alteración de una única base en una secuencia de ADN. En la figura 7 se muestran secuencias de ADN ejemplificando algunas variaciones de punto, las cuales se definen como SNPs. Algunos autores consideran SNPs sólo cuando ocurre una sustitución de base, otros consideran también la inserción/delección de una base (InDel).

Los SNPs pasaron a tener mayor importancia a partir de la secuenciación del genoma humano, al descubrirse que el 90% de polimorfismo encontrado en el genoma eran SNPs.

```
CACTTATTCAATATTAATTATGATAATGAAATAAAGGTTAAGGTGGATGGAAC
CACTTATTCAATATTAGTTATGATAATGAAATAAAGGTTAAGGTGGATGGAAC

ATGTATATGTATATGTATATGTATATGTATATGTATATGTATATCTCATCAATCAAAACCT
ATGTATATGTATATGTATATGTATATGTATA-----CTCATCAATCAAAACCT
```

Figura 7.

Recientemente en el área vegetal, la secuenciación a gran escala de genomas completos y de secuencias expresadas (ESTs), ha permitido evidenciar la presencia de SNPs en especies como *Arabidopsis thaliana*, melón, soja, girasol, arroz, maíz, cebada, trigo, y caña de azúcar entre otras.

Los marcadores genéticos SNP poseen naturaleza bialélica y son muy abundantes en el genoma, siendo la frecuencia de SNPs de 1 cada 100-300 pb para los genomas de plantas. Los SNPs pueden localizarse en regiones codificantes, regulatorias y no codificantes. Cuando están presentes en regiones codificantes, muestran 100% de asociación con el carácter de interés, por lo que son muy útiles en MAS (*marker assisted selection* o selección asistida por marcadores) y en el aislamiento de genes.

Debido a su frecuencia de distribución, los SNPs surgen como importantes marcadores para la obtención de mapas genéticos de alta resolución. Estudios llevados a cabo utilizando *Arabidopsis* como organismo modelo, han demostrado que estos marcadores posibilitan la obtención de mapas de una resolución cerca de 100 veces superior a la obtenida con los marcadores convencionales.

Los SNPs son estables desde el punto de vista evolutivo, lo que facilita su empleo en estudios de poblaciones. Otra característica importante es que la genotipificación de los SNPs no está basada en la medida del tamaño de los alelos como ocurre con los otros marcadores moleculares, y la distinción de los alelos puede ser automatizada. Por lo tanto, los SNPs, por tener una tasa de mutación relativamente baja, ser mucho más frecuentes en el genoma y ser detectables en forma automatizada, surgen como importantes marcadores genotípicos.

En tiempos recientes se han desarrollado varias metodologías para detectar SNPs que utilizan diferentes estrategias para comparar regiones específicas del ADN obtenidas de varios individuos. La elección de uno de los métodos dependerá de muchos factores: costos, potencial para el procesamiento de los datos generados, los equipamientos necesarios y la dificultad de los ensayos.

Inicialmente, los abordajes para la detección de SNPs consistían en amplificar y secuenciar

fragmentos genómicos equivalentes de regiones génicas específicas del ADN de varios individuos y comparar sus secuencias buscando SNPs. La adopción de esa estrategia involucra el diseño de iniciadores para amplificar segmentos de ADN de entre 400 a 700 pb, derivados frecuentemente de genes de interés o provenientes de ESTs. Para la amplificación se emplean ADNs de varios individuos, preferencialmente representativos de la diversidad de la población de interés. Estos productos de amplificación resultantes se secuencian directamente y las secuencias resultantes se alinean, empleando programas bioinformáticos apropiados para la identificación de polimorfismos (SNPs).

Actualmente, la secuenciación a gran escala del genoma de varios organismos permite la identificación de SNPs mediante la comparación de millares de secuencias depositadas en las bases de datos, incluyendo clones genómicos y, principalmente, secuencias de ADNc y/o ESTs.

Independientemente del método utilizado para identificar los SNPs es indiscutible la contribución de la bioinformática en dicho proceso. Por otra parte, la necesidad de la validación experimental de los datos es indispensable. Actualmente, están disponibles distintos métodos de validación y genotipado (detección), uno de ellos son los chips de ADN o microarreglos de ADN. Como se dijo anteriormente, estos chips consisten en arreglos de oligonucleótidos de secuencia conocida depositados sobre un soporte sólido. Para el caso de la detección de SNPs, los oligonucleótidos difieren entre sí en sitios específicos en nucleótidos individuales (en el sitio del SNP). La técnica es apropiada para analizar varios SNPs en paralelo a partir de cada muestra (en forma multiplex). En una columna del arreglo cuatro oligonucleótidos diferirán solamente en el sitio del SNP (tendrá cada uno, una de las cuatro bases en la posición del SNP). Cuando este arreglo es hibridado con productos de PCR o fragmentos de ADN genómico obtenidos por nebulización (romper el ADN en fragmentos de un tamaño determinado y al azar), estos se unirán solo a los oligonucleótidos perfectamente complementarios y los productos no perfectamente

complementarios (con *mismatch*) serán lavados. La unión perfecta de cada caso podrá ser tomada por un sistema de detección. Así, en un único microarreglo (chip) es posible analizar miles de SNPs, correspondientes a distintos loci en simultáneo.

Otros métodos de análisis de SNPs incluyen: cromatografía líquida de alta resolución desnaturalizante (DHPLC), espectrometría de masa, ensayos con extensión de iniciadores, PCR en tiempo real, minisequenciación, secuenciación de una única base, digestión por enzimas de restricción (RFLP), CAPS, entre otros. Puede encontrarse una revisión detallada de estos métodos en Kwok (2001), Tsuchihashi y Dracopoli (2002).

En cuanto a las aplicaciones y perspectivas de los marcadores SNPs cabe destacar que han sido fundamentales para el análisis de genes y el descubrimiento de la base genética molecular de importantes características agronómico-industriales. Como por ejemplo en arroz, el descubrimiento de SNPs involucrados en la calidad de cocción, procesamiento y aroma del grano (Larkin y Park, 2003).

La comparación directa de SNPs también ha sido empleada en estudios de genética de poblaciones y filogenia, identificación de variedades, construcción de mapas genéticos y físicos, análisis funcionales, análisis de asociación en mejoramiento genético vegetal etc.

El uso de métodos masivos de análisis, como los arreglos de alta densidad de oligonucleótidos, se están empleando en la actualidad para identificar *Single Feature Polymorphisms* (SFPs, Polimorfismos de Característica Única) como una alternativa atractiva para detectar SNPs y otro tipo de mutaciones entre genotipos. Los SFPs son detectados sobre arreglos de alta densidad de oligonucleótidos (chips) y representan polimorfismos de secuencia de ADN entre dos genotipos dentro de un oligonucleótido individual, el cual se detecta por diferencia en la afinidad de hibridación. El término “característica (*feature*)” refiere a la señal de hibridación dada por una sonda (oligonucleótido) en el arreglo (Zhu y Salmeron, 2007).

El descubrimiento de los SNPs, asociado a la posibilidad de utilizarlos como marcadores, permite a los investigadores explorar nuevas

hipótesis. Se considera que muchos de estos SNPs están localizados en el interior de secuencias génicas, esto puede significar una importante reducción en el tiempo y costos para el descubrimiento de genes de interés, comparado con los marcadores actualmente disponibles. Asimismo, el desarrollo constante de tecnologías para su aplicación permitirá automatizar el mapeo de alta densidad y, consecuentemente, reducir los costos de su empleo en estudios moleculares a gran escala.

5.7 Lecturas recomendadas

- Andersen J.P. & Lübberstedt T. 2003. Functional markers in plants. *Trends Pl. Sc.* 8: 554-560.
- Botstein D., White R.L., Skolnick M. & Davis R. W. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331. 1980.
- Branlard G., Dardevet M., Saccomano R., Lagoutte F. & Gourdon J. 2001. Genetic diversity of wheat storage proteins and bread wheat quality. *Euphytica* 119: 59-67.
- Caetano-Anollés, G., Bassam, B.J. & Gresshoff, P.M. 1991. DNA amplification fingerprinting using very short arbitrary oligonucleotide primers. *Bio/Technology* 9: 553-557. Se puede borrar
- Galbraith D.W. 2006. DNA Microarray Analysis in Higher Plants. *OMICS: A Journal of Integrative Biology.* 10(4): 455-473.
- Gupta P.K. & Rustgi S. 2004. Molecular markers from the transcribed/expressed region of the genome in higher plants. *Funct Integr Genomics* 4:139-162.
- Konieczny A., & F. Ausubel. 1993. A procedure for mapping Arabidopsis mutations using co-dominant ecotype-specific PCR based markers. *Plant J.* 4:403-410.
- Kwok P-Y. 2001. Methods for genotyping Single Nucleotide Polymorphisms. *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2: 235-258.
- Larkin P.D. & Park W.D. 2003. Association of waxy gene single nucleotide polymorphism with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol Breed* 12:335-339.
- Litt M. & Luty J.A. 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am. J. Hum. Genet.* 44:398-401. 1989.
- McCallum C.M., Comai L., Greene E.A. & Henikoff S. 2003. Targeting induced local lesions in genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 123:439-442.

- Olson M., Hood L., Cantor C. & Dotstein D. 1989. A common language for physical mapping of the human genome. *Science* 245:1434-1435.
- Paran I. & Michelmore R.W. 1993. Development of reliable PCR based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. *Theor. Appl. Genet.* 85:985-993.
- Rensink W.A. & Buell C.R. 2005. Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends Pl. Sc.* 10(12): 603-609.
- Steinmetz L.M. 2000. Combining genome sequences and new technologies for dissecting the genetics of complex genotypes. *Trends Pl. Sc.* 5(9): 397-401.
- Tsuchihashi Z. & Dracopoli N.C. 2002. Progress in high throughput SNP genotyping methods. *Pharmacogenomics* 2: 103-110.
- Vos P., Hogers M., Bleeker M., Rijans M., Van de Lee T., Hornes M., Frijters A., Pot J., Peleman J., Kuiper M. & Zabeau M. 1995. AFLP: A new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Welsh J. & McClelland M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- Williams J.G., Kubelik A.R., Livak K.J., Rafalski L.A. & Tingey S.D. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Zhu T. & Salmeron J. 2007. High-definition genome profiling for genetic marker discovery. *Trends Pl. Sc.* 12(5): 196-202.

I CAPITULO 6

Construcción de mapas de ligamiento genético, localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres de interés en plantas

Gerardo D L Cervigni,
Juan Pablo A Ortiz, Sergio E Feingold

1. Introducción

La posibilidad de construir mapas de ligamiento genético en especies vegetales o animales es una de las contribuciones de mayor impacto de las técnicas de marcadores moleculares en las ciencias biológicas. Los marcadores moleculares utilizados pueden corresponder a regiones intergénicas no codificantes o a segmentos génicos, en cuyo caso son denominados *funcionales* y constituyen marcadores “ideales” a los efectos de selección de genotipos. Un mapa genético establece de manera probabilística el arreglo lineal de un grupo marcadores (o genes) sobre el genoma de una especie. Si bien el concepto data de principios de siglo XX, a partir de los trabajos de Morgan y Bridges con mutantes de *Drosophila*, recién a partir del advenimiento de los marcadores moleculares fue técnicamente posible construir mapas genéticos saturados en la mayoría de las especies vegetales de interés agronómico. Usando este tipo de mapas es posible identificar la posición y el efecto de genes sobre caracteres de importancia mediante asociaciones estadísticas entre los valores fenotípicos y las variantes alélicas de los marcadores. La disponibilidad de mapas genéticos permite también la selección indirecta de genotipos deseables, comúnmente denominada *MAS* (del inglés *Marker Assisted Selection*), mediante el seguimiento de marcadores localizados en regiones genómicas determinadas. La utilización de marcadores comunes permite comparar la estructura del genoma de diferentes especies (*comparative mapping*) e identificar rearrreglos cromosómicos a pequeña y gran escala (micro y macro *sintenia*) para estudios de filogenia y evolución molecular. Por otro lado, el desarro-

llo de mapas genéticos altamente saturados permite el clonado posicional de genes.

2. Introducción a la construcción de mapas genéticos en vegetales

Para comprender mejor las bases teóricas y metodológicas empleadas en el mapeo genético es necesario recordar algunos conceptos básicos de genética Mendeliana. Gregor Mendel realizó sus experimentos en *Pisum sativum* (arveja cultivada) efectuando cruza- mientos controlados entre individuos que se diferenciaban en determinadas características (como por ejemplo el color de la flor, tipo de tegumento de las semillas y largo de los tallos), y estudió la forma en que estos caracteres se transmitían a la descendencia. A partir de datos experimentales formuló una hipótesis simple para explicarlos y posteriormente diseñó expe- rimentos para contrastarla. Sus trabajos permiti- eron inferir la existencia de “factores” heredi- tarios y sus mecanismos de transmisión antes de conocer la existencia del ADN como mate- rial de transmisión genético. En base a sus da- tos experimentales Mendel formuló su prime- ra ley, o ley de la segregación. Ella establece que los miembros de un par génico (alelos) se segregan (se separan) uno de otro durante la formación de las gametas. Como consecuen- cia, la mitad de las mismas portan un alelo y la otra mitad el otro. La progenie es luego for- mada por la combinación al azar de las game- tas de ambos progenitores. La segunda ley de Mendel, o ley de la segregación independiente, indica que la segregación de los alelos de un gen es independiente de la segregación de los alelos de otro gen. Estas dos leyes fueron los puntos de partida sobre los cuales se elaboró toda la teoría de herencia que hoy conocemos. Incluso aún en el presente, los análisis de las frecuencias en que aparecen los caracteres en las progenies de cruzamientos controlados son una parte fundamental de los análisis ge- néticos. Los caracteres genéticos pueden estar controlados por uno o pocos genes, o poseer un control complejo que involucra muchos ge- nes, denominados *loci* de caracteres cuantitati- vos o *QTLs* (del inglés *Quantitative Traits Loci*), a menudo afectados por el ambiente. La dis- ponibilidad de un gran número de marcadores

(*loci*) polimórficos, no afectados por el medio ambiente, neutros, sin efectos deletéreos y cuya herencia puede determinarse con relativa facilidad, simplificó enormemente los análisis genéticos en especies vegetales y animales. La construcción de un mapa de ligamiento genético es esencialmente una representación gráfica lineal del orden más probable de marcadores moleculares o genes a partir de los valores de recombinación observados entre ellos. Cada arreglo lineal es denominado “grupo de ligamiento”. En teoría un mapa saturado debe contener el mismo número de grupos de ligamiento que número básico de cromosomas.

En este Capítulo se desarrollarán los conceptos básicos del mapeo genético en vegetales y algunas de sus aplicaciones. De ninguna manera se pretende abordar el tema en toda su extensión debido a que la misma supera largamente los objetivos de este libro. Aquellos lectores que deseen ampliar y profundizar los temas que aquí se desarrollan pueden consultar los textos que se citan en la lista de referencias bibliográficas al final del Capítulo.

Los pasos fundamentales a seguir en la construcción de un mapa genético de una determinada especie o el mapeo específico de un gen (*locus*) de interés pueden resumirse en: **1)** selección de progenitores y desarrollo de una población segregante (población de mapeo), **2)** generación de un número suficiente de marcadores y registro de los mismos en cada uno de los individuos de la población (*genotipado*), **3)** determinación de las frecuencias de recombinación entre marcadores y determinación de grupos de ligamiento y **4)** determinación del orden de los marcadores y conversión de la frecuencia de recombinación (*r*) en unidades de mapeo o centiMorgan (cM).

2.1. Poblaciones de mapeo

El primer paso en todo proyecto de mapeo es el desarrollo de una población segregante para una o más características de interés. La selección de los progenitores es un punto importante debido a que no sólo deben ser contrastante para la característica en estudio, sino que además deben presentar diferencias a nivel de secuencias del ADN y así obtener suficientes marcadores polimórficos que per-

mitan la construcción del mapa genético. En ausencia de polimorfismos genéticos los análisis de segregación y ligamiento son impracticables. En general los cruzamientos entre especies alógamas presentan mayor grado de polimorfismo que entre autógamas. La falta de polimorfismos es común en poblaciones derivadas de cruzamientos entre progenitores de base genética estrecha, como los realizados entre distintos cultivares de la misma especie o entre individuos de especies silvestres derivados de la misma población natural. En teoría es posible desarrollar varios tipos de poblaciones segregantes y la decisión de cual utilizar depende de la resolución que se desee alcanzar con el mapa y la posibilidad y/o facilidad de desarrollarla. En la Figura 1 se muestra un esquema del desarrollo de 5 poblaciones básicas de mapeo. Las poblaciones de tipo retrocruza (*backcross* o BC_1) y F_2 son generalmente adecuadas y fáciles de generar en la mayoría de las especies cultivadas como: trigo, maíz y soja. Las poblaciones F_2 proveen mayor información genética que las retrocruzas para el mismo número de individuos debido a que pueden evaluarse dos cromosomas recombinantes por planta. En especies autoincompatibles y altamente heterocigotas las poblaciones F_1 también son segregantes y pueden emplearse para mapeo. Estos 3 tipos de familias son efímeras, es decir, que cada individuo segre-

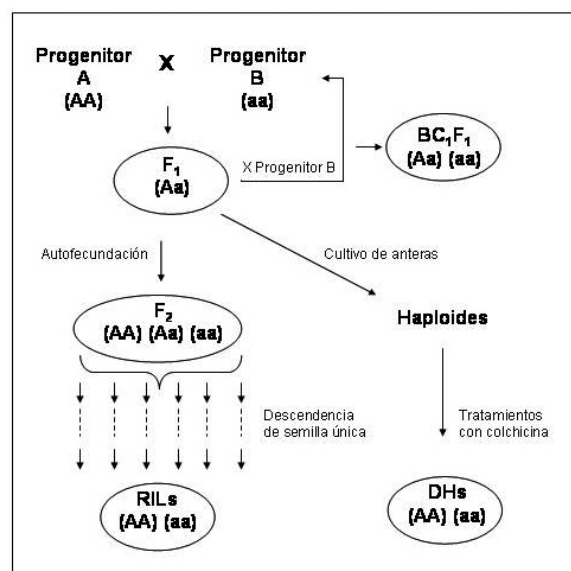


Figura 1.

gará las combinaciones génicas que porta en la siguiente generación. Si no es posible mantenerlas clonalmente como por ejemplo a partir de órganos vegetativos o por cultivo *in vitro*, la información obtenida en ellas debe ser transferida a una nueva población utilizando algunos de los marcadores que fueron previamente localizados (mapeados) de manera de conservar puntos de referencia entre ambas.

En el caso de requerirse múltiples ensayos, (repeticiones intra experimento, ensayos en distintas localidades o en varios años), es necesario desarrollar poblaciones de mapeo inmortales como las Líneas Endocriadas Recombinantes (RILs por *Recombinant Inbred Lines*) o poblaciones de Haploides Duplicados (DHs). Ambas poblaciones se componen de un conjunto de líneas homocigotas que pueden ser replicadas por semillas varias veces y por varios ciclos de cultivo. Estas características las hacen especialmente adecuadas para mapear QTLs. Las RILs son generadas a partir de una población F_2 por descendencia de semilla única de un número determinado de individuos durante cinco o más generaciones. Finalmente, cada línea representará los diferentes bloques de ligamiento presentes en un individuo F_2 de la población original, pero en estado homocigota. Una vez estabilizadas, las RILs pueden ser mantenidas y multiplicadas por semillas año tras año. Una de las desventajas de este método es que algunas regiones del genoma pueden seguir en el estado heterocigota a pesar de las múltiples autofecundaciones. Por otro lado, no es posible desarrollarlas en especies autoincompatibles. Las poblaciones DH se generan a partir del cultivo de tejidos de anteras de individuos F_1 . En algunas especies es posible regenerar plantas enteras a partir de microgametofitos haploides (grano de polen en el estado uninucleado). Si la planta dadora es una F_1 , sus granos de polen portarán las gametas derivadas de la meiosis con diferentes combinaciones alélicas. Posteriormente, por tratamientos de duplicación cromosómica con colchicina, las plantas haploides obtenidas pueden diploidizarse llevando todos los *loci* al estado homocigota. Como resultado se obtiene una serie de líneas que representan las combinaciones génicas presentes en las gametas

de la F_1 . La desventaja de este método es que es necesario disponer de un protocolo eficiente para la regeneración de plantas *in vitro* a partir del cultivo de anteras y la posterior duplicación cromosómica.

Una vez establecido el tipo de población a utilizar, el número de individuos es también un punto importante debido a que la resolución del mapa y el ordenamiento de los marcadores en los grupos de ligamiento dependen de éste. En general, poblaciones de 60 a 100 individuos son adecuadas para trabajos de tipo académico, como la localización de un determinado *locus* en el genoma o el mapeo de un carácter cualitativo. Sin embargo, para proyectos de mapeo de QTLs o la construcción de mapas de alta resolución son necesarias poblaciones de 500 a 1000 individuos.

2.2. Registro de marcadores moleculares y clasificación de la población

Los marcadores moleculares útiles para mapeo deben existir en 2 o más formas alélicas distinguibles, de manera que los genotipos de cada individuo puedan ser claramente identificados. Los mismo pueden ser de tipo dominante (presencia o ausencia de una banda como en RAPD y AFLP) por lo cual no es posible distinguir entre el genotipo homocigota (AA) del heterocigota (Aa) o co-dominantes (todos los alelos pueden identificarse, por ej., usando SSR y RFLP), donde los 3 genotipos de un mismo *locus* dialélico pueden ser discriminados (AA, Aa y aa). Como criterio general una vez que se dispone de entre 100-200 marcadores en una determinada población es posible identificar grupos de ligamiento, regiones genómicas específicas y mapear genes o QTLs. Asimismo, prácticamente cualquier nuevo marcador que se agregue puede integrarse a los preexistentes. El genotipo de cada individuo de la población, para cada uno de los marcadores debe ser determinado (genotipado). En general se toman como marcadores informativos aquellos que muestran relaciones de segregación, por presencia/ausencia, que se ajusten a las frecuencias esperadas considerando el tipo de población y marcador molecular utilizado (por ej.: 1 Aa: 1 aa en una retrocruza o 3 A_: 1aa en una F_2), por medio de la prueba del ji-cuadrado (X^2).

2.3. Estimación de las frecuencias de recombinación y detección de grupos de ligamiento

2.3.1. Concepto de ligamiento

Dos *loci* que se encuentran muy cercanos en el mismo cromosoma no segregan independientemente durante la meiosis. Esta relación se denomina ligamiento genético y explica la aparición de una proporción mayor de individuos portando combinaciones alélicas parentales que lo esperado según la Segunda Ley de Mendel. Los genes ligados pueden ser separados por un intercambio físico de partes de cromosomas (cromátidas hermanas) durante la meiosis por el proceso de entrecruzamiento o “*crossing-over*” (CO), el cual genera gametas recombinantes, distintas de las parentales (Figura 2).

para que el número de plantas recombinantes sea igual al de no recombinantes, se dice que los mismos segregan independientemente. Por otro lado, si el número de plantas recombinantes es menor al esperado (50%) se considera que ambos *loci* están ligados genéticamente. De esta manera, determinando la frecuencia de aparición de individuos con combinaciones alélicas recombinantes es posible realizar una medida relativa de la distancia entre ellos. **2.3.2**

Detección del ligamiento

El primer paso en el estudio del ligamiento entre 2 *loci* (por ej., A y B) consiste en determinar si los mismos segregan individualmente de acuerdo al modelo esperado (1:1, 3:1, 1:2:1, etc.), y posteriormente, si lo hacen en forma independientemente o no. En ambos casos la prueba estadística adecuada es el χ^2

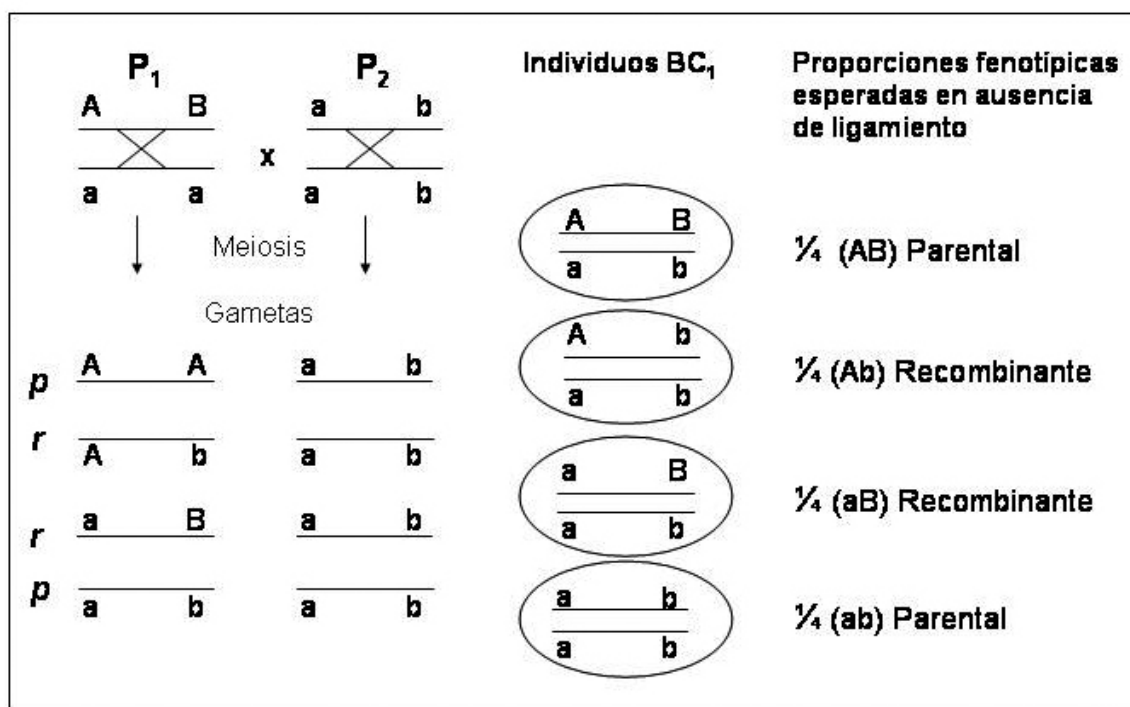


Figura 2.

Existe una relación entre la distancia física a la que se encuentran 2 *loci* y la probabilidad de que se produzca un CO entre ellos. Cuanto más alejados estén uno del otro mayor será la probabilidad de que ocurra un entrecruzamiento y se generen gametas recombinantes. Consecuentemente, si dos *loci* están lo suficientemente separados en el cromosoma como

considerando un nivel de significancia predeterminado ($p \geq 0,05$ o $0,01$), aunque también es posible utilizar el *LOD score* (ver punto 2.4). Si la probabilidad asociada al χ^2 obtenido para cada *locus* en forma individual es superior a la predeterminada, se considera que ambos marcadores segregan de acuerdo a lo esperado. En el segundo paso, el número de progenies

observadas en cada clase genotípica se contrasta con los valores esperados para una segregación independiente (Tabla 1).

Tabla 1: Segregaciones esperadas para 2 loci independientes en distintas poblaciones de mapeo.

Tipo de población	Marcador dominante	Marcador co-dominante
BC ₁	1:1:1:1	1:1:1:1
F ₂	9:3:3:1	1:2:1:2:4:2:1:2:1
RILs	1:1:1:1	1:1:1:1
DH	1:1:1:1	1:1:1:1

BC₁: población de retrocruzamiento; F₂: población tipo F₂ derivada del cruzamiento entre 2 progenitores heterocigotas; RIL: población de líneas endocriadas recombinantes (RILs por Recombinant Inbred Lines) y DH: población de haploides duplicados.

La hipótesis nula (H₀) es que ambos loci segregan independientemente y la hipótesis alternativa (H_A) es que ambos loci están ligados. Si los desvíos obtenidos entre los valores observados y esperados tienen una probabilidad de ocurrencia menores que 1/20 o 1/100 (p < 0,05-0,01), se considera que los loci A y B no segregan independientemente y por lo tanto se acepta H_A que indica la existencia de ligamiento entre ellos (ver ejemplo Figura 3).

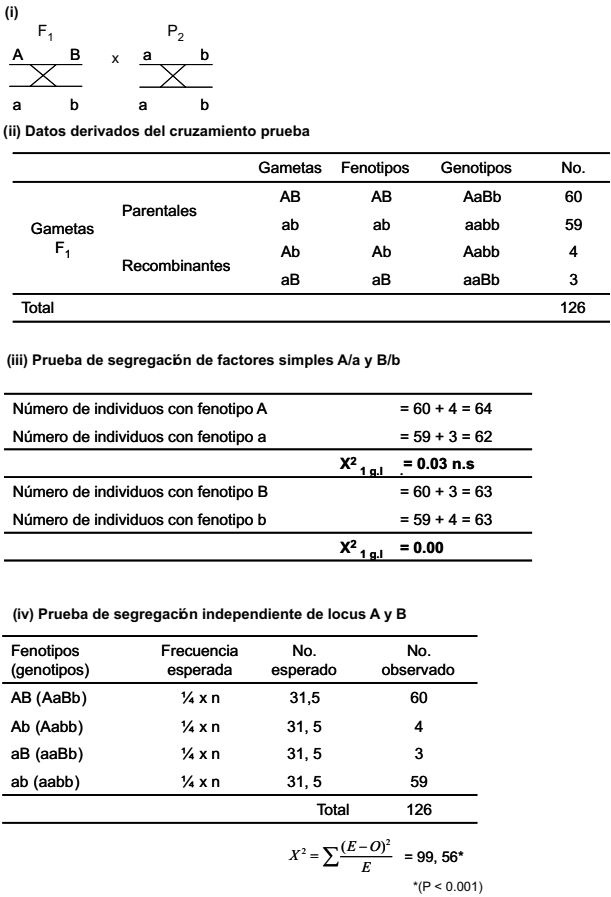
2.3.3. Estimación de la frecuencia de recombinación

Una vez verificada la existencia de ligamiento entre 2 loci es posible estimar la frecuencia de recombinación (r) entre ellos. En el caso más simple de una retrocruza, todas las clases fenotípicas (o genotípicas) pueden ser identificadas (Figura 3). El valor de r expresado en porcentaje se calcula:

$$r(\%) = \frac{\text{número de gametas recombinantes}}{\text{número total de gametas}} \times 100$$

Una estimación de r = 0,01 (1 %) es definida como una unidad de mapeo (u.m), y corresponde a la distancia entre dos loci en la cual

1 producto de cada 100 meiosis es del tipo recombinante. Un ejemplo de los pasos a seguir en la estimación del ligamiento entre dos genes se muestra en la Figura 3.



(v) Cálculo del porcentaje derecombinación (% r)

$$\% r = \frac{\text{número de gametas recombinantes}}{\text{número total de gametas}} = \frac{4 + 3}{126} = 0,0555 \text{ o } 5,55 \%$$

Figura 3.

En este caso la frecuencia de recombinación entre A y B es de 5,55 %. Como la frecuencia de recombinación es una proporción, su variancia (derivada de la distribución binomial) está dada por la expresión: R (1-R)/N, donde R es la frecuencia de recombinación y N es el número total de los individuos de la población. Por lo tanto, un valor de r = 5,55 % (como el de nuestro ejemplo), posee el siguiente error estándar:

$$\sqrt{[0,055 \times (1 - 0,055) / 126]} = 0,020$$

De esta manera es posible establecer el grado de ligamiento entre 2 *loci*. Sin embargo, en algunos tipos de poblaciones como las F_2 , no todas las clases genotípicas pueden ser identificadas fácilmente, especialmente cuando se trabaja con marcadores co-dominantes. Esto es debido a que no es posible diferenciar si los dobles heterocigotas derivan de 1 o 2 gametas recombinantes. Para estos casos se han desarrollado procedimientos alternativos para estimar las distancias genéticas. El método de máxima probabilidad (*maximum likelihood method*) es el más utilizado. Debido a que se trata de un método estadístico de estimación de probabilidades las fórmulas empleadas en los cálculos son generalmente complejas. Allard (1956) desarrolló el método de los *scores* para derivar las fórmulas, estimar las distancias genéticas y calcular las desviaciones estándares para varios tipos de poblaciones. Afortunadamente en el presente se dispone de programas de computación que utilizan estas fórmulas y permiten trabajar con grandes archivos de datos derivados de poblaciones de un gran número de individuos. Entre los más populares se encuentran el Mapmaker (Lander 1987) y el JoinMap (Stam et al. 1993).

2.3.4. Ordenamiento de los marcadores y conversión de frecuencias a unidades de mapeo

Cuando se estudia el ligamiento simultáneo entre 3 o más marcadores (por ej. A, B y C), se puede establecer un orden en base a las distancias relativas entre ellos (mapeo de 3 puntos). Suponiendo que el orden sea ABC, la distancia estimada en la prueba de 2 puntos entre A y C será aproximadamente igual a la suma de la distancia entre A-B + B-C. Sin embargo, frecuentemente la distancia entre A y C (medida como prueba de dos puntos) suele ser menor a la de A-B + B-C. Esto se debe a la presencia de entrecruzamientos dobles entre A y C cuyo resultado final es la formación de gametos parentales AC y ac que se computan como "no recombinantes", cuando en realidad sí lo son. Si no hubiéramos mapeado el gen

B nunca hubiéramos detectado estos dobles entrecruzamientos. Extendiendo este razonamiento, en realidad tampoco sabemos si entre A-B hubo entrecruzamientos dobles y, por lo tanto, haber subestimado la proporción de recombinantes entre ellos. Cuanto más grande es la distancia entre 2 marcadores, más inexacta será la medida de la distancia. Asimismo, otro hecho que debe considerarse es el fenómeno de interferencia (I). La interferencia se relaciona con la imposibilidad física de que adyacente a un punto de entrecruzamiento se produzca otro en la misma meiosis debido a un impedimento físico entre ellos (se "interfieren"). Estas características hacen que las frecuencias de recombinación no sean magnitudes aditivas para grandes segmentos cromosómicos. Para solucionar esto, los valores de *r* se convierten en unidades de mapeo (centMorgan – cM) mediante la aplicación de las funciones de mapeo. Las ecuaciones para convertir *r* en cM derivan de funciones de distribución y son fundamentalmente dos, la función de Haldane (1919) y la de Kosambi (1944). La diferencia básica entre ellas es el supuesto que asumen con respecto a la interferencia en la ocurrencia de dobles CO. La función de Haldane considera interferencia nula ($I=0$) mientras que la función de Kosambi estima el valor de *I*. Estos valores generalmente se encuentran entre 0 y 1 (interferencia completa). El valor real de interferencia se ubicará entonces en algún lugar en medio de ambos valores. Los valores de cM estimados con ambas funciones son equivalentes cuando se consideran valores de *r* de hasta 10 %, para valores mayores la transformación de Kosambi es más exacta.

2.4. Programas de mapeo

La utilización de programas de mapeo como el Mapmaker 3.0 (Lander et al. 1987; <http://www.nslj-genetics.org/soft/mapmaker>) o JoinMap 1.4 - 4.0 (Stamp 1993; <http://www.kyazma.nl>), permiten el análisis simultáneo de muchos marcadores en poblaciones de gran número de individuos, mediante la utilización de métodos de estimación de parámetros como el de máxima probabilidad o mínimos cuadrados. Estos programas poseen diferentes procedimientos, o rutinas, que permiten la

estimación de r entre pares de marcadores, la identificación de los grupos de ligamiento y la determinación del orden de los marcadores dentro de cada grupo. El programa Mapmaker utiliza el test estadístico LOD score para evaluar el valor de r estimado y la posición más probable de un marcador en el grupo de ligamiento. El LOD score (*logaritmo de los odds*) es el logaritmo en base 10 del cociente entre la probabilidad de obtener los datos observados en caso de que los *loci* considerados estuvieran ligados, sobre la probabilidad de obtener los datos en ausencia de ligamiento. Un LOD = 3 para un par de marcadores indica que es mil veces más probable que los *loci* estén ligados respecto a que no lo estén. El programa Mapmaker también utiliza LOD score para comparar diferentes órdenes posibles entre varios genes. Al orden más probable le asigna un 0 y a los restantes le asigna valores negativos. Por su parte, el programa JoinMap (Stam, 1993) permite trabajar con distintos tipos de poblaciones e inclusive con distintos tipos de segregación dentro de la misma población. Este programa fue especialmente diseñado para estimar datos de ligamiento genético en poblaciones derivadas de especies altamente heterocigotas y/o donde no es posible obtener líneas puras. Otra de sus principales ventajas es que permite “combinar” mapas derivados de distintas poblaciones (o datos bibliográficos) si disponen marcadores en común (Stam 1993). Debido a que las unidades de mapeo genético están basadas en frecuencia de recombinación su significado en cuanto a distancia física (número de nucleótidos) entre dos *loci* varía según la especie considerada, el cromosoma y la localización dentro del mismo. Es conocido que existen regiones de alta frecuencia de recombinación localizadas sobre los brazos cromosomales (comúnmente llamados *hotspots*) y regiones donde la recombinación está fuertemente restringida como por ejemplo cerca de los centrómeros o telómeros. Aunque se corre el riesgo de cometer un error grosero puede considerarse que en promedio 1 cM equivale aproximadamente a 1 Mpb (un millón de pares de bases) en humanos y entre 500 y 750 kpb (mil pares de bases) en plantas superiores (como el arroz y tomate, respectivamente).

3. Mapeo de QTL

Muchas de las características de importancia agronómica presentan una distribución continua de valores, esto es, dentro de una población determinada no existe una clara distinción en clases fenotípicas. La base genética de estas características fue esclarecida poco después del redescubrimiento de las leyes de Mendel, cuando Yule en 1902 propuso que esa variación era la consecuencia de la acción aditiva de muchos genes. Entre éstos se suele identificar a genes de efectos pronunciados, denominados *genes mayores* y genes con pequeños efectos que fueron inicialmente denominados *poligenes*. Sin embargo, la distinción entre *poligenes* y *genes mayores* (también llamados *oligogenes*) no resultó satisfactoria ya que el efecto de un gene depende del entorno genético, el ambiente y del alelo presente en el *locus* del gen. Geldermann (1975) propuso denominar a estos *loci* controladores de características cuantitativas como QTLs (del inglés *Quantitative Traits Loci*). Esta nomenclatura resultó más adecuada ya que no asocia al gen con la magnitud de su efecto.

Si bien la genética cuantitativa ha propuesto y utilizados modelos biométricos con gran éxito a lo largo de la historia del mejoramiento de plantas y animales, estos modelos se basan en la estimación de los efectos génicos y no tanto en el número de genes involucrados. Utilizando marcadores moleculares ligados a los QTLs, es posible estimar el genotipo, los efectos genéticos y tener una aproximación menos sesgada del número de o genes/QTLs determinantes del carácter. Es indispensable que el lector no considere la metodología de marcadores moleculares sustituta de de los modelos genéticos-estadísticos utilizados por la genética cuantitativa, por el contrario, ellos son la base de los estudios de mapeo de genes/QTL utilizando marcadores moleculares.

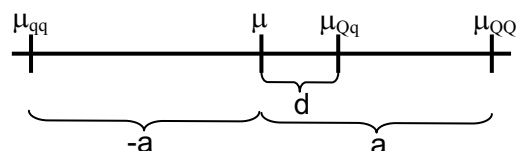
Una de las técnicas de identificación de QTLs es la denominada asociación con marcas simples o marcadores individuales. En este caso, la utilización de un mapa genético no es necesaria, aunque un mapa genético ayuda a la interpretación de los resultados. Las posibilidad de identificar un QTL usando marcadores

moleculares depende de la distancia genética existente entre el marcador y el QTL, y de la magnitud de los efectos genéticos, aditivo (a) y de dominancia (d) (ver más abajo), del propio QTL. La estimación de estos efectos es indirecta pues se realiza con base en el marcador ligado al QTL. Además, la estimación de estos efectos será más o menos exacta dependiendo de la técnica de mapeo utilizada, siendo la más adecuada aquellas técnicas derivadas del *mapeo por intervalo*.

Consideremos M/m el *locus* del marcador molecular y Q/q el *locus* del QTL. Para saber si M y Q están ligados, son necesarias las siguientes etapas:

- obtener una población segregante para ambos *loci* M y Q (población de mapeo),
- medir la característica fenotípica (Y) controlada por el QTL (Q),
- obtener el fenotipo del marcador (M) en cada planta de esta población, y registrarlo en una matriz de datos.

Considerando el caso de un único *locus* (Q/q), en que el alelo Q aumenta el valor de la característica, y haciendo μ_{QQ} , μ_{Qq} y μ_{qq} las medias de los individuos con genotipos QQ , Qq y qq , respectivamente, y $\mu = (\mu_{QQ} + \mu_{qq})/2$ la media entre los genotipos homocigotos, los siguientes efectos genéticos pueden ser obtenidos una población F_2 :



a) efecto aditivo (a) y (d) efecto de la dominancia donde:

$$a = \frac{\mu_{QQ} - \mu_{qq}}{2} \quad d = \mu_{Qq} - \frac{\mu_{QQ} + \mu_{qq}}{2}$$

En una generación F_2 cuyos genotipos marcadores MM , Mm y mm estarán presente en la frecuencia de $1/4$, $1/2$ y $1/4$, respectivamente. En este caso los efectos a , d y d/a son estimados con base en el marcador ligado al QTL, como sigue:

Efecto aditivo

$$a = \frac{\mu_{MM} - \mu_{mm}}{2(1 - 2r)}$$

Efecto de dominancia:

$$d = \frac{\mu_{Mm} - \frac{\mu_{MM} + \mu_{mm}}{2}}{(1 - 2r)^2}$$

Razón d/a (grado medio de dominancia):

$$\frac{d}{a} = \frac{2\mu_{Mm} - \mu_{MM} - \mu_{mm}}{(1 - 2r)(\mu_{MM} - \mu_{mm})}$$

Si el QTL no estuviera ligado al marcador, ($r = 0,5$) las diferencias entre las tres medias no serán estadísticamente significativas. De la misma forma, si a y d fuesen iguales a cero (ausencia de efecto), no se detectarían diferencias estadísticas entre las medias. De esta manera, sólo si $r < 0,5$ es posible detectar asociaciones entre M y Q , dependiendo esta detección del grado de ligamiento o magnitud de r (pequeños valores de r facilitan la detección) y del efecto del alelo Q sobre el carácter.

Formalmente tenemos: $H_0: \mu_{MM} = \mu_{Mm} = \mu_{mm}$; $H_{A1}: \mu_{MM} \neq \mu_{Mm}$; $H_{A2}: \mu_{MM} \neq \mu_{mm}$; $H_{A3}: \mu_{Mm} \neq \mu_{mm}$.

Medias de los genotipos

Valores genotípicos

La asociación Marcador-QTL se confirma si las diferencias entre las medias fenotípicas de grupos de marcadores son estadísticamente diferentes de cero (se rechaza de H_0). Las diferencias pueden ser evaluadas por medio del análisis de la varianza (ANOVA) o prueba t , eligiendo un nivel de significancia de $P \leq 0,05$ como se ejemplifica en la Tabla 2.

En una población F_2 , la asociación entre el marcador y el QTL puede ser valorada a través de la regresión entre los genotipos y su corres-

Tabla 2: ANOVA entre los tratamientos MM, Mm y mm obtenidos de una población F_2

FV	GL	SC	CM	F	P
Tratamiento	2	202791,97	101395,98	54,94	0,0000
Residuo	142	262030,95	1845,28		
Total	144	464822,93			

FV: fuente de variación, GL: grados de libertad, SC: suma de cuadrados, CM: cuadrados medios, F: valor del estadístico F (CM Tratamiento/CM Residuo) y P: probabilidad de rechazar una H_0 verdadera. Cuando $P < 0,05$ indica asociación entre el marcador (M) y el QTL (Q).v

pendiente fenotipo. En este caso, es necesario codificar los tres genotipos (MM, Mm y mm) como 1, 0 y -1 para el modelo aditivo, y 0, 1 y 0 para el modelo dominante.

El modelo de regresión adoptado es:

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 X_{1j} + \beta_2 X_{2j} + \varepsilon_j$$

donde:

Y_i = valor de la característica; X_{1j} = código del marcador para efecto aditivo (MM = 1, Mm = 0, mm = -1); X_{2j} = código del marcador para efecto dominante (MM = 1, Mm = 0, mm = -1); β_0 = intercepto de la regresión (media de la característica); β_1 = inclinación de la recta para el modelo aditivo; β_2 = inclinación de la recta para el modelo dominante y ε_j = error aleatorio para j -ésimo individuo.

Una vez evaluado y confirmado el modelo completo (modelo aditivo + dominante), debe analizarse la importancia relativa de cada uno de los modelos, por ejemplo mediante la metodología de regresión múltiple de eliminación por paso (stepwise).

En poblaciones de retrocruzamiento, sólo el genotipo heterocigoto (Qq) y uno de los homocigotos (QQ o qq) están presentes por lo que el efecto aditivo y dominante quedan confundidos, en este apartado denominados g_1 y g_2 , respectivamente, y estimados como sigue:

$$g_1 = \mu_{MM} - \mu_{Mm} = (a-d)(1-2r)$$

$$g_2 = \mu_{Mm} - \mu_{mm} = (a+d)(1-2r)$$

Observe que:

$$a = g_1 - g_2$$

$$d = g_2 + g_1$$

por lo que para estimar los efectos a y d en una población de retrocruzamiento debe retrocruzarse la F_1 con cada uno de los progenitores. Un problema adicional es que a y d pueden anularse. Si existiera dominancia completa de Q sobre q

($d = a$), $g_1 = 0$ y si existiera dominancia completa de q sobre Q ($d = -a$), $g_2 = 0$.

El análisis de ANOVA y la regresión son técnicas que permiten la identificación de marcadores ligados a QTLs, pero poseen ciertas limitaciones:

- 1) no indican si hay uno o más QTLs asociados al marcador,
- 2) no estiman la posición del QTL y
- 3) el efecto del QTL puede ser subestimado debido a que es confundido con la frecuencia de recombinación.

3.2. Mapeo por intervalos

El mapeo por intervalo (*interval mapping*) fue propuesto originalmente por Lander y Botstein (1989) y es la base de todos los métodos de mapeo de QTL utilizados actualmente. Para conceptualizar esta metodología podemos considerar el cruzamiento entre dos progenitores homocigotos cuya F_1 posee la constitución genética que se ejemplifica en la Figura 4.

A diferencia del mapeo por marcas simples, en el mapeo por intervalo es indispensable poseer un mapa genético ya que la unidad de análisis es el intervalo genético y no un marcador individual. De manera resumida el mapeo por intervalo utiliza la siguiente estrategia: **1)** como la distancia entre cada par de marcadores es conocida, el método estima los parámetros del modelo a incrementos de distancias genéticas predefinidos, **2)** los parámetros del modelo pueden ser estimados mediante la función de verosimilitud o regresión, **3)** la hipótesis H_0 : ausencia de QTL/ H_A : QTL en un intervalo entre marcadores, son contrastadas a través

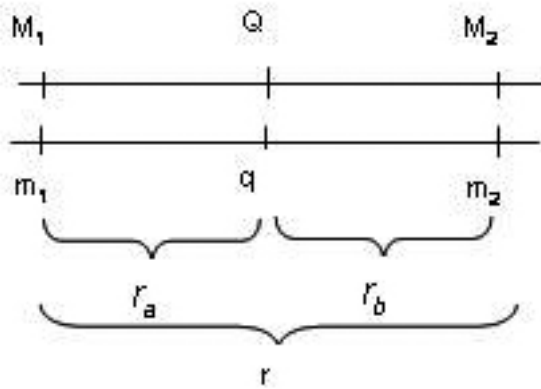


Figura 4.

de la razón de dos verosimilitudes, LR (*LR por Likelihood Ratio*) o LOD score y 4) la presencia de un QTL es inferida cuando el máximo valor de LR o de LOD obtenido es mayor a un umbral previamente establecido (punto 3.4).

Haley y Knott (1992), presentaron un modelo de mapeo por intervalos basados en regresión. El modelo adoptado para poblaciones F₂ es:

$$Y_j = \mu + ax^* + dz^* + \varepsilon_j$$

donde: Y_j = valor de la característica Y en el individuo j; μ = media de la característica en la población; a = efecto aditivo del *locus* que está siendo estudiado, sobre la característica Y; d = efecto de dominancia del *locus* que está siendo estudiado, sobre la característica Y; x* y z* son las variables indicadoras (utilizadas para estimar los efectos a y d del QTL) y dependen de los genotipos de los marcadores flanqueantes del QTL, en el individuo j y ε_j = error aleatorio para j-ésimo individuo.

Explicaremos como se obtienen los valores de las variables indicadoras x* y z* presentados en la Tabla 3. Para adjudicar estos valores debemos respondernos la pregunta: Dado un intervalo genético de marcadores moleculares, cuyo fenotipos son conocidos, ¿cuál es la probabilidad que dentro del intervalo el genotipo del QTL sea QQ, Qq o qq?. Consideremos el intervalo genético M₁M₁M₂M₂. El genotipo de los marcadores indica que fue generado por el encuentro al azar de las gametas parentales M₁M₂. Dado que no existió recombinación

entre los marcadores, el genotipo de QTL más probable dentro del intervalo sería QQ. Así, la única variable indicadora que asume valor es x* y ese valor es 1 ($p = 1$), pues no existen desvíos debido a la dominancia y el alelo Q incrementa el valor del carácter. El intervalo M₁M₁M₂m₂ fue generado por una gameta parental y otra recombinante. Ahora es probable que dentro del intervalo genético el genotipo del QTL sea QQ o Qq con probabilidades 1-p y p, respectivamente. El valor 1-p será máximo cuando estemos cerca del genotipo marcador M₁M₁ y mínimo cuando estemos próximos de M₂m₂. Lo contrario sucederá con el valor de p. Las variables x* y z* asumirán valores 1-p y p, respectivamente, cuyos valores variaran conforme nos desplazemos en el intervalo a distancias r_a. Con el mismo razonamiento se pueden encontrar las probabilidades condicionales de los genotipos QQ, Qq y qq para los intervalos M₁M₁m₂m₂ y M₁m₁M₂m₂.

Según el modelo de Según Haley y Knott (1992) una regresión es realizada para cada valor de r_a entre los marcadores M₁ y M₂. El valor de r_a que produzca el mayor valor de R² (coeficiente de determinación), LR o de LOD indica la localización del QTL. El test de significancia de hipótesis, LR, según puede ser expresado como:

$$LR = 2 \ln \frac{SCR_{(reducido)}}{SCR_{(completo)}}$$

educado) = Suma de cuadrados del residuo del modelo reducido: $Y_j = \mu + e_j$; $SCR_{(completo)}$ = Suma de cuadrados del residuo del modelo completo: $Y_j = \mu + ax^* + dy^* + \varepsilon_j$ (para F₂), $Y_j = \mu + g_1x^* + \varepsilon_j$ (para Retrocruzamientos) y $Y_j = \mu + ax^* + \varepsilon_j$ (para RIL y DH). Los valores de LOD se encuentran dividiendo el valor LR por 4,61 (LOD = LR / 4,61).

3.3. Mapeo por intervalo compuesto

En el mapeo por intervalo, los tests de hipótesis no son independientes de otros QTLs ligados al intervalo siendo analizado. Para QTLs no ligados al intervalo el efecto no es tan dramático, pero deben hacerse las siguientes consideraciones: 1) la segregación del QTL no

Tabla 3: Esperanza de los efectos genotípicos medios para un QTL para todos los posibles genotipos de los marcadores flanqueantes, en una población F_2 , cuando no se considera la ocurrencia de recombinaciones dobles en el intervalo.

Genotipo Marcador	Probabilidad QQ	Probabilidad Qq	Probabilidad qq	Variables indicadoras (a)x*	Variables indicadoras (d)z*
$M_1M_1M_2M_2$	1	0	0	1	0
$M_1M_1M_2m_2$	1-p	p	0	1-p	p
$M_1M_1m_2m_2$	$(1-p)^2$	$2p(1-p)$	p^2	1-2p	$2p(1-p)$
$M_1m_1M_2M_2$	p	1-p	0	p	1-p
$M_1m_1M_2m_2$	$cp(1-p)$	$1-2cp(1-p)$	$Cp(1-p)$	0	$1-2cp(1-p)$
$M_1m_1m_2m_2$	0	1-p	p	-p	1-p
$M_1m_1M_2M_2$	p^2	$2p(1-p)$	$(1-p)^2$	$-(1-2p)$	$2p(1-p)$
$m_1m_1M_2m_2$	0	p	1-p	$-(1-p)$	p
$m_1m_1m_2m_2$	0	0	1	-1	0

$$p=r_a/r ; (1-p)=r_b/r ; c=r^2/[r^2+(1-r)^2] \text{ (Tomado de Schuster \& Cruz, 2004).}$$

ligado contribuye a la variación fenotípica; **2)** interfiere en la estimación del efecto del QTL y **3)** removiendo el efecto de la segregación del otro QTL se reduce la varianza residual del intervalo en consideración, aumentando el poder de detección y precisión. El mapeo por intervalo compuesto (Jansen 1993, 1994; Zeng 1993, 1994), combina el mapeo por intervalo con la regresión múltiple. Esta última, permite incluir en el mapeo marcadores ubicados por fuera del intervalo como cofactores, incrementando el poder de detección y precisión en la estimativa de la posición del QTL. La pregunta de cuántos cofactores deben utilizarse no es de fácil respuesta. En principio los dos marcadores que flanqueen el intervalo deben ser incluidos, al igual que aquellos que resulten significativos en una regresión múltiple. Definidos los marcadores que se utilizarán como cofactores, la metodología de mapeo por intervalo compuesto se aplica exactamente igual a la de mapeo por intervalo simple.

3.4. Test de hipótesis y nivel de significancia

La formulación de hipótesis adecuadas y utilización de estadísticos apropiados, para la evaluación de las mismas, es esencial para declarar la presencia de un QTL. En una po-

blación F_2 pueden ser estimados los efectos aditivo y de dominancia, en un RC el efecto g_1 o g_2 y sólo el efecto aditivo en poblaciones de RILs y DH. Para determinar si el valor de cada efecto estimado es diferente de cero se usan las estadísticas LR o LOD. En muchos trabajos de mapeo un valor de LOD superior a 2 – 3 es utilizado como criterio para declarar la presencia de un QTL. Esta forma de determinar el valor umbral o crítico es arbitrario y la mayoría de los autores no lo consideran el más adecuado, pues la probabilidad de detectar al menos un falso positivo (declarar la real la presencia de un QTL inexistente) en alguna región del genoma es prácticamente 1 (100 %). Se propuso disminuir este sesgo determinando un nivel de significancia para cada cromosoma. En este caso, el nivel de corte para cada cromosoma correspondería al del genoma completo dividido el número de cromosoma o grupos de ligamientos obtenidos. También es posible definir un nivel de significancia para cada intervalo, dividiendo la significancia del cromosoma por el número de intervalos en el grupo de ligamiento (número de marcadores menos uno).

Finalmente, el valor crítico de corte puede establecerse empíricamente mediante el test de permutaciones que es actualmente el más usado. Para realizar este test deben numerar-

se los individuos de 1 a n . Los valores fenotípicos de las características son tomados al azar y atribuidos a los individuos conforme vayan siendo retirados. El primer valor fenotípico retirado es asignado al individuo 1, el segundo valor fenotípico al individuo 2, así sucesivamente, se asignan todos los valores fenotípicos a cada uno de los individuos. Los datos permutados son analizados para detectar la presencia de QTL, almacenando el mayor valor de LOD obtenido. El proceso se repite de forma completa N veces, finalmente, los valores de LOD retenidos, son ordenados por orden de magnitud permitiendo estimar el valor crítico de cada test. El valor crítico de cada intervalo tendrá la magnitud $N(1 - \alpha)$, o sea, si se realizaron 1000 permutaciones, la significancia de 5% será el 950 ° valor ordenado. Se procede de la misma forma para obtener el valor de corte para un determinado grupo de ligamiento o para el genoma completo (conjunto de grupos de ligamientos) considerando uno u otro en el test de permutación. Cuanto mayor el número de permutaciones, mayor la precisión en el valor crítico.

4. Mapas y marcadores funcionales

En la historia del desarrollo de los marcadores moleculares se ha priorizado la detección de polimorfismos en regiones no codificantes del genoma. Esto ha sido en función de asegurar la neutralidad fenotípica de los marcadores y posibilidad de maximizar la variación entre diferentes genotipos. Esta última característica está sustentada en que las regiones no génicas del genoma no han sufrido presión de selección sobre las mutaciones que pudieran haber ocurrido en el transcurso de la evolución y por consiguiente ser más variables. La asociación de los marcadores con caracteres de interés, como se ha visto anteriormente, está determinada por la distancia de recombinación (o física) del marcador con el gen responsable del fenotipo. De esta manera, los mapas genéticos basados en marcadores moleculares han posibilitado la localización de regiones cromosómicas estadísticamente asociadas a caracteres de tipo cualitativos (monogénicos) o cuantitativos (poligénicos o QTLs). Como ya se ha visto, la determinación de QTLs permite

establecer el número, posición y efecto individual de cada uno de los *loci* involucrados. Sin embargo, la identificación de QTLs en diversos cultivos no ha concluido con la identificación de los genes responsables del fenotipo, cuya existencia se presume en el intervalo comprendido entre marcadores flanqueantes de los mismos. Como consecuencia, la función biológica (o el modo de acción) de los genes responsables de los efectos de los QTLs es aún desconocida en la mayoría de los casos reportados. Asimismo, la posibilidad de realizar un “caminado cromosómico” (*cromosome walking*) desde el marcador flanqueante al QTL hacia la región física donde reside el gen responsable con el fin de aislarlo, depende de la distancia de recombinación entre el marcador y el gen, y de la relación de esa distancia con la distancia física real, que puede estar afectada por varios otros factores, como fuera mencionado antes en este capítulo.

La creciente disponibilidad pública de información de secuencias de transcritos de ADN mensajero (*Expressed Sequence Tags*, ESTs), junto con el grado de homología evidenciado entre especies, ha permitido la generación de los llamados marcadores génicos o funcionales, cuya característica relevante es la de estar localizados en regiones codificantes del genoma.

Participan en las llamadas mutaciones silenciosas. Esto es, cuando el cambio nucleotídico se produce en la tercera base del codón sin alterar el aminoácido para el cual codifica. La identificación de SNPs puede inferirse directamente a partir de datos de secuencias públicas, si estas corresponden a distintos genotipos, o por secuenciación de fragmentos de genes amplificados por PCR de individuos diversos.

Aunque históricamente se ha asumido que las secuencias tipo microsatélites son propias del ADN no codificante, hoy sabemos que las mismas pueden encontrarse también en regiones génicas. Si bien la frecuencia relativa de estos motivos es baja (< 5 %) la gran abundancia de secuencias de ESTs en diversos cultivos, ha ocasionado que varios estudios hayan usado esta estrategia para el desarrollo de marcadores moleculares. La selección de motivos de trinucleótidos, aumenta la posibilidad

de encontrar SSRs polimórficos en regiones codificantes, minimizando los posibles cambios en el marco de lectura ocasionados por una variación en el número de repeticiones de motivos de di, tetra o pentanucleótidos. Estos marcadores, denominados SSRs génicos o EST-SSRs, presentan las mismas ventajas que los SSRs neutros que han sido enunciadas en el Capítulo 5.

Los marcadores CAPs requieren la existencia de un sitio de restricción polimórfico en la secuencia génica, y si bien se han reportado casos, los mismos son de baja ocurrencia.

La aproximación más sencilla para el desarrollo de un marcador funcional es a través de una amplificación por PCR de un fragmento de un gen y estableciendo la existencia de polimorfismo entre genotipos a través de la resolución del producto en geles de SSCP. Los polimorfismos detectados mediante esta técnica se basa en que hebras simples de ADN con secuencias distintas, migrarán diferencialmente en un campo eléctrico, en función de un diferente plegamiento intra-cadena dado por la complementariedad de bases. Patrones de bandas distintos entre genotipos estarían indicando una variación de secuencia en el fragmento amplificado. Sin embargo, no puede asegurarse identidad de secuencia de dos fragmentos amplificados, por no observarse diferencias en los patrones de electroforesis, ya que la detección de las mismas es un balance entre el número de SNPs presentes y el tamaño del fragmento amplificado. Los polimorfismos presentados por los marcadores funcionales pueden entenderse como variantes alélicas, que pueden o no estar asociados a una variación a nivel proteico, ya sea en estructura o expresión. De todos modos, estos marcadores, análogamente a lo enunciado antes en este capítulo, pueden utilizarse para generar mapas genéticos, que al estar formados por marcadores funcionales se denominan mapas funcionales.

Los mapas funcionales en general están basados en mapas pre-existentes de marcadores neutros con el agregado de marcadores funcionales. Estos marcadores funcionales pueden corresponder a genes sin relación entre sí, como por ejemplo en mapas de ESTs-SSRs, o incluir análogos de genes de resistencia

(RGAs) o genes pertenecientes a rutas metabólicas particulares (por ejemplo: síntesis de carbohidratos), o a integrantes de una familia génica (por ejemplo: genes de la familia P450).

Los mapas genéticos funcionales posibilitan establecer una estrategia de genes candidatos en la identificación de factores responsables de QTLs a nivel molecular, a través de la coincidencia en la localización de QTLs y marcadores génicos. Un marcador funcional se convierte en gen candidato cuando está asociado al carácter fenotípico a través de un análisis de marcas simple, o cuando en un mapa su localización coincide con un QTL. En el primer caso, tanto el marcador como el carácter fenotípico deben estar evaluados en la misma población, mientras que en el segundo caso esto no es necesario, y es factible comparar la posición de un marcador funcional con QTLs de mapas de otras poblaciones de la misma u otra especie. Por ejemplo, se ha encontrado que el locus del gen *Lin5* del cromosoma IX del tomate correspondiente a una invertasa vacuolar (responsable de la degradación de sacarosa en glucosa y fructosa) co-localizada con el QTL *Brix9-2-5* de rendimiento de azúcar de fruto, mientras que en papa el gen ortólogo *invGE* está asociado a variaciones en el nivel de azúcares reductores en tubérculos de una población segregante, y su posición coincide con el QTL *Sug9a*, responsable del endulzamiento por frío en tubérculos de otra población de papa. Análogamente se ha encontrado que marcadores funcionales, basados en análogos a genes de resistencia (RGAs) se asocian en diferentes especies a resistencias a distintas enfermedades fúngicas y virales.

Asimismo, en caracteres complejos donde se hayan establecido múltiples QTLs, los marcadores funcionales permiten establecer la interacción entre éstos a la luz de las rutas metabólicas involucradas, pudiéndose identificar enzimas claves para la manifestación del carácter. Esta información genera un marco adecuado para estudios de ingeniería metabólica.

El mejoramiento genético asistido por marcadores moleculares (MAS) encuentra en los marcadores funcionales una situación ideal en la que la recombinación entre el gen responsable y el marcador es nula, ya que ambos guardan identidad.

Al estar diseñados sobre genes, la transferencia de estos marcadores a través de especies está beneficiada, dada la mayor conservación de las secuencias codificantes. Asimismo, la comparación de mapas funcionales aporta información en estudios de sintenia (conservación del tipo y orden de marcadores entre especies relacionadas), evolución y especiación entre diferentes organismos.

Del mismo modo, la utilización de marcadores funcionales en la conservación de los recursos genéticos permite ponderar la diversidad genética existente en base a las variantes alélicas intra e inter-específicas. Concordantemente, los estudios de genética de asociación (o mapeo de asociación), basados en el desequilibrio de ligamiento entre un marcador y un carácter fenotípico en una población de individuos no relacionados (como es el caso de los bancos de germoplasma) se presenta robustecido por el uso de marcadores génicos.

Finalmente, la correlación de los marcadores funcionales con datos fenotípicos o con QTLs sólo sugiere la función putativa de un gen y sus variantes alélicas. Es por esto que la confirmación definitiva de la función génica debe realizarse mediante estrategias más directas como ensayos de complementación y/o silenciamiento génico.

5. Bibliografía y lecturas recomendadas:

- ALLARD, R. W.** 1956. Formulas and tables to facilitate the calculation of recombination values in heredity. *Hilgardia* 24: 235–278.
- FEINGOLD, S. E.; LLOYD, J.; NORERO, N.; BONIERBALE, M. y LORENZEN, J.** 2005. Map location and diversity values for new potato SSRs developed from EST databases. *Theor. Appl. Genet.* 111: 456–466.
- GELDERMANN, H.** 1975. Investigations on inheritance of quantitative characters in animals by gene markers. I. Methods. *Theor. Appl. Genet.* 46: 319–330.
- HALEY, C. S. y KNOTT, S.A.** 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69: 315–324.
- JANSEN, R. C.** 1993. Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135: 205–211.
- KEARSEY, M. J. y POONI, H.S.** 1996. Estimation of recombination frequency. En: *The genetic analysis of quantitative traits*. (First edition). Chapman & Hall. London. pp. 120–132
- LANDER, E. S.; GREEN, P.; ABRAHAMSON, J.; BARLOW, A.; DALY, M. J.; LINCOLN, S. E. y NEWBURG, L.** 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174–181.
- LANDER, E.S. y BOTSTEIN, D.** 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185–199.
- ORTIZ, J. P. A.; PESSINO, S. C.; BATH, V.; HAYWARD, M. D. y QUARÍN, C. L.** 2001. A genetic linkage map of diploid *Paspalum notatum*. *Crop. Science* 41: 823–830.
- RUSSELL, P.J.** 1996. Mendelian Genetics. En: *Genetics*, Chapter 2 (4th Edition). Harper Collins College Publishers, New York. pp. 17– 46
- SAX, K.** (1923) The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* 8:552–560
- SCHUSTER, I. y CRUZ, C. D.** 2004. Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. Primeira Edição. Viçosa, Brasil. Ed. UFV. pp 568.
- STAM, P.** 1993. Construction of integrated genetic linkage maps by means of a new computer package: JoinMap. *Plant J.* 3:739–744.
- WEISING, K.; NYBON, H.; WOLFF, K. y KAHL, G.** 2005. Linkage analysis and genetic maps. En: *DNA Fingerprinting in plants. Principles, Methods, and Applications* (2nd Edition). CRC Press, Taylor & Francis Group, Boca Raton, Florida. pp. 277–289
- YOUNG, N.D.** 1994 Constructing a plant genetic linkage map with DNA markers. En: *DNA-based markers in plants. Advances in cellular and molecular biology of plants*. Vol. 1. (PHILLIPS, R. L. y VASIL, I. K. Editors). (1st edition). Kluwer Academic Publishers. Dordrecht, The Netherlands. pp. 39–57
- YULE, G.U.** 1902. Mendel's laws and their probable relation to intra-racial heredity. *New Phytol.* 1: 193–207.

I CAPÍTULO 7.

Genómica

Viviana Echenique; Juan P. Selva; Mauro Meier;
Pablo Roncallo; Gustavo Schrauf

1 Introducción

La «**genómica**» se desarrolló en las últimas dos décadas como consecuencia de los avances realizados en biología molecular e Informática, dos áreas de la ciencia que han tenido un desarrollo tecnológico enorme, generando una revolución en el conocimiento y en la comprensión de los procesos biológicos.

El término fue acuñado en 1986 por Thomas Roderick para referirse a la **subdisciplina de la genética que se ocupa del mapeo, secuenciación y análisis de las funciones de genomas completos** y sirvió de nombre para una revista especializada en la publicación de los mencionados temas, “**Genomics**”. Consiste en la caracterización molecular de genomas enteros y aporta información acerca de la secuencia y de la función de cada sector del genoma en diferentes situaciones de desarrollo y bajo diferentes condiciones ambientales, así como de los mecanismos implicados en la regulación de la expresión e interacción génica.

Para ello, las herramientas que se utilizan para el análisis individual de genes o pequeñas regiones cromosómicas, se aplican al análisis global de genomas completos, estudiando en conjunto los miles de genes, proteínas y metabolitos que constituyen un organismo, así como las complicadas redes de interacciones que operan entre ellos. La información generada es enorme y es clave para la identificación y el aislamiento de genes de interés y permitirá interpretar, en términos moleculares, los procesos biológicos. Para ayudar en este proceso han surgido poderosas **herramientas bioinformáticas** que permiten almacenar e interpretar esta información.

Las aplicaciones de la genómica alcanzan a todos los ámbitos de la actividad humana relacionados con la biología, como la salud, la alimentación y el medio ambiente. Actualmente

se encuentran disponibles las secuencias de nucleótidos y aminoácidos de miles de genes y productos génicos codificados por los genomas de varios organismos complejos. Esta información se utiliza para el estudio de enfermedades humanas complejas y para comprender fenómenos tales como la fisiología celular, el desarrollo, la conducta, la evolución, etc. También aportan información acerca de todos los aspectos del crecimiento y desarrollo vegetal, diferenciación y respuesta a estreses bióticos y abióticos. Gracias al potencial de relacionar fenotipos biológica y económicamente importantes con los genes responsables de los mismos actualmente es posible identificar genes de interés para ser transferidos a otros organismos por medio de tecnología génica. Por otro lado, el conocimiento de la secuencia de los genes posibilita el desarrollo de marcadores perfectos, basados en la secuencia del mismo gen, lo cual facilita la selección y la transferencia de los mismos a variedades de interés. La conjunción entre tecnología génica, marcadores moleculares, genómica y bioinformática ha revolucionado el mejoramiento genético vegetal, dando origen a lo que se denomina **mejoramiento molecular** y se están desarrollando nuevos y promisorios cultivares (**Fig. 1**).

La genómica puede dividirse en:

- **Genómica estructural**, que se ocupa de la caracterización física de los genomas.

- **Genómica funcional**, que caracteriza el **transcriptoma**, que está constituido por el conjunto completo de transcritos producidos por un organismo, el **proteoma** o conjunto de proteínas codificadas por un genoma, y el **metaboloma** o conjunto total de metabolitos de una célula, consecuencia de la función de los ARN y proteínas.

El objetivo de la genómica es la dilucidación completa y exacta de la secuencia de ADN de un genoma haploide representativo de una especie. Cuando esta secuencia se conoce, abre la puerta a numerosas posibilidades.

Por análisis computacional de la misma y utilizando principios conocidos de genética es posible:

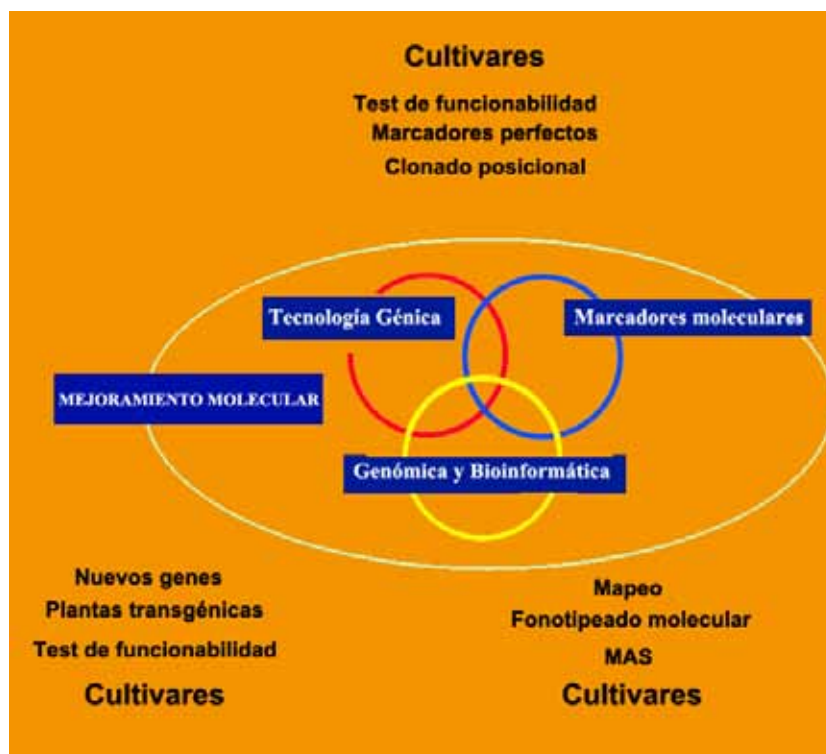


Figura 1: La conjunción entre tecnología génica, marcadores moleculares, genómica y bioinformática revolucionaron el mejoramiento vegetal, conduciendo al desarrollo de nuevos cultivares. Los nuevos genes hallados son introducidos en plantas por tecnología génica. Esto a su vez permite establecer la funcionalidad de los mismos. El conocimiento de la secuencia permite la obtención de mapas, marcadores perfectos y realizar selección asistida por marcadores moleculares (MAS), así como el fenotipado molecular. Gentileza de G. Spangenberg.

- **Comparar secuencias** similares presentes en diferentes entidades biológicas y comprender la función de las mismas.
- **Realizar predicciones** acerca de todas las proteínas codificadas por una especie.
- **Establecer las variaciones genéticas** entre distintas poblaciones de una misma especie.

Comparar secuencias de diferentes especies y entender procesos evolutivos.

Esto ha dado origen a la **genómica comparativa** y ha demostrado que existe considerable sintenia, es decir, una localización conservada de genes en posiciones equivalentes en especies relacionadas (**Fig. 2**). También ha sido una excelente herramienta para identificar motivos de secuencia altamente conservados y, por lo tanto, funcionalmente importantes en regio-

nes codificantes y no codificantes del genoma. Catalogar las variaciones genéticas entre individuos ayudará a identificar aquellos cambios que conducen a enfermedades genéticas, investigar nuevas terapias y establecer la resistencia o susceptibilidad a diferentes factores. Para la comparación de secuencias se utiliza el algoritmo **BLAST** (**b**asic **l**ocal **a**lignment **s**earch **t**ool: herramienta de búsqueda de alineación local básica), para lo cual existen distintos programas que permiten hallar regiones similares entre diferentes genes (Parte I, Cap. 12).

En Febrero de 2001, coincidiendo con el cincuenta aniversario de la publicación del modelo estructural del DNA por Watson y Crick, la revista *Nature* publicó el primer borrador del **genoma humano**, que ha sido secuenciado completamente. También se han secuenciado otros genomas como maíz, colza, soja, trébol, raigrás, etc. (Tabla 1).

Tabla 1. Ejemplos de genomas secuenciados en los últimos años.

	Especie	Tamaño del genoma
Bacterias	<i>Haemophilus influenzae</i>	1.830.137 pb
	<i>Mycoplasma genitalium</i>	580.070 pb
	<i>Methanococcus jannaschii</i>	1.660.000 pb
	<i>Helicobacter pylori</i>	1.667.867 pb
	<i>Escherichia coli</i>	4.639.221 pb
	<i>Bacillus subtilis</i>	4.214.810 pb
	<i>Treponema pallidum</i>	1.138.006 pb
	Levadura (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>)	12.052.000 pb
Organismos Eucariotas	<i>Trichomonas vaginalis</i>	160 Mpb
	Nematodo (<i>Caenorhabditis elegans</i>)	97 Mpb
	Mosca del vinagre (<i>Drosophila melanogaster</i>)	120 Mpb
	Mosquito de la malaria (<i>Anopheles gambiae</i>)	278 Mpb
	Mosquito del dengue y fiebre amarilla (<i>Aedes aegypti</i>)	1.380 Mpb
	Abeja (<i>Apis mellifera</i>)	236 Mpb
	Protozoo malaria (<i>Plasmodium falciparum</i>)	22 Mpb
Plantas	Sorgo (<i>Sorghum bicolor</i>)	700 Mbp
	Arroz (<i>Oryza sativa</i> ssp. <i>japonica</i> e <i>indica</i>)	420 - 466 Mpb
Vertebrados	Pez globo (<i>Tetraodon nigroviridis</i>)	300 Mpb
	Gallo rojo de la jungla (<i>Gallus gallus</i>)	1.000 Mpb
	Zarigüeya (Marsupial, <i>Monodelphis domestica</i>)	3.475 Mpb
	Ratón (<i>Mus musculus</i>)	2.500 Mpb
	Rata (<i>Rattus norvegicus</i>)	2.750 Mpb
	Perro (<i>Canis familiaris</i>)	2.411 Mpb
	Chimpancé (<i>Pan troglodytes</i>)	2.843 Mpb
	Macaco rhesus (<i>Macaca mulatta</i>)	2.870 Mpb
	Humano (<i>Homo sapiens</i>)	3.000 Mpb

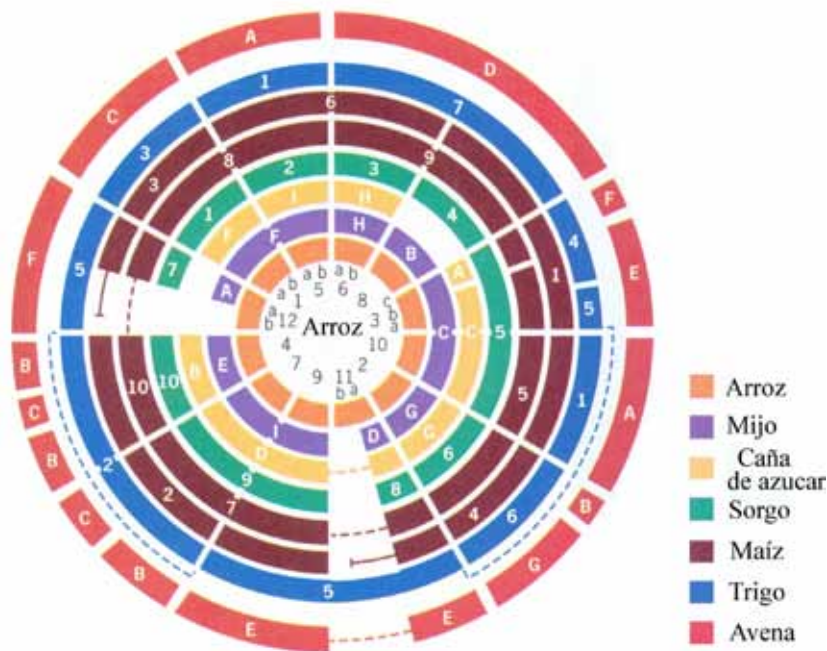


Figura 2: Sintenia entre los genomas de varias gramíneas. El genoma de arroz contiene grupos de marcadores que se hallan altamente conservados en muchos cereales, por lo cual dichos genomas pueden sintetizarse básicamente como compuestos por «bloques de ligamiento de arroz». En la figura se muestra el alineamiento de los cromosomas y segmentos de cromosomas (identificados con letras mayúsculas) de varias gramíneas con los del arroz (centro). El genoma del maíz tiene dos copias semejantes de cada bloque de genes por lo que está representado por dos anillos del círculo. Las líneas externas punteadas conectan sectores adyacentes de los cromosomas de trigo. Modificado de Gale y Devos (1998).

También es posible estudiar todos los genomas bacterianos asociados a genomas más complejos, sin necesidad de aislar y de cultivar especies microbianas particulares. Esto se denomina **metagenómica** (Parte I, Cap. 11). Para este estudio se extrae todo el ADN de una comunidad microbiana de un ambiente particular (suelo, agua de mar, intestino humano, etc.), se determina que genes se encuentran presentes, cuales son sus funciones y las diferencias que existen entre distintas comunidades a este nivel.

Más recientemente ha surgido la denominada **“Genómica Sintética”**, que pretende crear formas sintéticas de vida recreando genomas artificiales, células con vías metabólicas predeterminadas y propiedades catalíticas específicas. Involucra el rediseño y la fabricación de sistemas biológicos. Como ejemplo podemos citar el transplante de un genoma de una célula bacteriana a otra.

A continuación se brinda un panorama global acerca de la forma en que se articulan los proyectos de genómica, algunos resultados relevantes, las aplicaciones en agricultura y el estado de la investigación en Sudamérica.

2 Genómica estructural

Como su nombre lo indica, el objetivo de la misma es caracterizar la **estructura del genoma**. Conocer la estructura de un genoma individual puede ser de utilidad para manipular genes y segmentos de ADN en una especie particular. El análisis comparativo de diferentes genomas posibilitará deducir reglas generales que gobiernan la estructura de todos los genomas.

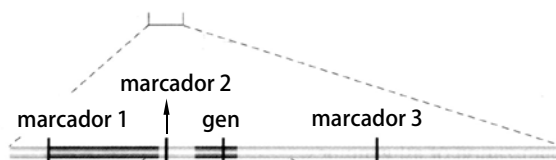
La genómica estructural procede a través de niveles incrementales de resolución analítica, comenzando con la asignación de genes y marcadores a cromosomas individuales, mapeando estos genes y marcadores dentro de los cromosomas, finalizando con la preparación de un mapa físico a través de la secuenciación. Es decir, que se procede desde un mapeo genético de baja resolución, basado en el análisis de recombinación meiótica, hacia uno de alta resolución, basado en marcadores moleculares, llegando a la realización de un mapa físico, basado en la secuencia de fragmentos clonados parcialmente solapantes (**Fig. 3**).

Los pasos a seguir son:

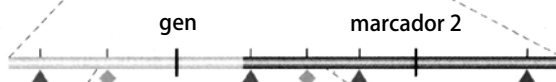
1) -Asignación de genes a los cromosomas



2) -Mapeo Cromosómico



3) -Mapeo de Restricción



3) -Mapeo Físico

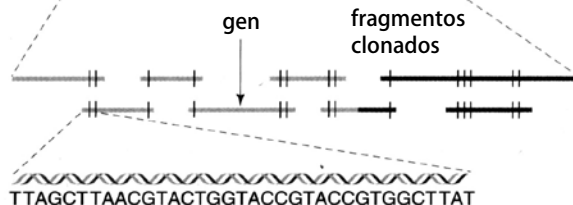


Figura 3: Niveles de complejidad de la genómica estructural. La genómica estructural procede desde un mapeo genético de baja resolución, basado en el análisis de recombinación meiótica, a uno de alta resolución, basado en marcadores moleculares hasta la realización de un mapa físico, basado en la secuencia de fragmentos clonados solapantes. Modificada de Griffiths *et al.* (2004).

- **Mapeo cromosómico de baja resolución** (ubicación de genes que producen fenotipos mutantes conocidos y algunos marcadores). Las distancias genéticas se basan en frecuencias de entrecruzamientos («crossing overs») y son medidas como porcentaje de recombinación en centimorgans (cM).

- **Mapeo genético de alta resolución** de cada cromosoma (con marcadores moleculares ubicados muy próximos entre sí).

- **Mapeo físico**, basado en distancias moleculares, resultantes de mapas de fragmentos de restricción parcialmente superpuestos. La distancia entre dos marcadores puede ser medida determinando el tamaño de los fragmentos de restricción que los contienen, siendo el fragmento más pequeño que lleva ambos marcadores una estimación de la distancia entre ellos. Utilizando combinaciones de sondas y enzimas de restricción puede construirse un mapa

físico determinando qué fragmentos poseen marcadores en común. Las distancias físicas se miden en kilobases (kb) o megabases (Mb).

- **Anclado del mapa genético en el mapa físico.**

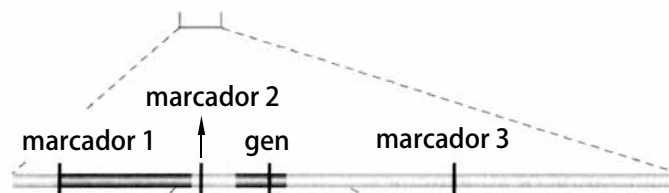
- **Secuenciación de ADN a gran escala**, que brinda un mapa completo de cada cromosoma.

- **Anclado del mapa genético y del mapa físico en el de secuencia.** Las distancias físicas generalmente no se correlacionan directamente con las distancias genéticas porque las frecuencias de recombinación no son siempre proporcionales a las distancias moleculares. Sin embargo, a menudo las dos correlacionan razonablemente bien en regiones eucromáticas de los cromosomas (aquellas menos condensadas, que se colorean de manera más difusa). En humanos, un cM es equivalente, en promedio, a aproximadamente 1 Mb de ADN.

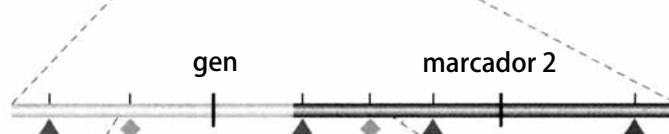
1) -Asignación de genes a los cromosomas



2) -Mapeo Cromosómico



3) -Mapeo de Restricción



3) -Mapeo Físico

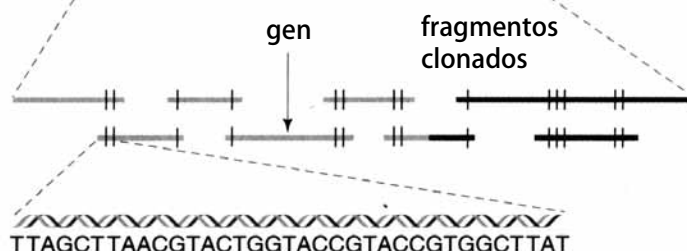


Figura 3: Niveles de complejidad de la genómica estructural. La genómica estructural procede desde un mapeo genético de baja resolución, basado en el análisis de recombinación meiótica, a uno de alta resolución, basado en marcadores moleculares hasta la realización de un mapa físico, basado en la secuencia de fragmentos clonados solapantes. Modificada de Griffiths *et al.* (2004).

2.1 Asignación de loci a cromosomas específicos.

Se utilizan los siguientes métodos:

- **Ligamiento a loci conocidos:** análisis tradicional basado en cruzamientos, en especies en las que es factible hacerlo.

- **Electroforesis de campo pulsátil:** se usa en el caso de especies que poseen cromosomas pequeños, separables por esta técnica, como sucede con los de levaduras. Las bandas en el gel corresponderían a cromosomas individuales y pueden utilizarse **para localizar nuevos genes por hibridación**. Primero, utilizando sondas de localización conocida se establece que banda corresponde a cada cromosoma. Luego, un nuevo gen clonado de ubicación desconocida se utiliza como sonda para asignarle una posición en un cromosoma determinado.

- **Híbridos celulares interespecíficos**, por ejemplo humano-ratón. Se utiliza exclusivamente en mapeo del genoma humano o de especies animales. Se establecen bancos de líneas celulares que contengan todos los cromosomas del roedor y un cromosoma humano particular. Siempre incluye un cromosoma humano que lleva un alelo salvaje defectivo para una función bioquímica determinada en el genoma del ratón. Si sobreviven en un cultivo deficiente para el factor que no sintetizan es porque llevan el alelo humano equivalente, que complementa la función faltante.

2.2 Ubicación de los genes a lo largo del cromosoma

El próximo nivel de resolución consiste en determinar la posición de un gen o marcador molecular sobre el cromosoma. Este paso es importante porque los mapas genéticos pueden alinearse con los mapas físicos y utilizarse para validar los mismos.

- **Mapeo por recombinación:** en los casos en que ha sido factible hacerlo (organismos experimentales como levaduras, mosca de la fruta, ratón, *Arabidopsis*, etc.) ha posibilitado la construcción de mapas que a lo largo de los años aparecen repletos de genes con efectos fenotípicos determinados. Sin embargo, los

intervalos recombinacionales entre genes conocidos contienen cantidades muy grandes de ADN. Estos intervalos o «gaps» no pueden ser completados utilizando análisis de ligamiento debido a la ausencia de marcadores en esas regiones. Para llenarlos y construir mapas de alta resolución surgieron los marcadores moleculares, entre los que se encuentran los RFLP y los SSLP (mini y microsatélites)(Parte I, Cap. 5). Estos marcadores permiten la construcción de mapas genéticos con una densidad de un marcador/centimorgan (cM). Aunque tal resolución es un logro muy importante, un centimorgan representa, en humanos, una megabase, lo que equivale a un millón de pares de bases o 1000 kb. Para lograr mayor resolución actualmente existen los SNP, que son marcadores basados en el polimorfismo de un solo nucleótido.

- **Hibridación *in situ*:** cuando se dispone de un gen clonado éste puede ser utilizado como para hibridar con los cromosomas *in situ*, para lo cual se lo marca radiactivamente o por fluorescencia. Puede, de ese modo, identificarse a los cromosomas portadores de la secuencia, determinar si son secuencias específicas de un cromosoma y determinar la posición del gen en el mismo. En el caso de fluorescencia, la técnica se denomina **FISH** («fluorescence *in situ* hybridization»). La localización del fragmento en el cromosoma se visualiza como un punto brillante (Parte I, Cap. 3).

- **Mapeo físico de los cromosomas:** aporta un nivel de resolución mayor. Se trata de identificar un conjunto de fragmentos de ADN clonados superpuestos que, juntos representen un cromosoma o un genoma completo. Los mapas así obtenidos se llaman **mapas físicos**, porque el ADN es el material físico del genoma.

2.3 Secuenciación a gran escala del genoma

- **Generación de bancos de EST (etiquetas de secuencias expresadas)**

La complejidad de los genomas eucariotas hace aconsejable, como primera aproximación, no abordar el estudio del genoma completo. Es preferible estudiar sólo una fracción del mismo, es decir, aquellos genes que se están expresando en un momento determinado de la

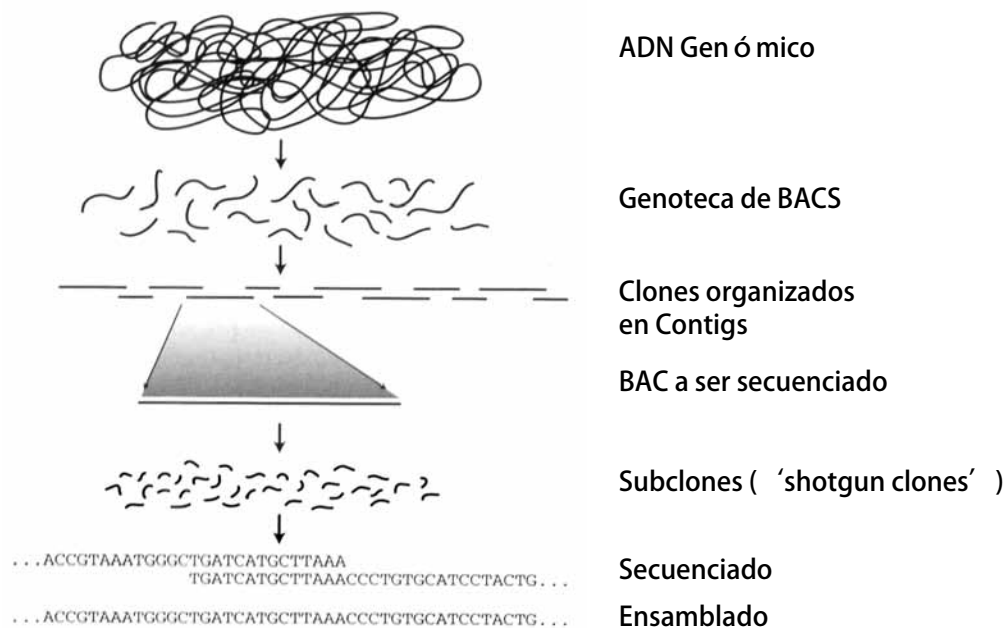


Figura 4: Estrategia de secuenciado jerárquico («hierarchical shotgun sequencing strategy»). El primer paso consiste en construir una genoteca por fragmentación del ADN e introducción del mismo en vectores que aceptan grandes insertos, en este caso de BACs. Los fragmentos de ADN representados en la misma son organizados en un mapa físico y los clones individuales son seleccionados y secuenciados para lo cual se hace una nueva genoteca de trozos más pequeños («shotgun library»). La secuencia de los clones se ensambla finalmente para reconstruir la secuencia del genoma. Modificada de la publicación del International Human Genome Sequencing Consortium, 2001

vida del organismo. Para ello se obtienen poblaciones de ADNc (que reflejan sólo secuencias expresadas) que se secuencian de forma masiva para generar miles de secuencias parciales conocidas como ESTs (Parte I, Cap. 8). Estas secuencias de entre 300-500 pb. suelen ser suficientes para la identificación de los genes mediante comparación con las secuencias existentes en las bases de datos públicas (ej. Genbank, EMBL), utilizando para ello programas de análisis informático (Parte I, Cap.12). Si la información contenida en la secuencia parcial no es suficiente, habría que determinar la estructura del ADNc completo para estudiar su función por otros métodos.

- Secuenciación genómica

La aproximación anterior no permite identificar genes que se expresan a bajo nivel o en situaciones fisiológicas no consideradas o regiones no representadas en el ARNm. Para obtener esta información debe secuenciarse el

genoma completo. Para ello, el ADN genómico total se digiere con enzimas de restricción apropiadas o se fragmenta mecánicamente en fragmentos de gran tamaño (100-300 kb.), que se clonan en vectores apropiados, para construir genotecas que contienen, al menos, una representación completa del genoma, que puede estudiarse en detalle y secuenciarse (Parte I, Cap. 4). A fin de distinguir las regiones codificantes de las no codificantes, las secuencias se comparan con las de ESTs y ADNc previamente estudiados.

Para reconstruir la secuencia del genoma original a partir de los fragmentos clonados se utilizan las siguientes estrategias:

a) Secuenciación de los clones y ensamblado de los fragmentos

El clonado comienza obteniendo un número elevado de fragmentos al azar que se clonan en un vector apropiado. En la preparación de

mapas físicos de genomas se utilizan vectores como los cósmidos, YACs, BACs y PACs, que aceptan insertos de gran tamaño (Parte I, Cap 4). El contenido de estos clones se caracteriza y se ordenan, buscando los puntos de solapamiento o superposición. Un conjunto de clones solapantes se llama contiguo. Para establecer el solapamiento de clones se secuencian regiones cortas del inserto proximas al sitio de clonado utilizando *primers* posicionados en el vector. Los intervalos sin secuencias (*gaps*) se completan utilizando el final de un fragmento clonado para llegar al siguiente (*primer walking*). A medida que se van caracterizando los clones, los contiguos se alargan y van convergiendo unos con otros. El proyecto termina cuando se tiene un conjunto de contiguos que equivale al número de cromosomas de la especie en estudio. En la Figura 4 se resume una estrategia de secuenciación jerárquica (*hierarchical shotgun sequencing*). Esta se usa para genomas grandes. Para genomas más pequeños se utiliza otra, llamada secuenciación de

genomas completos (*whole genome shotgun sequencing*) (Fig. 5). Todos los estadios del análisis genómico como la preparación de clones, el aislamiento de ADN, la electroforesis y la secuenciación han sido bien adaptados a diferentes máquinas o robots, automatizando el trabajo.

b) Ordenamiento de los clones

Se utilizan varias técnicas para ordenar los clones en contiguos. Entre ellas:

- **FISH:** para localizar las posiciones aproximadas de insertos grandes.

- **Fenotipificación (fingerprinting):** se corta el clon con enzimas de restricción que generan un grupo de bandas que representan un «fingerprint» o «huella digital» del clon. Las bandas generadas por varios clones pueden alinearse visualmente o por un programa de computación para determinar si se superponen o solapan.

- **STS («sequence tag sites» o sitios de secuencia marcada):** son secuencias cortas

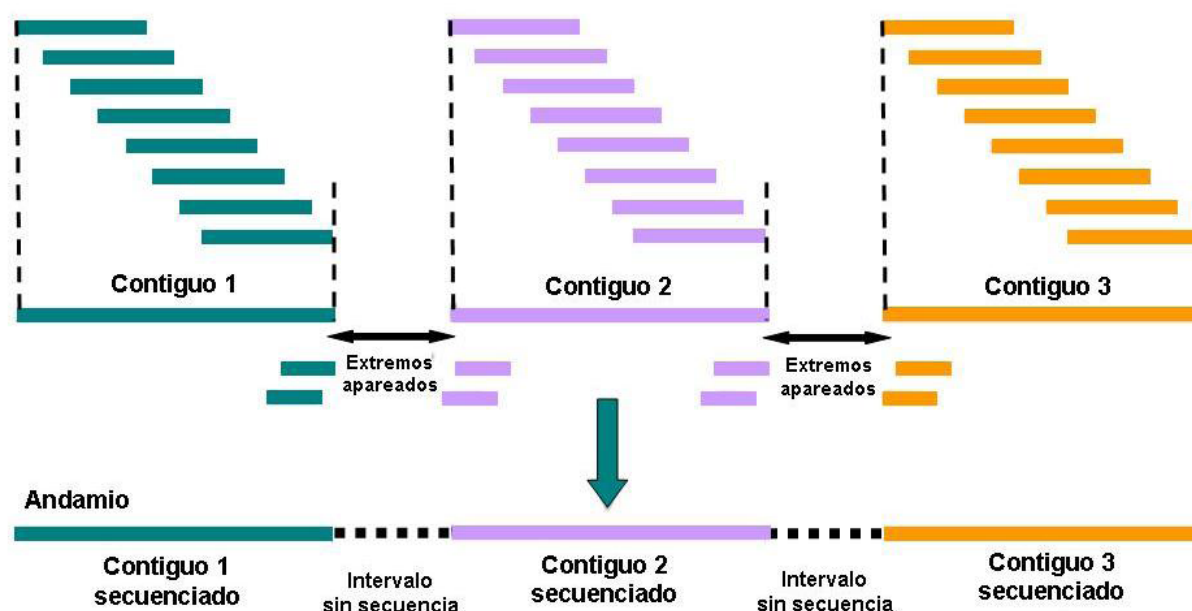


Figura 5: Montaje de un genoma complejo mediante la secuenciación completa del genoma por tiros de escopeta («whole genome shotgun sequencing»). En primer lugar, se construyen los contiguos con las secuencias que se superponen. Finalmente se utilizan los extremos apareados para cubrir los intervalos sin secuencia y así orientar y ordenar los contiguos en unidades llamadas andamios (*scaffolds*) Modificado de Griffiths *et al.* (2004).

de insertos grandes clonados. Se reúne un conjunto de clones al azar y se cortan en fragmentos más pequeños que se clonan en λ y se secuencian pequeñas regiones de cada uno. Para ello se diseñan *primers* que amplifican una secuencia corta de ADN (STS).

Actualmente existe una tecnología más moderna para el secuenciado de genomas, la pirosecuenciación. Esta técnica utiliza esferas atrapadas en una placa que contiene 1.600.000 microceldas. Cada esfera (una por microcelda) permite realizar una reacción de secuenciación individual, basada en la síntesis complementaria de un ADN de cadena sencilla, previamente multiplicado por PCR y alineado a cada esfera. La incorporación de cada nucleótido durante la síntesis de ADN libera una molécula de pirofosfato (PPi), que al interactuar con enzimas presentes en el medio (luciferasa, entre otras) produce una señal quimioluminiscente captada por una cámara de detección de fotones, la traducida en una computadora como la adición de un nucleótido determinado, generando una secuencia individual por cada celda. Esta tecnología, desarrollada por la empresa 454 Life Sciences, dio lugar a la creación del primer equipo de secuenciación masiva (Secuenciador GS 20™) diseñado para secuenciar genomas bacterianos, con una capacidad para descifrar 20 millones de bases por corrida (4hrs) en secuencias individuales de ± 100 bases. En el proyecto del género *Bacillus*, que tiene un genoma de aproximadamente 4 Mb, con seis corridas se descifraron 129.6 Mb, con una cobertura mayor a 20x de su genoma. En comparación, por el método de Sanger, se logró una cobertura de 3x (12,5Mb).

3 Utilización de mapas genómicos para el análisis genético

Los mapas genéticos y los físicos son un importante punto de partida para varios tipos de análisis genético, incluyendo el aislamiento de genes y genómica funcional.

Por ejemplo:

- **Aislamiento de genes por clonado posicional:** para ubicar un gen cuya secuencia se desconoce se puede partir de un marcador conocido que esté estrechamente ligado al

mismo. El mismo actúa como punto de partida para el caminado cromosómico (*chromosome walking*), donde los fragmentos finales del marcador ligado son utilizados como sondas para seleccionar otros clones de la genoteca. Del segundo grupo de clones (los que solapan con el inicial) se hacen mapas de restricción y los fragmentos obtenidos son utilizados para realizar una nueva ronda de selección de clones superpuestos. Así el proceso de «caminado» se mueve hacia ambos lados a partir del sitio inicial, que culmina cuando se llega al gen de interés. Existe otra técnica relacionada llamada salto cromosómico, que permite saltar a través de áreas distantes y potencialmente no clonables del ADN y genera «marcas», ampliamente espaciadas a lo largo de la secuencia, que pueden utilizarse como puntos de inicio para múltiples caminatas cromosómicas bidireccionales. Esta técnica consiste en crear fragmentos grandes (entre 80-150 kb) por restricción del ADN en la región que se cree contiene al gen de interés. Cada fragmento de ADN es luego circularizado, poniendo en contacto los extremos libres. Este procedimiento acerca puntos relativamente distantes de la región de genoma en estudio. Se trata de generar en esa unión un sitio que no sea cortado en una posterior restricción, de manera que esas dos regiones que estaban distantes en el genoma ahora estén unidas en un fragmento. El círculo se corta con una nueva enzima de restricción y los fragmentos obtenidos, entre los que se encuentran los sitios de unión, se clonan en fagos.

Esto es lo que se llama una «**genoteca de saltos**». Una sonda del sector de comienzo de la región que contiene al gen de interés puede utilizarse como punta de partida para comenzar a «saltar» por el genoma. Un salto puede, por ejemplo, avanzar unos 50 kb hacia el locus de interés. Una vez allí, el otro extremo de la unión del fragmento inicial se corta y se usa para buscar el siguiente punto de salto en la genoteca. O sea que a través de las uniones se va avanzando hacia el punto donde se encuentra el locus. Cada posición de salto es un punto de partida para una caminata cromosómica. Estas regiones se van secuenciando. Allí comienza la búsqueda de genes utilizando programas

de predicción y se seleccionan las secuencias candidatas. Esta estrategia de saltos se utilizó para clonar el gen de la fibrosis quística, que es una enfermedad humana que resulta fatal y es causada por mutaciones en un gen de gran tamaño localizado en el cromosoma 7.

- **Estrategia del gen candidato:** la caracterización de una región cromosómica hace que aparezcan varios genes de función desconocida. Si un gen de interés es mapeado en esa región, estas secuencias pasan a ser «candidatas». Para cada una de ellas, o para la más probable, de acuerdo al análisis de secuencia, se diseñan experimentos tendientes a determinar en cuales tejidos se expresa, en qué condiciones, etc., utilizando Northern blot o RT-PCR. Si el patrón de expresión encontrado coincide con el patrón esperado es altamente probable que hayamos encontrado el gen de interés. El experimento ideal para confirmar esto, sería la transformación de un individuo mutante para esta función con el gen normal. Si se produce la reversión del fenotipo mutante (**complementación**), tendremos la prueba irrefutable de que estamos frente al gen buscado.

- **Genes con patrones complejos de herencia:** no todos los genes muestran patrones simples de herencia. Puede suceder que:

- La **variación fenotípica sea cuantitativa**, como peso o altura. Este tipo de variación se debe a la interacción acumulativa entre alelos + y – de varios genes y el ambiente.

La disponibilidad de miles de marcadores moleculares como los SSLP, dispuestos a lo largo del cromosoma, ha posibilitado el mapeo de algunos de estos genes que contribuyen a la variación cuantitativa cuyos loci son llamados **QTL** (*quantitative trait loci*) (Parte I, Cap. 5 y 6). Para abordar este problema, se buscan dos tipos de líneas que muestren fenotipos contrastantes para un carácter cuantitativo y se cruzan para generar descendencia homocigota que contenga solo un segmento o un pequeño número de segmentos de una de las líneas. Estos individuos pueden caracterizarse por su fenotipo y puede estimarse la contribución de los segmentos específicos a la variación observada. Los SNP (polimorfismos de un nucleótido simple) aceleran el mapeo de caracteres complejos.

4 Análisis funcional de los genes

Una vez secuenciado el genoma completo pueden identificarse la mayoría de los genes de una especie. Restaría entonces determinar cuál es la **función** de cada uno de ellos y cómo interaccionan para definir un fenotipo determinado. La **genómica funcional** intenta resolver esta cuestión a través del estudio de:

- **El transcriptoma:** se refiere al estudio de los **perfiles de expresión de todos los genes presentes en el genoma**. Para ello se extraen todos los ARNm contenidos en una célula, tejido u órgano en un determinado momento de desarrollo o situación fisiológica. El método más utilizado es el de micromatrices de ADN, que permite analizar simultáneamente la expresión de miles de genes, pudiéndose disponer entre 5000-50.000 genes (ESTs, ADNc, oligonucleótidos) sobre un portaobjetos utilizando un sistema robotizado. Sobre este *chip* de ADN se realizan experimentos de hibridación con muestras marcadas radiactivamente o con fluoróforos apropiados, y los resultados se cuantifican mediante análisis con *phosphorimager* o microscopía confocal. De esta manera se pueden identificar, de forma simultánea, los patrones de expresión de miles de genes en un momento del desarrollo o en respuesta a diferentes estímulos ambientales. El análisis bioinformático de estos datos permite asociar grupos de genes que se expresan de forma coordinada y proporciona información importante sobre la función de los mismos (Parte I, Cap. 8).

- **El proteoma:** comprende el **conjunto total de proteínas expresadas por un genoma completo**, incluyendo las modificadas después de la traducción. El estudio del transcriptoma debe ser complementado con el análisis de las proteínas codificadas por los transcritos, puesto que estas macromoléculas están al final de la ruta de expresión génica. El método más utilizado para estudiar la abundancia relativa de cientos de proteínas es la electroforesis bidimensional en geles de poliacrilamida (2DPAGE), que permite separar con gran resolución la mayoría de los polipéptidos celulares combinando de forma secuencial diferencias en carga y en masa molecular. Utilizando sistemas computarizados de análisis de imagen

se seleccionan las proteínas cuya abundancia relativa cambia durante el desarrollo o en respuesta a diferentes estímulos ambientales (Parte I, Cap.9).

- **El metaboloma:** comprende el **conjunto total de metabolitos de una célula**. En plantas, el metabolismo secundario (reacciones que no son vitales para el individuo y que conducen a la producción de compuestos que a veces ayudan a su supervivencia, como por ejemplo antraquinonas, alcaloides, digoxina, taumatina, vainillina, menta, etc.) produce una enorme variedad de compuestos diferentes. Se han identificado más de 40.000 y se estima que aún quedan por descubrir alrededor de 100.000. Los investigadores que trabajan en este nuevo campo de la química aplicada a la biología (metabolómica) consideran que sólo de esta forma se podría definir, en términos moleculares, un fenotipo concreto. En metabolómica se emplean herramientas analíticas muy sensibles (tales como espectrometría de masa, cromatografía líquida o gaseosa y resonancia magnética nuclear) para analizar los cambios metabólicos provocados por mutaciones génicas o por la expresión de transgenes. La metabolómica puede ser aplicada al monitoreo de estreses inducidos, para identificar pasos metabólicos limitantes, para el análisis de mutantes y hasta para realizar la evaluación de manejos agronómicos, tales como el efecto de fertilizantes sobre el metabolismo, etc. (Parte I, Cap. 10).

- **La bioinformática** intenta dar sentido a la información derivada de las técnicas anteriormente descritas. La importancia de esta ciencia resulta obvia cuando se considera que los genomas poseen miles de millones de pares de bases (Parte I, cap. 12).

5 Modelos

El mapeo comparativo ha demostrado que **la organización de los genes dentro de los genomas ha permanecido muy conservada** a través de la evolución, existiendo estrechas relaciones de **colinearidad** entre los genomas de casi todas las gramíneas cultivadas, entre las solanáceas, entre las brassicáceas cultivadas y *Arabidopsis*, entre los pinos, rosáceas y varias leguminosas. Por ello, teniendo

en cuenta la envergadura de un proyecto de secuenciado, los emprendimientos genómicos tomaron especies modelo, representativas de un genoma vegetal. El primer modelo vegetal fue una dicotiledónea, *Arabidopsis thaliana*. Le siguió una monocotiledónea, el arroz, cuyo genoma es seis veces menor que el del maíz y 37 veces menor que el del trigo. El estudio de estas dos especies permitirá arribar a conocimientos clave para el mejoramiento vegetal.

Arabidopsis thaliana es una dicotiledónea que **posee uno de los genomas vegetales más pequeños**. Carece de importancia económica pero resulta ser un excelente organismo para la investigación puesto que es fácil de transformar y su ciclo de vida tarda sólo 7 semanas, de semilla a semilla. Alrededor de 12.000 científicos trabajan coordinadamente en esta pequeña planta, conformando el más avanzado sistema de experimentos en biología vegetal del mundo. Su secuencia genética es de libre acceso en el sitio <http://www.arabidopsis.org>. En un artículo publicado en Nature (2000) se analiza el genoma de *Arabidopsis* a partir de las 115.4 megabases secuenciadas (de un total de 125). Su evolución involucró una duplicación completa del genoma, seguida por una subsecuente pérdida y duplicación de genes, lo cual dio origen a un genoma dinámico, enriquecido por una transferencia lateral de genes de cianobacterias. Contiene 25.498 genes que codifican para 11.000 familias de proteínas, con una diversidad funcional similar a la encontrada en *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans*. *Arabidopsis* posee varias familias de proteínas nuevas pero carece de otras comunes, indicando que los grupos proteicos en común han experimentado una expansión y contracción en estos tres grupos eucariotas.

El genoma de arroz está compuesto por 19 bloques génicos que, reordenados como “*bloques de Lego*”, permiten reconstruir el genoma de las *Tritáceas*, maíz, *Setaria*, caña de azúcar y sorgo (**Fig. 6**). Considerados como una unidad genética representarían el genoma ancestral de las gramíneas, el cual tendría un único par de cromosomas.

La familia de las gramíneas es probablemente la mejor caracterizada en este aspecto, contando con una buena cantidad de *mapas*

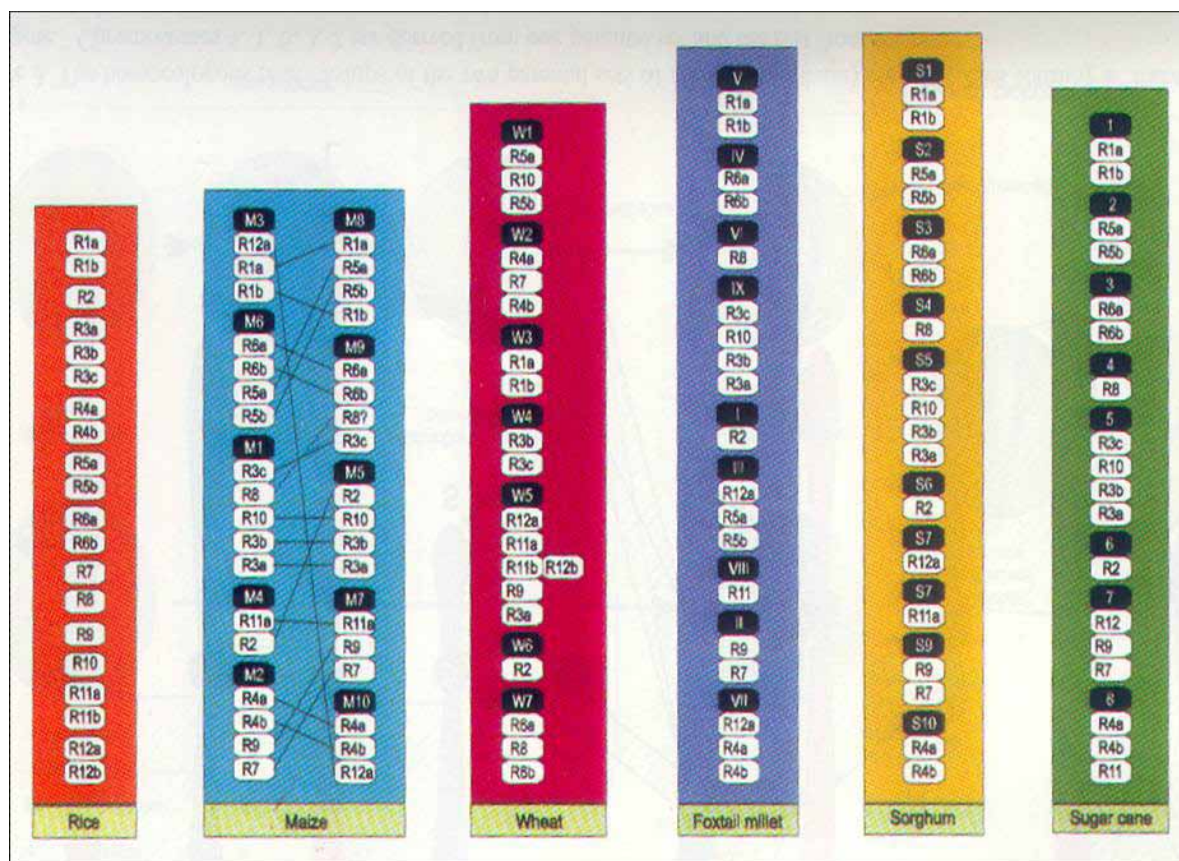


Figura 6: El genoma de arroz está compuesto por 19 bloques génicos que, reordenados como «bloques de Lego», permiten reconstruir el genoma de las *Triticeas*, maíz, *Setaria*, caña de azúcar y sorgo. Estos bloques, considerados como una unidad genética, representarían el genoma ancestral de las gramíneas, el cual tendría un único par de cromosomas.

genéticos comparativos que demuestran las relaciones interespecíficas (Fig. 7). En términos genéticos, las gramíneas representan una familia muy diversa. Se estima que el genoma de las mismas divergió hace alrededor de 65 millones de años desde un antecesor común. El nivel de ploidía y el número básico de cromosomas son muy variables, así como el tamaño del genoma.

6 Algunas generalizaciones acerca de los genomas

Los estudios en especies modelo han permitido arribar a varias generalizaciones. Una de ellas es que **el número de genes no es la base de la complejidad**. La mosca de la fruta tiene unos 13.000 genes, *Caenorhabditis elegans* 18.000, *Arabidopsis* 26.000 y los humanos 30.000. Si el número de genes no es

muy diferente entre estas especies, ¿cuál es la base de la mayor complejidad en los humanos? La explicación estaría en el proteoma, más que en el genoma. Las proteínas codificadas por los genes pueden agruparse en familias en base a su similitud y muchas de estas familias proteicas son compartidas por todos los grupos mencionados, aunque el número de miembros por familia es mayor en humanos.

Esto es particularmente evidente en aquellos genes involucrados en el desarrollo. Los humanos tenemos 30 genes para factores de crecimiento del fibroblasto, mientras que *Drosophila* y *Caenorhabditis elegans* tienen 2. Las nuevas proteínas surgen a través de cortes y empalmes alternativos de un mismo ARN mensajero (*alternative splicing*), lo que permite aumentar considerablemente la diversidad proteica a partir de los mismos mensajes. Las

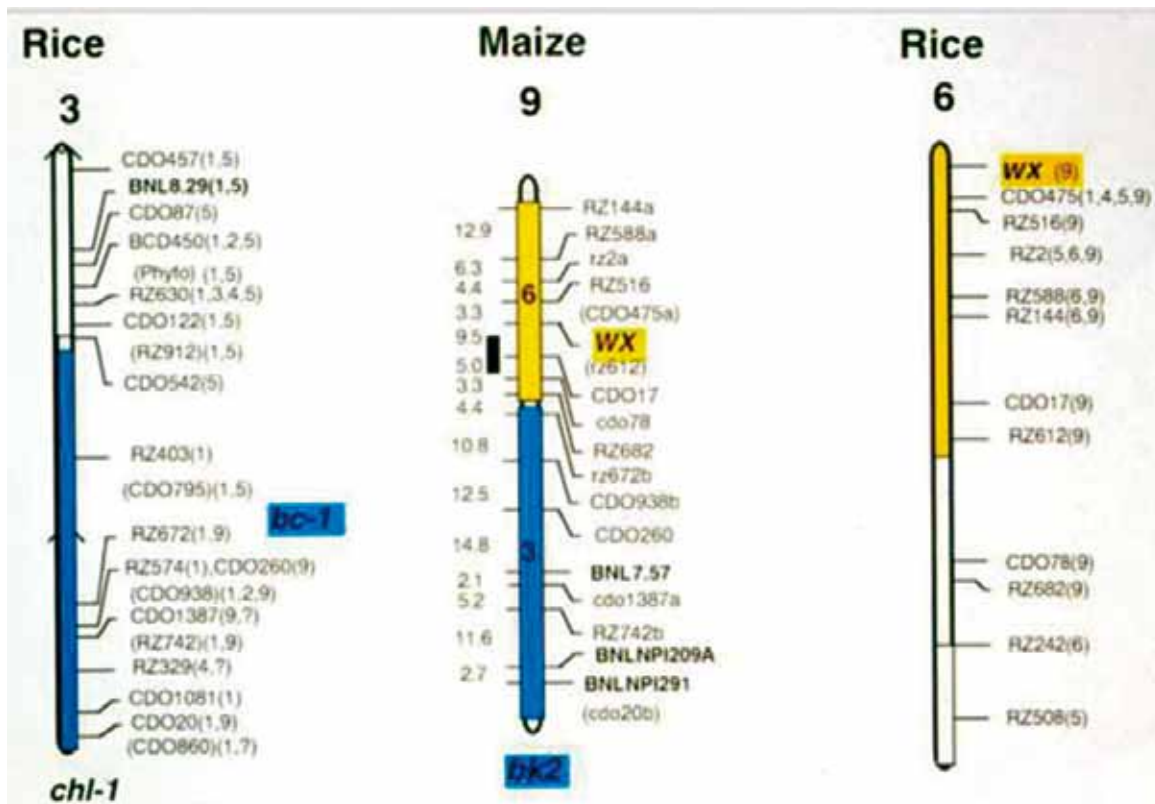


Figura 7: Alineamiento de cromosomas de arroz (3, 6) y maíz (9).

predicciones indican que el 60% de los genes humanos tiene dos o más alternativas de empalme. En *Caenorhabditis* el 22%.

Un elevado número de factores de transcripción y modificaciones postraduccionales también conducen a una mayor complejidad. En el caso de *Arabidopsis*, cerca del 9% de los genes son factores de transcripción (FT). Si se compara la proporción con los genomas de otras especies, se observa que *Arabidopsis* no sólo tiene más genes que algunos animales pequeños, sino que la proporción de FT es más alta que en cualquier clase de organismo estudiado. Esto parece reflejar el hecho de que las plantas deben adaptarse a una amplia variedad de condiciones medioambientales, a diferencia de los animales, que pueden movilizarse y cambiar de lugar si este no les resulta propicio.

En humanos, los genes ocupan una cuarta parte del genoma, y sólo el 1,5% codifica para proteínas. Las secuencias correspondientes a

los exones (secuencias del mensajero que se encuentran representadas en la proteína, las secuencias correspondientes a los intrones no lo están) comprenden un porcentaje bajo del genoma, mientras que los intrones comprenden el 24%. Los genes no están distribuidos en forma pareja. Algunos se encuentran agrupados en ciertas regiones del genoma mientras que otros se encuentran aislados. En la mosca, el nematodo y *Arabidopsis* la disposición de los genes es mucho más regular.

Aproximadamente **la mitad del genoma humano consiste de secuencias repetitivas**, siendo la mayoría **elementos transponibles** que se propagan replicándose e insertando una copia de sí mismos en otras regiones del genoma. En la actualidad solo dos tipos de elementos son activos, Alu y LINE1. La mayoría de los mismos se encuentran en regiones ricas en A y T, mientras que los genes se encuentran en áreas con elevado contenido de G y C. Fragmentos de estos elementos también

se encontraron en las secuencias regulatorias que controlan la expresión de varios genes, por lo que se ha sugerido que, de alguna manera, podrían afectar positivamente su expresión y evolución.

Los genomas vegetales también están plagados de secuencias repetitivas (transposones y retrotransposones), que constituyen un porcentaje muy importante del ADN nuclear y han contribuido, a lo largo de la evolución, a la expansión de los genomas. En maíz representan del 50 al 80% del genoma y en trigo el 80% (**Fig. 8**). De esta manera los genomas de los cereales pueden considerarse como islas de genes que se hallan dispersas en un mar de secuencias repetitivas.

7 Genómica y Agricultura

Especialistas en varias disciplinas han llegado a la conclusión de que el alcance de la genómica será mayor en lo que se refiere a la economía y la calidad de vida que en el ámbito de la salud humana. Gracias al aporte de grupos de investigación de todo el mundo se dispone de bases de datos públicas con información genómica de utilidad para los mejoradores. El conocimiento de cómo actúan los genes en una especie puede ayudar a los mejoradores a perfeccionar su función en otra. Las secuencias de los genomas de *Arabidopsis* y de arroz proporcionan información relevante acerca de otros cultivos, como el maíz y el trigo. Dado que estos tres cereales representan

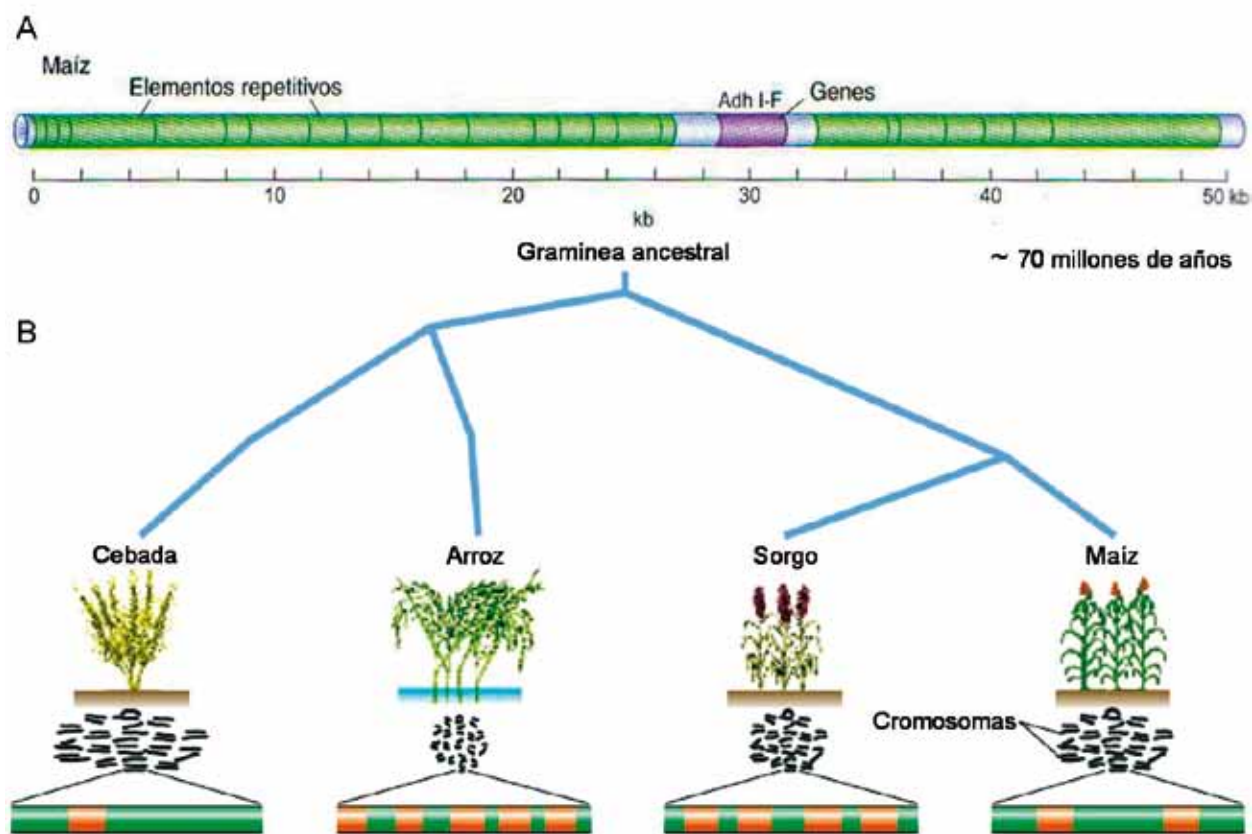


Figura 8: a) Elementos repetitivos en un fragmento cromosómico de maíz. b) Diagrama que muestra como los elementos transponibles en gramíneas son responsables del incremento en el tamaño del genoma. El arroz, sorgo, cebada y maíz derivaron de un ancestro común hace aproximadamente 70 millones de años. Desde entonces, los transposones y retrotransposones se han ido acumulando a diferentes niveles en las especies. Los cromosomas son más largos en maíz y cebada, cuyos genomas contienen grandes cantidades de retros con LTR (long terminal repeats). En verde se señalan los elementos transponibles y en naranja los genes. Modificada de Griffiths *et al.* (2000).

más de la mitad de la producción alimentaria mundial y que el arroz es el alimento básico de más de la mitad de la población del planeta, la trascendencia de la genómica en la agricultura es indiscutible.

La similitud entre las especies de cereales también implica que cuando se trasladan genes de una especie a otra, tenderán a funcionar bien y en la misma forma con una mínima manipulación genética.

A través de esfuerzos públicos y privados se trabaja en la identificación de genes asociados con caracteres como rendimiento, resistencia a la sequía, calidad de los alimentos, resistencia a insectos y tolerancia a herbicidas.

De esta manera se ha acelerado significativamente el aporte de nuevas variedades al mercado, ya sea por modificación genética o por selección con marcadores moleculares o utilizando criterios de selección a partir de la información molecular.

La **genómica comparativa**, basada en el análisis de ESTs de diferentes plantas tolerantes a estreses abióticos, ha permitido la identificación de redes de genes comunes asociados con estreses ambientales, tales como salinidad, sequía, bajas y altas temperaturas. El análisis de especies tolerantes a situaciones extremas ha identificado genes involucrados en los mecanismos que las hacen tolerantes. Dichos genes podrán entonces ser transferidos a especies de cultivo.

Como ejemplos pueden citarse *Agrostis adamsonii* y *Agrostis robusta*, tolerantes a salinidad, *Microlaena stipoides*, tolerante a aluminio y *Deschampsia antarctica*, tolerante a bajas temperaturas (la única gramínea que crece en la Antártida) (**Fig. 9**).

También se ha mencionado que los factores de transcripción serían las “llaves” para desbloquear funciones génicas que aprovechen la diversidad de la naturaleza para producir mejo-

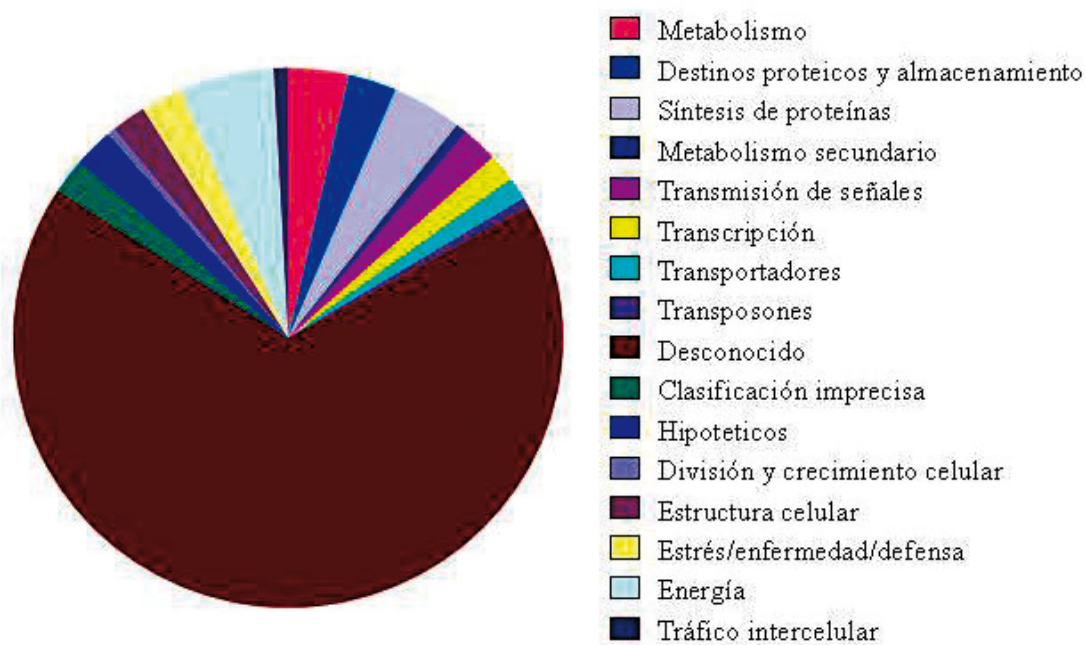


Figura 9: Categorización funcional de ESTs de *Deschampsia antarctica*. El objetivo de este proyecto es encontrar genes involucrados en la resistencia a bajas temperaturas para ser transferidos, por tecnología génica, a especies de cultivo. Gentileza de G. Spangenberg.

res cultivos. Estos son genes que virtualmente controlan todo carácter importante, desde el punto de vista agrícola, en las plantas, incluyendo rendimiento, resistencia a las enfermedades, protección contra las heladas y sequía, producción de químicos, proteínas usadas en farmacéutica, etc. La mayoría de los caracteres vegetales a los que interesa aplicar la ingeniería genética son multigénicos (ej. tolerancia al estrés hídrico) y los genes involucrados se expresan en cascadas de forma tal que genes primarios activan a genes secundarios que a su vez activan a genes terciarios. Los factores de transcripción serían los responsables de hacer funcionar a los genes primarios, obteniéndose largas cascadas de expresión de genes por la manipulación de un solo gen.

Durante los últimos años se ha obtenido una gran colección de FT de plantas, funcionalmente caracterizados, no sólo en *Arabidopsis*, sino también en especies como tomate, maíz y soja. En total hay cerca de 1900 FT en *Arabidopsis* pero en el contexto de la **genómica funcional** el interés recae en unas 60 familias que tienen funciones reconocidas. La herramienta primaria que se utiliza para conocer la función de los FT consiste en sobreexpresarlos y/o detener la expresión de algunos de ellos. Se puede, por ejemplo, medir el efecto de cada FT en la composición de los lípidos en las semillas aceiteras y la composición de lípidos en las hojas, la composición de azúcares, de esteroides, etc., estudiar procesos básicos, a través de la dilucidación de sus efectos en el desarrollo vegetal y la resistencia a las enfermedades, o tratar de identificar el FT que regula el consumo de nitrógeno (N). El N es uno de los insumos más costosos para la agricultura, por lo que identificar los genes que controlan y modifican la respuesta al N sería de gran valor.

También existen proyectos genómicos relacionados con leguminosas y con sus simbiontes fijadores de nitrógeno. Recientemente se han secuenciado los genomas de las especies de *Mesorhizobium* y *Sinorhizobium* y se han producido cientos de miles de EST de *Medicago truncatula*, *Lotus corniculatus* y soja. En el caso de *M. truncatula* no sólo se han disectado los pasos que controlan las señales entre la

bacteria fijadora y la planta sino también entre la planta y otro simbiote, las micorrizas (asociación de un hongo con la raíz de una planta superior. Esta asociación no es específica de especie como el caso de *Rhizobium* y las leguminosas. El hongo puede ser de varios géneros y aporta fósforo a la planta). Recientemente se logró la identificación, en alfalfa, de un receptor requerido para el reconocimiento de señales bacterianas de nodulación, los llamados factores NOD.

Las plantas medicinales aportan el 25% de los compuestos activos utilizados actualmente por la industria farmacéutica. Entre estos compuestos se encuentran los citocromos P450, que participan en la biosíntesis de muchos compuestos anticancerígenos, alcaloides, fitoesteroides, antioxidantes y antimicrobianos. También tienen un rol muy importante en la detoxificación de xenobióticos (herbicidas y pesticidas). Se han identificado 1052 citocromos P450 y el objetivo actual es, utilizando herramientas de metabolómica, determinar su función bioquímica precisa.

Otro de los objetivos de la metabolómica es el estudio de la síntesis de las esencias que confieren perfume a las flores y el mejoramiento del sabor de algunas plantas utilizadas en alimentación humana, como por ejemplo mandioca, donde el objetivo sería la eliminación de los glucósidos cianogénicos que le confieren sabor amargo.

La devastación de los bosques es motivo suficiente para invertir en proyectos de genómica tendientes a la identificación de genes involucrados en perennidad, desarrollo, interacción con herbívoros, respuesta a estrés y síntesis de metabolitos secundarios como lignina y celulosa. Se han generado ESTs de álamo, abedul, abeto, pino y eucaliptos. El álamo se utiliza como sistema modelo para el análisis de los genes involucrados en la formación de madera. Otro objetivo en este campo es la búsqueda de estrategias para inducir floración temprana, que es un factor crítico en el mejoramiento de forestales.

La secuenciación de los genes y la dilucidación de las vías que controlan la floración en los cereales, que difiere en varios aspectos con los correspondientes en *Arabidopsis*, ha sido

otro de los logros de la genómica. También se localizaron y caracterizaron, en trigo y cebada, los genes *VRN1* y *VRN2*, que son los genes centrales en la vía de vernalización en trigo, cebada y otros cereales invernales. Este conocimiento es clave en agricultura, ya que permitiría, potencialmente, controlar la floración en cultivos de gran importancia económica, como los cereales y los forrajes.

8 Aportes de la genómica al mejoramiento de cereales

El trigo pan (*Triticum aestivum* L. $2n=6x=42$; AABBDD) es uno de los principales cultivos alimenticios ya que provee cerca del 55% de los carbohidratos consumidos por el hombre. La genética de este cultivo resulta compleja, es de naturaleza hexaploide, con tres genomas homeólogos denominados A, B y D que aportan 7 pares de cromosomas cada uno. Los genes redundantes son una norma, con sets homoalélicos triplicados en la mayoría de ellos. El genoma del trigo hexaploide es el de mayor tamaño (17000 Mbp trigo, 2800 Mbp maíz, 800 Mbp sorgo, 450 Mbp arroz). Más del 80% del mismo está constituido por secuencias de ADN altamente repetitivo. El restante 20% está compuesto por secuencias de bajo número de copias o copia única, donde se encuentran la mayoría de los genes. Si bien las secuencias altamente repetitivas varían de especie en especie, las secuencias génicas, en general, son conservadas. Esta característica permite el uso de **sondas heterólogas** (de otros genomas) en experimentos de hibridación de tipo RFLP (Parte I, Cap. 5) para identificar secuencias conservadas en especies diferentes dentro de una misma familia taxonómica (Devos y Gale, 2000).

En 1989 se publicó el primer mapa genético molecular de trigo, correspondiente a los cromosomas homeólogos del grupo 7, observándose que el orden de los genes y marcadores se conserva en gran parte de los tres genomas de trigo hexaploide. Esta fue la primera prueba de colinearidad en gramíneas y permitió el desarrollo de la genética comparativa en cereales.

En trabajos posteriores se comprobó que largos segmentos de los cromosomas de

maíz, sorgo, arroz, trigo y cebada conservan la presencia y el orden de marcadores y genes, aunque en algunos casos la correspondencia cromosómica fue modificada por duplicaciones, inversiones o translocaciones. De esta manera se logró consensuar un mapa unificado de gramíneas en el que se detallan secuencias y genes conservados en diferentes genomas (**Fig. 2**). Utilizando estas herramientas fue posible transferir información proveniente de plantas de genomas pequeños (arroz, sorgo) a plantas de genomas más complejos como el trigo. Esto ha facilitado la localización más precisa de genes para tolerancia a estrés biótico y abiótico (prebrotado, dormición, vernalización, frío y otros) y el desarrollo de marcadores útiles para el mejoramiento. También ha conducido a la obtención de mapas consenso específicos para trigo pan, candeal, maíz y cebada.

Las nuevas técnicas de genómica funcional, epigenética, mapeo por asociación, "TILLING" y los ARN interferentes (ARNi), entre otras, contribuirán a un mayor conocimiento del funcionamiento del genoma de este cereal. Existen genotecas de BACs/BIBACs para todos los genomas de trigo. Estas representan un importante complemento para saturar los mapas.

En los últimos años fueron confeccionado numerosos mapas genéticos de trigo pan, candeal y cebada a partir de poblaciones de RILs (líneas recombinantes endocriadas) o haploides duplicados, que resultan útiles en estudios de identificación de QTL asociados a calidad y estreses bióticos (enfermedades) y abióticos (sequía, salinidad). Para ello se utilizaron y desarrollaron miles de marcadores moleculares, incluyendo RFLPs, SSRs, AFLPs, SNPs, y marcadores DArT (*Diversity array technology*), (estos últimos basados en matrices de diversidad). La información generada permitió el desarrollo de marcadores perfectos, a partir de la secuencia del gen a seleccionar, en lugar de marcadores genéticamente ligados. Como ejemplo pueden citarse los genes de las enzimas polifenol oxidasas, lipoxigenasas y fitoeno sintasa, entre otros. También permitió la confección de mapas consenso para trigo pan, candeal y cebada.

El acceso a los principales genes que afectan la calidad ha abierto nuevas vías para el desarrollo comercial de diferentes productos derivados del trigo. Es posible obtener variedades con diferente calidad de almidón, diferente textura de grano, diferente composición de gluteninas, gliadinas y secalinas en función del uso industrial. El descubrimiento de genes valiosos de otros genomas y la posibilidad de incorporarlos al trigo por transgénesis permitirán resolver problemas del cultivo, como pueden ser limitantes debido a estreses bióticos y abióticos o desarrollar nuevas generaciones de transgénicos en función de las necesidades del consumidor, con mayor contenido de aminoácidos esenciales como la lisina, vitaminas, etc.

La complejidad del genoma del trigo ha hecho aconsejable abordar los estudios genómicos a través del transcriptoma. Para ello se han establecido consorcios internacionales como el International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC) o el International Triticeae Mapping Initiative (ITMI), el cual coordina grupos de investigación de distintos países en la construcción de mapas moleculares del genoma de trigo. Existe colaboración internacional para otros cultivos como el arroz, donde el Internacional Rice Genome Sequencing Project (IRGSP) coordina esfuerzos de 10 países y como resultado de esto, en 2002, fueron colocadas en bases de datos públicas secuencias de alta calidad que representaban 366 Mbp del genoma de arroz. En el 2005 se llegó a 371 Mbp, que representan el 95% del mismo. Las bases de datos de EST han crecido exponencialmente en la última década, de manera que en Septiembre de 2008 había 55 millones de ESTs depositadas en el National Center for Biotechnology Information dbEST database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST>). Esto incluye cerca de 1.607.934 de ESTs de trigo hexaploide y sus parientes más cercanos de la tribu Triticeae, que son *Hordeum vulgare* L.; especies diploides y tetraploides de *Triticum*, *Secale cereale* L. y *Aegilops speltoides* Tausch. Estas ESTs se utilizan para el desarrollo de marcadores funcionales, la preparación de mapas de transcritos y la construcción de matrices de ADNc. Actualmente el estudio de ARN interferentes, TILLING y la “genética de expresión” lideran el mapeo de eQTL (*Quantitative*

Traits Loci de expresión) y han sido utilizados para identificar funciones de genes individuales.

Toda esta información permite inferir que la biotecnología puede cambiar el escenario de los cereales en dos áreas principales: (1) protegiendo al cultivo de estreses bióticos y abióticos y (2) modificando el concepto de producción de «commodities» por el de producción de «specialities», por ejemplo para derivados de trigo con mayor valor agregado, como noodles (clase de fideo muy utilizado en Asia), galletitas dulces, crackers (un tipo de galletita que se rompe fácilmente), masa congelada, pan de molde, pasta, almidones, plásticos biodegradables, etc.

Se han identificado cinco áreas de investigación a desarrollar en los próximos años para el mejoramiento de trigo, que pueden aplicarse a los cereales en general: (i) mapeo genético, (ii) análisis de QTL, (iii) mejoramiento molecular, (iv) mapeo por asociación, y (v) desarrollo de software.

9 Genomas trabajadores

La genómica aplicada a dilucidar los mecanismos por los cuales funcionan los microorganismos puede conducir al aislamiento de sus componentes para desarrollar nanoestructuras que lleven a cabo funciones complejas. Como ejemplos pueden citarse:

Methanococcus jannaschii: es una bacteria que produce metano, una importante fuente de energía. Contiene enzimas que soportan temperaturas y presiones elevadas por lo que son potencialmente útiles para fines industriales.

Deinococcus radiodurans: soporta niveles de radiación extremadamente elevados por lo cual tiene un alto potencial para limpiar desechos radiactivos.

Thalassiosira pseudonana: se trata de una diatomea marina que es la principal participante en el bombeo biológico de carbono hacia las profundidades de los océanos, por lo que posee un elevado potencial para mitigar los cambios climáticos del planeta.

10 Proyectos de Genómica en Sudamérica

En Sudamérica se han desarrollado y se encuentran en ejecución algunos proyectos genómicos. Frente al estado del desarrollo de

estas áreas en el mundo, existen en la región serias carencias, tanto de recursos humanos entrenados como de infraestructura y equipamiento. En Brasil se estableció una red de cooperación que secuenció completamente el genoma de *Xylella fastidiosa*, bacteria que ataca a los cítricos causando importantes pérdidas económicas. También incursionó en el estudio de genómica funcional de células cancerosas y de secuenciación del genoma de caña de azúcar, *Saccharum officinalis*. En Argentina se ha trabajado en la secuenciación de *Brucella abortus*, agente causal de la brucelosis bovina.

Investigadores argentinos participan también en proyectos de genómica en cooperaciones internacionales, como el consorcio involucrado en la secuenciación del genoma de *Trypanosoma cruzi*, el proyecto que llevó a la clonación y caracterización de los genes de vernalización en trigo o el proyecto de búsqueda de genes de tolerancia a frío en *Deschampsia antarctica*. En Chile se ha completado recientemente la secuenciación de *Piscirickettsia salmonis*, patógeno intracelular de salmones que causa importantes pérdidas en esta industria. También se trabaja activamente en especies hortícolas, principalmente frutales.

Otros ejemplos son el desarrollo de **marcadores microsatélites** (Parte I, Cap. 5) de diversas especies, como girasol (colaboración de INTA-Argentina con empresas semilleras locales), vides (INIA-Chile como parte de un consorcio internacional), alpacas y otros camélidos sudamericanos (INIA-Chile), pasto llorón (CERZOS, UNR, INTA Castelar), entre otros. El girasol es una especie de importancia económica en la Argentina y es el eje de varios proyectos genómicos. Algunos de los objetivos son la caracterización de la diversidad funcional del girasol y la identificación de SNPs asociados a caracteres agronómicos de importancia como la resistencia a estreses bióticos y abióticos. Por otro lado, el desarrollo de marcadores microsatélites, ESTs y el mapeo genético de las mismas es utilizado para asistir al mejoramiento y realizar identificación varietal.

En Chile se ha desarrollado un programa de genómica funcional coordinado por diversos ministerios, destinado a enfrentar problemas de postcosecha y enfermedades en plantas de

interés agrícola. Otro proyecto de genómica, en este mismo país, apunta a desarrollar plataformas tecnológicas en genómica forestal con el objeto de mejorar la posición competitiva del sector forestal chileno.

En el marco del Programa Cooperativo para el Desarrollo Tecnológico Agroalimentario y Agroindustrial del Cono Sur (PROCISUR), los Institutos Nacionales de Investigación Agropecuaria de Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay han conformado una plataforma regional para enfrentar los desafíos que impone la secuenciación del genoma de la papa. Esta iniciativa es desarrollada a nivel mundial por el Consorcio Internacional de Secuenciación del Genoma de la Papa, que lidera la Universidad de Wageningen de Holanda y en la que están comprometidos China, Estados Unidos, Holanda, India, Inglaterra, Irlanda, Nueva Zelanda, Polonia, Rusia y los sudamericanos Chile, Perú, Argentina y Brasil. Estos últimos, en conjunto, secuenciarán el cromosoma 3 del genoma de la papa y en total se deberán secuenciar los 12 cromosomas de la especie.

En varios países se han secuenciado fragmentos de genomas de virus y viroides (Argentina, Chile, Uruguay). En Argentina se está realizando la caracterización biológica y molecular del virus del mal de Río Cuarto (MRCV) con el fin de estimar la diversidad genética de las poblaciones del virus, detectar la existencia de razas y limitar la propagación de esta enfermedad de importancia para el maíz.

En el año 2003 la Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica de Argentina (ANPCyT) lanzó una convocatoria para Proyectos de Área de Vacancia (PAV), donde la genómica era una de las prioridades. En respuesta a esta convocatoria se formó una Red de laboratorios dedicados al análisis genómico funcional y comparativo en especies de interés agropecuario, forestal o ambiental (PAV137). Los objetivos fueron generar una infraestructura operativa y comunicacional adecuada y formar recursos humanos necesarios para apoyar el desarrollo de iniciativas e investigaciones en áreas de genómica funcional y bioinformática críticas para la biología agropecuaria, forestal y ambiental. La red pudo capa-

citar recursos humanos orientados a la búsqueda, prospección y/o análisis funcional de genes con interés básico o aplicado. Se abordaron cinco áreas de desarrollo e integración: a) transcriptómica, b) proteómica, interactómica y metabolómica, c) genómica comparativa, d) genómica evolutiva para la caracterización de la diversidad genética y e) ecogenómica (aplicada a la evaluación de impacto ambiental) y epidemiología molecular. En los dos primeros subproyectos se encararon trabajos de prospección y caracterización funcional de regiones genómicas de interés en plantas superiores y bacterias zoonóticas mediante el análisis de perfiles de transcripción, interacción de proteínas y perfiles metabólicos (girasol, citrus, soja, solanáceas, *Mycobacterium* y otros). En el c) se caracterizaron molecularmente regiones genómicas involucradas en características reproductivas (apomixis) de especies forrajeras, de resistencia a estreses en especies cultivadas, así como de características productivas en girasol y caprinos. El área d) sirvió para evaluar la diversidad genética de recursos biológicos naturales o cultivados, en particular en especies leguminosas y en forestales. La e) permitió estudiar la dinámica poblacional de variantes alélicas en ecosistemas (impacto del cultivo de maíces transgénicos en potenciales genes de resistencia en insectos plaga, cuantificación de diversidad genética de especies en peligro de extinción en ecosistemas naturales explotados por el hombre) y encarar la epidemiología molecular de la fiebre aftosa y de la peste porcina clásica.

Este proyecto acaba de finalizar (septiembre de 2008) y, si bien aún no se ha realizado la evaluación final del mismo, varios de los objetivos fueron cumplidos exitosamente, ya que se formaron varios doctores en el área en distintas Universidades del país, entrenados para trabajar en equipos multidisciplinarios, además de lograr avances en el conocimiento en las mencionadas áreas.

El INIA (Uruguay) cuenta con proyectos de desarrollo y validación de herramientas bioinformáticas para integrar información genómica en programas de fitomejoramiento y selección de germoplasma. Dentro de los proyectos de genómica de arroz, el EMBRAPA (Brasil), rea-

liza el estudio de genes y sus productos, involucrados en los mecanismos moleculares de susceptibilidad y resistencia a estreses bióticos, a través de estudios de genómica funcional, utilizando ESTs y unigenes y micromatrices de ADNc.

Los objetivos para programas de genómica sudamericanos deberían enfocarse hacia el aumento de la productividad y la mejora de la calidad de los productos, desarrollando capacidades para identificar genes del germoplasma regional, de manera de disminuir la dependencia de variedades y genes desarrollados y aislados por países del primer mundo y buscar soluciones para problemas propios de la región, que difícilmente pueden ser enfrentados por programas de mejoramiento genético ajenos a la misma.

11 Lecturas / sitios recomendados

- Cenci A., Chantret N., Xy K., Gu Y., Anderson O.D., Fahima T., Distelfeld A. Y Dubcovsky J. 2003. Construction and characterization of a half million clones Bacterial Artificial Chromosome (BAC) library of durum wheat. *Theor Appl Genet* 107: 931-939.
- Cervigni G., Paniego N., Díaz M., Selva J.P., Zapacosta D., Zanazzi D., Landerreche I., Felitti S., Pessino S., Spangenberg G. And Echenique V. 2008. Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Molecular Biology*. 67: 1-10.
- Devos K.M Y Gale M.D. 2000. Genome relationship: the grass model in current research. *Plant Cell* 12: 637-646
- Echenique V., Stamova B., Wolters P., Lazo G., Carollo V. Y Dubcovsky J. 2002. Frequencies of Ty1-copia and Ty3-gypsy retroelements within the *Triticeae* EST databases. *Theor. Appl. Genet.* 104: 840-844.
- Gale M. Y Devos K. 1998. Plant comparative genetics after 10 years. *Science*, 282: 656-658.
- Gibson D.G., Benders G.A., Andrews-Pfannkoch C., Denisova E.A., Baden-Tillson H., Zaveri J., Stockwell T.B., Brownley A., Thomas D.W., Algire M.A., Merryman C., Young L., Noskov V.N., Glass J.I., Venter J.C., Hutchison Iii C.A. Y Smith H.O. 2008. Complete chemical synthesis, assembly, and cloning of a *Mycoplasma genitalium* genome. *Science*, 319: 1215-1220.
- Glass J.I., Assad-Garcia N., Alperovich N., Yooseph

- S., Lewis M.R., Maruf M., Hutchison Iii C.A., Smith H.O. Y Venter J.C. 2005. Essential genes of a minimal bacterium. *Proc. Nat. Acad. Sci.* 103: 425-430.
- Goff S.A., Ricke D., Lan T.H., Presting G., Wang R., Dunn M., Glazebrook J., Sessions A., Oeller P., Varma H. *et al.* 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*). *Science*, 296: 92-100.
- Griffiths A., Miller J., Suzuki D., Lewontin R. Y Gelbart W. 2004. An introduction to genetic analysis. Octava Edición. W.H. Freeman, N.York. 860 pp.
- Gupta P.K., Mir R.R., Mohan A. And Kumar J. 2008. Wheat genomics: Present status and future prospects. *International Journal of Plant Genomics*. Article ID 896451, 36 pages. doi:10.1155/2008/896451
- Kumar A. Y Bennetzen J.L. 1999. Plant retrotransposon. *Annu Rev Genet* 33: 479-532.
- Lacadena J.R. 2000. Seréis como dioses. *Crítica (Madrid)*, 874: 12-16.
- Lartigue C., Glass J.I., Alperovich N., Pieper R., Parmar P.P., Hutchison Iii C.A., Smith H.O. Y Venter J.C. 2007. Genome transplantation in bacteria: changing one species to another. *Science* 317: 632-638.
- Moore G. 2000. Cereal chromosome structure, evolution and pairing. *Ann. Rev. Plant Mol. Biol.* 51: 195-222
- Sanmiguel P., Ramakrishna W., Bennetzen J.L., Busso C. Y Dubcovsky J. 2002. Transposable elements, genes and recombination in a 215 kb. contig from wheat chromosome 5A. *Functional and Integrative Genomics*. 2: 70-80.
- Wade C.M., Kulbokas E.J. Iii., Kirby A.W., Zody M.C., Mullikin J.C., Lander E.S., Lindblad-Toh K. Y Daly M.J. 2002. The mosaic structure of variation in the laboratory mouse genome. *Nature*, 420: 574-578.
- Warren R.L., Varabei D., Platt D., Huang X., Messina D., Yang S., Kronstad J.W., Krzywinski M., Warren W.C., Wallis J.W., Hillier L.W., Chinwalla A.T., Schein, J.E. Siddiqui A.S., Marra M.A., Wilson R.K., Y Jones S.J.M.. 2006. Physical map-assisted whole-genome shotgun sequence assemblies. *Genome Res.* 16: 768-775.
- Yu J., Hu S., Wang J., Wong G.K., Li S., Liu B., Deng Y., Dai L., Zhou Y., Zhang X. *Et Al.* 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *indica*). *Science*, 296: 79-92.
- The *Arabidopsis* Genome Initiative: Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. *Nature* 2000. 408: 796-815.

I CAPÍTULO 8

Transcriptómica

Silvina Felitti y Silvina Pessino

El análisis de los niveles de representación de ARN mensajeros proporciona información importante sobre la actividad de un gen, evidenciando si está siendo copiado para posteriormente dirigir la síntesis de la proteína a la cual codifica. En los últimos años los procedimientos para la detección de los niveles de ARN mensajeros han progresado velozmente desde el análisis de genes únicos específicos (como el Northern, slot, y dot blotting, la RT-PCR semicuantitativa y cuantitativa y los ensayos de protección de nucleasas) hacia otros enfocados en la identificación de múltiples transcritos que difieren en su representación entre las diversas muestras experimentales (como la hibridización substractiva, el display diferencial, el ADNc-AFLPs®, la secuenciación de etiquetas expresadas o ESTs, el análisis serial de la expresión de genes o SAGE y la hibridización de microarreglos). La organización posterior de las secuencias dentro de grupos funcionales basada en los datos de homología proporciona un marco básico para conducir nuevos estudios dirigidos a definir el rol biológico de cada producto génico. Por otra parte, la aplicación de técnicas de PCR en tiempo real y de hibridización *in situ* de tejidos permiten una validación más precisa de los datos de expresión diferencial obtenidos por métodos anteriormente citados.

La capacidad tecnológica creciente permite ahora capturar sectores de tejidos o incluso células aisladas y analizar su contenido de ARNm, lo que provee información específica sobre la representación del transcriptoma para tipos celulares únicos. La asociación de los datos provenientes de la secuenciación genómica con aquellos originados en la transcriptómica y la proteómica facilita la predicción de la existencia de fragmentos codificantes en sectores acotados del genoma, y da información sobre la posible función de los candidatos en tejidos particulares. Además, la asociación de los da-

tos de posición (originados en el mapeo genético) con los datos de expresión (originados en el análisis del transcriptoma) posibilita la selección de candidatos responsables de disparar un determinado carácter de interés.

Este capítulo tiene como objetivo presentar en forma abreviada una serie de metodologías que son utilizadas habitualmente para el análisis del transcriptoma de plantas. Debido al muy rápido cambio y perfeccionamiento en las técnicas empleadas para abordar el estudio de la representación de mensajeros tanto a nivel de mesada como bioinformático, algunas de las metodologías mencionadas aquí ya han sido reemplazadas y se usan actualmente en forma poco frecuente. Sin embargo hemos decidido incluirlas, dada su gran importancia histórica en relación al cambio de abordaje conceptual que va desde el análisis de la actividad de genes únicos al estudio integral de la expresión génica. Comenzaremos describiendo las técnicas en orden cronológico de desarrollo.

Hibridización substractiva

Los métodos de hibridización substractiva fueron creados a principios de los años 80 con el propósito de construir bibliotecas de ADNc para obtener sondas de genes expresados diferencialmente. Fueron los primeros que se utilizaron de manera amplia con el propósito de identificar genes regulados positiva o negativamente en una escala global. Sus ventajas incluyen la habilidad de aislar genes de función relacionada sin tener conocimientos previos de su secuencia o identidad y el uso de técnicas comunes de biología molecular que no requieren equipos especializados de detección y análisis. El procedimiento general consiste en la hibridización de un ADNc proveniente de una muestra prueba (tester) con un exceso de ARNm proveniente de una muestra control (driver). Los transcritos expresados en ambas muestras (tester y driver) forman moléculas de ARNm/ADNc híbridas, mientras que las secuencia de ADNc que están presentes únicamente en la muestra tester permanecen como hebras simples. Las moléculas de hebras simples y dobles se separan usando cromatografía en hidroxilapatita. Los ADNcs expresados diferencialmente pueden entonces ser recu-

perados y clonados o usados directamente como sondas para analizar una biblioteca. Dos limitaciones importantes del protocolo original son: i) el requerimiento de grandes cantidades de ARNm y ii) una tendencia a una menor eficiencia en la identificación de transcritos poco abundantes.

La hibridización substractiva es aplicable sólo a comparaciones de pares de muestras y debe ser realizada por duplicado con el tester y el driver invertidos para detectar tanto aumentos como disminuciones en los niveles de expresión. Además no genera una medida cuantitativa y aunque es eficiente en la identificación de genes que están completamente ausentes en el driver no revela fácilmente a aquellos que están presentes en ambas muestras en distinta proporción. Se realizaron modificaciones para mejorar el protocolo original que incluyen la producción de ADNc con marcas de biotina o oligo(dT)30-látex de manera de refinar la separación de las moléculas de cadena simple y doble. También se incorporó la amplificación de ADNcs selectos por PCR para disminuir la cantidad inicial de ARNm requerido y aumentar la eficiencia de clonado de los transcritos seleccionados. También se ha utilizado un protocolo ingenioso conocido como *hibridización substractiva de supresión* (SSH) que fue diseñado para favorecer la detección de transcritos raros expresados diferencialmente. Este incluye una normalización en la representación de los transcritos diferenciales basada en la inhibición de la amplificación de aquellos que son más abundantes, eliminando también la necesidad de separar moléculas de cadena doble y simple (ver Figura 1).

Display diferencial y RAP-PCR

Las técnicas conocidas en general como “huellas digitales de ARN” (ARN fingerprinting) incluyen al display diferencial (DD) y la PCR de ARN cebada arbitrariamente (RAP-PCR). Ambos métodos están basados en una amplificación por PCR de subgrupos al azar de transcritos a partir de dos o más muestras. La primera etapa de ambos procedimientos es común y consiste en generar ADNcs haciendo una transcripción reversa de una fracción de las moléculas de ARNm de una muestra. En

el display diferencial esto se logra utilizando como cebador de la transcripción reversa a un poliT anclado con una o más bases adicionales al extremo 3' del ARN mensajero (por ejemplo (T)₁₂AC). Estos oligonucleótidos se fijan al ARN mensajero a través de la unión de las bases adicionales, impidiendo que el poliT “resbale” sobre distintas zonas del poli A. El único grupo de ARNms que es transcrito en forma reversa es el integrado por las moléculas que llevan las bases complementarias a las bases adicionales del poliT en el extremo del mensajero adyacente al poliA. En contraste, la RAP-PCR utiliza oligonucleótidos de secuencia arbitraria para la transcripción reversa. Estos cebadores tienen normalmente 10 bases de largo y se unen a sus secuencias complementarias permitiendo formar una hebra de ADNc desde este sitio. En este caso el subgrupo de ARNms que sufre transcripción reversa estará integrado por aquellas moléculas que presenten la secuencia complementaria a la del cebador orientada en el sentido adecuado.

Luego de haberse realizado la síntesis de la primer hebra del ADNc, se amplifican segmentos de los transcritos usando pares múltiples de cebadores de PCR. Tanto para el display diferencial como para el RAP-PCR, el cebador superior es un oligonucleótido arbitrario de 10 pares de bases. El cebador inferior es el mismo oligonucleótido poliT anclado (para el caso del display diferencial) o el decámero arbitrario (para el caso de RAP-PCR) que se usaron alternativamente para hacer la transcripción reversa. Se ha estimado que los productos de PCR de 240 combinaciones particulares de pares de cebadores de display diferencial (por ejemplo todas las combinaciones de 20 oligonucleótidos arbitrarios y 12 oligonucleótidos anclados) representan estadísticamente a todos los ARNm originalmente presentes en la muestra. Los productos de PCR pueden ser marcados por incorporación de un nucleótido radiactivo o de una molécula que pueda ser detectada a través de su interacción con un anticuerpo conjugado a un sistema de detección (por ejemplo digoxigenina). También puede usarse un cebador unido a un fluoróforo u optarse por no marcar los fragmentos amplificados y usar luego una tinción con nitrato de plata para revelar

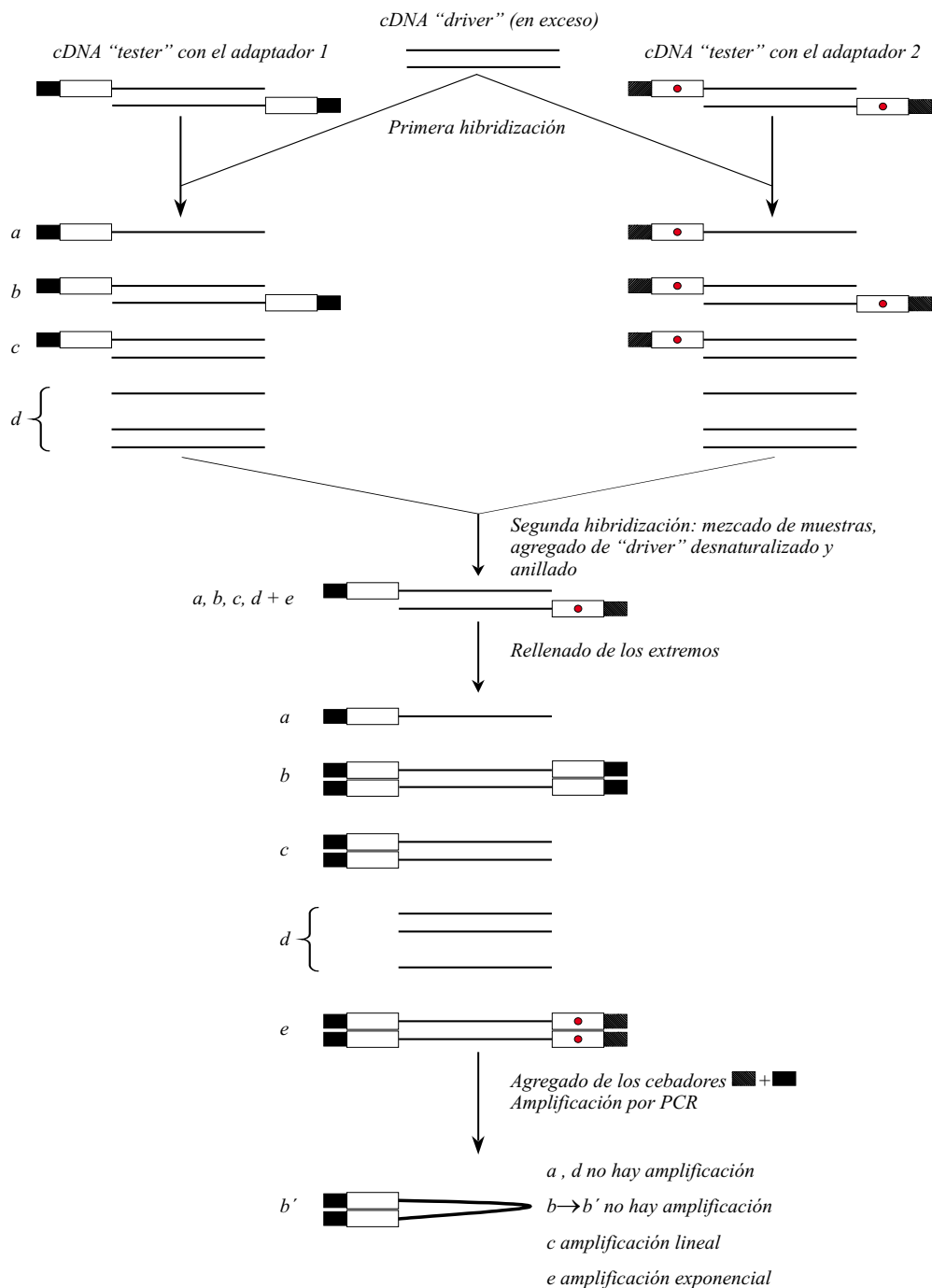


Figura 1.

los geles. La visualización de los productos de PCR se logra luego de la electroforesis en geles de poliacrilamida seguida de la apropiada generación y detección de imágenes, que son evaluadas comparando la intensidad relativa de las bandas producidas a partir de diferentes muestras experimentales. Los fragmentos que están presentes en una muestra y ausentes en

la otra, o aquellos que están presentes con diferentes intensidades relativas en los distintos tratamientos experimentales, representan potenciales transcritos de ARNm de expresión diferencial. Típicamente, las bandas son evaluadas sólo si amplifican en forma consistente en reacciones de PCR duplicadas para cada muestra (ver la Figura 2).

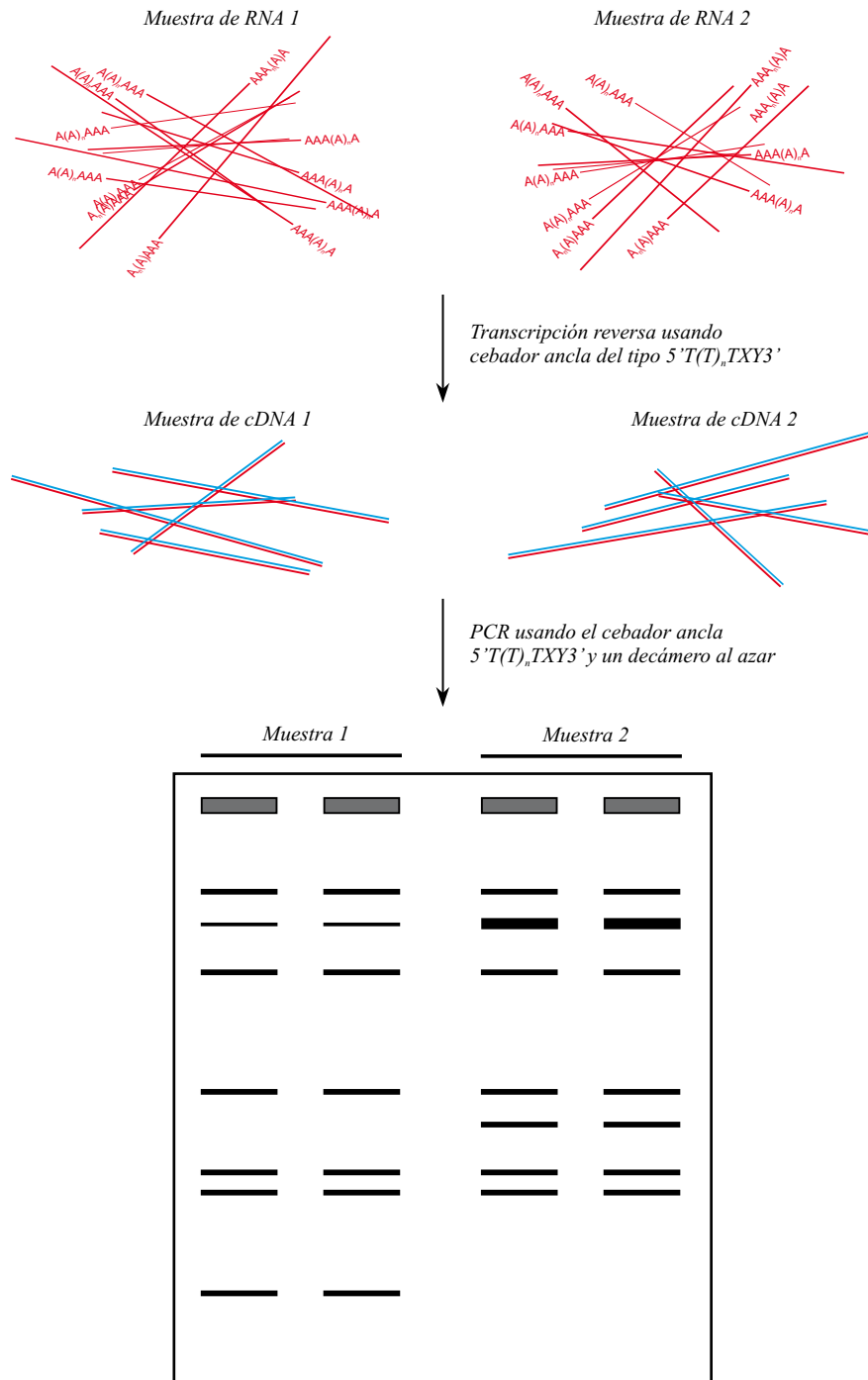


Figura 2.

La fase final del display diferencial consiste en la identificación de la secuencia del transcrito representado por el producto de PCR y la confirmación de que éste realmente se expresa en forma contrastante. Estas etapas se logran localizando físicamente y escindiendo la sección del gel de poliacrilamida que contiene al producto de interés. En la mayoría de los

casos debe realizarse un alineamiento de las imágenes de los fragmentos de amplificación con el gel de poliacrilamida seco. En los casos en que se utiliza tinción con nitrato de plata no es necesario realizar este paso, por lo cual la recuperación de la banda es mucho más eficiente. Los productos de PCR son purificados del gel y reamplificados. Para ello el fragmento

de poliacrilamida se procesa en fragmentos pequeños con un bísturi que se transfieren a una solución tampón adecuada para la elución de los fragmentos. Luego de una centrifugación, el sobrenadante se purifica con fenol/cloroformo y el ADN se precipita con etanol, se diluye en agua y se reamplifica por PCR.

Se han utilizado varias estrategias para confirmar la expresión diferencial de los transcritos, que incluyen el uso de los fragmentos como sondas de Northern, la siembra de los fragmentos en membranas para someterlos a análisis de Northern inverso y el clonado y secuenciación de los productos para diseñar cebadores específicos que permitan realizar PCR semicuantitativas, así como también la hibridación *in situ* de tejidos.

Dos ventajas importantes de los métodos de fingerprinting de ARN con respecto a los de hibridación substractiva son la capacidad de comparar muestras experimentales múltiples en forma simultánea y la de identificar genes que están regulados tanto positiva como negativamente en una muestra respecto de las otras. Sin embargo, los métodos de fingerprinting de ARN comparten con el SSH la limitación de que no son cuantitativos.

Uno de los problemas que suelen atribuirse a display diferencial es la amplificación de falsos positivos o sea fragmentos de genes que parecen estar diferencialmente expresados pero son luego considerados artefactos de PCR porque no pueden validarse por Northern blot o PCR en tiempo real. Es necesario dar una mirada más detallada a este punto. Es cierto que es imprescindible realizar las amplificaciones de DD PCR por duplicado o triplicado para asegurarse que la amplificación es reproducible y no se trata de una banda espuria. Pero una vez superado este punto de la reproducibilidad de la amplificación, hay que considerar que no siempre las diferencias detectadas con esta técnica pueden ser validadas por Northern o por PCR en tiempo real. Por ejemplo, cuando existe expresión alélica diferencial entre muestras, o cuando diferentes miembros de una misma familia génica son expresados diferencialmente, es posible que se detecten polimorfismos en los geles de DD, como consecuencia de que los primers se unan a sitios variables

de la secuencia. Sin embargo, es probable que distintos alelos o incluso diferentes miembros de una familia génica hibridicen en conjunto en el experimento de Northern, o que los diseños de cebadores para real time PCR no permitan diferenciarlos. También puede ocurrir que en los experimentos de DD se detecte una hebra antisentido sobreexpresada en una de las muestras. Si la hebra sentido está expresada en la otra, los experimentos de real time no permitirán la detección de la expresión diferencial. Estos son sólo algunos de los muchos casos posibles en los cuales el northern y la PCR en tiempo real no reproducirán los datos de DD, pero no precisamente porque el DD haya generado un falso positivo, sino simplemente porque estas técnicas están basadas en principios de detección diferentes. Muchos de los supuestos “falsos positivos” detectados por DD en el pasado (cuando no se tenía conciencia sobre la frecuencia de la expresión antisentido) pueden englobarse seguramente en estas categorías.

Otro problema es que estas técnicas deben aplicarse en general a muestras provenientes del mismo individuo sometido a distintas condiciones o sobre individuos genéticamente idénticos (por ejemplo isolíneas). Cuando se comparan los perfiles de ARNm de individuos diferentes genéticamente, pueden aparecer falsos positivos que son resultado de una amplificación diferencial debida a una variación en la secuencia de los transcritos más que a diferencias en su representación. Ese problema puede ser evitado utilizando estrategias de análisis de segregantes en grupo (BSA) aplicadas al estudio de perfiles de ARN. Finalmente, la investigación de todos los genes que potencialmente se expresan en forma diferencial requiere el uso de equipamiento de última generación y una inversión extensiva de tiempo y trabajo para detectar y confirmar la expresión diferencial de cada uno de los genes individuales.

Polimorfismos en el largo de los fragmentos de ADNc amplificados (ADNc-AFLP®)

La tecnología de AFLP®, generalmente utilizada para producir huellas genéticas de DNA genómico, puede ser aplicada también a pre-

paraciones de ADNc de doble hebra para obtener un perfil del transcriptoma. Los patrones obtenidos por esta técnica son una herramienta confiable y eficiente para la identificación de ARNms expresados diferencialmente. La técnica de ADNc-AFLP® detecta fragmentos de restricción de DNA por medio de amplificación por PCR. Comprende las siguientes etapas: i) generación de ADNc, ii) restricción del ADNc con dos endonucleasas específicas, preferiblemente una que reconoce sitios de 6 bases y otra que reconoce sitios de 4 bases, iii) ligación

de adaptadores de cadena doble a los extremos de los fragmentos de restricción, iv) amplificación de un subgrupo de los fragmentos de restricción usando dos cebadores complementarios al adaptador que llevan bases selectivas adicionales en el extremo 3' v) electroforesis de los fragmentos de restricción amplificados en geles de poliacrilamida, vi) visualización de las huellas digitales genéticas mediante el uso de autoradiografías, fosfoimágenes y otros métodos (ver Figura 3).

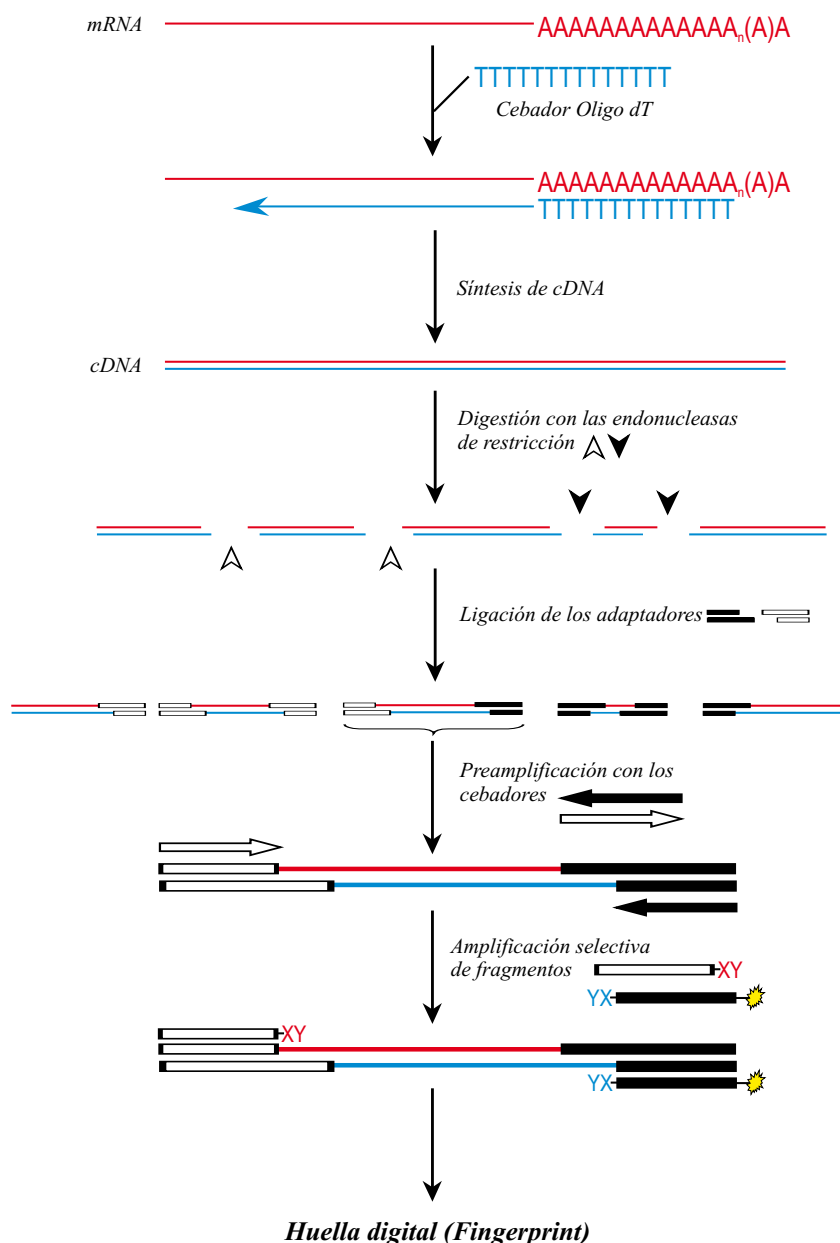


Figura 3.

Las mayores ventajas del uso de la tecnología de ADNc-AFLP® son: i) no se requiere información previa de secuencia; ii) se puede estudiar una fracción muy grande de todos los genes expresados, iii) es una técnica muy sensible que permite la detección de transcritos de baja abundancia, iv) los fragmentos son extraídos fácilmente de los geles y las secuencias correspondientes pueden determinarse sin necesidad de clonados previos.

Etiquetas de secuencia expresadas (Expressed sequence tags, ESTs)

La secuenciación exhaustiva de ESTs (Expressed Sequence Tags) es considerado principalmente un método para la caracterización de la expresión génica, a pesar de que la generación de ESTs resulta también importante para deducir la presencia de genes no predichos en ausencia de datos genómicos. Las ESTs son obtenidas a gran escala por secuenciación de una sola hebra de clones de ADNc (aproximadamente 500 pb) provenientes de bibliotecas que representan distintos tejidos o condiciones experimentales. Las ESTs representan descripciones parciales de las regiones que se transcriben de un genoma. Una cantidad creciente de centros de investigación han construido y secuenciado bibliotecas de ADNc en los últimos años. Esta tendencia se ve reflejada en el número de ESTs depositadas en la base de datos del NCBI (ESTdb), el que al 6 de Junio de 2008 es de 2994249 provenientes de 261 especies de plantas.

En teoría, la abundancia de una EST es directamente proporcional a la representación en número de copias de un transcrito en un tejido determinado. El proceso de generación de ESTs es relativamente lento y costoso, lo que hace difícil que se logre la saturación de una biblioteca. Teóricamente, si se secuencia el número suficiente de ESTs, este método permite analizar incluso aquellos genes que presentan niveles de expresión bajos, pero si el número de secuencias obtenidas es limitado conviene recurrir a técnicas de amplificación complementarias (ADNc-AFLP o DD) para detectar transcritos poco abundantes.

Las secuencias ESTs a menudo se generan a partir de bibliotecas de ADNc que han sido

normalizadas para ecualizar la abundancia de clones que corresponden a los diferentes transcritos. Los EST secuenciados a partir de estas últimas pueden ser comparados para identificar transcritos que se expresan en una biblioteca y están completamente ausentes en otra, pero si se pretende obtener datos cuantitativos exactos que describan abundancia relativa se debe recurrir indefectiblemente a bibliotecas de ADNcs no normalizadas. También existen productos comerciales que permiten la construcción de bibliotecas donde los transcritos han sido amplificados pero manteniendo la proporción relativa de unos respecto a otros, lo que facilita la comparación cuantitativa entre muestras.

Las ESTs requieren de varias etapas de procesamiento, ensamblado en grupos (contigs) y anotación para que se pueda extraer información biológica a partir de las mismas. Para esto, resulta muy importante el almacenamiento, la organización y la anotación de estas secuencias utilizando distintas herramientas informáticas (revisadas por Nagaraj et al., 2007).

Análisis serial de la expresión de genes (SAGE)

El análisis serial de la expresión de genes (SAGE) consiste esencialmente en una versión acelerada de la secuenciación de ESTs. Está basada en el concepto de que una etiqueta corta de unas pocas bases es suficiente para identificar inequívocamente a un transcrito, siempre y cuando esté ubicada en una posición definida dentro de la secuencia del mensajero. Una etiqueta SAGE consiste típicamente en 9-14 bases de secuencia ubicadas por debajo del último sitio de reconocimiento de una endonucleasa específica en el transcrito blanco. Múltiples etiquetas SAGE se ligan juntas en un vector de clonado de manera que una reacción de secuenciación de 300 a 500 pb genera las secuencias de 20 a 30 etiquetas al mismo tiempo (ver Figura 4). Como cada etiqueta SAGE representa un único transcrito de ARNm, es posible obtener una visión general de todos los genes expresados en la muestra original. Las diferencias en la expresión de genes entre muestras experimentales pueden entonces ser identificadas comparando la abundancia

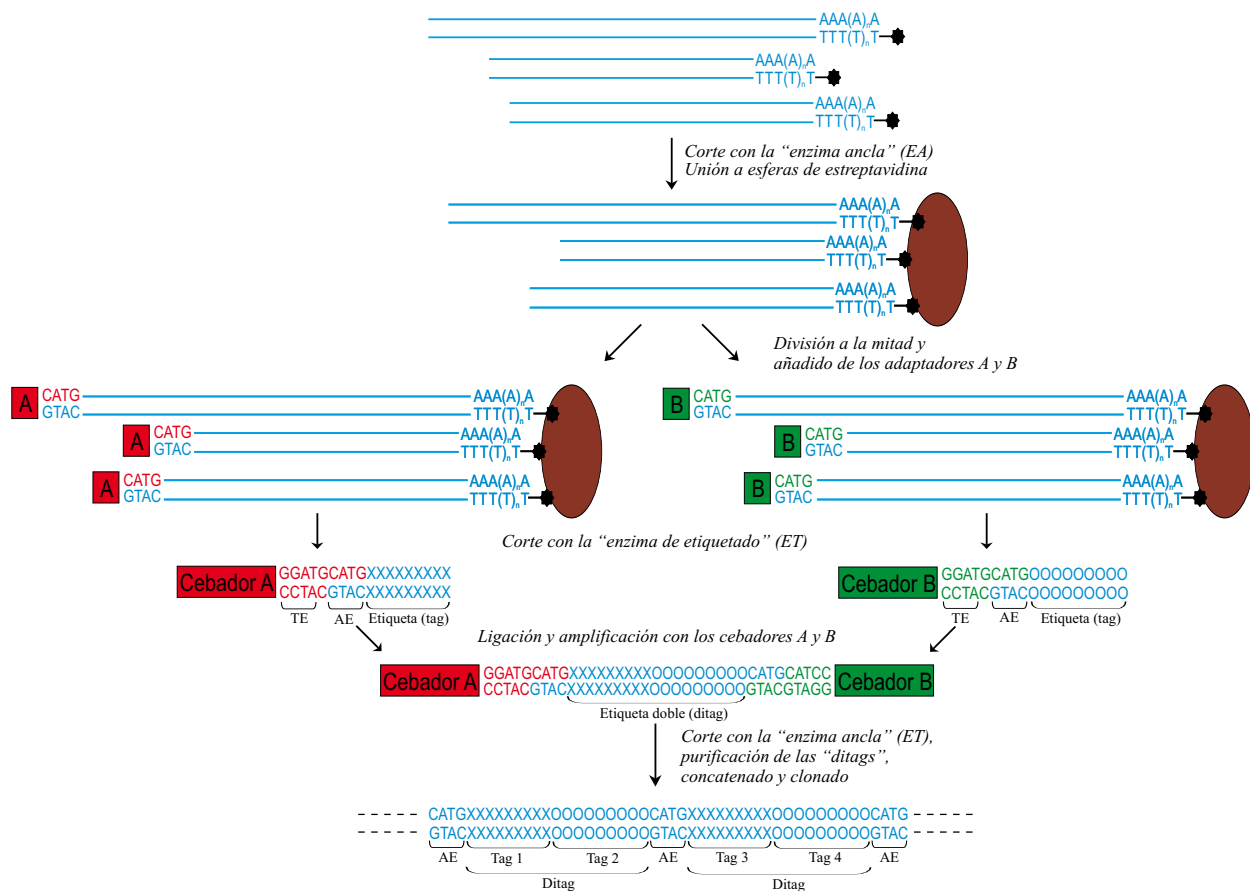


Figura 4.

relativa de etiquetas SAGE específicas en diferentes bibliotecas. Los genes o las secuencias ESTs representados por las etiquetas SAGE son localizados en las bases de datos detectando aquellos transcritos que tengan la etiqueta SAGE en la posición adecuada.

Esta técnica se utiliza para identificar y cuantificar transcritos. Fue descrita por primera vez por Velculescu y colaboradores en 1995 (ver bibliografía recomendada). Brevemente, se utiliza una enzima de restricción tipo II (enzima de etiquetado) que libera fragmentos de entre 9 y 14 pb a partir de los ADNc previamente digeridos con otra enzima de restricción (la más comúnmente utilizada es *NlaIII*). Estos fragmentos son luego ligados entre sí para formar un concatémero que es clonado y secuenciado. Los fragmentos detectados en una muestra representan a los transcritos que los originaron y su frecuencia de detección indi-

ca su abundancia en la muestra en estudio. A diferencia de los microarreglos, la técnica de SAGE permite detectar transcritos de los cuales no se conoce su secuencia previamente a la realización del experimento, es decir es una técnica conocida como "abierta" (pueden reconocerse genes nuevos).

A partir de un experimento de SAGE se pueden obtener unos 50.000 a 100.000 fragmentos, los que representan de 20.000 a 40.000 genes únicos. Estos fragmentos brindan información cualitativa de los transcritos detectados, mientras que el número de copias de cada uno de ellos brinda información cuantitativa y refleja la abundancia de los transcritos en la muestra. Generalmente se observa que algunos de los fragmentos detectados por SAGE presentan más de 100 copias, otros entre 2 y 100 copias y la mayoría de ellos (70-80%) se encuentran en copia única. En la mayoría de

los casos se observa que entre el 50-70% de los fragmentos presentan similitud con genes o transcritos de función conocida, mientras que entre 30-50% no son similares a ninguna secuencia conocida. Es esperable que estos porcentajes que son usuales actualmente se modifiquen en el futuro a medida que aumente el número de genes caracterizados y la cantidad de etiquetas promedio secuenciadas por proyecto.

Se ha observado una especificidad relativamente alta de un fragmento de entre 9 y 14 pb para su asociación con transcritos conocidos en el caso de genomas relativamente simples. Sin embargo, la especificidad disminuye cuando se estudian genomas más complejos. Se han hecho intentos para mejorar la especificidad aumentando el largo de los fragmentos. LongSAGE aumenta el largo de los fragmentos a 21 pb y SuperSAGE a 26 pb, utilizando diferentes enzimas de etiquetado. Esta estrategia mejoró la especificidad de un dado fragmento para representar a un transcrito único (aunque no completamente) y también la probabilidad de que dicho fragmento se localice una única vez en el genoma. Sin embargo, el hecho de trabajar con fragmentos más largos aumenta los costos de secuenciación de la técnica. Por estos motivos, el usuario debe considerar cuidadosamente cuál es la longitud de los fragmentos a utilizar para cada caso particular.

Los fragmentos obtenidos mediante SAGE no se pueden utilizar directamente en búsquedas de homología con secuencias contenidas en bases de datos debido a que son muy cortos. Para poder asignar un gen a un dado fragmento es necesario contar con una base de datos de referencia construida previamente. Esta base de datos contiene información de fragmentos obtenidas *in silico* a partir de secuencias conocidas de transcritos o de genes de la especie en estudio. Si un fragmento aislado experimentalmente presenta homología con una secuencia presente en la base de datos SAGE de referencia, entonces se considera que el transcrito que lo originó proviene del gen que había sido asignado a esa secuencia. La confiabilidad de la asignación de genes utilizando estas bases de datos está influenciada por factores biológicos (por ejemplo, isoformas

del transcrito tales como las resultantes de splicing alternativo o SNPs presentes en la etiqueta pueden resultar en distintos fragmentos que en realidad se correspondan con un mismo gen), experimentales (artefactos introducidos en las secuencias como consecuencia de la técnica utilizada) y por redundancia de transcritos. Las bases de datos de referencia se construyen con secuencias que son altamente redundantes. Las mismas son agrupadas en función de la homología de secuencias, lo que puede originar que se encuentren transcritos que corresponden a un mismo gen en grupos distintos (como en el caso de que hubiera splicing alternativo) o que se agrupen transcritos correspondientes a genes distintos porque presentan un alto grado de homología de secuencia. Es importante mencionar que las bases de datos de referencia pueden ser incompletas, debido a que comúnmente se incluyen en las mismas secuencias de alta calidad y anotadas para aumentar la especificidad. Sin embargo, esta estrategia disminuye en gran medida el número de transcritos representados en la base de datos. Esto origina que muchos de los fragmentos obtenidos por SAGE sean clasificados como desconocidos incluso cuando sus transcritos correspondientes hayan sido previamente identificados. Además, un mismo fragmento puede presentar homología con más de un gen, lo que presenta un desafío adicional para la clasificación de los mismos. Por todos estos motivos, es necesario verificar la asignación de un fragmento mediante otras técnicas. Entre las más utilizadas se pueden mencionar el RACE (Rapid Amplification of ADNc Ends) y GLGI (Generation of Long ADNc from SAGE tags for Gene Identification).

Los fragmentos obtenidos por SAGE pueden organizarse en tres grupos: de alta, intermedia y baja abundancia. Sin embargo, no se ha analizado exhaustivamente aún si el número de copias de un fragmento obtenido por SAGE refleja exactamente en todos los casos la cantidad de ARNm mensajero real contenida en la muestra. Dado que el SAGE involucra numerosas amplificaciones por PCR, pueden originarse errores específicos para un dado fragmento. Además se ha observado que las secuencias obtenidas por esta técnica presentan un ma-

yor contenido de G+C, lo que sugiere una preferencia de amplificación que compromete la exactitud de la cuantificación.

Dos ventajas importantes del SAGE sobre la hibridización substractiva y el display diferencial es que los datos obtenidos son cuantitativos y acumulativos. Si se genera la suficiente cantidad de información de secuencia se obtienen perfiles exactos de la expresión de los transcritos, que describen la abundancia de todos los genes expresados en una célula o tejido. Existe una base de datos pública de expresión génica que ha sido creada para el almacenamiento y análisis de secuencias de SAGE cuyo poder continuará creciendo a medida que se contribuya con más información. Otra característica de los datos de SAGE es que pueden complementar otros de ESTs generados a partir de bibliotecas de ADNc normalizadas o substraídas. Los ESTs brindan información de secuencia mientras que el SAGE provee datos cuantitativos describiendo la abundancia de los transcritos. Finalmente, a pesar de que el SAGE requiere capacidad de secuenciación de última generación, la cantidad de datos que aporta puede ser 20 veces mayor que el que posibilita la misma cantidad de secuenciación EST.

Hibridización de microarreglos

Los microarreglos han revolucionado la biología molecular. Esta técnica utiliza cientos a miles de sondas altamente organizadas sobre una superficie sólida para interrogar de manera simultánea a todas las moléculas de ARN (definidas como blancos) contenidas en una muestra biológica. Las muestras a ser analizadas se marcan fluorescentemente o radiativamente y se aplican al microarreglo. Los ácidos nucleicos marcados hibridan con las moléculas de ADN complementarias que se encuentran inmovilizadas en el microarreglo. La fuerza de la señal fluorescente o radiactiva capturada por las sondas de ADN en el arreglo es detectada y digitalizada para su cuantificación.

Los microarreglos fueron originalmente diseñados para identificar diferencias de expresión génica en dos muestras distintas basadas en las cantidades relativas de blancos unidos a una sonda determinada en el arreglo. La utili-

dad de la técnica se ve reflejada en su amplia variedad de aplicaciones que abarca desde el análisis de expresión génica hasta estudios de ADN genómico (como Comparative Genomic Hybridization - CGH- y Chromatin Immunopurification microarrays - conocidos como ChIP-chips). Sin embargo, en este capítulo sólo describiremos los microarreglos de ADNc y de oligonucleótidos, ya que son los más utilizados para el análisis del transcriptoma.

Los microarreglos de ADN pueden ser creados de dos maneras: fijando las moléculas de ácidos nucleicos sobre una superficie sólida o por síntesis *in situ* de oligonucleótidos. En el primer caso las moléculas de ADN pueden ser ADNcs amplificados por PCR, oligonucleótidos o fragmentos de ADN genómicos clonados en BACs (Bacterial Artificial Chromosomes).

La utilización de clones de ADNc amplificados por PCR como sondas es el método de elección cuando se interrogan muestras de organismos cuyo genoma no está secuenciado. Estos microarreglos son generalmente fabricados utilizando robots. Los mismos contienen un cabezal de puntas que es sumergido en soluciones de sondas de ADN disueltas en el buffer correspondiente y que luego son depositadas sobre un sustrato de vidrio modificado químicamente. Las puntas se cargan de sonda por capilaridad y la tensión superficial entre el buffer y el vidrio actúa para descargar las sondas. Las perturbaciones en la estructura de las descargas son frecuentes y son una fuente significativa de variación de la señal. Si bien existen otras alternativas, la utilización de robots es la más popular debido a su disponibilidad, alta flexibilidad y bajos costos. Los sustratos inertes sobre los cuales se depositan las sondas son variados. Los portaobjetos de vidrio cubiertos con poli-L-lisina fueron gradualmente reemplazados por sustratos con aminosilano comerciales debido a su mayor consistencia en cuanto a la morfología de las descargas. Para este tipo de químicas, las sondas son inicialmente unidas por atracción electrostática y luego fijadas por ligación cruzada (cross-linking) al sustrato mediante radiación UV o calor. Posteriormente se introdujeron sustratos reactivos y sondas modificadas que permiten una mayor discriminación de secuencia debido

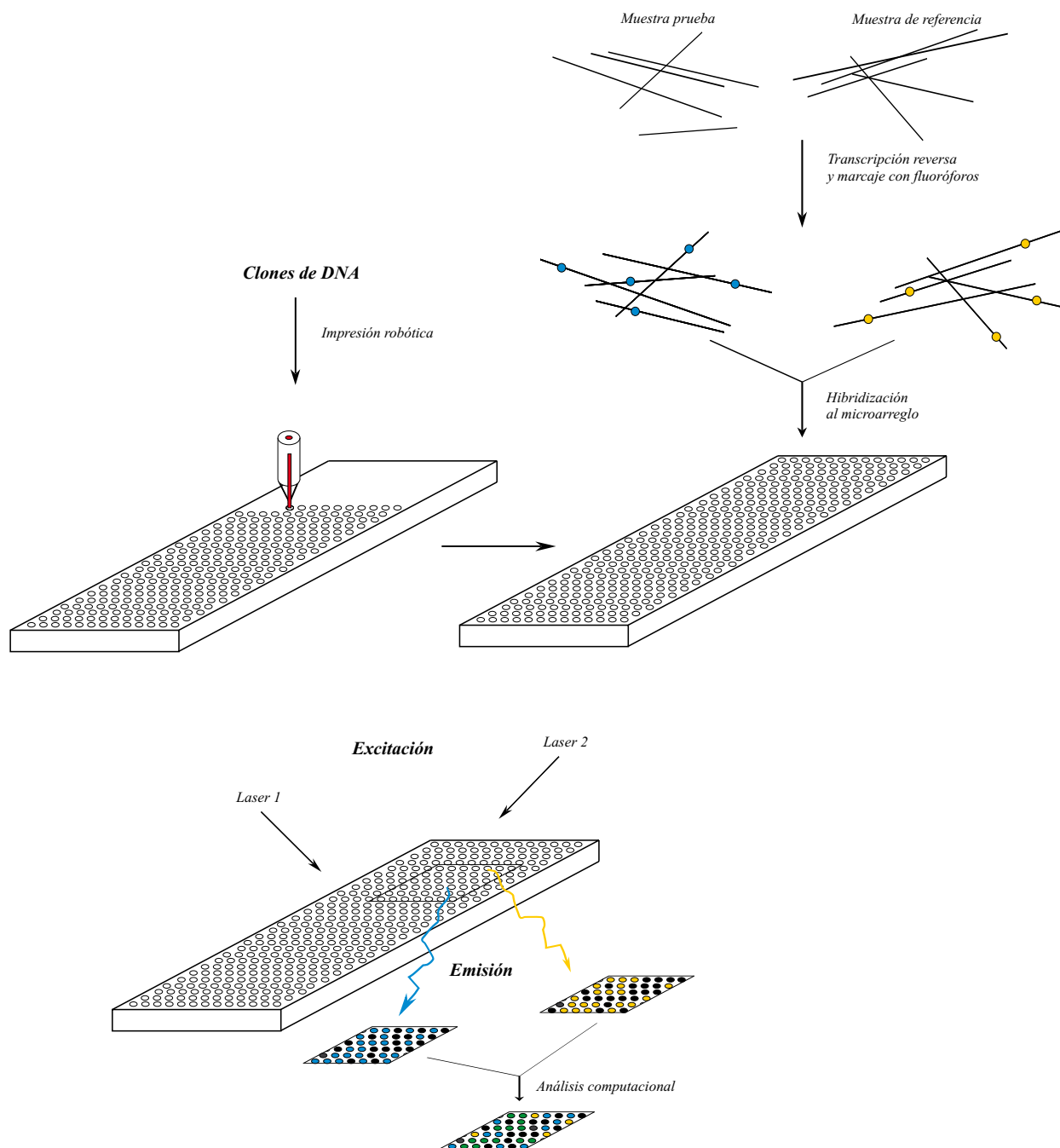


Figura 5.

a que hay un único punto de unión y una mayor retención de la sonda al sustrato. También se han desarrollado otros sustratos para producir señales más intensas y que demanden menores cantidades de sondas. Para lograrlo se aumentó la cantidad de grupos reactivos sobre la superficie. Esto se puede lograr cubriendo los portaobjetos con dendrímeros, mezclas de epoxisilano y aminosilano o con polímeros que se auto-absorben.

Originalmente, las sondas de ADN eran disueltas en soluciones con alto contenido de sales. Luego se introdujo la utilización de detergentes para mejorar la morfología de las descargas. Sin embargo, algunos investigadores informaron que la presencia de detergentes resulta en un mayor arrastre de la sonda y una mayor variabilidad entre una deposición y la siguiente. La utilización de soluciones de descarga conteniendo agentes higroscópicos

permitió mejorar la estructura de los puntos y aumentar las intensidades de señal obtenidas. La desventaja de la utilización de aditivos higroscópicos es que producen aumentos en el área ocupada por la sonda, sin embargo, este efecto se puede reducir disminuyendo la velocidad del robot o aplicando micro-vibraciones de las puntas. Disminuir la temperatura de la cámara del robot donde se generan los microarreglos y utilizar soluciones hidrofóbicas contribuye también a reducir el tamaño promedio de las descargas. La variedad de soluciones de descarga que existe sugiere que no hay un tipo de solución que resulte ideal para todas las aplicaciones y que la elección de la misma depende en gran medida del tipo de microarreglo que se quiere construir. Las puntas de los cabezales que se utilizan son normalmente de acero inoxidable o de titanio y contienen un capilar generado mediante descargas eléctricas o la utilización de un láser. Se observa una variación sistemática en la extensión de la descarga, porque ésta es una función del formato de la punta, y existe variabilidad durante la fabricación de las mismas. Se han desarrollado nuevas tecnologías para solucionar este problema como por ejemplo la generación de puntas de cerámica más uniformes.

La evaporación durante el proceso de impresión de los microarreglos es la principal causa de variabilidad. La evaporación reduce el volumen de solvente en las microplacas de 384 pocillos y dentro del reservorio capilar de las puntas, lo que produce un aumento de concentración de las sondas y altera las características de la solución de descarga. Como consecuencia de esto, las propiedades del punto sembrado y la distribución de la sonda de ADN dentro del área del mismo se modifican. Este problema se puede solucionar en parte regulando las condiciones de humedad y temperatura dentro de la cámara del robot donde se realiza la impresión de los microarreglos. Dado que existen numerosas interacciones entre los distintos componentes del proceso, no es sencillo predecir en forma exacta cómo va a resultar la combinación entre una solución de siembra y un sustrato determinados. Sin embargo, se están realizando constantemente estudios para examinar este proceso que, suma-

dos al desarrollo de nuevas tecnologías, van a permitir reducir los niveles de variabilidad sistemáticos resultantes de la fabricación de los microarreglos.

La mayoría de los laboratorios ensayan la calidad de sus microarreglos antes de realizar los experimentos de hibridación con las muestras biológicas de interés. Generalmente se controla la bondad de la impresión y se detectan errores tales como puntos que no están bien formados, aquellos de tamaños mayores a los deseados o faltantes. Los puntos pueden ser visualizados utilizando tinturas fluorescentes de unión a ADN. También se pueden emplear métodos más precisos como son la hibridación con mezclas de oligonucleótidos al azar de 9-mer marcados fluorescentemente o con oligonucleótidos marcados que hibridizan con secuencias marcadoras cortas que están presentes en todas las sondas de ADN del microarreglo. Para controlar la calidad de la producción de microarreglos es recomendable desarrollar, documentar y emplear protocolos estándar (Standard Operating Procedures-SOPs). Se pueden encontrar ejemplos de los mismos en la página <http://www.flychip.org.uk>. Esta práctica no solamente aumenta la consistencia entre experimentos dentro de un laboratorio, sino que facilita la transferencia de información entre laboratorios.

El segundo método posible para la construcción de microarreglos es la síntesis de oligonucleótidos *in situ*, inicialmente desarrollada por Affymetrix (Affymetrix, Santa Clara, EEUU). Este método usa una conjunción de fotolitografía y de química combinatoria que resulta en la síntesis de chips de ADN de alta densidad. También NimbleGen (NimbleGen, Madison, EEUU), Xeotron (Xeotron, Houston, EEUU) y Febit (Febit, Mannheim, Alemania) han desarrollado otros procesos para lograr la síntesis de oligonucleótidos *in situ*. Todos estos procesos se basan en la utilización de radiación UV. En cambio Combimatrix (Combimatrix, Mukilteo, EEUU) usa electroquímica localizada. En el caso de Affymetrix se logra la síntesis *in situ* mediante fotoactivación y desprotección de ácidos nucleicos. Se utilizan fotomáscaras para dirigir la radiación UV a sectores específicos del microarreglo, de modo de lograr

la síntesis en forma selectiva. En el caso de NimbleGen, Xeotron y Febit, todos ellos usan métodos que no requieren la utilización de fotomáscaras. En este caso, la radiación UV es dirigida mediante miles de espejos regulables y el ADN es sintetizado utilizando nucleótidos modificados con fosfoamidita. En el caso de CombiMatrix, numerosos microelectrodos son utilizados para sintetizar distintas moléculas de ADN en paralelo. La reacción química para la síntesis de oligonucleótidos ocurre en el área que rodea a cada microelectrodo a la que se suele denominar “vaso virtual” (virtual flask).

Una estrategia para estudiar la expresión génica de todo un genoma es la detección de la actividad transcripcional completa de los cromosomas usando “arreglos solapados o en tejado” (tiling arrays). En este caso, en lugar de utilizar sondas específicas para cada gen, el genoma completo incluyendo regiones intergénicas está representado en el arreglo. Además de detectar transcritos estos chips permiten realizar hibridaciones comparativas de genomas para detectar delecciones y polimorfismos, estudiar los perfiles de metilación y analizar muestras de inmunoprecipitación de cromatina. Affymetrix desarrolló los primeros arreglos de este tipo para *Arabidopsis*. Los estudios realizados utilizando arreglos de tipo “tejado” permiten la identificación de numerosos sitios transcripcionalmente activos que no habían sido detectados mediante algoritmos predictivos y/o en colecciones de ADNc. Muchos de estos nuevos transcritos son expresados a partir de la hebra complementaria y en antisen-tido con respecto a transcritos anotados previamente. O sea, mientras que en determinados tejidos y/o condiciones se expresa la hebra sentido, en otros se transcribe la antisentido. Sumado a esto, también se demostró que las regiones centroméricas presentan actividad transcripcional en ambos sentidos resultando esta observación sorprendente, ya que hasta hace muy poco tiempo atrás se suponía que en estas regiones no había transcripción activa. Esta metodología permite asimismo el estudio del metiloma, de las regiones de ADN regulatorias, del procesamiento alternativo de ARN y del descubrimiento de polimorfismos de

secuencia. Por lo tanto, los estudios de expresión usando arreglos de tipo “tejado” permiten obtener una visión mucho más completa del transcriptoma y de su relación con el genoma.

La necesidad de descripciones precisas de experimentos de microarreglos para permitir el almacenamiento de los datos experimentales y su análisis posterior ha originado la creación del “Minimum Information About a Microarray Experiment (MIAME) Standard” (MIAME Standard). Al igual que con las secuencias de ADN o con las estructuras de proteínas, es cada vez más común el requerimiento de enviar los resultados a bases de datos de este tipo antes de su publicación. Estos estándares son necesarios para permitir que la información esté públicamente disponible en un formato único, y también para uniformar la nomenclatura empleada lo que hace posible la integración y comparación de resultados obtenidos de distintas fuentes. MIAME administra descripciones técnicas detalladas (plataforma utilizada, métodos de marcación e hibridación, medición de datos y diseño del arreglo), pero no provee información relevante específica del organismo en estudio que es necesaria para comprender el experimento planteado. Por este motivo, se diseñó la base MIAME/Plant, la que incluye detalles biológicos para describir experimentos de microarreglos realizados en plantas.

El análisis de los datos originados en un microarreglo resulta mucho más laborioso que su generación. En el mismo se consideran la hipótesis de trabajo y los objetivos experimentales para lograr identificar a los genes candidatos en las condiciones de estudio. El análisis puede dividirse en dos fases: 1) el procesamiento de datos y 2) la identificación de genes de interés y la interpretación biológica de los resultados. El procesamiento de los datos incluye la determinación del nivel de ruido, la cuantificación de las señales fluorescentes, el examen de la calidad de los datos, la eliminación de los errores técnicos y la normalización de los datos. La identificación de los genes candidatos incluye la reducción del volumen de la información a un nivel manejable y más fácil de visualizar, el reconocimiento de patrones de expresión específicos y la interpretación del significado biológico de los mismos.

Conclusiones

Los métodos descritos en este capítulo son tecnologías eficaces que expanden los estudios de expresión desde los genes únicos hasta el nivel del transcriptoma completo. Ninguno de estos procedimientos *per se* es óptimo para todas las aplicaciones y la mejor estrategia para situaciones específicas puede ser crear combinaciones de varios de ellos. El continuo refinamiento de las técnicas de transcriptómica y de la bioinformática relacionada proporcionará a los investigadores nuevas herramientas para estudiar la expresión de la información hereditaria y lograr un mejor entendimiento sobre el control genético de los procesos fisiológicos.

Cada plataforma empleada actualmente para estudiar el transcriptoma tiene sus ventajas y desventajas. Por ejemplo, los microarreglos son una técnica de alto rendimiento pero sólo se pueden aplicar a transcritos de secuencia conocida. Los métodos de ADNc- AFLP y DD son abiertos, es decir permiten detectar genes nuevos y son especialmente útiles cuando se trabaja fuera de los modelos, pero son cualitativos o semicuantitativos y requieren de un complemento de PCR en tiempo real para validar y cuantificar las diferencias de expresión.

Las colecciones de ESTs presentan alta especificidad para los transcritos en estudio pero baja sensibilidad para aquellos de escasa abundancia. La técnica de SAGE disminuye el largo secuenciado por transcripto lo que aumenta la velocidad de relevamiento, pero esta simplicidad resulta en una alta sensibilidad pero a costa de una menor especificidad. Una comparación de las características de cada técnica se presenta en la Tabla 1.

La combinación de la información generada por la transcriptómica (nivel y localización espacio/temporal de la expresión génica) y la de los proyectos de secuenciación de genomas (secuencias completas de los genes y sus promotores) permite realizar asociaciones de expresión y homología estructural que en muchos casos facilitan la inferencia de la posible función de los genes identificados. Por supuesto esto constituye una instancia inicial en la definición de la función de cada gen. Para determinar su rol preciso deben hacerse estudios particulares en general dirigidos a bloquear o aumentar su expresión por ingeniería genética y a modificar estructuralmente la molécula de manera de alterar la actividad de los diferentes dominios de la proteína que codifica.

Tabla 1: Comparación de los principales métodos de relevamiento del transcriptoma.

Características	SAGE/ESTs	Microarreglos	DD/cDNA-AFLP	Hibridización sustractiva
Detecta transcritos conocidos	Sí	Sí	Sí	Sí
Detecta transcritos desconocidos	Sí	No	Sí	Sí
Detecta transcritos con splicing alternativo	Sí	Sí o no	Sí	No
Detecta transcritos antisentido	Sí	Sí o no	Sí	Sí
Cuantificación	Absoluta	Relativa	Relativa	Relativa
Sensibilidad	Alta	Moderada	Alta	Alta
Especificidad	Moderada	Alta	Moderada	Moderada
Reproducibilidad	Buena para transcritos abundantes	Buena para datos obtenidos con la misma plataforma	Requiere realización de duplicados o triplicados	Buena para transcritos abundantes
Comparable entre si	Buena para transcritos abundantes	Buena para transcritos abundantes	Buena para transcritos abundantes	Buena para transcritos abundantes
Costo	Más alto que el de microarreglos	5-10 veces menor que el de SAGE	Muy bajo	Muy bajo

Adaptado de Wang 2006 understanding SAGE data, Trends in Genetics.

Para maximizar el potencial de la transcripción es necesario un cambio de paradigma respecto a la interpretación de los resultados obtenidos en este tipo de experimentos. Este cambio de paradigma implica comprender que los datos de expresión no están libres de errores y aceptar que la variabilidad biológica espacio-temporal es una parte inherente y cuantificable de este tipo de experimentos. A pesar de que los continuos cambios en la expresión de genes en tiempo y espacio colocan al investigador en un escenario de arenas movedizas, es mucha y muy relevante la información que puede obtenerse de este tipo de estudios. Esta transición en la interpretación de los resultados será más fácil si se delinea claramente la diferencia entre proponer una función biológica a partir de simples datos de expresión y postular una hipótesis que debe luego validarse en base a datos experimentales concretos.

Bibliografía Recomendada

- Adams, M. D., J. M. Kelley, J. D. Gocayne, M. Dubnick, M. H. Polymeropoulos, H. Xiao, C. R. Merril, A. Wu, B. Olde, R. F. Moreno. 1991. Complementary DNA sequencing: expressed sequence tags and human genome project. *Science (Wash DC)* 252:1651–1666.
- Affymetrix: <http://www.affymetrix.com>
- Combimatrix: <http://www.combimatrix.com>
- Davis, M. M., D. I. Cohen, E. A. Nielsen, M. Steinmetz, W. E. Paul, L. Hood. 1984. Cell-type-specific ADNC probes and the murine 1 region: the localization and orientation of Ad. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81:2194–2198.
- Diatchenko, L., Y.-F. C. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Pukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: A method for generating differentially regulated or tissue-specific ADNC probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 93:6025–6030.
- Febit: <http://www.febit.com>
- Gregory B.D., Yazaki J. and Ecker J.R. 2008. Utilizing tiling microarrays for whole-genome analysis in plants. *The Plant Journal*, 53, 636-644.
- Gurskaya, N. G., L. Diatchenko, A. Chenchik, P. D. Siebert, G. L. Khaspekoy, K. A. Lukyanov, L. L. Vagner, O. D. Ermolaeva, S. A. Lukyanov, E. D. Sverdlov. 1996. Equalizing ADNC subtraction based on selective suppression of polymerase chain reaction: cloning of Jurkat cell transcripts induced by phytohemagglutinin and phorbol 12-myristate 13-acetate. *Anal. Biochem.* 240:90–97.
- Liang, P., A. B. Pardee. 1992. Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the polymerase chain reaction. *Science (Wash DC)* 257:967–971.
- Meyers B.C., Galbraith, D.W., Nelson T. and Agrawal, V. 2004. Methods for transcriptional profiling in plants. Be fruitful and replicate. *Plant Physiol.*, 135, 637-652.
- MIAME Standard: <http://www.mged.org/Workgroups/MIAME/miame.html>
- Moody D. E. 2001. Genomics techniques: an overview of methods for the study of gene expression. *J. Anim. Sci.* 79 (E. Suppl.): E128-E135.
- Nagaraj S.H., Gasser R.B. and Ranganathan S. 2007. A hitchhiker's guide to expressed sequence tag (EST) analysis. *Brief Bioinform.*, 8, 6-21.
- NimbleGen: <http://www.nimblegen.com>
- Okubo, K., N. Hori, R. Matoba, T. Niyama, A. Fukushima, Y. Kojima, K. Matsubara. 1992. Large scale ADNC sequencing for analysis of quantitative and qualitative aspects of gene expression. *Nat. Genet.* 2:173–179.
- Rensink W.A. and Buell C.R. 2005. Microarray expression profiling resources for plant genomics. *Trends in Plant Science*, 10, 603-609.
- Sargent T. D., I. B. Dawid. 1983. Differential Gene expression in the gastrula of *Xenopus laevis*. *Science (Wash DC)* 222: 135-139.
- Schena M., D. Shalon, R. W. Davis, P. O. Brown. 1995. Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science (Wash DC)* 270:467–470.
- Velculescu, V. E., L. Zhang, B. Vogelstein, K. W. Kinzler. 1995. Serial analysis of gene expression. *Science (Wash DC)* 270:484–487.
- Venkatasubbarao S. 2004. Microarrays – status and prospects. *Trends in Biotechnology*, 22, 630-637.
- Welsh, J., K. Chada, S. S. Dalal, R. Cheng, D. Ralph, M. McClelland. 1992. Arbitrarily primed PCR fingerprinting of RNA. *Nucl. Acids Res.* 20:4965–4970.
- Xeotron: <http://www.xeotron.com>
- Zimmermann P., Schildknecht B., Craigon D., Garcia-Hernandez M., Grissem W., May S., Mukherjee G., Parkinson H., Rhee S., Wagner U. and Hennig L. 2006. MIAME/Plant – adding value to plant microarray experiments. *Plant methods*, 2:1.

I CAPÍTULO 9

Proteómica

Paula Casati y María F. Drincovich

1. Introducción

La proteómica, entendida como el estudio del patrón proteico de una célula u órgano, se encuentra ya en su segunda década como campo de estudio. Durante la primera década, la mayor parte de los estudios se realizaron principalmente mediante el uso de geles en dos dimensiones seguidos de técnicas de tinción convencionales. Si bien estos métodos continúan siendo utilizados de manera importante, durante esta segunda década otros métodos más sensibles y que además presentan mayor reproducibilidad han comenzado a ser utilizados. Estas técnicas han sido clasificadas como “proteómica cualitativa”. Muchos de estos métodos están siendo aplicados en experimentos de biología vegetal. Por ejemplo, la electroforesis bidimensional DIGE (del inglés, differential gel electrophoresis) y el marcado isotópico de proteínas y péptidos, son técnicas utilizadas en la actualidad para el estudio de diversos proteomas. En el presente capítulo se describen primero los métodos utilizados en proteómica en la actualidad, seguido de una descripción de las aplicaciones de estas técnicas en la biología de plantas.

2. Electroforesis en dos dimensiones

El procedimiento más utilizado para los estudios de proteómica es la separación electroforética por isoelectroenfoque (IEF) de las proteínas seguido de una segunda separación en gel de poliacrilamida en presencia de SDS (SDS-PAGE). Esta técnica se denomina comúnmente electroforesis bidimensional (2D), donde las proteínas se separan en base a su carga y masa molecular. Los avances recientes en la resolución del IEF gracias al uso de geles comerciales en tiras han aumentado la reproducibilidad y la resolución de los geles 2D en proteómica. En particular, la disponibilidad de tiras comerciales de diferentes tamaños y rangos de pH permiten un análisis detallado del proteoma.

Luego de la separación electroforética, se lleva a cabo la tinción de los geles y el análisis de las imágenes para visualizar y cuantificar cada proteína. Los métodos de tinción utilizados van desde los más convencionales, como la tinción con azul de Coomassie o nitrato de plata, hasta métodos más sensibles como la tinción fluorescente. Por otro lado han sido desarrollados recientemente varios compuestos fluorescentes que permiten múltiples tinciones de un mismo gel, técnica que permite la tinción y visualización de diferentes grupos de proteínas o diferentes subproteomas (por ejemplo, el fosfoproteoma o el glicoproteoma) de manera secuencial en un mismo gel. La separación en geles bidimensionales puede dar lugar a un mapa proteico complejo, y algunas veces la reproducibilidad de estos geles puede ser problemática debido a la naturaleza diversa de las distintas proteínas, sumado a la tarea de identificar el mismo punto proteico en distintos geles. Esto se debe a que cuando se realizan estudios comparativos es necesario analizar múltiples geles que pueden contener 1000 puntos proteicos cada uno. Así, a pesar del uso de programas avanzados para el análisis de geles 2D, se requiere una validación manual final. Existen distintos paquetes de computación para el análisis de las imágenes que permiten asistir con la substracción del ruido de base, la detección de los puntos proteicos, el ajuste de las imágenes, la detección e identificación de puntos entre geles, y la cuantificación mediante un análisis estadístico. Los geles bidimensionales son una herramienta para la resolución y visualización de isoformas proteicas, productos de degradación y modificaciones postraduccionales; además de permitir el cálculo empírico de la masa molecular, punto isoelectrico y niveles de expresión. Las limitaciones de la técnica son la no automatización, la dificultad para resolver proteínas de membrana y proteínas muy básicas o ácidas.

Una técnica que aumenta la sensibilidad y disminuye la variabilidad que existe entre distintos geles es la llamada electroforesis diferencial en gel o DIGE. En esta técnica, las muestras proteicas se preincuban con compuestos fluorescentes activos que se unen a residuos de Lys o Cys que pueden ser utilizados para

cuantificar la abundancia de cada proteína en una población. La mayor ventaja de esta técnica es la posibilidad de correr dos muestras distintas en un mismo gel, siempre y cuando las muestras se hayan marcado con marcadores fluorescentes con distintos espectros de emisión. Esto disminuye los problemas que se generan durante la identificación de los puntos y la cuantificación. En teoría, la cantidad máxima de muestras que se pueden separar en un mismo gel se limita al número de compuestos fluorescentes que se encuentren disponibles y que no muestren espectros de emisión que se superpongan, aunque en general se utilizan sólo tres: dos para el marcado de las muestras a comparar, y el tercero se utiliza para marcar un control interno. La imagen de los geles es generada utilizando un escáner de fluorescencia capaz de adquirir las imágenes provenientes de cada uno de los fluorescentes utilizados. Esta técnica es muy sensible, ya que permite resolver alrededor de 1000 puntos proteicos con solo 50 µg de proteínas sembradas, por lo que el límite de detección es del orden de pico a femtomolar de proteína en cada punto.

Una ventaja de realizar estudios de proteómica mediante separación en geles bidimensionales es que estos experimentos pueden ser realizados utilizando muestras de cualquier especie vegetal, sin necesidad de que el genoma de la especie en estudio se encuentre secuenciada. Además, esta técnica es ideal para experimentos en donde se observen pocos cambios en los patrones proteicos.

Una alternativa a las separaciones 2D por IEF/SDS-PAGE es la técnica de separación en electroforesis nativa en presencia de azul de Coomassie (BN-PAGE, del inglés "blue-native"). Esta técnica es utilizada para la separación de proteínas hidrofóbicas y proteínas en su estado nativo, ya que éstas no se separan correctamente en los geles IEF/SDS-PAGE. Esta técnica se basa en la integración de una carga neta negativa en las proteínas y complejos proteicos por adición del colorante azul de Coomassie, y permite la separación en condiciones nativas en la primera dimensión. En la segunda dimensión se realiza un SDS-PAGE, donde los complejos proteicos que migraron juntos en la primera dimensión se separan en

sus subunidades, que se observan en filas verticales de puntos proteicos en los geles 2D. Esta técnica complementa a los geles 2D IEF/SDS-PAGE.

3. Cuantificación por espectrometría de masa (MS)

Luego de la selección de las proteínas de interés en un gel 2D, éstas pueden ser identificadas por espectrometría de masas. Básicamente, luego de la digestión de las proteínas cortadas del gel con una proteasa (típicamente tripsina), la mezcla compleja de péptidos es analizada. Existen distintos tipos de espectrometría de masas, que utilizan distintos métodos para la ionización de las muestras. Por un lado, la espectrometría de masa por desorción por ionización mediante láser asistida por una matriz (del inglés matrix-assisted laser desorption ionisation (MALDI))-tiempo de vuelo (time-of-flight (TOF)), se utiliza principalmente para realizar huellas dactilares de péptidos y proteínas. Por otro lado, la espectrometría en tandem por electropulverizado (ESI), usualmente se acopla a una separación previa en un sistema de cromatografía de alta presión (HPLC) y se utiliza para la elucidación de la secuencia e identificación de la proteína correspondiente (Figura 1).

En estos momentos, existe una actualización constante en los distintos tipos de espectrómetros de masa que se encuentran disponibles en el mercado, y la sensibilidad, selectividad y precisión de los equipos son cada vez mayores. Los principios de esta técnica pueden ser resumidos en cuatro funciones del equipo:

1-Ionización: la molécula de interés sufre un cambio en la carga neta, formándose un anión o un protón. Dependiendo del método de ionización utilizado, es posible que se generen iones fragmentados. En el caso de usos en proteómica, los métodos de ionización utilizados son MALDI y electrospray/microspray/nanospray.

2-Separación: las especies iónicas son separadas de acuerdo a su relación masa/carga (m/z),

3-Medida de la masa: las masas son asignadas según las medidas de algún parámetro físico.

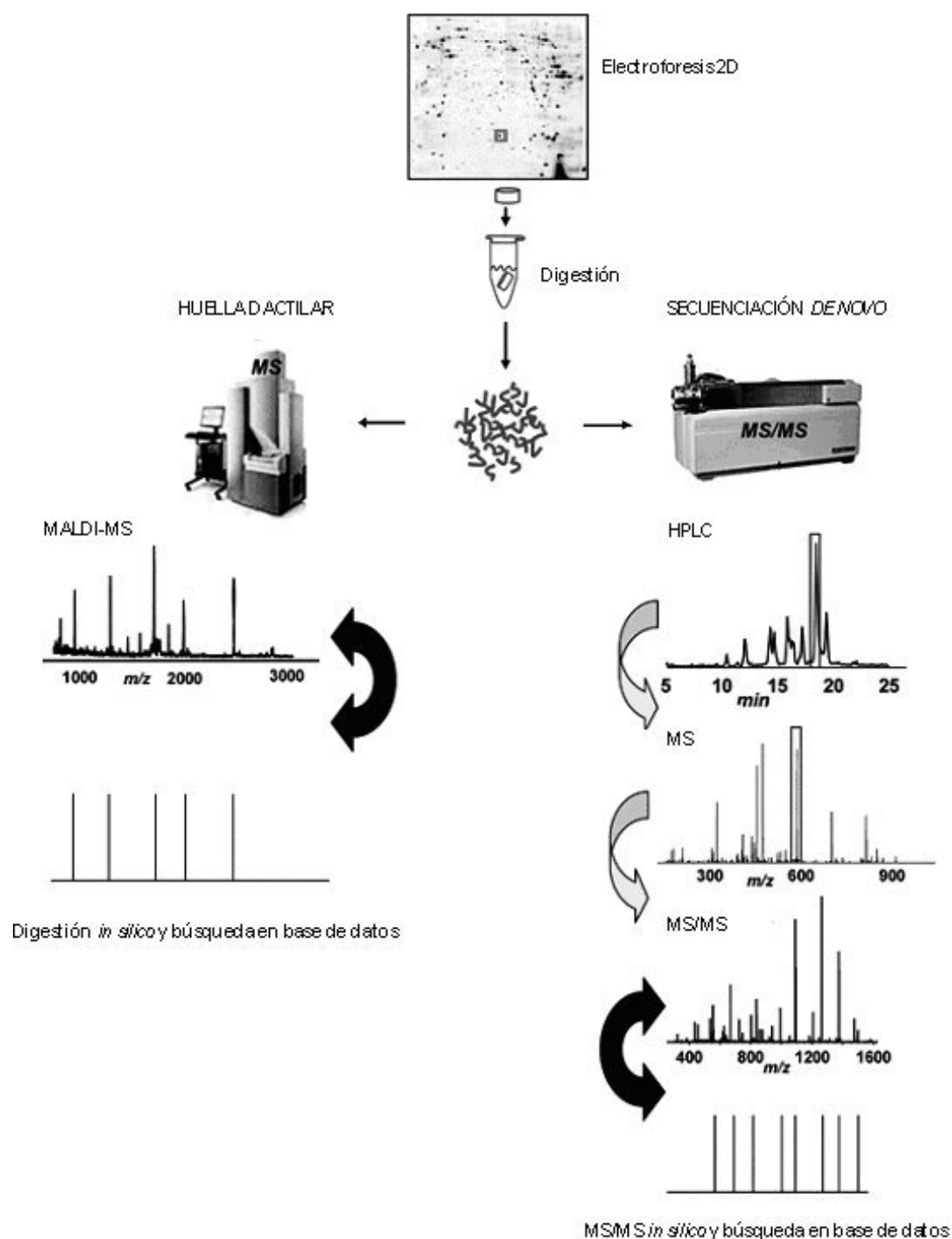


Figura 1. Técnicas de MS para identificación de proteínas a partir de geles bidimensionales. Los puntos de interés del gel 2D son cortados y colocados en tubos. La proteína del bloque de acrilamida es digerida con una proteasa, y los productos obtenidos son analizados por distintas técnicas para su identificación. Adaptado de Nesatyy and Suter (2007).

4-Medida de la abundancia: la medida de la abundancia de cada ion se realiza en base a la altura o área del pico en el espectro, permitiendo una semicuantificación o cuantificación de cada ion.

3.1. MALDI-TOF y huella dactilar de péptidos:

En esta técnica, los péptidos generados luego de la digestión con tripsina son mezclados a una matriz en solución, que está formada por una solución concentrada o saturada de un compuesto de bajo peso molecular ácido y que absorbe el UV. En el caso de péptidos, el compuesto más utilizado es el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico. Aproximadamente 1 μ L de la mezcla muestra/matriz es colocada en una placa para MALDI y se permite co-cristalizar en un único punto. Como la matriz se coloca en exceso con respecto a la muestra y absorbe UV, cuando se irradia con un láser de UV esta energía es absorbida por la matriz y pasada a la muestra de manera que se ioniza pero no se fragmenta. Estos iones son luego acelerados por el espectrómetro de masa: los iones mas livianos viajan más rápido que los pesados, por lo que el tiempo en el que llegan al detector puede ser utilizado para determinar la relación masa/carga de cada ion, obteniéndose un espectro que contiene todos los iones acelerados, y se obtiene una lista de las masas de los picos que presentan mayor intensidad. La lista de picos es enviado a una base de datos que compara las masas de los picos de los espectros con los teóricos de las proteínas digeridas, y produce una lista de las posibles identidades utilizando un sistema de puntaje.

3.2. Espectrometría de masas en tandem por electropulverizado.

Este proceso analiza los péptidos generados luego de la digestión con tripsina. En este caso, el espectrómetro de masas está acoplado a un equipo de HPLC. Durante la ionización por electropulverizado, los péptidos se separan previamente por HPLC (usualmente son utilizadas columnas de C18) y luego entran a una fuente de ionización. Un voltaje alto es aplicado a una aguja por donde pasan las muestras que llegan como gotas, produciendo una carga en la superficie. En la gota se genera una repul-

sión electrostática que hace que se liberen iones gaseosos que son acelerados en el espectrómetro de masas. Cuando los péptidos entran al espectrómetro de masa, algunos iones peptídicos son seleccionados y fragmentados por colisión con un gas para producir un número de fragmentos iónicos. Las relaciones m/z de estos fragmentos son registrados para dar el espectro de fragmentación de ese péptido. Un péptido se puede considerar como una cadena aminoacídica que se puede fragmentar en cualquier punto; sin embargo la fragmentación ocurre preferencialmente entre la unión de N y C entre aminoácidos, por lo que la secuencia de un péptido puede determinarse por el patrón de picos que se obtienen del espectro de fragmentación. El espectrómetro de masa realiza el registro de todos los picos de fragmentación, y luego de completada la separación y espectrometría de masa de todos los péptidos, los espectros son enviados a una base de datos para la identificación de la proteína en estudio por comparación al patrón de ionización teórico de los péptidos de la proteína.

3.3. Bases de datos para la identificación de proteínas:

Existen numerosas bases de datos para la identificación y caracterización de proteínas luego de la espectrometría de masas, búsqueda de semejanzas, patrones de fragmentación y perfiles, predicción de sitios de modificación postraducciona, etc. Entre ellos se encuentran MASCOT, ProteinProspector, ExPASy Proteomics. Muchos de estos sitios son accesibles luego de una suscripción, mientras que otros están disponibles en la web a todos los usuarios interesados. La tabla 1 muestra las páginas correspondientes de algunos de los sitios.

4. Alternativas a los geles bidimensionales

Algunas alternativas al uso de geles en dos dimensiones son los métodos basados en espectrometría de masa para comparar la abundancia de péptidos. Luego de la digestión de las proteínas (sin que se realice ninguna separación previa), la mezcla compleja de péptidos se separa por cromatografía previo al análisis por MS. La espectrometría de masas

Tabla 1.

Páginas disponibles correspondientes a bases de datos para identificación de proteínas para el análisis posterior a la espectrometría de masas

ExPASy Proteomics	http://us.expasy.org/tools
MASCOT	http://www.matrixscience.com
ProSight PTM	http://prosightptm.scs.uiuc.edu
Protein Prospector	http://prospector.ucsf.edu
GPM	http://thegpm.org
PROWL	http://prowl.rockefeller.edu

puede ser corrida de manera independiente o bien acoplada a la separación por HPLC. Los péptidos producidos por la digestión de las proteínas totales son ionizados para adquirir el espectro de MS de todos los iones presentes en la mezcla. Algunos péptidos son seleccionados y son fragmentados individualmente para obtener un segundo espectro MS (MS/MS) que permite obtener la secuencia de aminoácidos del péptido. La señal o integración de los picos de los iones puede ser utilizada como técnica de cuantificación, ya que en teoría la intensidad de los picos es proporcional a la cantidad de proteína de la cual proviene el ion peptídico. Sin embargo, la variabilidad técnica, tanto a nivel de la cromatografía líquida como a nivel de los pasos de ionización, hacen que la comparación de las intensidades no sea confiable. Por ello, se han desarrollado diferentes técnicas de marcado de las proteínas que permiten una directa comparación de los picos en un mismo espectro MS o MS/MS. La base de todas estas técnicas es la misma: se introducen marcas inertes, estables e isotópicas a los péptidos de manera que los patrones de ionización y las propiedades cromatográficas de los péptidos marcados sean similares a los de las muestras de origen, pero pueden ser diferenciados luego del análisis por un leve corrimiento en el espectro de MS. De esta manera, las dos muestras a comparar pueden ser corridas de manera simultánea y analizadas a partir de un mismo experimento. Por ello, la separación de los péptidos seguida de la cuantificación de los iones refleja la abundancia relativa de cada proteína intacta de la cual deriva el péptido cuantificado. Los distintos métodos de marcado se diferencian en el momento en

el que la marca es introducida a la proteína o a los péptidos, y cómo son extraídos los datos de cuantificación. A continuación se describen brevemente los distintos tipos de marcado.

4.1. Marcado isotópico *in vivo*.

Este es un método comúnmente utilizado en proteómica comparativa. Para estos experimentos, una de las muestras se crece en una atmósfera de nitrógeno natural, mientras que la muestra a comparar se crece en presencia del isótopo pesado. Esto puede hacerse por la introducción de algún aminoácido marcado en cultivos celulares o utilizando ^{15}N como única fuente de nitrógeno, típicamente en la forma de K^{15}NO_3 . Como resultado, las masas de los péptidos de las poblaciones a comparar serán diferentes, permitiendo una comparación directa de las intensidades de los iones de las dos mezclas. En principio, las dos muestras a comparar pueden ser mezcladas al comienzo del experimento, por lo que se eliminan virtualmente todas las potenciales variaciones técnicas. Debido a que la diferencia isotópica de cada péptido es la misma entre los espectros de las dos muestras, el estudio del proteoma completo puede ser problemático debido a la complejidad de los espectros, por lo que esta técnica es recomendable para sub-proteomas, como por ejemplo el fosfoproteoma.

4.2. Marcado isotópico *in vitro*.

Una alternativa es introducir la marca en los péptidos de manera química durante o luego de la digestión de las proteínas. Una ventaja de esta técnica es que cualquier muestra proteica puede ser marcada, eliminando la limitación que existe al querer introducir la marca en una célula viva. La mayor desventaja es el cuidado que hay que tener para no introducir variaciones técnicas durante la obtención de la muestra proteica (en especial si existe algún paso de fracción subcelular).

4.2.1. Marcado con ^{18}O durante la digestión con tripsina

Durante la hidrólisis de las proteínas con tripsina, el oxígeno del agua se incorpora al C terminal del péptido triptico. Por lo tanto, si la digestión de una muestra se realiza en presencia de H_2^{18}O mientras que la de la muestra

a comparar se realiza en un medio con $H_2^{16}O$, en teoría se generan péptidos que difieren en cuatro unidades de masa en el espectro. Experimentalmente, sin embargo, la incorporación es siempre incompleta, generándose espectros que se solapan. Por esta razón este método no es tan elegido como otros, aunque presenta bajo costo comparado a los que se describen a continuación.

4.2.2. Marcado isotópico con sondas por afinidad (ICAT).

Otro método de marcado se basa en la modificación covalente de Cys con compuestos químicos biotinilados que sólo difieren en la inclusión de isótopos pesados y livianos luego de la digestión. El uso de biotina permite el rápido enriquecimiento de los péptidos marcados, y debido a que la mayoría de las proteínas contienen pocas Cys, sólo algunos péptidos de cada proteína son analizados. Por ello, este método permite el análisis de muestras complejas. Sin embargo, dado que una de cada siete proteínas no contiene residuos de Cys, existen limitaciones en el análisis.

4.2.3. Marcas isobáricas para cuantificación relativa y absoluta (iTRAQ).

Un método alternativo involucra la modificación de aminas primarias con marcas isobáricas. Esta técnica es similar a ICAT en cuanto a que cada muestra es marcada con una marca diferente, pero con los reactivos iTRAQ todos los péptidos tripticos son marcados. Además, esta técnica permite el análisis de hasta 8 muestras de manera simultánea si se utilizan distintos reactivos iTRAQ para marcar las distintas muestras.

4.3. Cuantificación libre de marca.

A pesar de los problemas de variabilidad descritos anteriormente en la cuantificación directa de la intensidad de los picos de MS luego de la cromatografía líquida, debido a la aparición de espectrómetros de masa de última generación y al aumento de la reproducibilidad de las separaciones en las cromatografías gaseosas, esta técnica ha comenzado a ser utilizada nuevamente. Para ello, varios programas de computación han sido desarrollados para comparar

los péptidos de múltiples espectros de LC-MS/MS. Una vez identificado el mismo péptido en distintos espectros, éstos se comparan y se genera una relación de expresión luego de un análisis estadístico.

4.4. Cuantificación absoluta utilizando péptidos AQUA

Los métodos descritos anteriormente son capaces de determinar cantidades relativas de proteínas o péptidos. Para convertir datos relativos a absolutos se requiere la inclusión de estándares internos de concentraciones conocidas, que deben estar marcados para distinguirse de la proteína nativa. Para ello se utiliza la técnica de marcado isotópico estable, en la que péptidos sintéticos son marcados con un aminoácido pesado en una o más posiciones (llamado péptido AQUA). Debido a que las propiedades cromatográficas e ionizantes de los péptidos AQUA son idénticas a las de los péptidos nativos, al analizar e integrar los cromatogramas de los iones del par isotópico, se obtiene una relación entre el péptido nativo y el sintético de concentración conocida. Estos péptidos pueden ser sintetizados para múltiples proteínas de interés y usados para determinar concentraciones absolutas en una muestra. Además, pueden ser utilizados para cuantificar modificaciones postraduccionales.

5. Aplicaciones de la proteómica

El análisis del proteoma de órganos o tejidos de plantas se ha llevado a cabo para analizar, por ejemplo, la respuesta a hormonas o moléculas señal, la respuesta a estímulos del ambiente, cambios durante el desarrollo o también para analizar los patrones proteicos de líneas con diferente base genética. Proteomas subcelulares también han sido analizados en diversas especies y, más recientemente, se ha utilizado este tipo de estudio para analizar interacción de proteínas o modificaciones postraduccionales. Además, se han analizado por esta técnica la equivalencia y seguridad de alimentos derivados de plantas transgénicas, así como el estudio de la presencia de alérgenos, entre otros. Así, los campos de aplicación de la proteómica en plantas ha ido en aumento en los últimos años (ver revisiones: Cánovas et al.

2004; Rossignol et al. 2006; Jarrín et al. 2007) y a continuación se detallarán algunos de los aspectos más estudiados. La Tabla 2 resume las áreas más relevantes en las que se ha aplicado la proteómica en plantas.

5.1. *Análisis de proteomas subcelulares de plantas*

El mayor avance en proteomas subcelulares se ha llevado a cabo en plastidios, mitocondrias y membranas. Estos estudios no sólo han contribuido a la localización de proteínas específicas, sino también que ha brindado información relevante sobre transporte, metabolismo, vías de secreción, diferenciación y respuesta a estrés. A pesar de que la purificación de plastidios es una técnica fácil y que brinda fracciones de alta pureza, el aislamiento de otras organelas o fracciones subcelulares es técnicamente más dificultosa. En todos los casos, siempre se debe estimar el nivel de contaminación de la fracción purificada utilizando marca-

dores específicos. Cabe destacar que muchas de las proteínas identificadas en los diversos compartimentos provienen de anotaciones de genes con función desconocida, por lo cual el conocimiento de la localización de la proteína que codifican permite comenzar a identificar la función de dichos genes.

El análisis de proteomas de plastidios, especialmente de cloroplastos, ha brindado información sobre nuevas proteínas localizadas en membrana externa y en tilacoides. Estos estudios, llevados a cabo fundamentalmente en *arabidopsis* y espinaca, han evidenciado diversos procesos de procesamiento y translocación y modificaciones postraduccionales de proteínas. Gracias al uso de extracciones con diversos solventes, se han identificados nuevas proteínas candidatas a ser transportadores de membrana. La técnica de electroforesis nativa en presencia de azul de Coomassie (BN-PAGE), seguida por segunda dimensión e

Tabla 2 Aplicaciones de la proteómica en plantas: Especies analizadas, tipos de proteomas estudiados, procesos biológicos y aspectos prácticos donde se ha analizado el proteoma.

Especies analizadas	Proteomas	Procesos Biológicos	Aspectos prácticos
Sistemas modelos <i>Arabidopsis thaliana</i> <i>Medicago truncatula</i>	Individuales Genotipos Mutantes Transgénicas	Desarrollo Germinación Maduración polen Embriogénesis Respuesta a hormonas Muerte celular programada	Identidad de marcadores moleculares Caracterización del genotipo Equivalencia de OGM
Cereales Maíz Arroz Trigo	Fracciones subcelulares Cloroplasto Mitocondria Plastidio	Estrés abiótico Sequía Osmótico Temperatura Anoxia Deficiencia nutricional Metales pesados UV-B	Identificación alergenosen
Leguminosas Alfalfa Arveja Soja Lenteja	Citosol Pared celular Membrana Vacuola		
Otros Papa Tabaco Tomate Vid Espinaca	Órganos y Tejidos Raíces Semillas Coleoptiles Haces vasculares Hojas Tricomas Polen	Estrés biótico Patógenos Herbívoros Estrés oxidativo	
	Estados de desarrollo Germinación Plantas maduras Plantas jóvenes		

identificación de las proteínas por MS, técnica ampliamente utilizada para el estudio de complejos mitocondriales, también ha sido utilizada para el estudio de la composición de los complejos proteicos de la membrana tilacoidal.

El estudio del proteoma mitocondrial se ha dividido en la identificación de proteínas solubles, proteínas periféricas y proteínas integrales de membrana. En este caso, el uso de BN-PAGE seguido por 2-DE e identificación de las proteínas, se ha utilizado para analizar la composición de los diversos complejos respiratorios, identificándose nuevos componentes y diferencias con complejos respiratorios de otros organismos.

El análisis de proteínas de membrana es uno de los desafíos más difíciles, debido a problemas de metodología por la baja abundancia de las proteínas y sus características hidrofóbicas, siendo muchas de ellas proteínas transmembrana. Para el análisis de este tipo de proteínas, se han empleado partición de proteínas en distintas fases de solventes seguido de fraccionamiento teniendo en cuenta las propiedades fisicoquímicas de las proteínas. Por ejemplo, el proteoma de la membrana plasmática de *arabidopsis* fue analizado, siendo uno de los primeros que, además, se sometió a análisis de proteínas fosforiladas, identificándose más de 300 sitios de fosforilación. El proteoma vacuolar de *arabidopsis*, tanto de la membrana como de las proteínas solubles, también ha sido analizado, confirmándose dicha localización subcelular para algunas de las proteínas identificadas por otras técnicas.

Además, se han llevado a cabo estudios para identificar proteínas de pared celular y extracelulares –identificándose la presencia de varias proteasas-, proteínas nucleares –muy difícil debido a su baja cantidad y a sus asociación con el Retículo Endoplasmático-, y proteomas mixtos del aparato de Golgi y del Retículo endoplasmático.

5.2. *Proteomas durante el desarrollo de órganos*

Uno de los primeros objetivos de la proteómica en plantas fue generar mapas de referencia de proteínas solubles de un órgano en un determinado estado de desarrollo. En

los últimos años un gran número de trabajos se han realizado con el objetivo de identificar los cambios proteicos que ocurren asociados al crecimiento y desarrollo, con la finalidad de identificar las proteínas claves implicadas en dichos procesos. Así, se han descrito los cambios en el proteoma asociados al crecimiento o desarrollo del grano de polen, semillas, raíces, haces vasculares, entre otros.

Muchos son los estudios que demuestran que los análisis de proteómica pueden generar información relevante para dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en procesos de desarrollo. Por ejemplo, estudios llevados a cabo en raíces de maíz han indicado que, de las proteínas identificadas luego de 5-días de germinación, sólo el 28% permanece en las últimas etapas del desarrollo, identificándose, además, proteínas asociadas a la formación de raíces laterales. Procesos como la embriogénesis somática también han sido analizados en diversas especies por proteómica, identificándose proteínas de membrana, nucleares, así como proteínas involucradas en metabolismo y producción de energía, en diversas etapas de este proceso. En muchos casos, se han identificado proteínas cuyos ARNm no fueron identificados por estudios de transcriptoma, como es el caso del análisis del grano de polen en *arabidopsis*, entre otros.

5.3. *Proteomas en respuesta a estrés abiótico*

El estudio de la interacción de las plantas con el ambiente ha sido clásicamente abordado mediante estudios bioquímicos, genéticos y más recientemente, a nivel de transcriptoma, mediante PCR en tiempo real (qRT-PCR), microarreglos, entre otros. Sin embargo, la proteómica, desde su aplicación en este tipo de situaciones, ha comenzado a brindar contribuciones relevantes en cuanto a los elementos involucrados tanto en la percepción de la situación ambiental como en la traducción de dicha señal en la planta. Los tipos de estrés analizados mediante proteómica han sido: sequía, estrés salino, alta temperatura, alta luz, radiación UV-B, deficiencia nutricional, niveles elevados de CO₂, anoxia, metales pesados y herbicidas.

Este tipo de aplicación de la proteómica incluye típicamente análisis de 2-DE/MS para estudiar variaciones proteicas entre especies sensibles y resistentes frente a una determinada situación de estrés. Se analizan las diferencias cuantitativas y cualitativas de proteínas con la finalidad de correlacionar estos cambios con las diferencias fenotípicas. Se estudian también plantas mutantes o transgénicas, donde una línea es resistente y otra sensible. Así, las proteínas diferenciales se seleccionan contrastando los proteomas entre líneas resistentes *versus* susceptibles, o entre líneas crecidas en condiciones óptimas *versus* estresadas.

5.4. Proteomas en respuesta a estrés biótico

En los últimos años, muchos estudios se han llevado a cabo para analizar la respuesta de los proteomas de diversos órganos frente al ataque por hongos, virus o bacterias. Típicamente, extractos crudos de hojas, semillas, raíces o cultivos celulares se analizan a distintos tiempos luego del tratamiento y se separan organelas o subfracciones para el análisis de los cambios en el proteoma. Además, se analiza el efecto de elicitores o moléculas claves de la señalización (como ácido salicílico, peróxido de hidrógeno u óxido nítrico) sobre el proteoma. Por otro lado, se estudian los proteomas de especies tolerantes o resistentes *versus* el de sensibles. Estos estudios, junto con el estudio del proteoma de diversos compartimentos celulares (apoplasto, tricoma, sap de floema o xilema, entre otros), han evidenciado que varias proteínas relacionadas a la defensa frente al ataque de patógenos están presentes incluso en ausencia del mismo y que las mismas proteínas responden a tipos variados de estrés. Además, muchas proteínas derivadas de genes de función desconocida, han sido encontradas en estos estudios.

En general, la mayoría de las proteínas identificadas en los estudios de proteomas de genotipos resistentes comparadas con los de sensibles, han mostrado dos tipos generales de proteínas: proteínas relacionadas a la defensa y enzimas asociadas al metabolismo del carbono o nitrógeno y al metabolismo secundario. Dentro del primer grupo, se han encontrado proteínas PR (como glucanasas,

quitinasas, proteasa, inhibidores de proteasas), antioxidantes (catalasas, SODs, peroxidases), chaperonas, HSPs, proteínas LEA. En el segundo grupo, varias enzimas asociadas a metabolismo como la glucólisis, fotosíntesis, ciclo de Krebs, asimilación del nitrógeno o implicadas en metabolismos secundarios han sido encontradas. Es notable que los estudios basados en análisis del transcriptoma han analizado en mucha mayor medida el primer grupo que el segundo. Sin embargo, la presencia de mayor concentración de proteínas implicadas en metabolismo primario en genotipos resistentes *versus* sensibles podría indicar una ventaja genética para defenderse frente al ataque.

5.5. Proteómica para el estudio de simbiosis en plantas

La proteómica se ha aplicado también para el estudio de las proteínas involucradas en la formación de nódulos en especies leguminosas. Mapas de proteínas de raíces de especies hospedadoras, nódulos, cultivos de bacterioides fueron generados y comparados, con el objetivo de identificar proteínas involucradas en la simbiosis. Además, se analizaron las proteínas involucradas en distintas etapas de la nodulación.

5.6. Modificación postraducciona l e interacción de proteínas

Una de las modificaciones postraduccionales de proteínas estudiadas mediante proteómica es la fosforilación. En estos estudios, se han identificado los cambios cuantitativos y cualitativos de las proteínas fosforiladas en respuesta a diversas señales. Además, se han analizado las proteínas modificadas en su estado redox en diferentes sistemas, identificándose muchos candidatos putativos de ser blanco de reducción por tioredoxinas. Recientemente, se ha comenzado a analizar el patrón de proteínas sujetas a ubiquitinación en plantas, mediante estudios de proteómica.

En cuanto al estudio de interacción de proteínas mediante proteómica, los estudios llevados a cabo en plantas son todavía muy pocos comparados con los llevados a cabo en otros sistemas, como mamíferos y levaduras. Algunos ejemplos incluyen estudios de com-

plejos formados por virus de plantas y proteínas del huésped, análisis de inmunoprecipitados de proteínas que interaccionan con fitocromos, así como proteínas que interaccionan con cobre.

6. Perspectivas

Los resultados obtenidos mediante estudios de proteómica en sus distintas aplicaciones han indicado que los estudios de genómica y transcriptoma no son suficientes, dado que la proteómica generalmente evidencia procesos no detectados por los otros estudios mencionados.

Esto se debe fundamentalmente a que las proteínas son física y químicamente más diversas que los ácidos nucleicos. Además, debido al procesamiento del ARN y a las modificaciones postraduccionales, las proteínas de un dado organismo exceden en número la cantidad de genes. Otro nivel de complejidad se presenta si se tienen en cuenta la interacción de proteína-proteína, lo cual modifica las propiedades de las proteínas individuales.

De esta manera, el estudio del proteoma, en paralelo con el del transcriptoma, llevado a cabo sobre el mismo sistema, podrá dilucidar los mecanismos de control de expresión de proteínas y evidenciará los procesos biológicos llevados a cabo en una determinada situación.

7. Bibliografía

- Cánovas F. M., Dumas-Gaudot E., Recorbet G., Jorrín J., Mock H-P and Rossignol M. 2005. Plant Proteome Analysis. *Proteomics*, **4**, 285-298
- Chen S., and Harmon A. C. 2006. Advances in plant proteomics. *Proteomics*, **6**, 5504–5516.
- Jorrín J. V., Maldonado A. M. and Castillejo M. A. 2007. Plant proteome analysis: A 2006 update. *Proteomics*, **7**, 2947-2962
- Nesatyy V. J. and Suter M. J-F. 2007. *Environmental Science & Technology*, **41**, 6891-6900.
- Newton R. P., Brenton, A. G., Smith, C. J. and Dudley E. 2004. Plant proteome analysis by mass spectrometry: principles, problems, pitfalls and recent developments. *Phytochemistry*, **65**, 1449-1485.
- Thelen J.J. and Peck S.C. 2007. Quantitative Proteomics in Plants: Choices in Abundance. *Plant Cell*, **19**, 3339–3346.

Rossignol M., Peltier J-B., Mock H-P., Matros A., Maldonado A. M. and Jorrín J. V. 2006. Plant proteome analysis: A 2004-2006 update. *Proteomics*, **6**, 5529-5548.

I CAPÍTULO 10

Metabolómica

Fernando Carrari, Telma E. Scarpeci,
Luciano A. Abriata, Alejandro J. Vila y
Estela M. Valle.

Definición de metaboloma

Se conoce como metabolismo al conjunto de reacciones químicas que ocurren en las células vivas, tejidos u organismos, mediante el cual estos participan del intercambio de materia y energía con su entorno. El origen de la palabra metabolismo procede del griego *metabolé* que significa cambio, transformación. En los sistemas biológicos los metabolismos se encuentran interconectados formando redes bioquímicas. En los últimos años y en esta era post-genómica, se ha acuñado el término “metaboloma”, para indicar la totalidad de los metabolitos que actúan en las redes metabólicas de un sistema biológico. Es decir, el metaboloma implica la identificación y cuantificación simultáneas de todos los metabolitos del material investigado.

El metaboloma está conformado por dos tipos de compuestos: los metabolitos primarios y los secundarios. Los metabolitos primarios son compuestos que están involucrados en funciones básicas de la célula, como la respiración o la biosíntesis de aminoácidos. Todos los organismos comparten básicamente los mismos tipos de metabolitos primarios y en términos generales se puede decir que se trata de moléculas simples y de bajo peso molecular. En cambio, los metabolitos secundarios son específicos de la especie y muchos de ellos están implicados en la defensa de la planta contra estrés biótico (siendo los terpenos los más abundantes), en procesos de desarrollo específicos de la especie (hormonas) y en estrategias de atracción de polinizadores (pigmentos de las flores). En las plantas, se estima que el número total de metabolitos supera los 200.000. El análisis del metaboloma de un sistema biológico dado es conocido como metabolómica. Este término no siempre tiene el mismo significado, ya que la metabolómica es multifuncional y depende del diseño experimental y del objeto de estudio. En

general, la metabolómica indica la totalidad de los patrones metabólicos de los sistemas biológicos, también conocidos como perfiles metabólicos. Como los metabolitos son el producto de reacciones enzimáticas, ellos brindarán información importante sobre las propiedades regulatorias o catalíticas de un producto génico dado. Los metabolitos presentes en un sistema biológico bajo condiciones específicas (estadios de desarrollo, condiciones ambientales, modificaciones genéticas) se pueden analizar mediante el uso de técnicas cromatográficas de separación en distintas fases (gaseosa, líquida, de alta presión, etc) y de identificación mediante espectrometría de alta resolución que han comenzado a establecerse recientemente en Argentina, como la espectrometría de masa (MS) gaseosa o líquida y técnicas espectroscópicas como la resonancia magnética nuclear (RMN). A su vez, el acoplamiento de los sistemas de separación con los de identificación mencionados más arriba permite la obtención de perfiles metabólicos de muestras complejas como por ejemplo, extractos crudos obtenidos de órganos fotosintéticos de plantas.

Diseño experimental, técnicas, entrenamiento. Métodos cromatográficos (fase gaseosa y líquida).

El análisis de los metabolitos presentes en muestras complejas (como las que pueden obtenerse a partir de extractos crudos de plantas) puede realizarse en primer lugar a partir de la separación de las moléculas que las componen. Existen diversos métodos de separación con distintos grados de resolución y sensibilidad. La cromatografía en fase gaseosa (GC) ha sido extensamente usada justamente por su alta resolución y sensibilidad. Consiste en la separación de las moléculas por su capacidad móvil en una fase gaseosa impulsada por un gas usualmente inerte (por ejemplo Helio -He-) de modo de evitar reacciones con la matriz a analizar. Luego de su obtención y acondicionamiento, los extractos son inyectados en una cámara de vaporización a alta presión y temperatura, donde la muestra es volatilizada para luego ser transportada a una columna bajo un flujo constante de gas. Existen diferentes protocolos en cuanto a las condiciones y tiempos

de corrida y se utilizan columnas diferentes en función del tipo de muestras y moléculas a analizar. Las moléculas se separan de acuerdo a sus propiedades físicas y químicas y al final de la columna, un detector emite una señal que es registrada como una serie de picos los que constituyen el cromatograma. En la figura 1 se observa un cromatograma obtenido luego de aproximadamente 40 minutos de corrida de una muestra de extractos de frutos de tomate. El ápice de un pico dado representa el momento de mayor intensidad registrado y se lo conoce como el tiempo de retención (RT) de ese grupo de moléculas. El RT es una propiedad de las moléculas que permite la identificación de las mismas en el cromatograma.

Sin embargo, dada la necesidad de volatilizar los extractos, es necesario un tratamiento previo de los mismos a fin de transformar las moléculas en compuestos menos polares y más volátiles. Este paso, denominado derivatización, consiste en la adición de grupos químicos (tales como sililo $-\text{Si}(\text{CH}_3)_3$ - y **metoxi**) a las moléculas que componen la muestra com-

pleja. Si bien se han desarrollado diferentes métodos de derivatización, esta etapa constituye la principal desventaja de la cromatografía gaseosa dada la diversidad de propiedades físico-químicas de las miles de moléculas que componen un extracto crudo. La principal dificultad radica en la exacta identificación de los fragmentos obtenidos luego de la ionización de las distintas moléculas (ver siguiente sección: “Espectrometría de masas. Principios básicos”).

En este sentido, la aplicación de la cromatografía en fase líquida (LC) constituye un complemento importante a la gaseosa y contribuye a expandir el rango de aplicaciones de las técnicas cromatográficas en metabolómica. Si bien la resolución de ésta es menor que la gaseosa, permite la separación de compuestos de mayor peso molecular y polaridad sin la necesidad del paso de derivatización previamente mencionado.

No obstante los avances en el conocimiento en cuanto a la separación e identificación de compuestos orgánicos, la cromatografía no ha

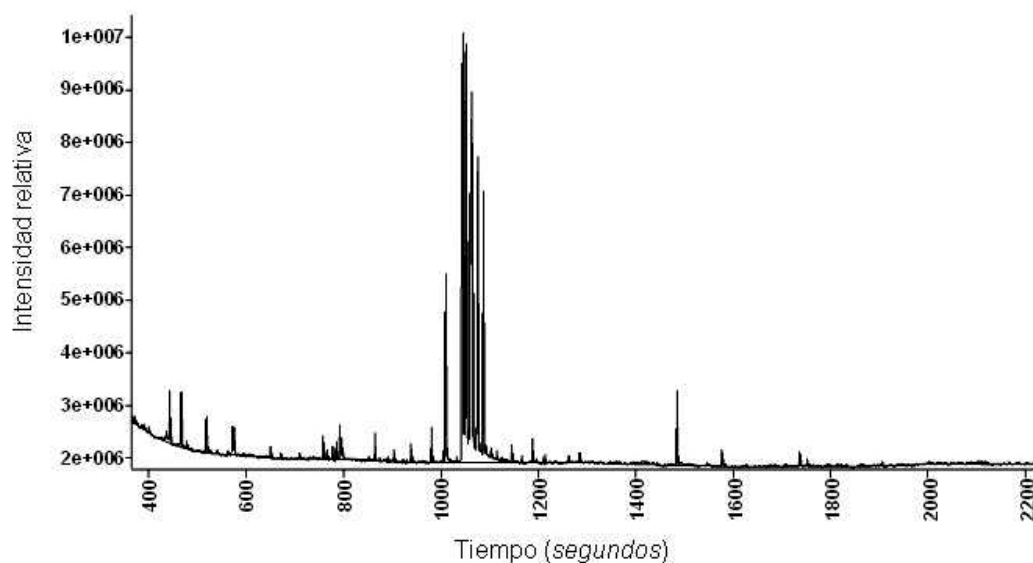


Figura 1. Cromatograma obtenido luego de aproximadamente 40 minutos de corrida de un extracto crudo de fruto de tomate. Sobre las abscisas se observan los tiempos de retención para grupo de moléculas en una columna en fase gaseosa. Sobre las ordenadas se grafican las intensidades relativas de cada grupo de moléculas separado. Bajo condiciones experimentales definidas estas intensidades son proporcionales a la cantidad de la molécula en análisis presente en una muestra dada.

resuelto aún la exacta identificación de moléculas individuales presentes en una muestra compleja. El empleo de sistemas de cromatografía acoplados a espectrometría de masas resulta de gran utilidad en la identificación de moléculas que se encuentran en trazas en una muestra compleja con un grado de exactitud de hasta 3-4 decimales.

Espectrometría de masas. Principios básicos.

La espectrometría de masas es un método que permite la identificación de moléculas a partir del patrón de fragmentos que se generan luego de la ionización de las mismas. A este patrón se lo denomina espectro de masas y constituye la “huella digital” de una molécula dada. Esta es una de las funciones primarias de los espectrómetros de masas. Existen varias métodos para la ionización de moléculas: ionización química (CI), por impacto de electrones (EI), bombardeo rápido de átomos (FAB), por campo eléctrico (FI), por láser (LIMS), desorción asistida por láser (MALDI) e ionización por electrospray (ESI). Este último método es uno de los más utilizados para la generación de los espectros de masas de moléculas orgánicas el cual consiste en un impacto con electrones de alta energía aplicado sobre una corriente de moléculas en fase líquida. Esto produce la nebulización y fragmentación de las moléculas y mediante cambios rápidos de temperatura se

produce luego una corriente gaseosa que conduce a los iones obtenidos hacia los detectores del espectrómetro. Durante esta corriente los iones generados son separados de acuerdo a su masa y carga que al impactar sobre los detectores generan una señal eléctrica que es registrada de acuerdo a su intensidad. La manera gráfica de representar estas señales es lo que se conoce como espectro de masas de una molécula. En la figura 2 se observa un espectro de masas del aminoácido fenilalanina.

Preparación de muestras. Extracción y derivatización.

La obtención de muestras biológicas para el análisis de sus perfiles metabólicos, como cualquier otra técnica que involucre la identificación y cuantificación de metabolitos, requiere la inmediata inactivación del metabolismo de modo de evitar efectos de su manipulación sobre el mismo. La inhibición rápida del metabolismo se logra mediante la disminución brusca de temperatura ($\leq -60^{\circ}\text{C}$) por inmersión de las muestras en N_2 líquido. A su vez, los procedimientos posteriores de extracción requieren el uso de materiales (tales como tubos plásticos o de vidrio) de alta calidad y pureza de modo de prevenir fuentes de eventuales contaminaciones. A su vez, dado que una de las aplicaciones comunes de estas técnicas es la comparación del estado metabólico de organismos frente a perturbaciones ambientales (por ejemplo de

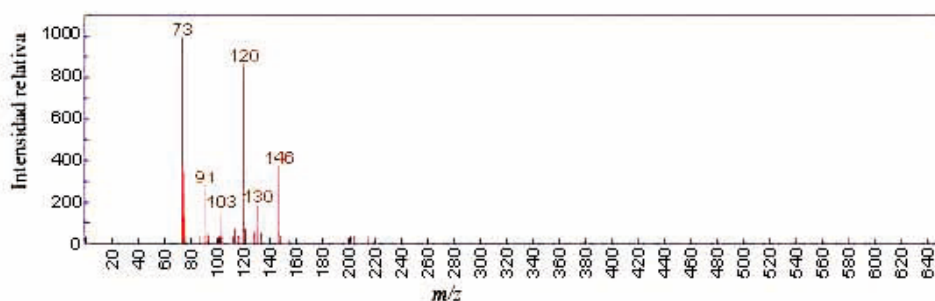


Figura 2. Espectro de masas del aminoácido fenilalanina. Sobre las abscisas se observan las relaciones masa/carga (m/z) de los diferentes fragmentos obtenidos luego de la ionización de la molécula. Sobre las ordenadas se grafican las intensidades relativas de cada fragmento obtenido. Bajo condiciones experimentales definidas estas intensidades son proporcionales a la cantidad de la molécula en análisis presente en una muestra dada. Fuente: adaptado de “*The Golm Metabolome databases*”.

plantas de cultivo en ambientes extremos) y/o a cambios en la constitución genética de los mismos (por ejemplo de plantas transgénicas que expresen diferencialmente una proteína involucrada en señalización por azúcares) una necesidad básica es las consideraciones de controles tanto de los materiales “*per se*” como de las condiciones en las que las muestras son extraídas y procesadas. A su vez, la aplicación de algoritmos estadísticos a los datos obtenidos requiere la determinación del grado de variación dentro de la población de muestras a ser analizadas.

A efectos explicativos, en este capítulo nos concentraremos en un ejemplo de muestreo, acondicionamiento y extracción de muestras de hojas de plantas (de tomate, papa, tabaco o *Arabidopsis*) en condiciones ambientales controladas (22-24°C, 250 $\mu\text{mol fotones.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ y 16 h de luz/8 h de oscuridad). El momento del día para el muestreo debe ser cuidadosamente controlado. Como regla general, la mitad del periodo de luz es el más indicado debido a que numerosos reportes en la literatura dan cuenta de los ritmos diurnos en los cambios en la composición metabólica de plantas. El otro punto importante a tener en cuenta es el estado fenológico de las plantas y los órganos a muestrear. La posición de las hojas en la planta y el área de las mismas también debe ser tenido en cuenta. Además, una vez que las porciones de hojas fueron cortadas de la planta, se debe registrar la masa exacta de la muestra y congelarlas inmediatamente. Las muestras deben mantenerse a la temperatura indicada durante todo el proceso de extracción. Para ello es conveniente enfriar todos los instrumentos necesarios para la toma de muestras, tales como tijeras, pinzas, sacabocados, tubos, etc. Para el ejemplo mencionado, la cantidad de tejido necesario puede variar entre 100-150 mg (peso fresco). La muestra debe ser homogeneizada en N_2 líquido, las enzimas inactivadas mediante el agregado de metanol y al mismo tiempo deben agregarse estándares internos (en concentraciones conocidas) no presentes en la muestra a analizar. La extracción se realiza luego calentando la muestra a 70°C con agitación constante. Si bien este protocolo puede aplicarse a la obtención tanto de la fase polar

como apolar, a los efectos de este ejemplo, los pasos siguientes se concentran en la obtención de la fase polar. Mediante un paso de extracción con cloroformo-agua, las alícuotas de la fase polar son concentradas y liofilizadas para su posterior derivatización.

Tal como se mencionó previamente, la derivatización consiste en la modificación de las moléculas a fin de disminuir su polaridad y permitir la volatilización de las mismas. Existen varios métodos y reactivos derivatizantes. Entre los más usados para esta aplicación, el MSTFA (N-metil-N-trimetilsililtri-fluoroacetamida) ha demostrado ser uno de los más reactivos en reemplazar los hidrógenos lábiles de un amplio rango de compuestos polares por grupos sililos y el hidroxiclورو de metoxiamina es usado en un segundo paso de derivatización a fin de proteger grupos aldehídos y cetonas de las moléculas presentes en la matriz.

Los extractos así preparados son inmediatamente inyectados en el cromatógrafo acoplado al espectrómetro de masas. Tanto las condiciones de corrida (tiempo, rampa de temperaturas, frecuencia de captura de datos, etc) como las especificaciones de flujo de gas y columnas cromatográficas deben ser puestas a punto para cada aplicación particular. En este sentido, en los últimos años se dispone de programas de computación especialmente diseñados por los fabricantes de espectrómetros que controlan toda la operación y posterior procesamiento de datos. A su vez, la disponibilidad de colecciones de espectros de masas en bases de datos de acceso público (ver sitios recomendados) permite la rápida evaluación de los datos adquiridos.

Resonancia magnética nuclear. Principios básicos

La resonancia magnética nuclear es un método de análisis espectroscópico no destructivo, que se basa en la absorción de energía en la zona de radiofrecuencia por parte de los núcleos de algunos átomos, en presencia de un campo magnético. La MS es la técnica más utilizada en metabolómica. Sin embargo, la técnica de RMN está ganando terreno en este sector, como una técnica que brinda información complementaria, ya que amplía el rango

de metabolitos detectados y provee información estructural detallada de las moléculas presentes. Más aún, la RMN permite identificar sustancias previamente no halladas en muestras similares.

La RMN explota una propiedad de los núcleos atómicos, el spin nuclear. El spin nuclear posee un momento magnético, es decir que se comporta como un pequeño imán. Normalmente, estos momentos magnéticos están orientados al azar y tienen la misma energía (figura 3). Si se aplica un campo magnético fijo (B_0) con una dada dirección, estos momentos magnéticos quedarán alineados a favor o en contra del campo magnético externo (figura 3). Según su orientación con respecto al campo B_0 , los núcleos tendrán ahora distinta energía. La diferencia de energía (ΔE) entre estos dos niveles está en el orden de las ondas de radio, es decir con frecuencias de MHz. Si ahora aplicamos al sistema orientado la frecuencia correspondiente a esa ΔE (ν_0), se inducirá una transición entre

estos niveles, que es el fenómeno de Resonancia (figura 3).

La frecuencia de absorción ν_0 depende del campo aplicado (B_0), el cual está fijo para cada equipo, y la constante giromagnética nuclear (γ) que es característica de cada núcleo (figura 3). Es decir que cada núcleo tendrá una frecuencia de absorción característica. Es importante tener en cuenta que, como se trata de una propiedad del núcleo atómico, dado un elemento químico, los distintos isótopos del mismo presentarán distintas propiedades magnéticas. Algunos isótopos (dependiendo de su composición) pueden carecer de spin, y por lo tanto no serán activos en RMN y este es el caso de ^{12}C , ^{16}O y ^{32}S . Por simplicidad, en este capítulo se considerarán sólo los núcleos con spin $\frac{1}{2}$, que son los de interés biológico. Dentro de los núcleos de spin $\frac{1}{2}$ se encuentran los núcleos de ^1H , ^{13}C , ^{15}N y ^{31}P , que pueden ser estudiados por RMN. Cada núcleo posee una sensibilidad determinada, que está determinada por su constante giromagnética. El or-

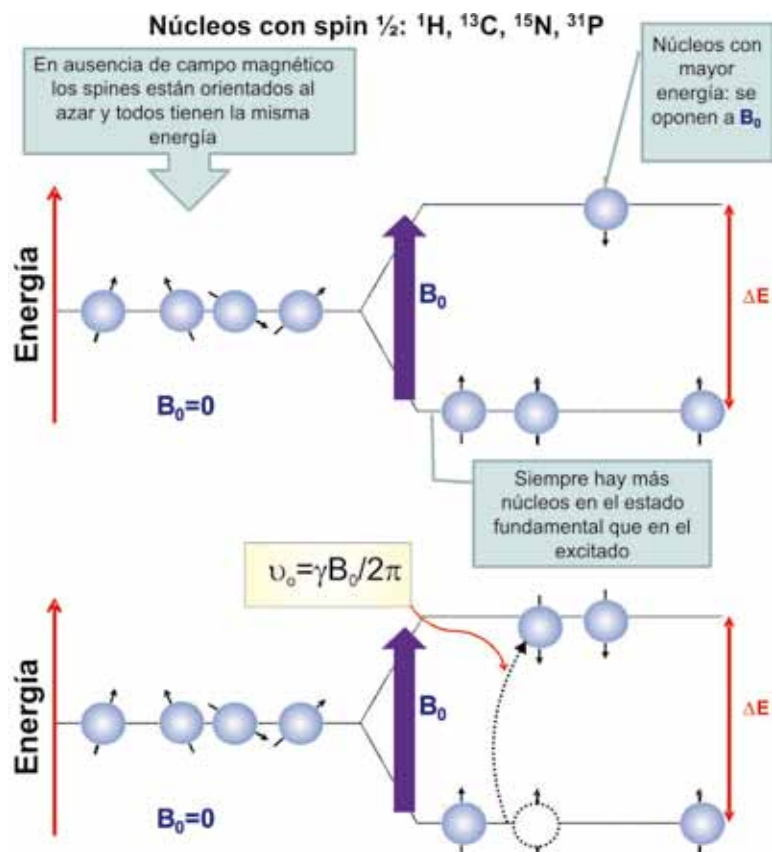


Figura 3. Esquema en donde se muestra los niveles de energía de los núcleos en presencia o ausencia de un campo magnético externo (B_0) y las transiciones de los núcleos entre un nivel de energía y otro superior al absorber una frecuencia (ν_0) correspondiente a la diferencia de energía (ΔE).

den de sensibilidad de estos núcleos es: $^1\text{H} > ^{31}\text{P} > ^{13}\text{C} > ^{15}\text{N}$. La detección de ^1H o ^{31}P , además de su alta sensibilidad, está favorecida por la alta abundancia natural de estos isótopos (99,9% y 100%, respectivamente). En cambio, los isótopos de ^{13}C y ^{15}N poseen una abundancia de 1,1% y 0,4%, lo cual dificulta más aún su detección. Este inconveniente se puede sortear enriqueciendo la muestra con el isótopo activo de interés. Cabe destacar que ninguno de estos isótopos es radioactivo, lo que facilita la manipulación de las muestras.

Todos los elementos con isótopos magnéticos detectables por la técnica RMN pueden ser usados para identificar metabolitos en tejidos de plantas y sus extractos. El ^1H es el isótopo magnético más utilizado debido a su alta sensibilidad intrínseca y su abundancia natural. La concentración límite para poder detectar un metabolito por RMN de ^1H en un extracto es alrededor de 10 μM . Para una muestra dada, la sensibilidad aumenta con el campo magnético del instrumento utilizado.

Los metabolitos fosforilados pueden ser identificados y cuantificados por RMN utilizando el isótopo magnético ^{31}P . De esta manera se pueden estudiar un número pequeño de moléculas abundantes y de gran importancia metabólica

como es el fosfato inorgánico, nucleósidos trifosfatos, fosfomonoésteres, etc.

Desplazamiento químico

La frecuencia de absorción de cada núcleo depende de su constante giromagnética y a un campo dado. Por ejemplo, a un campo de 9,4 T, los ^1H absorben a 400 MHz, los ^{13}C a 100,6 MHz y los ^{15}N a 40 MHz. Sin embargo, no todos los ^1H ni todos los ^{13}C absorben a la misma frecuencia. La frecuencia de absorción de cada protón depende de la ubicación del núcleo en las moléculas, es decir, de su ambiente químico. Las distintas posiciones de los núcleos en un espectro se cuantifican con un parámetro llamado *desplazamiento químico* (δ), cuyo valor no sólo informa la frecuencia precisa de absorción, sino que nos permite distinguir el tipo de protón (por ejemplo alifático, aromático, amídico, etc.). La intensidad de una señal de resonancia, o sea el área bajo cada pico, es proporcional al número de núcleos de ese tipo (figura 4).

Espectrómetro de RMN

Cada equipo de RMN trabaja a un campo magnético fijo. En general es conveniente

Para el caso hipotético de un núcleo aislado:



En una molécula, los núcleos van a absorber a distintas frecuencias debido a diferencias locales en el campo, lo cual generará distintas señales en el espectro de RMN

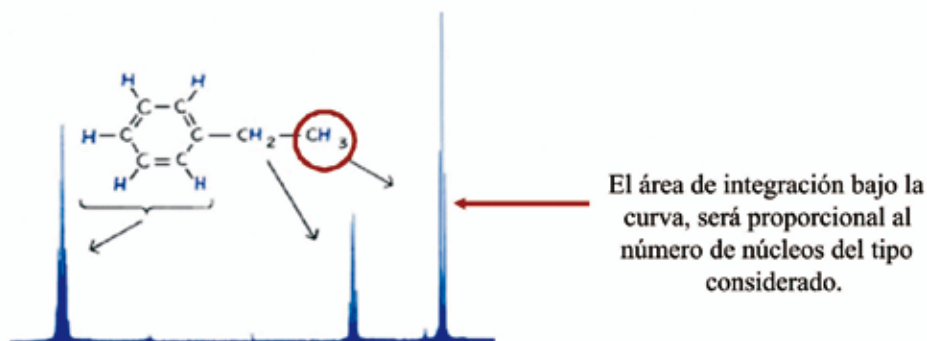


Figura 4. Dependencia ubicación del núcleo en las moléculas y su frecuencia de absorción.

trabajar con un campo magnético alto porque esto trae aparejado una mayor sensibilidad y resolución. Cada equipo se suele denominar no por la magnitud del campo (por ejemplo, 16 Tesla), sino por la frecuencia de absorción del ^1H a ese campo (para el caso mencionado, 600 MHz). La mayoría de los análisis metabólicos se realizan con instrumentos que operan en el rango de 300 a 900 MHz para ^1H .

El campo magnético está generado por Helio líquido a bajas temperaturas (4 K), que es superconductor, y se encuentra en un termo que rodea la muestra, que constituye el imán o magneto. Los pulsos de excitación de radiofrecuencia se generan mediante bobinas que están alrededor del tubo donde se encuentra la muestra, complementadas con un conjunto de bobinas que permiten la detección de la señal resultante.

Preparación de las muestras

Se pueden obtener espectros de RMN a partir de una amplia variedad de materiales: extractos vegetales (por ejemplo: jugo de tomate), suspensiones celulares e inclusive plántulas intactas.

En el caso de realizar RMN de ^1H , es conveniente liofilizar las muestras para eliminar el agua. Esto se realiza con el fin de reducir la señal correspondiente al solvente, que (por su alta intensidad) dificulta la detección de señales de los metabolitos. Luego se resuspende la muestra liofilizada en agua deuterada (D_2O). La adición de D_2O a la muestra hará que no se puedan detectar las señales de protones intercambiables con el solvente, como los de grupos amida o alcohol. En caso de que sea necesario poder identificar los mismos, deben realizarse experimentos que permitan la eliminación selectiva de la señal del solvente. En caso de que se deseen extraer algunos componentes específicos, también pueden utilizarse solventes orgánicos, de preferencia deuterados (que se venden comercialmente). Conviene utilizar solventes químicamente inertes y volátiles, lo que permite eliminar el solvente en caso de que la muestra deba ser analizada por otra técnica. Esto es posible debido a que la técnica de RMN es no destructiva. Las muestras se colocan en tubos de vidrio borosilicato puro y el

volumen de extracto utilizado es dependiente del ensayo pero varía entre 250 y 400 μl .

Utilización de la técnica RMN en metabolómica

1-Identificación y cuantificación de metabolitos en tejidos vegetales: ventajas y desventajas

Existen diversas ventajas de la técnica de RMN para el análisis de perfiles metabólicos. Las mayores ventajas con respecto a otras técnicas son: (1) no se requiere tratamiento previo de la muestras (pudiéndose utilizar extractos crudos); (2) es un método no destructivo, lo cual permite el análisis subsiguiente de la muestra con otros métodos; (3) se puede obtener información sobre una amplia variedad de metabolitos en un único experimento; (4) no existen restricciones en cuanto a la volatilidad, polaridad de los compuestos, o la presencia de determinados cromóforos que interfieran; y (5) la técnica puede ser aplicada con escaso conocimiento previo de la composición de la muestra.

Otra gran ventaja de ésta técnica para el análisis cualitativo de metabolitos es que no requiere del conocimiento de ningún parámetro equivalente a los coeficientes de extinción necesarios para cuantificar muestras mediante técnicas espectrofotométricas. Esto se debe a que la magnitud de la señal de resonancia de un isótopo es directamente proporcional al número de núcleos que contribuyen a dicha señal. Lo anterior implica que, por una parte, no se requieren curvas de calibración para efectuar el análisis cuantitativo, y por otro lado no es necesario conocer el espectro de un compuesto puro ya que por lo general basta con identificar señales debidas a una porción dada de la molécula para obtener la información deseada. La información cuantitativa se obtiene a partir del área integrada bajo la curva.

Ejemplo 1: caracterización de extractos de frutos de tomate

La Figura 5A muestra un espectro de RMN de ^1H en una muestra de jugo de tomate. En la región de campo alto (3,1-0,3 ppm) del espectro de protones contiene la resonancia de los grupos alifáticos de los aminoácidos y áci-

dos orgánicos pertenecientes al metabolismo de los ácidos tricarboxílicos. En particular, las señales provenientes de treonina, alanina, glutamato, glutamina, GABA, aspartato, citrato y malato fueron identificadas claramente. Las resonancias encontradas en la región del espectro de campo intermedio (desde 3,2 a 5,3 ppm) corresponden en su mayoría a sacáridos, de los cuales D-glucosa y D-fructosa son los componentes principales. En la región de campo bajo (5,5-9,4 ppm) del espectro se encuentran las señales correspondientes a aminoácidos aromáticos y compuestos fenólicos. Debido a la baja intensidad de la señal, las asignaciones se realizaron parcialmente. Estos resultados muestran que la técnica RMN puede ser una herramienta útil para ser usada en la caracterización de tomates.

La principal desventaja de la técnica de RMN es su baja sensibilidad. El advenimiento de instrumentos de RMN de alto campo, de técnicas especiales de detección y el diseño de criosondas (de mucha mayor sensibilidad) ha mejorado este aspecto. De todas formas, rara vez se usa RMN para el análisis de un componente que se encuentra en trazas. Generalmente, el problema de la baja relación señal-a-ruido en los espectros de RMN (que sucede principalmente con isótopos poco abundantes) puede ser superado haciendo varios espectros de manera automática, y sumándolos. Esto redundaría en mayor tiempo de adquisición del experimento. Sin embargo, si se tiene en cuenta que cada experimento permite seguir muchos metabolitos a la vez, este aspecto negativo se ve compensado.

La técnica de RMN aplicada a heteronúcleos (tales como ^{13}C , ^{15}N o ^{31}P) es útil debido al hecho de que estos núcleos presentan una gran dispersión en sus señales, dado que el rango de desplazamientos químicos de los mismos es mayor que el de ^1H . En el caso particular de ^{13}C o ^{15}N , como ya se mencionó, los núcleos son menos sensibles y abundantes, por lo cual es conveniente realizar una marca isotópica. Generalmente, se utiliza la estrategia de marcado isotópico selectivo (no uniforme) para el análisis de flujos metabólicos, más que para realizar perfiles metabólicos.

Otra de las desventajas de la técnica es el solapamiento de las señales obtenidas en ^1H

RMN. A fin de minimizar esto se puede combinar esta técnica con una de separación cromatográfica, de manera que el extracto se fraccione, disminuyendo la complejidad de la muestra y por ende del espectro de RMN. Esto es análogo a lo que se realiza cuando se acopla la cromatografía gaseosa a un espectrómetro de masa. La segunda opción para incrementar la resolución espectral es adquirir espectros bidimensionales, distribuyendo las señales a lo largo de dos ejes de frecuencia. Estos métodos bidimensionales pueden además utilizarse para incrementar la sensibilidad de isótopos menos abundantes como ^{13}C , y establecen conexiones entre las señales de ^1H y ^{13}C lo cual es útil para la identificación de los metabolitos.

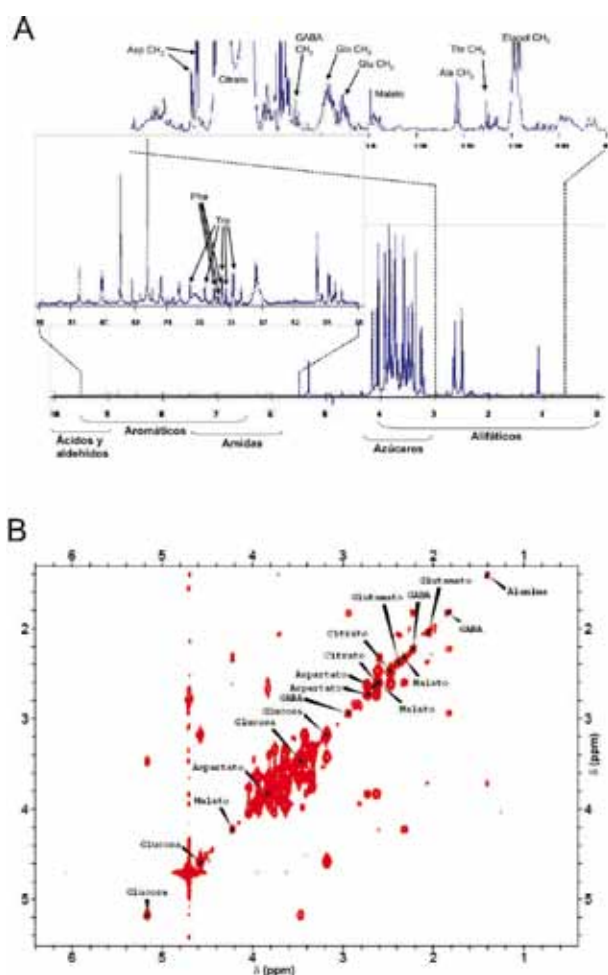


Figura 5. Perfil metabólico correspondiente a una muestra de jugo de tomate (A) espectro de ^1H RMN en una dimensión y (B) en dos dimensiones (COSY) de la zona de azúcares y alifáticos

La gran cantidad de información que se puede extraer de estos espectros bidimensionales compensa el hecho del mayor tiempo que lleva realizarlos. Estos experimentos explotan las interacciones entre los distintos isótopos detectables por RMN en una molécula y resultan en lo que se denomina correlación homonuclear, donde los dos ejes de frecuencia corresponden al mismo núcleo, por lo general ^1H , o correlación heteronuclear en donde uno de los ejes de frecuencia corresponde al ^1H y el otro a ^{13}C , ^{15}N y menos frecuentemente ^{31}P . Los experimentos de correlación homonuclear son particularmente útiles para realizar perfiles metabólicos, permitiendo que subgrupos de picos que se encuentran juntos en el espectro de una dimensión puedan ser identificados y asignados a compuestos particulares. La correlación heteronuclear también es útil cuando los extractos derivan de tejidos que han sido marcados con ^{13}C o ^{15}N .

Con el objeto de realizar una asignación completa de las señales resonantes a compuestos específicos presentes en el jugo de tomate, se realizaron diversos experimentos de RMN bidimensionales. La Figura 5B corresponde a un COSY de la zona de azúcares y alifáticos. Usando la información de conectividad y aprovechando la mayor separación de las señales en la dimensión adicional, muchas de las señales fueron asignadas sin ambigüedad. En los casos en donde la asignación fue dudosa, se adicionaron los compuestos puros al extracto para corroborar así la identidad del metabolito analizado. Se utilizaron las tablas de desplazamientos químicos existentes en la literatura como guía para asignar correctamente las señales.

Ejemplo 2: caracterización de plantas transgénicas

El desarrollo de técnicas para la generación de plantas transgénicas ha revolucionado el área de la biología de plantas. Estas plantas transgénicas pueden tener perturbaciones en las rutas metabólicas debido a la introducción del transgen en el genoma de la planta. La técnica de RMN permite tener un pantallazo general del estado metabólico de las plantas lo cual es de suma utilidad para generar líneas

de plantas que posean específicamente alguna ruta metabólica alterada. Un ejemplo de esto es el análisis de plantas de tabaco que producen constitutivamente el ácido salicílico, las cuales son más resistentes a infecciones. Los perfiles metabólicos que se obtuvieron por RMN mostraron que las plantas transgénicas tenían alterados los niveles de distintos compuestos como flavonoides, azúcares, aminoácidos, etc. Este ejemplo muestra claramente la potencialidad de utilizar la técnica de RMN para estudiar cambios metabólicos.

2-Mapas de distribución espacial de metabolitos en tejidos vegetales

La técnica ^1H RMN puede ser utilizada *in vivo* para obtener información acerca de la distribución espacial de un número limitado de metabolitos. Este método se utiliza generalmente para el H_2O ya que es la señal más fuerte detectada *in vivo*. Las imágenes brindan información acerca de la anatomía del tejido y el movimiento del H_2O dentro del mismo. También se puede obtener información acerca de la distribución espacial de ciertos metabolitos menos abundantes que el H_2O como ser aminoácidos y carbohidratos. Debido a que es una técnica no destructiva y no invasiva, se pueden monitorear cambios temporales en ciertos metabolitos. Es posible a partir de la misma muestra grabar una serie de espectros *in vivo* y luego analizar en el tiempo cómo es la respuesta metabólica frente a cambios en el estado fisiológico del tejido vegetal.

RMN versus MS

La espectrometría de masa acoplada a cromatografía gaseosa (GC-MS) es la técnica más utilizada en metabolómica. Sin embargo, la técnica de RMN está siendo utilizada como una técnica que brinda información complementaria a la que se obtiene con GC-MS.

La sensibilidad es tal vez el requisito más importante que debe cumplir una técnica analítica para ser utilizada en metabolómica, ya que una alta sensibilidad favorece el análisis rápido de una fracción mayor del metaboloma. La técnica ^1H RMN, que tiene un límite de detección de 5 nmoles, es varios órdenes de magnitud menos sensible que la técnica GC-MS, cuyo límite

de detección es de 10^{-12} mol. Esta diferencia se incrementa aún más si se tiene en cuenta la técnica de RMN con otros isótopos menos abundantes.

Se estima que con la técnica de GC-MS se puede identificar menos del 5 % de los metabolitos de una célula vegetal si bien todo el metaboloma es potencialmente detectable. Este argumento ignora cualquier diferencia que pudiese existir en la eficiencia de extracción y derivatización de metabolitos cuyas características son muy diversas. Otro obstáculo que impide un análisis completo tanto en RMN como en GC-MS es la dificultad de detectar componentes minoritarios en presencia de señales más intensas.

Existen otros factores que influyen en la elección de una técnica o la otra. Uno de ellos es el procesamiento de las muestras. Como se ejemplifico mas arriba, en el caso de GC-MS, es necesario realizar una extracción con solventes y además derivatizar los compuestos por lo que la preparación de las muestras es más laboriosa y además es más probable que en la muestra no estén representados todos los metabolitos que existen en el tejido de partida. Este no sería el caso de las muestras que son analizadas por RMN, en donde se pueden obtener espectros a partir de una amplia variedad de materiales sin necesidad de realizar extracciones con solventes.

La técnica de RMN tiene una ventaja para el análisis cuantitativo y es el hecho de que los espectrómetros modernos son muy estables en comparación con los GC-MS en donde es necesario realizar calibraciones frecuentes y la variabilidad en los tiempos de retención pueden complicar significativamente el análisis cuantitativo. Ambas técnicas generan usualmente múltiples señales lo cual es una ventaja para la identificación de metabolitos, pero a la vez representa una desventaja en términos de complejidad espectral. Sin embargo, en MS, algunas de estas multiplicidades se deben al fraccionamiento de la molécula ionizada, complicando el análisis cuantitativo. En cambio, para el caso de RMN, las señales múltiples provienen de la misma molécula, lo cual permite una verificación cruzada de los datos de cuantificación de los metabolitos.

Resumiendo, una comparación entre RMN y GC-MS muestra que esta última técnica es más sensible aunque el procesamiento de las muestras es más laborioso y la eficiencia de extracción y derivatización no sería homogénea para todos los metabolitos. Por otro lado, la facilidad con la que se generan los espectros y se cuantifican los metabolitos y la información complementaria (como ser estructural) que suministra hacen de la técnica RMN una herramienta de gran utilidad para los estudios metabolómicos.

Lectura y sitios recomendados

- Fiehn O. Metabolomics – the link between genotypes and phenotypes. *Plant Molecular Biology* 48:155-171
- Köckenberger W. Nuclear magnetic resonance micro-imaging in the investigation of plant cell metabolism. *Journal of Experimental Botany*. 2001, 52(356): 641-656.
- Krishnan P, Kruger NJ y Ratcliffe RG. Metabolite fingerprinting and profiling in plants using NMR. *Journal of Experimental Botany*. 2005, 56(410): 255-265.
- Lisec J, Schauer N, Kopka J, Willmitzer L y Fernie AR. Gas chromatography mass spectrometry-based metabolite profiling in plants. *Nature protocol*. 2006, 1(1): 387-396.
- Ratcliffe RG y Hill YS. Probing plant metabolism with NMR. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 2001, 52: 499-526.
- Silverstein RM y Webster FX. Proton magnetic resonance spectrometry. En: *Spectrometric identification of organics compounds*, 1998, 6° edición, Wiley & Sons.
- Sobolev AP, Segre A, Lamanna R. Proton high-field NMR study of tomato juice. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 2003, 41: 237-245.
- Verpoorte R, Choi YH, Kim HK. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem Rev*. 2007, 6:3-14.
- Weckwerth W. Metabolomics. *Methods and Protocols*. *Methods in Molecular Biology Series* 358. Humana Press 2007.
- www.metabolomicssociety.org (Sociedad de Metabolómica).
- www.springeronline.com/sgw/cda/frontpage/0,11855,5-40109-70-34409863-0,00.html (Sitio web de la revista científica Metabolomics, revista oficial de la la Sociedad de Metabolómica).
- www.metabolomics-nrp.org.uk (Norwich Research Park – Metabolomics and plants).

www.metabolomics.bbsrc.ac.uk (Rothamsted: The National Centre for Plant and Microbial Metabolomics).

<http://csbdb.mpimp-golm.mpg.de/csbdb/gmd/gmd.html> (Max Planck Institute of Molecular Plant Physiology / The Golm Metabolome databases consortium).

www.noble.org (Noble Foundation / Plant Biology / The Sumner group).

www.infometrix.com (Diversos paquetes informáticos para alineamiento de datos cromatográficos y espectroscópicos y análisis multivariados: PCA, SIMCA, etc).

www.metalign.nl (Software para pretratamiento suavizado, estimación del ruido, corrección de la línea base, alineamiento, etc de datos de GC y LC)

<http://metacyc.org> (La base de datos MetaCyc incluye información sobre las rutas metabólicas, sustratos, reacciones, enzimas, etc de más de 150 organismos diferentes).

I CAPÍTULO 11

Metagenómica

O. Mario Aguilar¹ y Daniel H. Grasso²

Introducción

Encaramos este capítulo reconociendo el protagonismo de los microorganismos en la vida de nuestro planeta, desde su origen más remoto. Tenemos el caso de nuestra atmósfera rica en oxígeno resultante de la actividad fotosintética de los primeros organismos microbianos, y aún hoy los microorganismos aportan la mayor capacidad fotosintética del planeta. Cada proceso en la biósfera hace uso de la casi ilimitada potencialidad de los microorganismos para transformar el medio que los rodea. El resto de los organismos vivos dependemos en gran parte de ellos gracias a su capacidad de transformar compuestos en nutrientes asimilables, accesibles y requeridos para nuestra forma de vida. En este sentido mencionemos los siguientes ejemplos: La capacidad de transformar el nitrógeno molecular atmosférico en una forma asimilable por las diferentes formas de vida se encuentra restringida a los microorganismos. Miles de millones de microbios benignos que habitan el intestino nos ayudan a digerir los alimentos, degradar potenciales toxinas y combatir otros microorganismos patógenos. También, nos beneficiamos de aquellos microorganismos que son capaces de mantener el medio ambiente libre de contaminantes y xenobióticos.

La capacidad de adaptación de los procariotas, que les permite prosperar y poblar cada ambiente, aún aquellos de condiciones extremas tales como los respiraderos hidrotermales del fondo del océano y los drenajes ácidos de las minas y efluentes industriales, es consecuencia de su gran diversidad metabólica y fisiológica. Además de su importancia debido a su rol esencial en la biósfera, los microorganismos han sido objeto del desarrollo de numerosas tecnologías que han contribuido a mejorar la calidad de vida. Son empleados industrialmente para producir la mayoría de los antibióticos y muchas otras drogas de uso clínico, también como agentes de remediación de

suelos y agua, mejoramiento de la producción agrícola, producción de biocombustibles, fermentar alimentos para el hombre, etc.

Alrededor de la década de 1950, los microbiólogos disfrutaban la percepción de haber logrado un conocimiento satisfactorio de los microorganismos del suelo. Así, en el año 1931 el microbiólogo Waksman, quien contribuyó significativamente al conocimiento de microorganismos del suelo productores de antibióticos, concluía "... disponemos de una buena información que nos da un panorama claro del mundo microscópico del suelo...". Sin embargo, otros investigadores con iniciativas aisladas y dispersas, persistían en su afán por demostrar la existencia de otras poblaciones microbianas ignoradas, recogiendo evidencias experimentales que cuestionaban esa aparente tranquilidad científica. En 1985, Staley y Konopka a partir de la revisión de los datos relacionados a la capacidad de cultivo de microorganismos de muestras ambientales, concluyen en la llamada "gran anomalía del conteo en placa". Esta anomalía es la discrepancia entre los valores de recuento de células obtenidos mediante microscopía y los valores de recuentos en placa. La conclusión latente, de un conocimiento limitado de los microorganismos del suelo, restringida esencialmente a aquellos que los microbiólogos habían sido capaces de cultivar *in vitro* en sus laboratorios, ha sido tanto abundante como sólidamente documentada durante la última década. El concepto de organismo viable pero no cultivable se hizo evidente con *Vibrio cholerae*, el cual es viable y virulento cuando se aísla de un medio acuático pero crece en cultivo hasta después de su pasaje por el intestino humano o de ratón. Este tipo de evidencias comenzaron a redirigir la atención hacia el mundo de los organismos no cultivables, entre las cuales destacamos dos descubrimientos que han tenido una gran relevancia en esta área. En el primero de ellos se describió mediante curvas de reasociación DNA-DNA la diversidad de las bacterias del suelo, encontrándose que era al menos 100 veces mayor que la que puede ser estimada mediante técnicas dependientes de cultivo. El segundo descubrimiento fue la demostración de *Helicobacter pylori* como agente etiológico de úlceras y cáncer gástrico. Pese a

que hace más de un siglo que esta bacteria ha sido observada en la mucosa gástrica, hasta que no fue cultivada no se aceptó su rol en la enfermedad.

La ecología microbiana ha experimentado una gran transformación en los últimos 25 años debido a la introducción de la filogenética, revolucionando la forma de ver a los microorganismos. El primer hito fue el trabajo de Carl Woese quien propuso a los genes rARN como cronómetros evolutivos (Woese, 1987). Posteriormente, Pace y colaboradores utilizaron el análisis de las secuencias de 5S y 16S rARN para describir la diversidad de los microorganismos (cultivables y no cultivables) presentes en muestras ambientales (Pace, 1997). Estos primeros trabajos se realizaron secuenciando directamente el ARN o sus respectivas copias de cADN. El desarrollo de la tecnología de PCR y el diseño de los cebadores que permiten amplificar el gen completo, permitió un acceso mayor a este procedimiento por una comunidad científica más amplia y a una mayor diversidad de nichos ecológicos. La aplicación de la amplificación por PCR de los genes 16S rARN a partir del ADN total de una comunidad, seguido del clonado y secuenciación, ha generado una gran cantidad de datos y ha redefinido la diversidad procariota. Si la muestra ambiental contiene varios tipos diferentes de organismos, se espera entonces encontrar diferentes secuencias de rARN, cuya diversidad será una medida de la complejidad de la comunidad y en el contexto de un árbol filogenético nos dirá quienes son sus miembros. Se ha empleado para caracterizar el perfil poblacional de diversos ambientes naturales. Así, mediante este tipo de análisis se ha demostrado que el suelo es el hábitat de la Tierra más rico en diversidad procariota, aún cuando los métodos basados en el cultivo *in vitro* no ponen de manifiesto esa alta diversidad.

El advenimiento de nuevas tecnologías y procedimientos de análisis de muestras ambientales, metodologías independientes del cultivo de los microorganismos, con potencialidades distintas para revelar componentes de la comunidad microbiana, impulsó un nuevo enfoque de estudio ampliando los horizontes del conocimiento. Se ha denominado con el

término **metagenómica** al análisis del genoma de comunidades independientemente de las tareas de aislamiento y cultivación. El conjunto de métodos desarrollados para acceder al conocimiento fisiológico y genético de comunidades, comprende la extracción directa de ADN de muestras ambientales, clonado de fragmentos de ADN en general o resultante de la amplificación de secuencias del gen 16S rRNA o genes asociados a funciones tales como metabolismo nitrogenado, antibiosis, etc. (Figura 1).

El avance y los logros ya alcanzados por la metagenómica están asociados al desarrollo de capacidades técnicas de secuenciación de

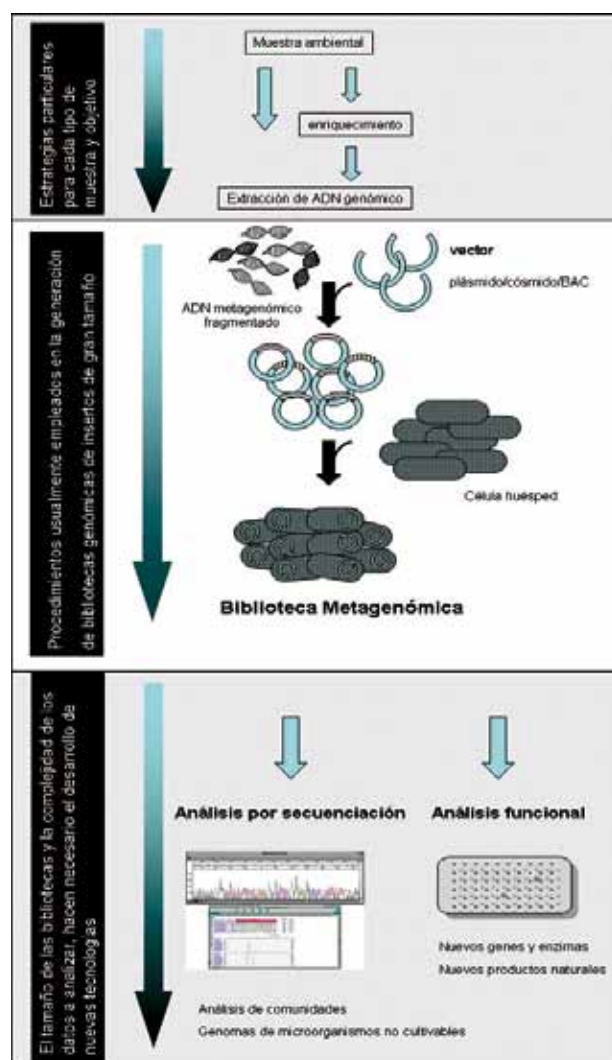


Figura 1. Bibliotecas metagenómicas. Esquema del proceso de obtención y análisis de bibliotecas construidas con ADN extraído directamente de muestras ambientales.

ADN con alta eficiencia de generación de datos primarios y a la bioinformática que ha desarrollado herramientas útiles para el procesamiento y análisis de datos.

Los microbiólogos encontraron la oportunidad para dirigir sus esfuerzos a una descripción amplia de la diversidad filogenética de ambientes comunes y exóticos tales como aguas oceánicas de superficie y profundidad, rumen de animales, superficie de redes y cañerías de agua, aguas termales surgentes y suelo. Más allá de permitirles realizar una descripción de la comunidad microbiana, con un nivel de resolución taxonómico preciso, promovió la aceptación y difusión del concepto ecológico de consorcio microbiano para lo cual el estudio de microorganismos aislados y cultivados *in vitro* resulta insuficiente para explicar la funcionalidad y dinámica poblacional.

Mirar más allá de los microorganismos que se pueden aislar, alcanzando al metagenoma permitirá responder no sólo la pregunta **cuáles** son los componentes de una determinada comunidad sino aún más importante **qué hacen** o serían capaces de hacer.

En el desarrollo de este capítulo se describirán las potencialidades de la metagenómica en general, haciendo énfasis en el suelo.

El suelo: Un hábitat complejo

El suelo constituye un soporte para la vida formado por partículas minerales de diferentes formas, tamaños y composición química, compuestos orgánicos en distintas etapas de degradación, e inmersos en este medio encontramos a la biota. A nivel macroscópico se detectan complejos de arcilla, materia orgánica, partículas de arena, todo en su conjunto formando agregados que constituyen una matriz. Los procariotes son los componentes predominantes de la biomasa del suelo, los cuales se encuentran adheridos o adsorbidos a las partículas del suelo. Dada la heterogeneidad de la matriz del suelo, los microorganismos pueden constituir micro-ambientes sobre la superficie y en los poros que se forman. La persistencia y el metabolismo de los microorganismos del suelo dependen de la disponibilidad de agua y nutrientes. El suelo es un ambiente que experimenta cambios drásticos en sus niveles

de humedad, pasando desde una saturación por persistentes lluvias o defectos de drenaje hasta períodos de aridez. Esto sugiere que la composición de la comunidad microbiana experimenta ajustes periódicos en respuesta a esos cambios ambientales, aunque se ignora la manera cuali y cuantitativa del impacto de esos efectores.

El suelo es un reservorio muy importante de carbono, y son los microorganismos quienes desempeñan roles protagónicos en el reciclado del carbono. Asimismo, funciones importantes tales como la captación del nitrógeno molecular, la movilización de fósforo inorgánico, y la formación de nitratos residen en actividades microbianas, los cuales impactan en la fertilidad de los suelos (Daniel, 2005).

Teniendo en cuenta la complejidad fisicoquímica del suelo y la diversidad de funciones que transcurren en el mismo, es posible imaginar al suelo como un cuerpo orgánico con capacidades metabólicas asociadas a poblaciones microbianas diversas, que su vez se complementan entre sí en forma semejante a lo encontrado entre los órganos de un cuerpo. Coincidentemente con este paralelismo, se ha renovado el enfoque del estudio de los genomas dirigido a la consideración global de las interacciones mutuas y la coordinación de la complejidad del sistema, que se lo conoce como biología de sistemas ("system biology"). Actualmente, el estudio del tamaño y la diversidad de las comunidades del suelo, es un desafío para los microbiólogos de suelo, que se proyecta en aspectos aplicados tales como la fertilidad de los suelos y su sustentabilidad.

Se ha estimado que un gramo de suelo contiene aproximadamente 4×10^7 células procariotas. El estudio de esta diversidad puede encararse aplicando métodos de cultivo directo o métodos moleculares de metagenómica. Los métodos tradicionales de aislamiento y cultivos en medios nutritivos y condiciones de laboratorio son apropiados pero insuficientes. Se ha estimado que solamente entre 0.1% y 1.0% de las bacterias de suelo son cultivables, lo cual remarca la magnitud de la comunidad aún no examinada. Estos números dan una idea de la magnitud de la complejidad, y del tamaño de la "caja negra" que representa descubrir los

elementos de esa biodiversidad presentes en una “pizca” de suelo. Es importante tener en cuenta que la metagenómica es aplicable no sólo a examinar la diversidad microbiana de un ambiente natural con el objetivo último de lograr el ensamble de genomas a partir de datos fragmentados (“meta análisis”), sino también revelar un espectro amplio de productos génicos con potencialidades biotecnológicas.

Métodos de análisis

El análisis metagenómico implica el aislamiento del ADN de la muestra, clonado de fragmentos de ADN usando vectores plasmídicos y transformación en alguna cepa apropiada de la bacteria *E. coli* (Figura 1). Aparentemente, el procedimiento es experimentalmente muy directo sin embargo el metagenoma comprende a numerosos genomas individuales que contribuyen, con distintos grados de representatividad, al tamaño y la complejidad del mismo. Esto impacta en el tamaño de la muestra a examinar.

La etapa siguiente al clonado molecular constituye la oportunidad de aplicar estrategias alternativas y en general exigen la creatividad del investigador a los efectos de maximizar las posibilidades de alcanzar resultados deseables e interesantes. En términos generales, los procedimientos de análisis de clones interesantes se pueden agrupar en aquellos basados en secuenciación masiva de ADN y en aquellos otros basados en la expresión heteróloga de funciones buscadas. Adoptaremos en este texto el anglicismo *screening* para referirnos a la etapa experimental de análisis de clones e identificación de genes y secuencias de interés.

Para lograr una idea de la envergadura de la tarea de screening hagamos la siguiente referencia a algunas estimaciones numéricas sobre el tamaño del ADN metagenómico.

- Es muy probable que el número de genomas distintos presentes en el suelo refleje el tipo y características del mismo; aquellos dedicados a la agricultura con un buen nivel de materia orgánica y humedad presentarán una diversidad más amplia que un suelo oligotrófico y características extremas de pH, humedad y/o salinidad. A partir de 1 gramo de suelo se puede obtener entre 1-500 ug de ADN, según

el protocolo de extracción aplicado y la naturaleza del suelo. Por otro lado y aplicando un procedimiento basado en cinética de reasociación de ADN, se ha estimado que 1 gramo de suelo comprendería entre 2.000 y 18.000 genomas.

- Según el vector usado para el clonado del ADN metagenómico de suelo, se estima recomendable examinar más de 10^7 clones plasmídicos o 10^6 clones BACs, con insertos de un tamaño de 5 kb y 100 kb, respectivamente. Para lograr representación significativa de los genomas de miembros raros de la comunidad (menos del 1%) se ha calculado necesario secuenciar 10.000 Gb del ADN extraído de suelo. Por otro lado, se ha estimado en 10^{13} genes en un gramo de suelo provenientes de al menos 10^3 especies, lo que indicaría que hay al menos 10^6 genes nuevos en 1 gramo de suelo (Schloss y Handelsman, 2006). El objetivo de establecer el metagenoma teniendo en cuenta estos números adquiere un valor relativo cuando se los pone en el contexto de los recursos tecnológicos y financieros necesarios para su abordaje. Actualmente, con el desarrollo de tecnologías de secuenciación de alta generación de datos, basadas en el denominado procedimiento de pirosecuenciación que no requiere de la construcción de bibliotecas metagenómicas, el tiempo requerido para la resolución de un metagenoma adquiere una dimensión real. Sin embargo, la limitación de estos procedimientos consistente en generar lecturas relativamente cortas –aproximadamente entre 100 y 200 nucleótidos– complica la tarea posterior de ensamble de secuencias parciales en un genoma completo.

No obstante, y aún haciendo uso de la tecnología precedente basada en el procedimiento de Sanger, el costo de secuenciación masiva es caro en general, y más aún para nuestro país. Sin embargo, y como se trata en las secciones siguientes de este capítulo, existen estrategias alternativas a la secuenciación de bibliotecas metagenómicas, que “asisten” la búsqueda y resultan útiles para revelar diversidad y descubrir nuevos genes.

Screening basado en el análisis del gen 16S rARN

Este método está basado en el análisis de la

secuencia del gen que codifica para el gen que codifica la subunidad 16S rARN de los ribosomas procarióticos. Todos los microorganismos poseen este ARN que presenta una alta similitud entre ellos pero con diferencias suficientes para su uso como medida de distancias evolutivas. Existe una amplia base de datos de secuencias del 16S rARN de organismos diversos que ha permitido elaborar un árbol filogenético llamado árbol de la vida. Esto permite usar los datos metagenómicos de 16S rARN generado a partir de una determinada muestra ambiental, para posicionar filogenéticamente a las distintas secuencias, y eventualmente inferir la biología y ecología de los mismos. El análisis del (los) gen (es) 16S rARN es económicamente accesible a los laboratorios y es útil para evaluar diversidad microbiana. En particular, ha sido efectivo para revelar la abundancia de especies, y la estructura poblacional de muestras de suelo (Aguilar et al., 2006).

La amplificación mediante la PCR, usando oligonucleótidos cebadores que hibridan las regiones conservadas de los genes 16S rARN de bacterias y arqueas, genera fragmentos que pueden ser clonados y secuenciados. El tamaño del ADN resultante de la amplificación, de aproximadamente 1,4 Kb se inserta en un plásmido vector tipo TA, seguido de transformación de *E. coli*. El ADN usado como molde puede ser el ADN metagenómico o también el proveniente de una biblioteca metagenómica (Furlong et al., 2002). Los datos primarios pueden ser examinados con programas computacionales apropiados que permiten evaluar la predominancia de especies (DOTOUR), y el grado de similitud entre los miembros de dos comunidades (SONS, LIBSHUFF, <http://www.libshuff.mib.uga.edu>).

El método tiene sus limitaciones. Por ejemplo, a- provee un marco filogenético de la comunidad pero da información escasa sobre la funcionalidad de la misma; b- como todo procedimiento basado en PCR, no todos los genes rARN amplifican igualmente, resultando en la sub-estimación de especies, y c- los genes 16S rARN pueden existir en múltiples copias no idénticas.

Es claro entonces que el análisis genético empleando 16S rARN provee valiosa informa-

ción acerca de la diversidad y de la evolución de poblaciones microbiana, sin embargo el gen 16S representa aproximadamente el 0.05% de un genoma procariota. Se ha demostrado que microorganismos que poseen secuencias de 16S rADN idénticas pueden poseer genomas muy distintos y presentar diferentes fisiologías y temperaturas óptimas de crecimiento. Los miembros de una comunidad microbiana pueden diferir enormemente en sus actividades bioquímicas e interacciones, no sólo entre especies sino dentro de una misma especie. Por ende la filogenética nos dice en el mejor de los casos quiénes son los miembros de la comunidad pero muy poco acerca de qué es lo que hace cada miembro. Uno de los principales objetivos de la ecología microbiana es el poder asociar la identidad de los diferentes microorganismos dentro de un hábitat con los procesos que ellos llevan a cabo en ese ambiente. Los métodos metagenómicos, que serán discutidos más adelante, comienzan a dar respuestas a esta segunda cuestión.

Construcción de bibliotecas genómicas ambientales

Muchos de los métodos corrientemente utilizados en la construcción de bibliotecas ambientales, son adaptaciones de las técnicas empleadas para la construcción de bibliotecas de insertos grandes de organismos eucariotas, tales como clonado en cromosomas artificiales (BACs) y lisis celular en tacos de agarosa. Sin embargo, en la construcción de genotecas ambientales se encuentran obstáculos que no se presentan en la construcción de bibliotecas de organismos aislados. La diversidad de nichos ecológicos plantea desafíos interesantes a la hora de diseñar una estrategia adecuada para la obtención de un ADN de calidad apropiada y que el mismo represente la población de microorganismos presentes en ese ambiente. En la actualidad se han preparado diversas bibliotecas metagenómicas de variados ambientes, en esta sección discutiremos algunos de los aspectos críticos a tener en cuenta en su preparación.

La primera biblioteca ambiental se construyó a partir de ADN de microorganismos oceánicos, los que fueron concentrados a partir de

agua de mar antes de la extracción de ADN. Sin embargo en el caso de otros hábitats tales como el suelo, existen procedimientos alternativos, cada uno con sus ventajas y desventajas.

La construcción de una biblioteca metagenómica de suelo se inicia con la toma de muestra. Como las muestras de suelo son heterogéneas, los datos fisicoquímicos tales como tamaño de partícula, tipo de suelo, contenido de agua, pH, temperatura y las plantas que lo cubren son útiles para la evaluación y comparación de los resultados obtenidos en estos estudios. Dado que las poblaciones microbianas son grandes, los volúmenes de muestras pueden ser pequeños. Durante la toma de muestra necesariamente se generan perturbaciones que pueden modificar la composición de las comunidades microbianas del suelo, por lo que es importante disminuir al mínimo el tiempo de transporte y almacenamiento de la misma.

Los métodos de extracción de ADN se pueden dividir en dos categorías: a) lisis directa de las células contenidas en la matriz de la muestra seguido de la separación del ADN de la matriz y los desechos celulares, o b) la separación de las células de la matriz del suelo seguido por lisis celular. El ADN crudo recuperado por ambos métodos se purifica por los procedimientos habituales. La recuperación de ADN aislado de diferentes tipos de suelo utilizando ambos tipos de protocolos van desde menos de aproximadamente 1 µg a 500 µg de ADN por gramo de suelo, sin embargo el rendimiento es entre 10 y 100 veces mayor por lisis directa cuando se compara para una misma muestra. Para lograr la lisis celular directa, se utilizan una combinación de tratamientos enzimáticos, detergente y altas temperaturas. Además del ADN de las células procariotas lisadas, también se recupera ADN extracelular y eucariota.

Los métodos de extracción de ADN basados en la separación de células como una etapa previa a la lisis de las mismas, aunque menos eficientes en términos de cantidad de ADN recuperado son menos dañinos para la integridad del mismo. La separación de los microorganismos de la matriz del suelo se logra mediante suaves fuerzas mecánicas como los procedimientos de mezcla, la rotación del pilón en mortero o químicos, tales como la adición

de resinas de intercambio catiónico, seguido de gradiente de densidad o centrifugación diferencial. En este caso el ADN obtenido es casi exclusivamente procariótico. Además, el ADN recuperado por este método parece ser menos contaminado con compuestos de la matriz compuestos, entre ellos sustancias húmicas. Además, el tamaño medio de los ADN aislados es mayor que el que suele obtenerse mediante lisis directa y, por lo tanto, es más adecuado para la generación de bibliotecas de insertos grandes.

Como los diferentes microorganismos del suelo tienen diferentes susceptibilidades a los métodos de lisis celular, las secuencias presentes en el ADN aislado y en las bibliotecas dependen del método de extracción. No se ha estudiado cuál es el sesgo que se introduce en las bibliotecas debido al método de extracción, sin embargo es de presumir que el ADN aislado por lisis directa represente mejor la diversidad microbiana de una muestra de suelo, ya que este no incluye el paso de separación de las células, por lo tanto serán lisados aún los microorganismos que se adhieren fuertemente a las partículas.

El análisis metagenómico puede requerir de bibliotecas con insertos de tamaño grande o pequeño. Las bibliotecas de insertos pequeños son suficientes en el caso en que el análisis involucre el estudio de un único gen o un pequeño grupo de genes. Por el contrario, se requieren insertos mayores para el estudio de rutas metabólicas completas, procesos complejos u organización genómica. Independientemente del tamaño de inserto requerido, la preparación de ADN es crítica para el éxito del análisis. En el caso de emplear digestiones parciales de ADN para la construcción de la biblioteca se requiere partir de un ADN de un tamaño promedio 3 veces mayor al de los insertos deseados. Por ende si se desea un inserto de 100 kb se deberá partir de un ADN de tamaño promedio > 300 kb. Un ADN de este tamaño es muy vulnerable a las fuerzas de cizalla que se producen en el manipuleo de las soluciones, centrifugaciones, congelado-descongelado, etc. Por ello en estos casos la lisis de las células para la liberación del ADN y su posterior digestión parcial con enzimas de restricción, se realiza en tapones de agarosa.

Dependiendo del tamaño promedio de los insertos, las bibliotecas se construyen empleando diferentes tipos de vectores. Así las de insertos pequeños (menores a 15 kb) emplean vectores plasmídicos, en tanto que las de insertos de hasta 40 kb hacen uso de cósmidos o fósidos, y BACs para más de 40 kb. Los vectores tipo BACs con número de copia inducible son particularmente útiles, dado que permiten un mantenimiento en la célula huésped a bajo número de copia, pero permiten el incremento del número de copias para facilitar el estudio de expresión.

Si bien el huésped de elección para la construcción y mantenimiento de todas las bibliotecas publicadas es *E.coli*, es fácil de notar que la búsqueda de fenotipos interesantes se verá restringida a aquellos que nos permita expresar este huésped. Se han construido vectores cosmídicos y BACs que permiten la transferencia de bibliotecas producidas en *E. coli* a otras especies huéspedes tales como *Streptomyces* o *Pseudomonas* (Martínez et al., 2004; Wexler et al., 2005).

Screening basado en la expresión funcional

Otra forma de acceder al metagenoma, particularmente cuando se trata de ambientes complejos en cuanto a su diversidad poblacional y a su alta densidad de microorganismos diferentes, es la búsqueda de genes que generen productos definidos e identificables, o asociados a determinadas actividades que se pueden evaluar *in vitro* aplicando bio-ensayos. La ventaja más importante de este abordaje es el desarrollo de un proyecto acotado de menor envergadura que el análisis alternativo dirigido a la secuenciación masiva del metagenoma. Este criterio de screening comprende varias estrategias agrupadas dentro de la llamado metagenómica funcional. A continuación se describirán algunas estrategias que ilustran formas ingeniosas de abordar el conocimiento del metagenoma con un propósito directo de descubrimiento y uso de propiedades específicas codificadas por el metagenoma.

El usufructo exitoso de actividades microbianas o vías metabólicas requiere del logro de varias etapas críticas. En primer lugar, el

ADN ambiental debe contener el/los gen(es) que codifican las funciones buscadas, y es deseable que las secuencias correspondientes se encuentren representadas en una frecuencia alta en el ADN ambiental; segundo, los procedimientos de preparación del ADN metagenómico y de clonado molecular deben permitir la recuperación e integridad de genes y operones; y finalmente, los genes deben ser detectables genéticamente o fenotípicamente. Resulta obvio al encarar un proyecto de este tipo, que la correcta selección del ambiente apropiado, constituya una de las etapas fundamentales para darle una base probabilística razonable de éxito a nuestro diseño experimental. Por ejemplo, en un trabajo publicado por Rhee et al., (2005), cuyo objetivo fue el aislamiento de genes nuevos codificantes de enzimas termoestables con actividad esterasa, se realizó la búsqueda sobre el metagenoma de muestras de suelo de sitios con aguas termales cuyas temperaturas fueron entre 65 y 90 °C (Rhee et al., 2005). Esta consideración da cierta certeza sobre la presencia de las funciones buscadas en la muestra pero, no asegura que la representación de los genes buscados en el metagenoma, sea suficientemente alta para lograr su recuperación. Por ejemplo, la búsqueda de clones con actividad lipolítica en una biblioteca proveniente de ADN de suelo, resultó en la identificación de un clon entre 730.000 clones examinados. Con el propósito de aumentar la probabilidad de detección de genes de interés se ha recurrido a la inclusión en el diseño experimental de etapas de enriquecimiento previas a la construcción de las bibliotecas génicas. En la mayoría de estos estudios, las fuentes de carbono y/o nitrógeno han sido los criterios selectivos de especies microbianas con genes deseados que son requeridos para su desarrollo en esas condiciones de incubación. El análisis metagenómico de cultivos enriquecidos ha demostrado su potencialidad para el aislamiento de genes determinantes de funciones catalíticas, degradativas, y nuevos antibióticos a partir de suelo y otros ambientes (Entcheva et al., 2001; Gupta et al., 2002; Knietzsch et al., 2003; Daniel et al., 2004; Mori et al., 2008). Sin embargo, se deben considerar sus limitaciones: Las poblaciones mi-

crobianas que contienen los genes deseados no responden eficientemente a las condiciones de enriquecimiento, su crecimiento lento determina baja representación en la muestra previa a la extracción de ADN.

Los métodos de screening funcional son potencialmente útiles para descubrir nuevas variantes de funciones interesantes. Su eficiencia, usando bibliotecas metagenómicas, depende a su vez de la eficiencia y sensibilidad del ensayo *in vitro* y también de la compatibilidad del sistema de transcripción y traducción de la célula hospedadora para transcribir y traducir el/los gen(es) contenidos en el clon transgénico. Aunque la bibliografía demuestra que el hospedador más usado es *Escherichia coli*, el rango de hospedadores se ha ampliado en los últimos años a otros microorganismos tales como *Streptomyces lividans*, *Pseudomonas putida*, y *Rhizobium leguminosarum* (Martínez et al., 2004; Li et al., 2005) e incluso eucariotes (Al Hasani et al., 2003). Esto permitirá un mayor acceso hacia la expresión de un amplio rango de actividades génicas del medio ambiente.

El análisis metagenómico basado en identificación de clones que expresan una determinada función ha sido exitoso cuando se lo ha combinado al uso de mutantes de *E. coli*. Por ejemplo, Daniel y su grupo usaron mutantes de *E. coli* deficientes en sus sistemas antiporter $\text{Na}^+(\text{Li}^+)/\text{H}^+$ para descubrir dos antiporters nuevos a partir del screening de una biblioteca de aproximadamente $1,5 \times 10^6$ clones. El procedimiento experimental consistió en transferir los clones a *E. coli*, y evaluar el crecimiento de los transformantes en cajas de petri conteniendo un medio de cultivo con 7,5 mM LiCl (Majernik et al., 2001). Aplicando un procedimiento similar se identificaron genes participantes en la biosíntesis de biotina, a partir de ADN de suelo (Entcheva et al., 2001).

Por otro lado, la selección por resistencia a antibióticos ha conducido al aislamiento de nuevas formas de resistencia a tetraciclina y a aminoglicósidos a partir de muestras de la biota de la boca humana, y de suelo, respectivamente. El descubrimiento de resistencia a aminoglicósidos es un buen ejemplo del uso del screening funcional. Se identificaron 9 clones, de los cuales 6 codifican para 6'-acetiltransfe-

rasas que forman un grupo nuevo. Estos genes resultaron del análisis de una biblioteca consistente en 4 Gb de ADN, equivalente a 10^6 genes, sugiriendo la obvia y baja representación de dichos genes en la biblioteca. El uso del procedimiento experimental de selección positiva hizo posible su detección que de otra manera –por ejemplo mediante secuenciación– hubiera resultado una tarea casi imposible. No obstante, el número de clones/muestras individuales de una biblioteca que son necesarios examinar, sigue siendo experimentalmente un número grande. Con el objetivo de encontrar resultados en tiempo real y examinar un universo grande, se han diseñado estrategias de alta productividad (en Inglés son referidas como “*high-throughput screen*”), las cuales incorporan sistemas automatizados y robotizados con alta tecnología instrumental.

Otro enfoque es el estudio de antibióticos nuevos en metagenoma de suelo el cual ha expandido nuestra visión de las comunicaciones entre comunidades microbianas. Se ha encontrado que concentraciones sub-inhibidoras de crecimiento inducen respuesta del tipo quórum sensing, aún cuando los compuestos no muestran similitud con las conocidas homoserina lactonas que han sido descritas como inductores naturales en bacterias. Esto sugiere la existencia de un diálogo comunicativo entre microorganismos que activan funciones en el entorno. Además, este hallazgo ha sido adoptado para el screening de moléculas que funcionan como inductoras de quórum sensing y eventualmente también como antibióticos. Esta oportunidad condujo al diseño de un procedimiento de screening con alta eficiencia cuantitativa de análisis de clones e identificación de compuestos que funcionan como inductores de genes que se encuentran bajo el control de un promotor sensible a quórum sensing. Este sensor consiste en el promotor del gen *luxR* fusionado al gen reportero *gfp*, residente en un plásmido replicativo en una variante de *E. coli* que no induce quórum sensing. En el caso que el ADN metagenómico exprese un inductor del promotor *luxR*, se sintetizará la proteína GFP revelándose fluorescencia. Este procedimiento acoplado a *cell sorting* activada por fluorescencia, permite capturar aquellos clones potencial-

mente productores de compuestos de *quorum sensing* (Figura 2) (Lynn et al., 2005; Uchiyama et al., 2005).

Otro método de enriquecimiento se basa en el uso de isótopos estables, en el cual se administra -como única fuente de carbono- un sustrato marcado con ^{13}C a una comunidad de microorganismos provenientes de suelo. Aquella comunidad bacteriana capaz de utilizar ese sustrato incorporará ^{13}C en sus macromoléculas, particularmente en ADN, determinando que el ADN será más denso que el ADN normal de la bacteria. El procedimiento continúa con la ultracentrifugación del ADN en gradientes de densidad de CsCl para separar el ADN marcado del ADN normal o no marcado. Este ADN puede separarse de la columna de gradiente, someterse a diálisis y posteriormente concentrarse por precipitación etanólica. El ADN se fragmenta y clona en vectores plasmídicos. La biblioteca resultante puede analizarse mediante un screening funcional, o haciendo uso de sondas dirigidas a revelar un determinado gen. El método tiene potencialidad para fraccionar

las poblaciones provenientes del suelo concentrando aquellas asociadas a una función (por ejemplo degradación de un compuesto hidrocarburo que es asimilado). Sin embargo, el método tiene sus limitaciones principalmente generadas por el llamado "cross feeding", en el cual bacterias carentes de esa propiedad pueden desarrollar en el medio a expensas de metabolitos provistos por otras bacterias (Radajewski et al., 2000)

Lo no cultivable se vuelve cultivable

El estudio metagenómico del biofilm que se forma sobre las aguas que drenan de una mina de hierro abandonada, ubicada en la Iron Mountain en Richmond, California ha permitido establecer la estructura de la comunidad y las funciones metabólicas y biogeoquímicas. Esa agua de drenaje constituye un medio extremadamente adverso, su acidez es de pH 1.0 y posee un alto contenido en metales. También es rica en pirita (FeS_2). No hay fuentes asimilables de carbono o nitrógeno más allá de las que pueden derivar del aire. Tyson et al. (2004)

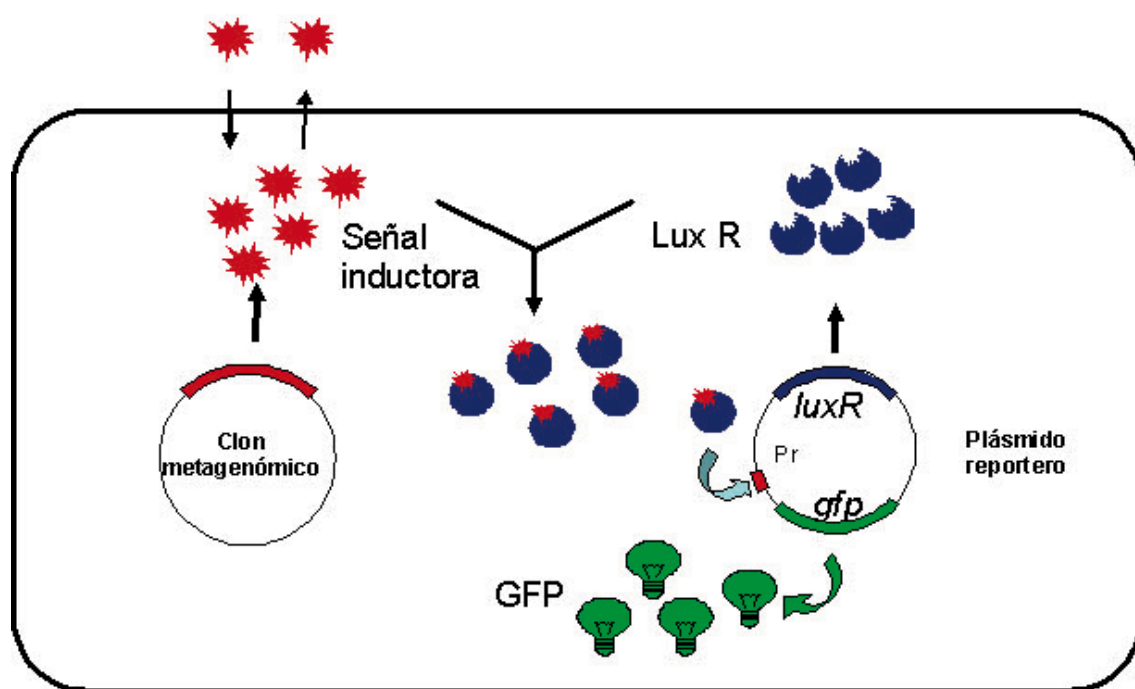


Figura 2. Aislamiento de clones provenientes de un biblioteca metagenómica, que expresan productos génicos inductores/activadores de quórum sensing. LuxR es un producto génico que interacciona con moléculas efectoras producidas por microorganismos, activador de un promotor sensible fusionado al gen reportero para GFP (green fluorescent protein) facilitando su detección.

secuenciaron una biblioteca construida con ADN extraído del biofilm, y lograron ensamblar a partir de datos metagenómicos los genomas de miembros del grupo *Leptospirillum* y *Ferroplasma* tipo II, también una sustanciosa información de otros miembros de la comunidad. El análisis de estos resultados fue muy sugestivo. Los autores notaron que no habían detectado la presencia de *Leptospirillum ferrooxidans*, la especie fijadora de N_2 . Por el contrario, el genoma de la comunidad reveló la presencia de miembros pertenecientes a los grupos II y III de *Leptospirillum*. El género *Leptospirillum* ha sido sub-dividido en 3 grupos, de los cuales aún no se había logrado cultivar a representantes del grupo III. El estudio también reveló la presencia de genes *nif* (genes de fijación biológica de nitrógeno) que los autores asociaron al genoma de *Leptospirillum* grupo III. Estos datos permitieron concluir que la contribución de esta población al consorcio del biofilm de la mina ácida, es el aporte de nitrógeno asimilable, y además, el conocimiento de las capacidades metabólicas inferidas de los datos metagenómicos guió los pasos siguientes dirigidos a lograr la cultivación en el laboratorio de *Leptospirillum* grupo III y a la definición de la especie *L. ferrodiazotrophum* (Tyson et al., 2005). De la misma manera, estudiando los datos resultantes, se ha especulado que *Ferroplasma* y *Leptospirillum* sp derivarían la energía a partir de la oxidación del hierro. Además, se encontró que todos los genomas muestran genes asociados con la remoción de elementos potencialmente tóxicos, tales como sistemas de flujo de protones y bombas de exclusión de metales (Tyson et al., 2004).

El estudio de las comunidades en el drenaje de aguas de la mina ácida de Richmond, es un modelo de complementariedad de funciones asignables a miembros del consorcio microbiano. Es posible imaginar que la proyección de este modelo de estudio a otros sistemas ambientales no resulte fácil. La extrema adversidad de la mina ácida limita la diversidad de genomas en la comunidad y facilitó el análisis

El mensaje intrínseco de este descubrimiento de componentes importantes de las comunidades del suelo, aplicando un análisis metagenómico, es su uso como guía en

la formulación del medio de cultivo y logro de su cultivación in vitro.

Potencialidades de la metagenómica

Las posibilidades que este nuevo campo ofrece son alucinantes. Descifrar la enorme gama de procesos e interacciones que caracterizan las comunidades microbianas en la Tierra puede conducir a avances en la salud humana, la mejora de la comprensión a gran escala de los cambios climáticos y atmosféricos, los métodos para obtener cultivos más fuertes y nutritivos, nuevos enfoques para la limpieza de la contaminación ambiental, y el desarrollo de nuevas fuentes de energía renovable. Estos son sólo algunos ejemplos de las muchas posibles aplicaciones prácticas de la metagenómica.

El ser humano siempre vivió en un mundo dominado por los microbios, y la estrecha relación entre los microbios y los seres humanos es un tema antiguo. Las células microbianas que viven en el cuerpo humano adulto son diez veces más numerosas que las células humanas. Los genomas microbianos de las comunidades que viven dentro y en el cuerpo humano (el microbioma humano) contiene muchos más genes que el genoma humano. Estudiar el microbioma humano puede dar lugar a valiosas nuevas herramientas en nutrición humana y animal, el descubrimiento de medicamentos, y en medicina preventiva. Este estudio también puede ampliar mucho la profundidad de nuestra comprensión de enfermedades complejas tales como obesidad, el cáncer y ciertas enfermedades inmunológicas, como el asma (Turnbaugh et al., 2006).

La inmensa mayoría de nuestros microorganismos asociados viven en el intestino. Estos 10 a 100 billones microorganismos desempeñan funciones tales como la extracción de nutrientes y calorías de componentes de nuestras dietas y la síntesis de vitaminas esenciales y aminoácidos. Las bacterias intestinales también ayudan a detoxificar productos químicos potencialmente nocivos que pueden estar presentes en lo que comemos. Algunos de los microbios que viven en y sobre el cuerpo humano desempeñan un papel fundamental en la defensa contra agentes patógenos. Esta relación mutuamente beneficiosa nos ayuda a prote-

germos de enfermedades al tiempo que se da a los microbios un lugar para vivir. El uso de metagenómica para obtener un conocimiento más profundo de las comunidades microbianas en el cuerpo humano podría ser inmensamente valioso en la comprensión tanto de microbios dañinos como de beneficiosos y puede conducir a formas más efectivas de diagnosticar, tratar y prevenir enfermedades.

El enfoque metagenómico ofrece la posibilidad no sólo de analizar la diversidad filogenética de diversos ambientes y biofilms, sino también de localizar los genes y operones que codifican propiedades de interés biotecnológico. La metagenómica ha dado lugar al descubrimiento y caracterización de una amplia gama de biocatalizadores, que revela mucho acerca de la diversidad natural de las enzimas y los factores que influyen en sus funciones. Uno de los principales enfoques para la detección de nuevos biocatalizadores implica la detección funcional lo que requiere la expresión de genes heterólogos generalmente en *Escherichia coli*. Mediante el enfoque metagenómico se estudian hábitats tan diversos como intestinos de termitas, el rumen de rumiantes como ciervos o vacas, las muestras de suelo de los desiertos y glaciares, así como hábitats extremos como géiseres, mar abierto de agua o chimeneas hidrotermales de aguas profundas. Es de esperar que la composición genómica de las poblaciones microbianas en estos hábitats se diferencien unos de otros, y con ella los biocatalizadores y biomoléculas que componen las respectivas bibliotecas metagenómicas. La metagenómica industrial se centra principalmente en procariotes, ya que sus genomas puede ser objeto fácilmente de las herramientas de selección funcional disponibles en la actualidad, y porque se supone que la mayor diversidad se encuentra entre estos microorganismos. Las enzimas se utilizan en una amplia gama de aplicaciones e industrias. Su versatilidad permite su uso tanto en los procesos para degradar polímeros naturales entre ellos almidón, celulosa y proteínas, así como para las síntesis enantioselectiva asimétrica de productos químicos, aunque hay muchas más aplicaciones.

En el año 2000 Rondon y col. publican las primeras bibliotecas de suelos clonados en

vectores de tipo BAC. Se generaron dos bibliotecas metagenómicas una con un tamaño de inserto promedio de 27 kb y otra de 44.5 kb. Pese a que el tamaño de inserto no es mayor al de una biblioteca convencional construida con vectores de tipo cósmido o fago lambda, es la primera publicación en la que se informa el clonado de fragmentos de ese tamaño a partir de las poblaciones microbianas de suelo. A partir de estas bibliotecas logran identificar clones que expresan fenotipos tales como, lipasas y amilasas. De igual modo Brady y col, recuperaron a partir de una biblioteca cósmica de ADN de suelo el conjunto de genes necesarios para la síntesis de violaceína, un antibiótico de amplio espectro,.

Aunque las bibliotecas metagenómicas constituyen en la actualidad la herramienta más poderosa para evaluar la diversidad funcional de comunidades microbianas naturales, no cubren los genomas de baja abundancia en ambientes complejos como los suelos. Como resultado, la frecuencia de clones con un fenotipo deseado en una biblioteca puede ser muy baja. Esto implica la búsqueda y selección en miles de clones, lo que significa una tarea larga y tediosa. En la actualidad se dispone de equipos con tecnologías que facilitan la recolección de colonias, y la inoculación en placas de numerosos clones al mismo tiempo.

Mientras que la industria de alimentos y de detergentes se concentran en un número limitado de reacciones enzimáticas y sustratos, las industrias química y farmacéutica trabajan con miles de moléculas química y estructuralmente diversas, y la producción de cada uno de estos requiere soluciones enzimáticas individuales. En consecuencia, debido a la riqueza de biocatalizadores potencialmente útiles, el uso de recursos microbianos es cada vez más difundido en las industrias químicas y son considerados indispensables para la química orgánica moderna. Es obvio que existe una amplia demanda de nuevos enzimas y biocatalizadores, y la metagenómica aparece como una de las tecnologías con mayor potencialidad para proveer de las moléculas necesarias.

Es creciente la conciencia y la percepción global de que la disponibilidad de combusti-

bles fósiles no renovables no es sostenible en el futuro próximo, y se deberá superar esa dependencia energética. Además, las emisiones de gases de invernadero como resultado de la quema de combustibles fósiles son una de las causas principales del calentamiento global. Estos factores determinan la búsqueda de combustibles renovables, y amigables para el medio ambiente sea una de las principales prioridades para el mundo. Una fuente de energía emergente es el etanol (alcohol de grano)-un biocombustible de alto octanaje derivado de maíz, caña de azúcar, o de otro tipo de fuentes agrícolas. El etanol celulósico se fabrica a partir de la celulosa que se encuentra en el común de los desechos agrícolas tales como la fibra de maíz, tallos de maíz, paja de trigo, y otras como la biomasa derivada del mijo y el miscanthus. Pero el proceso que convierte la celulosa a partir de residuos agrícolas a etanol utilizable depende de un ingrediente esencial: las comunidades microbianas. En primer lugar, varios tipos de microorganismos deben trabajar en conjunto para transformar la celulosa a partir de desechos agrícolas en azúcares. Luego, los azúcares son fermentados-también por los microbios- para producir etanol.

Las vacas, con la ayuda de las bacterias, son capaces de convertir las fibras vegetales (celulosa) en energía, pero este es un proceso complejo para mimetizarlo para la producción de biocombustibles.

La enzima que permite que una vaca digiera los pastos y otras fibras vegetales puede ser usada para convertir otras fibras vegetales en azúcares simples. Transformar las fibras vegetales en azúcar requiere de tres enzimas. Estas tres enzimas han sido recientemente introducidas en una variedad de maíz denominada Spartan III, que deriva de dos versiones anteriores. La primera versión contiene una enzima que procede de un microbio que vive en agua manantial caliente, y que es capaz de transformar el gran polímero de celulosa en fragmentos de menor tamaño. La segunda versión contiene un gen de un hongo natural que codifica para una enzima capaz de clivar estos fragmentos de celulosa en disacáridos. En la última versión se introdujo el gen codificante de una enzima capaz de catalizar la hidrólisis

de los disacáridos en azúcares simples. Este gen fue aislado a partir de microbios presentes en el rumen de vaca. Mediante ingeniería genética este gen ha sido modificado de forma tal de dirigir el producto de su expresión hacia vacuolas, de esta forma las enzimas digestivas permanecen almacenadas hasta su cosecha (Sticken, 2008). Estos son algunos ejemplos que ponen de manifiesto la potencialidad de los enfoques metagenómicos tanto en su propósito biotecnológico como en el análisis de las comunidades ambientales. En definitiva, la metagenómica surge hoy como una disciplina nueva que nos permitirá ampliar nuestro conocimiento de la microbiología hasta dimensiones aún inimaginables.

Lecturas recomendadas

- Aguilar O.M., M. V. López, M. Donato, B. Morón, M. E. Soria-Díaz, C. Mateos, A. Gil-Serrano, C. Sousa, and M. Megías. 2006. Phylogeny and nodulation signal molecule of rhizobial populations able to nodulate common beans -other than the predominant species *Rhizobium etli*- present in soils from the Northwest of Argentina. *Soil Biology and Biochemistry* 38:573-586.
- Al-Hasani, K., Simpfendorfer, K., Warden, H., Vado-las, J., Zaibak, F., Villain, R., and Ioannou, P.A. 2003. Development of a novel bacterial artificial chromosome cloning system for functional studies. *Plasmid* 49:184-187.
- Brady SF, Chao CJ, Handelsman J, Clardy J. 2001. Cloning and heterologous expression of a natural product biosynthetic gene cluster from cDNA. *Org Lett* 3:1981-1984.
- Daniel, R. 2005. The metagenomics of soil. *Nature* 3:470-478.
- Entcheva P., Liebl, W., Johann, A., Hartsch, T., and Streit, W.R. 2001. Direct cloning from enrichment cultures, a reliable strategy for isolation of complete operons and genes from microbial consortia. *Appl. Environ. Microbiol.* 67:89-99.
- Environmental Microbiology* www.blackwell-synergy.com/toc/emi/7/12
- Furlong, M.A., Singleton, D.R., Coleman, D.C. and Whitman, W.B. 2002. Molecular and Culture-Based Analyses of Prokaryotic Communities from an Agricultural Soil and the Burrows and Casts of the Earthworm *Lumbricus rubellus*. *Appl. Environ. Microbiol.* 68:1265-1279.
- Knietsch, A., Bowien, S., Whited, G., Gottschalk, G. and Daniel, R. 2003. Identification and Charac-

- terization of Coenzyme B12-Dependent Glycerol Dehydratase- and Diol Dehydratase-Encoding Genes from Metagenomic DNA Libraries Derived from Enrichment Cultures. *Appl. Environ. Microbiol.* 69:3048-3060.
- Lynn, L., Williamson B.R., Borlee, R. Schloss P.D., Guan C., Allen, H.K., and Handelsman, J. 2005. Intracellular screen to identify metagenomic clones that induce or inhibit a quorum sensing biosensor. *Appl. Environm. Microbiol.* 71:6335-6344.
- Majernik, A., Gottschalk, G., Daniel, R. 2001. Screening of Environmental DNA Libraries for the Presence of Genes Conferring Na⁺ super(+)(Li⁺ super(+))/H⁺ super(+) Antiporter Activity on *Escherichia coli*: Characterization of the Recovered Genes and the Corresponding Gene Products. *J. Bacteriol.* 183:6645-6653.
- Martínez, A. Kolvek, S.J., Yip, C.L.Y., Hopke, J., Brown, K.A., MacNeil, I.A., and Osbourne, M.S. 2004. Genetically modified bacterial strains and novel bacterial artificial chromosome shuttle vectors for constructing environmental libraries and detecting heterologous natural products in multiple expression hosts. *Appl. Environm. Microbiol.* 70:2452-2463.
- Mori, T., Mizuta, S., Suenaga, H. And Miyazaki, K. 2008. Metagenomic Screening for Bleomycin Resistance Genes. *Appl. Environm. Microbiol.* 74:6803-6805.
- Pace, N.R. 1997. A molecular view of microbial diversity and the biosphere. *Science* 276:734-740.
- Radajewski, S., Ineson, P., Parekh, N.R., and Murrell, J.C. 2000. Stable isotope probing as a tool in microbial ecology. *Nature* 403:646-649.
- Rhee, J.K., Ahn, D-G, Kim, Y-G and Oh, J-W. 2005. New Thermophilic and Thermostable Esterase with Sequence Similarity to the Hormone-Sensitive Lipase Family, Cloned from a Metagenomic Library. *Appl Environm Microbiol* 71:817-825.
- Rondon MR, August PR, Bettermann AD, Brady SF, Grossman TH, Liles MR, Loiacono KA, Lynch BA, MacNeil IA, Minor C *et al.*. 2000. Cloning the soil metagenome: a strategy for accessing the genetic and functional diversity of uncultured microorganisms. *Appl Environ Microbiol* 66:2541-2547.
- Staley J.T., and Konopka, A. 1985. Measurement of in situ activity of nonphotosynthetic microorganisms in aquatic and terrestrial habitats. *Annu. Rev. Microbiol.* 39:321-346.
- Sticklen, M.B. 2008. Plant genetic engineering for biofuel production: towards affordable cellulosic ethanol, *Nature Reviews Genetics* 9, 433-443.
- Turnbaugh, P.J., Ley, R.E., Mahowald, M.A., Magrini, V., Mardis, E.R., and Gordon, J.I. 2006. An obesity-associated gut microbiome with increased capacity for energy harvest. *Nature* 444:1027-1031.
- Tyson, G.W., Chapman, J., Hugenholtz, P., Allen, E.E., Ram, R.J., Richardson, P.M., Solovyev, V.V., Rubin, E.M., Rokhsar, D.S., and Banfield, J.F. 2004. Community structure and metabolism through reconstruction of microbial genomes from the environment. *Nature* 428:399-428.
- Tyson, G.W., Lo, I., Baker, B.J., Allen, E.E., Hugenholtz, P., and Banfield, J.F. 2005. Genome-Directed Isolation of the Key Nitrogen Fixer *Leptospirillum ferrodiazotrophum* sp. nov. from an Acidophilic Microbial Community. *Appl Environm. Microbiol.* 71:6319-6324.
- Uchiyama, T., Abe, T., Ikemura, T. and Watanabe, K. 2005. Substrate-induced gene-expression of environmental metagenome libraries for isolation of catabolic genes. *Nature* 23:88-93.
- Waksman, S.A., and Starkey, R.L. 1931. The soil and the microbe. John Wiley, New York, N.Y.
- Wexler, M., Bond, P.L., Richardson, D.J., and Andrew W. B. Johnston. 2005. A wide host-range metagenomic library from a waste. *Environmental Microbiology* 7:1917-1926
- Woese, C.R. 1987. Bacterial evolution. *Microbiol. Rev.* 51:221-271.

I. CAPÍTULO 12

Bioinformática aplicada a la biotecnología vegetal

N Paniego; R Heinz; P Fernández; V Lia;
C Fusari

Introducción

La Bioinformática es una disciplina científica que ha evolucionado rápidamente en los últimos años respondiendo al avance y a las necesidades de procesamiento, almacenamiento y análisis de datos biológicos derivados de las tecnologías asociadas a las *ómicas*, para generar nueva información y conocimientos en el área de la biología. El campo de la bioinformática es multidisciplinario abarcando el desarrollo de bases de datos, el alineamiento de secuencias, la predicción de estructuras proteicas, la construcción de árboles filogenéticos, entre otros. En este capítulo nos dedicaremos específicamente a la bioinformática aplicada a la biotecnología vegetal, particularmente a cultivos agronómicos y plantas modelo, con el propósito de guiar al estudiante de un curso inicial de biotecnología vegetal o de biología molecular de plantas en la aplicación de los conceptos y las herramientas básicas de la bioinformática, complementando los conceptos introducidos en la primera edición de este libro. Este material no pretende cubrir la totalidad de los recursos existentes para la materia, el objetivo es motivar el interés de los estudiantes en la exploración y el uso de recursos y métodos computacionales básicos para el desarrollo de su actividad científica o profesional futura. Para ello, describiremos en primer lugar algunas bases de datos específicas de iniciativas genómicas de plantas e introduciremos el concepto de anotación de datos genómicos. La segunda parte del capítulo está dedicada a la bioinformática aplicada a estudios de expresión, la búsqueda de marcadores moleculares funcionales y el análisis de su variabilidad genética.

Bases de datos generales y específicas de especie

El uso de tecnologías de bases de datos ha

sido adoptado por la comunidad científica desde el inicio de las iniciativas genómicas para facilitar la organización y la difusión de los datos. Esto hace que se distingan distintas categorías de bases de datos, entre las principales están aquellas que son repositorios públicos a gran escala y bases de datos específicas de iniciativas comunitarias

Los repositorios públicos a gran escala son bases de datos estables, generalmente mantenidas por agencias gubernamentales, que archivan principalmente información estática, un ejemplo típico es Genbank. La información disponible en esa base de datos en particular puede ser accedida a través de ENTREZ, un buscador que combina la interrogación simultánea de 35 bases de datos disponibles en el sitio NCBI. Algunas de éstas son bases de datos secundarias que agregan información a los datos primarios (secuencias nucleotídicas), entre las cuales podemos mencionar Gene, UniGene, HomoloGen o RefSeq.

Dentro de las bases de datos comunitarias están aquellas que almacenan datos derivados de estudios sobre especies modelo, generalmente focalizando en una especie o en un grupo de especies relacionadas. La primera base de datos de esta categoría establecida para especies vegetales es "The Arabidopsis Information Resource" (TAIR), que reúne la información asociada a esta especie modelo en relación a secuencias, genes y proteínas, marcadores, alelos, mapas, vías metabólicas, literatura, protocolos, microarreglos, ontología de genes, anotaciones, disponibilidad de germoplasma/semillas y herramientas de análisis. En los últimos años, ha surgido una nueva generación de bases de datos que integran la información de muchas especies para permitir la comparación de genomas, entre ellas está Gramene que integra recursos para la comparación de mapas genéticos y físicos de arroz y otras especies de gramíneas; LIS permite la comparación genómica y de transcritos de distintas especies de leguminosas; finalmente Phytozome (<http://www.phytozome.net>: Tool for green plant comparative genomics) reúne la información competa de 14 genomas vegetales, agrupamientos de genes ortólogos, parálogos y familias de genes y herramientas de análisis

como BLAST para hacer comparaciones contra los proteomas de cada una de las especies representadas en la base de datos. La Tabla 1 condensa un número importante de bases de datos específicas junto con sus accesos Web para facilitar la exploración de las mismas.

Asimismo, existen bases de datos específicas de patógenos que afectan cultivos agrónomicamente importantes. Estas bases aportan información sobre la secuencia del genoma de los patógenos, la cual puede ser asociada a la información derivada de estudios funcionales de transcritos inducidos durante la interacción con la planta huésped, permitiendo el diseño de estrategias de mejoramiento de los cultivos para lograr resistencia. Entre estas bases de datos se pueden mencionar a: Phytophthora Functional Genomics Database y PathoPlant.

Anotación funcional de los datos genómicos

El proceso de anotación de los datos genómicos a nivel de proteínas consiste en tratar de deducir a partir de los datos de secuenciación nucleotídica, las características funcionales del genoma de un organismo, explorando y describiendo los niveles intermedios de organización como funciones y procesos moleculares, celulares, fisiológicos, compartimentalización de las funciones, etc. Este proceso de anotación demanda una gran integración de los datos e información disponible para la especie o para especies relacionadas, haciendo uso de herramientas de la bioinformática para la comparación y la extracción de datos y de las bases de datos generales y específicas, del conocimiento biológico acumulado en publicaciones y de los análisis transcriptómicos o genómicos disponibles.

Una de las primeras etapas en este proceso es la de tratar de asignar una función molecular a la mayoría de las secuencias incógnitas mediante la comparación con genes de función conocida. La forma más precisa para hacer esta comparación es a nivel de productos de genes, o sea, trabajando con las secuencias de aminoácidos obtenidas a partir de la traducción de las secuencias nucleotídicas a los seis marcos de lectura posibles. Este método de comparación de secuencias, que es central

en el proceso de anotación funcional, se basa en la característica que tienen las proteínas homologas de conservar la misma función y se sustenta con bases de datos de secuencias de proteínas curadas cuidadosamente como por ejemplo SwissProt o PIR.

No obstante, puede asumirse en general que las bases de datos de proteínas asociadas a organismos modelo se encuentran correctamente anotadas y pueden usarse como referencia para inferir posibles funciones moleculares. Sin embargo, para que los procesos de anotación dentro y entre especies en organismos no-modelo sean lo más eficiente y comparable posible, lo óptimo es referir la anotación asignada a vocabularios estructurados u ontologías. Existen diferentes iniciativas para establecer vocabularios controlados, una de las más frecuentemente usadas es la "Ontología de genes" (Gene Ontology, GO), que establece tres categorías o jerarquías: (1) las funciones moleculares, (2) los procesos biológicos y (3) la localización sub-celular o componente celular.

El proceso de anotación es un proceso continuo que debe ser constantemente actualizado con el fin de agregar nueva información y refinar la información existente.

Anotación de secuencias en especies de plantas no-modelo

Acorde a lo mencionado, la anotación genómica llevada a cabo en la mayoría de los proyectos y en especial en los proyectos de pequeña envergadura dedicados a la caracterización de transcritos o ESTs, se basan en el uso del algoritmo BLAST. La calidad de los resultados en todos los casos depende de los parámetros definidos para recuperar secuencias similares en la comparación usando BLASTX o BLASTP, recomendándose como parámetros óptimos E valores menores de e^{-10} , identidades mayores a 30% y coberturas mayores o iguales a 50%.

Las bases de datos contra las cuales se realizan las comparaciones juegan también un rol importante en relación al número y calidad de los "hits" recuperados. Algunas de las bases de datos de nucleótidos y proteínas más utilizadas para la anotación de secuencias de plantas son los Índice de Genes (DFCI: <http://compbio.dfci.harvard.edu/tgi/>), Unigenes (NCBI) y PlantGDB

(<http://www.plantgdb.org/>). Las bases de datos de proteínas que se utilizan en general son: NR, SwissProt, Trembl, Uniprot, Uniprotsw, Uniprot-tr, Uniref100 y bases de proteínas de proyectos específicos (Tabla 1).

En base al mejor valor de similitud obtenido en la comparación, se asigna una función génica probable a cada secuencia analizada. Posteriormente, dicha anotación se mapea contra una base de datos de Gene Ontology para finalmente anotar los productos de genes acorde a las normas del Consorcio de Ontología Génica (GO). Otros vocabularios controlados complementarios a GO, son la Comisión de Enzimas (Enzyme Comisión, EC)

que adjudica una numeración basada en una clasificación esquemática de enzimas según la reacción que se encuentran catalizando y el Consorcio KEGG (The Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes) que genera anotación de vías metabólicas para aquellas especies que presentan su genoma secuenciado o en vías finalización. La anotación funcional basada en ontologías puede realizarse usando software libre por ejemplo Blast2GO o GOtcha.

Expresión de Genes

El análisis de patrones de expresión consiste en la identificación de todos los transcritos presentes en una determinada muestra

Tabla 1: Bases de datos genómicas específicas de especie.

Bases de datos generales	URL
NCBI Plant Genomes Central	www.ncbi.nlm.nih.gov/genomes/PLANTS/PlantList.html
PlantGDB: plant genome database	www.plantgdb.org
MIPS plants databases	mips.gsf.de/proj/plant/jsf/genomes.jsp
Bases de datos multiespecie para genómica comparativa	
Phytozome: comparative genomics of plants	www.phytozome.net
Gramene: a Resource for Comparative Grass Genomics	www.gramene.org
LIS: Legume Information System	www.comparative-legumes.org
SALAD: Surveyed Alignment and Associating Dendrogram	salad.dna.affrc.go.jp/salad
SGN: Solanaceas genomic network	www.sgn.cornell.edu
Bases de datos de genomas de iniciativas genómicas completas y parciales	
TAIR: The Arabidopsis Information Resource	www.arabidopsis.org
Rice Annotation Project Database (RAP -DB)	rapdb.dna.affrc.go.jp
Grain Genes 2.0: a Database for Triticeae and Avena	wheat.pw.usda.gov/GG2/index.shtml
MaizeDB	www.maizegdb.org
Medicago truncatula: a model for legume research	www.medicago.org
Lotus japonicus genome	www.kazusa.or.jp/lotus
Wheat Applied Genomics	maswheat.ucdavis.edu
SoyBase and the Soybean Breeder's Toolbox	soybase.org
SoyMap: An integrated map of soybean for resolution and dissection of multiple	www.soymap.org/
Brassica rapa genome	www.brassicarapa.org/BRGP/index.jsp
Compositae genomics project	compgenomics.ucdavis.edu/compositae_index.php
Cotton Marker Database	www.cottonmarker.org
Dendrome: a collection of forest tree genome databases and other forest genetic	dendrome.ucdavis.edu
International Grape Genome Project	www.vitaceae.org
Populus Genome Integrative Explorer	www.popgenie.db.umu.se
Bases de datos de diversidad	
PanZea: Molecular and Functional Diversity of the Maize Genome	www.panzea.org
ToL: Tree of Life Web Project	www.tolweb.org

de tejido. El desarrollo de tecnologías de alto procesamiento de datos ha permitido abordar estudios de expresión génica en forma concertada para miles de genes a partir de distintos genotipos en determinados órganos, tejidos, y condiciones de crecimiento. El diseño de los experimentos de expresión, así como las herramientas de análisis de la información generada constituyen factores claves para obtener información con significado biológico.

Las distintas estrategias que permiten evaluar perfiles transcripcionales pueden dividirse en dos grupos. Un primer grupo corresponde a estrategias en las que la estimación del nivel de la expresión se basa en la intensidad relativa de una señal de hibridación e incluye los tradicionales experimentos de *northern blot* y los microarreglos de ADNc, en los cuales se toma la intensidad relativa de la señal como medida de la transcripción. El otro grupo de estrategias se basa en una cuenta directa del número de cada transcripto presente en una muestra, incluyendo la secuenciación de secuencias expresadas o “Expressed Sequence Tags” (ESTs), el análisis de la expresión génica en serie o “Serial Analysis of Gene Expression” (SAGE) y la secuenciación masiva en paralelo o “Massively Parallel Signature Sequencing” (MPSS). En este capítulo se discutirán las estrategias de análisis de expresión que permiten la evaluación concertada de un gran número de genes en forma procesiva.

Expressed Sequence Tags (ESTs):

La secuenciación de moléculas de ADN complementario (ADNc) sintetizadas a partir de ARN mensajeros obtenidos de muestra biológica en particular, realizada a través de una única lectura, da origen a un conjunto de secuencias denominadas ESTs, que representan secuencias parciales de las colecciones originales de ADNc.

Actualmente, la división EST de GenBank cuenta con un total aproximado de 6.000.000 secuencias y se encuentran representadas más de 100 especies de plantas.

La secuenciación de ADNc constituyó una herramienta alternativa de los proyectos genómicos para el descubrimiento de nuevos genes para distintas especies, cuando la secuenciación de genomas complejos no contaba con

las actuales técnicas de secuenciación masiva que prometen en un futuro cercano capacidad de procesamiento elevada a costos accesibles a la comunidad en general. Aún con el advenimiento de proyectos genómicos de gran escala, la secuenciación de ESTs permite la identificación de genes que se expresan en pocos tejidos y/o su expresión es muy baja, mediante la construcción de colecciones de ADNc normalizadas o enriquecidas en determinados transcritos como las colecciones derivadas de técnicas de hibridación sustractiva o “Suppressed Subtracted Hybridization” Asimismo, el agrupamiento de ESTs derivados de distintas colecciones de ADNc para una dada especie en grupos o clusters de secuencias no redundantes, utilizando rutinas de análisis como las esquematizadas en la Figura 1 permite estimar el número de genes de una especie.

Respecto al análisis de expresión génica, los ESTs contribuyen a estos estudios a través de dos vías: 1) la proporción de ESTs correspondientes a un determinado gen respecto a un conjunto de ESTs generados en distintas condiciones experimentales refleja el nivel de expresión del mismo; y 2) en segundo lugar las bases de ESTs se utilizan para el diseño de oligonucleótidos en experimentos de microarreglos de ADNc para evaluar expresión génica.

Los experimentos de microarreglos representan una de las herramientas más frecuentes para aproximarse a los análisis de expresión de genes a gran escala. Una vez que se obtienen los resultados surgen interrogantes como ¿Cuáles son los genes sobre o sub-expresados en el experimento?, ¿Cuáles son los perfiles de expresión que pueden revelarse en general a partir de este experimento? En esta sección ejemplificaremos un caso de estudio para ilustrar el proceso de análisis utilizando programas de libre distribución basados en el lenguaje estadístico R (Bioconductor).

En el Instituto de Biotecnología de INTA Castelar (IB) se diseñó un microarreglo de ADNc conteniendo 317 secuencias de tipo ESTs previamente desarrollados en base a secuencias órgano-específicas de una línea de girasol cultivado). Para la impresión de los microarreglos de ADNc sobre soporte de vidrio, se amplificaron por PCR los fragmentos re-

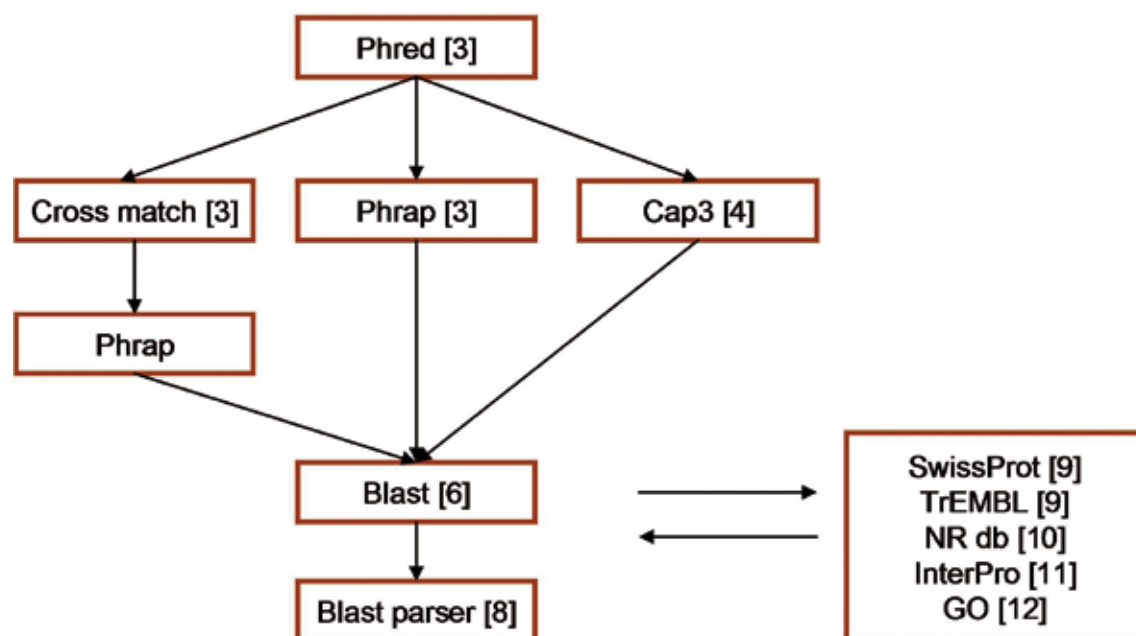


Figura 1: eBiopipeline. A. vista esquemática; B. página inicial, menú de programación y salidas del programa.

presentativos de los unigenes anotados en las bibliotecas previamente caracterizadas. Estos microarreglos fueron hibridados con ARN total de plantas crecidas en invernáculo y sometidas a dos condiciones de estrés abiótico diferenciales: frío y salinidad. Una vez impresos, los vidrios fueron escaneados (usando canales para ambos fluoróforos) a tres intensidades diferentes, usando el lector de fluorescencia VersArray Chip Reader (BioRad). Las imágenes obtenidas fueron analizadas utilizando el programa de acceso libre Spotfinder (www.tm4.org/spotfinder.html), cuantificándose la intensidad de señal para cada spot. Luego, se realizó una integración de los datos de las imágenes escaneadas (Figura 2).


Preprocesamiento de los datos

La imagen obtenida a partir de un microarreglo corresponde a la información cruda de un experimento de estas características. Es así que los algoritmos computacionales convierten la imagen en información numérica que cuantifica dicha expresión: este es el primer paso en un análisis de datos de microarreglos, y es fundamental la calidad y la rigurosidad obteni-

da de la misma para la posterior interpretación que se obtendrá como resultado.

Normalización

La normalización es un término genérico que se refiere a la resolución de errores sistemáticos y desvíos producidos en un microarreglo debido a condiciones experimentales inevitables y propias de la plataforma utilizada. La normalización y el análisis de expresión global se realizaron en este caso a través de programas generados utilizando el programa R (University of Auckland) a través de su versión R 1.9.0 (<http://www.rproject.org>). Los datos de cada vidrio fueron normalizados corrigiendo la dependencia por intensidad mediante la utilización del suavizador no paramétrico LOWESS (regresión local ponderada). Se realizó una integración de los datos de las réplicas técnicas dentro de cada soporte (cada *spot* fue impreso 4 veces) y las réplicas técnicas entre soportes (intercambio de fluoróforos o “*dye-swap*”). Luego de este paso el producto obtenido es una matriz de expresión génica cuyo análisis se focaliza en la identificación de genes con expresiones diferenciales.




[Home](#)

Pipeline of programs

Process name

Browse FASTA file



[Home](#)

Cross match program			
Banded Search		Filtering of Matches	
Minmatch <input type="text" value="14"/>	Mincore <input type="text" value="30"/>	Options	
Maxmatch <input type="text" value="30"/>	Vector bound <input type="text" value="80"/>	Input data interpretation	
Bandwidth <input type="text" value="14"/>	Masklevel <input type="text" value="80"/>	Default qual <input type="text" value="15"/>	
		Miscelaneas	
		Indexwordsize <input type="text" value="10"/>	

Screen

Search report: prueba2

[Csv file](#)

[Hit file in fasta format](#)

[Go to Primer3](#)

Query Name: /var/www/html/pipeline/run_pipeline/prueba2.Contig1 Query Accession: /var/www/html/pipeline/run_pipeline/prueba2.Contig1 Query Length: 759 Database Name: Helianthus_annuus.mRNA.PUT.fasta Hits: 250

Hit 1

Name	PUT-157a-Helianthus_annuus-30342507		
Length	911		
Accession	PUT-157a-Helianthus_annuus-30342507		
Description	PlantGDB-assembled Unique Transcript-fragment derived from Helianthus_annuus mRNAs Jan_24_2007 (based on GenBank release 157)		
Significance	0.0		
Hit Score	586		
Hsp Quantity	1		
Hsp 1	Score	346	
	Length	358	
	E Value	0.0	
	Frac identical	0.991620111731844	

Figura 2: Imagen de una micromatriz de dos canales (Bello y col. 2006)

Limpieza de datos y transformación

Una vez obtenida la matriz de expresión génica, existe una serie de pasos que se llevan a cabo para asegurar una alta calidad en el análisis. Ellos son: la remoción de *spots* dudosos o conflictivos (*flagged features*), que se resuelve ya sea eliminando los *spots* con error aparente (con el consiguiente riesgo de pérdida de datos valiosos), o marcándolos para luego referirlos a la imagen original en el momento de su análisis; la corrección y/o sustracción del ruido de fondo (*corrección o sustracción de background*). La señal de fondo es indicadora de una hibridación inespecífica siempre y cuando la intensidad del *spot* de interés sea mayor que la intensidad del ruido de fondo. Si ocurre al revés, existe la posibilidad que esté representando un problema local en el microarreglo y la intensidad del *spot* se convierta en información no confiable; y por último la transformación logarítmica de los valores para hacer constante la variabilidad a todos los niveles de intensidad detectados.

Análisis estadístico de los datos

Evaluación de consistencia en las repeticiones

Para evaluar las diferencias asociadas a las repeticiones biológicas de este experimento se obtuvo una ordenación de las mismas en un plano de ordenación generado mediante análisis de componentes principales aplicado a la matriz de expresiones génicas. Esta aproximación tuvo en cuenta la información de todos los genes simultáneamente y permitió establecer si una repetición se comportaba de manera atípica o no.

Identificación de grupos de genes con expresión diferencial.

El análisis de la matriz de expresión génica se focalizó en la identificación de genes con expresiones diferenciales. Existen diversas estrategias para obtener un listado de genes candidatos. La estrategia más sencilla es aplicar una prueba de hipótesis tradicional gen a gen. Esta aproximación tiene el inconveniente de generar un gran número de falsos positivos. Los métodos correctivos, basados en el control de

la tasa de falsos positivos, presentan a su vez la dificultad de generar una alta tasa de falsos negativos. Por consiguiente, la metodología utilizada en este trabajo consistió en complementar las técnicas de inferencia clásicas con un criterio de selección basado en el ordenamiento de genes y tratamientos en el espacio generado por los dos primeros ejes principales obtenidos de un análisis de componentes principales de la matriz de expresión génica. Posteriormente, y dentro del conjunto de genes seleccionados en el paso anterior, se realizó el reconocimiento de grupos de genes con perfiles de expresión similar mediante la aplicación de un algoritmo de clasificación no supervisada, k-centroides para nuestro caso de estudio. El análisis transcripcional mediante la aplicación de k-centroides permitió detectar 3 grupos de genes bien diferenciados en sus patrones de expresión. Por una parte el Grupo 2, integrado por 126 genes, no mostró variación en sus niveles medios a través de los tratamientos. En cambio, el Grupo 1 (integrado por 112 genes) evidenció sobre-expresión respecto del control cuando las plantas fueron sometidas a estrés (por frío o por salinidad). De manera análoga, 49 genes conformaron el Grupo 3, pero en este caso se observó una sub-expresión respecto del control en ambos tratamientos.

Obtención de la lista de genes diferencialmente expresados

Para combinar esta aproximación, basada en la ordenación de genes por ACP y el criterio clásico de prueba de hipótesis para igualdad de medias, se consideraron sólo aquellos genes que para la prueba clásica de análisis de la varianza tuvieran un *p-valor* menor o igual a 0,05 y que estuvieran a una distancia del origen en la Figura 3 mayor que 9 (correspondiente, aproximadamente al percentil 70 de la distribución de distancias al origen). Este criterio de corte se seleccionó teniendo en cuenta el gen T411 (Genbank AN BU671801), que había sido previamente validado experimentalmente.

Para cada uno de los 80 genes seleccionados como genes candidatos se graficó el perfil de expresión según su comportamiento en cada tratamiento a través de un gráfico de colores de expresión diferencial (*heatmap*) de

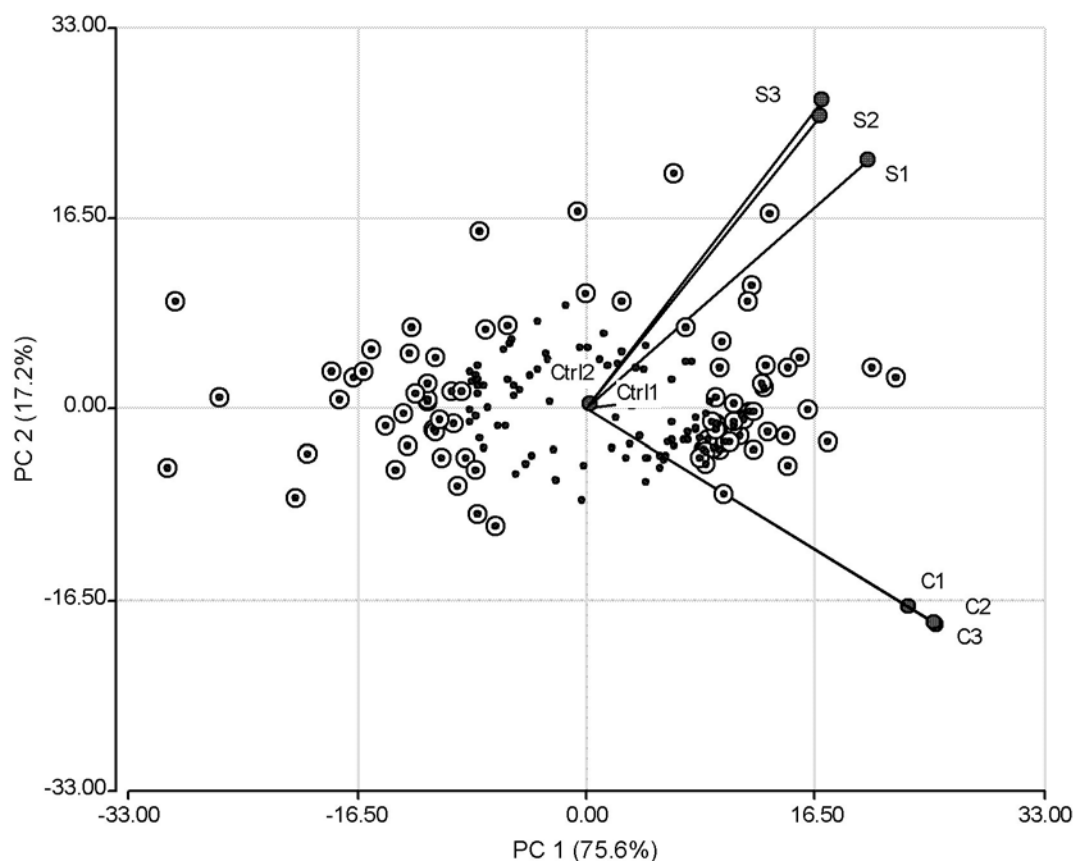


Figura 3. Bi-plot que muestra genes con p-valor para un test $F < 0,05$ y con una distancia al origen < percentilo 70 de la distancia al origen de la distribución (círculos rellenos).

modo de analizar cualitativamente el gradiente diferencial por tratamiento y por gen mediante un gráfico de perfiles de expresión individuales. De estos resultados surgieron genes candidatos de interés para su análisis de expresión diferencial, de los cuales 15 fueron seleccionados para validar mediante la técnica de PCR cuantitativa (qPCR).

Este último paso de validación es de una herramienta indispensable en el análisis de microarreglos ya que por todo lo expuesto anteriormente podemos inferir que los genes obtenidos son producto de transformaciones numéricas y una evaluación subjetiva al criterio estadístico aplicado. Es así que podemos concluir que la validación experimental confiere rigurosidad biológica a un conjunto de supuestos genes candidatos obtenidos a partir de una lista de genes diferencialmente expresa-

dos para las condiciones evaluadas, producto final de un análisis de microarreglos.

Búsqueda de marcadores funcionales en bases de datos genómicos

Como mencionamos anteriormente, la secuenciación completa de los genomas de especies modelo o parcial de especies de interés ha generado una rápida acumulación de información biológica que es depositada en bases de datos genómicas y es fácilmente accesible a través de Internet. Esta información, que deriva en muchos casos de la caracterización de líneas elite de una misma especie, de especies de un mismo género o de distintas fuentes relacionadas, constituye el recurso que permite sistematizar el desarrollo de marcadores moleculares potencialmente asociados a la variación fenotípica para caracteres de interés. El

potencial de descubrir marcadores moleculares funcionales analizando las secuencias depositadas en las bases de datos generales, fundamentalmente de ESTs, ha permitido superar una de las limitaciones más importantes de los marcadores moleculares locus-específico que es el costo inicial de desarrollo.

Identificación *in silico* de SNPs

Los polimorfismos de nucleótido simple (SNPs) o los generados por pequeñas inserciones/delecciones (Indels) se han convertido en una de las herramientas más utilizadas para la caracterización genética tanto de plantas como de animales debido a su baja tasa de mutación y a su gran abundancia, ubicuidad y dispersión en los genomas. Su uso se ha extendido a aplicaciones tales como la construcción de mapas genéticos de alta resolución, mapeo de asociación, estudios de diversidad genética y conservación, identificación y análisis de la estabilidad de cultivares, delimitación y asignación de grupos heteróticos, análisis filogenéticos, selección asistida por marcadores y caracterización de recursos genéticos.

Un SNP representa una diferencia en una base nucleotídica entre 2 secuencias de ADN y puede ser categorizada como transición (C/T or G/A) o transversión (C/G, A/T, C/A, o T/G) de acuerdo a la sustitución nucleotídica observada. El uso de marcadores SNP para cualquiera de las aplicaciones mencionadas requiere de una primera etapa de detección y desarrollo que puede ser abordada a partir de una estrategia “de laboratorio” (ej. secuenciación y comparación de genes o regiones candidatas en un conjunto de materiales de interés) o bien estar basada en aproximaciones *in silico* que hacen uso de la información de secuencia disponible en las bases de datos biológicas. En este último caso, el procedimiento de búsqueda generalmente involucra un protocolo de pocos pasos. Primero se identifican secuencias con alta similitud entre múltiples individuos a partir de una o varias bases de datos previamente seleccionadas en función del organismo o tipo de carácter que se desee estudiar, utilizando habitualmente los algoritmos de búsqueda de similitud de secuencias de tipo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool). Posteriormente,

se realizan los alineamientos base a base para cada uno de los grupos de secuencias y los mismos son analizados para detectar las diferencias nucleotídicas o SNPs. La rigurosidad y detallada evaluación de esta instancia es fundamental para encontrar verdaderas variantes alélicas dentro de los diferentes grupos. Es por ello que se encuentran disponibles diversas herramientas estadísticas que permiten diferenciar los errores de secuenciación de las verdaderas variantes alélicas basándose en el valor de calidad de la base secuenciada y en medidas de exactitud de la secuencia. Los programas desarrollados para la detección de SNPs, tanto para uso académico (PolyBayes y PolyPhred) como aquellos sujetos a licencias comerciales (Sequencher, Gene Codes Corporation) utilizan los datos de calidad de secuencia para eliminar los falsos positivos o incorporan el concepto de velocidad de mutaciones esperadas para distinguir los verdaderos SNPs. Asimismo, estos programas ofrecen la ventaja de presentar una interfase gráfica y pueden ser usados tanto para comparación de secuencias cortas como para estimar SNPs dentro de largas regiones genómicas. Muchos grupos han explorado además métodos alternativos de detección de SNPs basados en el uso de microarreglos de ADN de alta densidad.

Identificación *in silico* de SSRs

Los microsatélites (repeticiones en tandem de mono, di, tri, tetra o pentanucleótidos) son herramientas muy útiles como marcadores genotípicos debido a que son relativamente abundantes, multialélicos (hipervariables con respecto al número de repeticiones), heredados en forma estable y codominantes (se distinguen los alelos de un locus), permitiendo distinguir materiales estrechamente relacionados. Desde el punto de vista metodológico, son fáciles de detectar mediante PCR, requiriendo poca cantidad de ADN para el análisis y poco equipamiento.

La identificación *in silico* de SSRs a partir de la abundancia de secuencias genómicas disponibles para genomas vegetales, al igual que para los SNPs, se ha convertido en la alternativa más económica de desarrollar este tipo de marcadores haciendo uso de herramientas

computacionales eficientes. Asimismo, es muy frecuente poder asociar una función molecular determinada por similitud a la secuencia que alberga la repetición convirtiéndolo en un marcador funcional.

Existen distintas herramientas computacionales basadas en la web para el descubrimiento de SSRs y el diseño de iniciadores específicos para la amplificación de los mismos. Se pueden mencionar como ejemplos el programa SSRPoly accesible desde el sitio <http://acpfg.imb.uq.edu.au/ssrpoly.php>, que permite la identificación de SSR polimórficos que se distinguen de las variantes monomórficas por la representación de tamaños variables del microsatélite identificado en alineamientos múltiples de secuencias representadas en la bases de datos. Otra herramienta valiosa disponible en la web es CUGI SSR Server (http://www.genome.clemson.edu/cgi-bin/cugi_ssr).

Análisis de la variabilidad genética

Finalizada la etapa de desarrollo de marcadores moleculares, la fase siguiente generalmente consiste en la genotipificación de grandes cantidades de individuos a fin de determinar las variantes alélicas presentes en cada uno de ellos para cada uno de los marcadores detectados. La elección de la metodología más apropiada dependerá de los recursos disponibles y del nivel de procesamiento que se desee alcanzar. Entre las más utilizadas para el caso de los SNPs pueden mencionarse: secuenciación directa, amplificación alelo-específica por reacción en cadena de la polimerasa (PCR), métodos de digestión enzimática, hibridación con oligonucleótidos alelo-específicos, y por último las plataformas de microarreglos GoldenGate e Infinium desarrolladas por Illumina (Illumina, San Diego, CA, USA).

La tecnología de SNPs presenta un gran potencial para la identificación de las formas alélicas que controlan procesos biológicos complejos, como la resistencia a los estreses bióticos y abióticos que afectan la productividad de los cultivos. Sin embargo, para ser aprovechado en su totalidad, este potencial debe ser combinado con metodologías analíticas apropiadas. En los últimos años las metodologías de mapeo por asociación han surgido como com-

plemento de las aproximaciones convencionales (ej. Mapeo de QTLs) y han ido cobrando cada vez más importancia como herramientas para alcanzar un mayor grado de resolución. En pocas palabras, el razonamiento subyacente al mapeo de asociación consiste en utilizar eventos de recombinación históricos a lo largo de un linaje, y no solamente aquellos ocurridos en una determinada población de mapeo, para establecer posibles relaciones entre genotipo y fenotipo. Los polimorfismos responsables de la variación fenotípica no son observados en forma directa, si no que surgen a partir de inferencia estadística. La base para la detección de tales correlaciones es la asociación no aleatoria entre un polimorfismo dado y la variación fenotípica para cierto rasgo de interés, es decir la identificación de desequilibrio de ligamiento (DL) entre las variantes genéticas causales de la variación del carácter y los polimorfismos analizados.

Previo a cualquier estudio de mapeo por asociación, y para realizar un diseño experimental apropiado, es necesario conocer el grado y la estructura genómica del DL en la especie a evaluar, ya que éste es variable tanto entre especies como para las diferentes regiones de un mismo genoma. Las dos medidas preferidas en la literatura para cuantificar DL son el coeficiente de desequilibrio estandarizado (D') y la correlación de frecuencias alélicas al cuadrado (r^2). La estimación del DL generalmente involucra grandes cantidades de marcadores, razón por la cual suelen resultar útiles las herramientas de software que permiten sistematizar el cálculo de ambas medidas y representar gráficamente las asociaciones halladas (por ej.: DNAsp, Arlequin, Gold, GoldSurfer).

El desarrollo de un estudio de mapeo por asociación involucra la evaluación fenotípica del carácter agronómico de interés (ej. peso del grano, contenido de aceite, días a floración, AUDPC, etc) y la genotipificación de un conjunto apropiado de SNPs para cada una de las entidades a comparar (líneas, variedades, etc). El número y naturaleza de los polimorfismos a caracterizar dependerá de la estrategia de análisis que se haya seleccionado. Si se desea explorar todo el genoma (genome-wide analysis) el número de SNPs será mucho ma-

yor (entre 10.000 y 100.000) que el requerido si sólo se estudian los polimorfismos correspondientes a un grupo de genes candidatos. Sin embargo, en este último caso es necesario un conocimiento previo de la base genética del carácter fenotípico en estudio. Otro aspecto importante del diseño experimental es la selección de individuos. En humanos generalmente es la utilización de metodologías basadas en poblaciones de enfermos vs. controles sanos (case-control) o aquellas que involucran individuos relacionados o familias en donde algún individuo es enfermo (Transmission disequilibrium tests). En plantas, los individuos de la población en estudio usualmente incluyen germoplasma de distinto origen geográfico con el objeto de abarcar la mayor cantidad posible de variación genética y fenotípica.

Las inferencias estadísticas del mapeo por asociación para rasgos continuos son generalmente realizadas a través de análisis de regresión lineal, si bien también son aplicables otras aproximaciones. Dado que existen diversos factores que pueden llevar al establecimiento de asociaciones espurias, se han desarrollado modelos específicos en donde es posible incorporar las distintas variables intervinientes y controlar su efecto en la detección de asociaciones. Entre los procesos que pueden interferir en el análisis se encuentran: la subestructuración de las poblaciones estudiadas, las interacciones epistáticas y pleiotrópicas, las interacciones entre genotipo y ambiente, el tamaño muestral pequeño, la complejidad del carácter en estudio y la calidad de los registros fenotípicos. El software Tassel es uno de los paquetes más utilizados para los estudios de asociación en plantas ya que incluye metodologías que permiten tener en cuenta la estructura poblacional y el grado de parentesco entre los individuos analizados.

En conclusión, el mapeo por asociación constituye una poderosa herramienta para la disección genética de caracteres complejos, siendo los SNPs marcadores ideales para la implementación de tales estudios dada su alta frecuencia y ubicuidad en los genomas.

Lecturas recomendadas

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers, and D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J Mol Biol* 215:403-10.
- Ashburner, M., C.J. Mungall, and S.E. Lewis. 2003. Ontologies for biologists: a community model for the annotation of genomic data. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 68:227-35.
- Ashburner, M., C.A. Ball, J.A. Blake, D. Botstein, H. Butler, J.M. Cherry, A.P. Davis, K. Dolinski, S.S. Dwight, J.T. Eppig, M.A. Harris, D.P. Hill, L. Issel-Tarver, A. Kasarskis, S. Lewis, J.C. Matese, J.E. Richardson, M. Ringwald, G.M. Rubin, and G. Sherlock. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* 25:25-9.
- Bairoch, A. 2000. The ENZYME database in 2000. *Nucleic Acids Res* 28:304-5.
- Bairoch, A., and R. Apweiler. 1996. The SWISS-PROT protein sequence data bank and its new supplement TREMBL. *Nucleic Acids Res* 24:21-5.
- Balding, D.J. 2006. A tutorial on statistical methods for population association studies. *Nat Rev Genet* 7:781-91.
- Cervigni, G.D., N. Paniego, M. Diaz, J.P. Selva, D. Zappacosta, D. Zanazzi, I. Landerreche, L. Martelotto, S. Felitti, S. Pessino, G. Spangenberg, and V. Echenique. 2008. Expressed sequence tag analysis and development of gene associated markers in a near-isogenic plant system of *Eragrostis curvula*. *Plant Mol Biol* 67:1-10.
- Conesa, A., and S. Gotz. 2008. Blast2GO: A Comprehensive Suite for Functional Analysis in Plant Genomics. *Int J Plant Genomics* 2008:619832.
- Diatchenko, L., Y.F. Lau, A.P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E.D. Sverdlov, and P.D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93:6025-30.
- Fernandez, P., N. Paniego, S. Lew, H.E. Hopp, and R.A. Heinz. 2003. Differential representation of sunflower ESTs in enriched organ-specific cDNA libraries in a small scale sequencing project. *BMC Genomics* 4:40.
- Fernandez, P., J. Di Rienzo, L. Fernandez, H. Hopp, N. Paniego, and R. Heinz. 2008. Transcriptomic identification of candidate genes involved in sunflower responses to chilling and salt stresses based on cDNA microarray analysis. *BMC Plant Biol* 8:11.
- Gupta, P.K., J.K. Roy, and M. Prasad. 2001. Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for

- molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. *Curr Sci* 80:524-535.
- Kanehisa, M., S. Goto, S. Kawashima, and A. Nakaya. 2002. The KEGG databases at GenomeNet. *Nucleic Acids Res* 30:42-6.
- Martin, D.M., M. Berriman, and G.J. Barton. 2004. GOtcha: a new method for prediction of protein function assessed by the annotation of seven genomes. *BMC Bioinformatics* 5:178.
- Oraguzie N. et al., eds. 2007. *Association Mapping in Plants*. Springer Science+Business Media, LLC.
- Rafalski, A. 2002. Applications of single nucleotide polymorphisms in crop genetics. *Curr Opin Plant Biol* 5:94-100.
- Stekel, D. 2003. Image Processing, *In* P. C. University, ed. *Microarray Bioinformatics*, NY, USA.
- Stich, B., and A.E. Melchinger. 2009. Comparison of mixed-model approaches for association mapping in rapeseed, potato, sugar beet, maize, and Arabidopsis. *BMC Genomics* 10:94.
- Wold, B., and R.M. Myers. 2008. Sequence census methods for functional genomics. *Nat Methods* 5:19-21.
- Wu, C.H., L.S. Yeh, H. Huang, L. Arminski, J. Castro-Alvear, Y. Chen, Z. Hu, P. Kourtesis, R.S. Ledley, B.E. Suzek, C.R. Vinayaka, J. Zhang, and W.C. Barker. 2003. The Protein Information Resource. *Nucleic Acids Res* 31:345-7.

PARTE II

Métodos para generar y analizar diversidad

II CAPÍTULO 1

Polinización y fertilización *in vitro*

Susana Cardone, Gladys Pérez Camargo,
Aurora Picca

1 Introducción

Durante la reproducción sexual de las Angiospermas los procesos de polinización y fecundación conducen a la unión de las gametas masculina y femenina para formar el embrión, que junto con el endosperma darán origen a la semilla, que generará una nueva planta. La fecundación contribuye a la diversidad genética y proporciona la base sobre la que se trabajará en fitomejoramiento.

El hecho más notable de la fertilización in vivo de las Angiospermas es el de la “doble fecundación”, que es un fenómeno muy complejo en comparación con lo que acontece en todos los demás seres vivos. Para que la polinización se produzca, durante el desarrollo in vivo, deben ocurrir una serie de interacciones y señales entre el grano de polen y los diferentes tejidos del pistilo. El grano de polen hace contacto con las células receptoras del pistilo

(células papilares del estigma) que permiten su adhesión, hidratación y germinación, extendiendo su intina y generando un tubo polínico, cuya función es transportar las células espermáticas hacia el óvulo. En ese momento se desorganiza el núcleo vegetativo mientras que la célula generativa dará lugar a las dos células espermáticas que se vuelcan en una de las sinérgidas, ésta se desorganiza y uno de los núcleos espermáticos se fusiona con la oósfera para dar el cigoto, que luego producirá el embrión. El otro núcleo masculino se reunirá con dos núcleos femeninos para dar la célula madre del endosperma que es, por lo tanto, triploide (**Fig 1**).

Durante la evolución de las plantas superiores, surgieron diferentes barreras de cruzamiento que controlan la transferencia de genes de una especie a otra o dentro de la misma especie.

A veces, el polen no puede germinar sobre el estigma de la flor aunque éste se halle receptivo. Este hecho puede deberse a limitaciones genéticas o fisiológicas. Estas barreras se denominan de **prefertilización o precigóticas** y pueden ser eludidas mediante las técnicas de **polinización *in vitro***.



Figura 1. Corte longitudinal de un óvulo mostrando la doble fecundación en Angiosperma

Otras veces, a pesar de la ocurrencia de la polinización, la fecundación no puede llevarse a cabo, por diversos motivos. El término “**fertilización *in vitro***” se utiliza para aquellos casos donde la fusión de las gametas aisladas se logra por distintos métodos como la electrofusión, altas concentraciones de calcio o elevado pH.

En este capítulo se utilizarán indistintamente los términos “fecundación” y “fertilización” como sinónimos, refiriéndose a la unión de las gametas masculina y femenina para originar un nuevo individuo.

En ocasiones, la fecundación ocurre normalmente pero el embrión aborta en forma precoz. Esto es lo que se conoce como **barreras posfertilización o poscigóticas**, que pueden contrarrestarse con técnicas de **rescate embrionario**.

Frente a todas estas limitaciones, las técnicas de cultivo *in vitro* y manipulación de células aisladas resultan apropiadas para lograr el proceso completo de desarrollo del embrión y del endosperma y la obtención de semillas normales. Una de esas técnicas, desarrollada por Kanta y colaboradores (1962), demostró que en algunas especies de Papaveráceas los granos de polen tenían la capacidad de germinar *in vitro*, directamente sobre los óvulos en cultivo. A partir de la misma, surgen una serie de metodologías que se conocen en general como técnicas de **polinización *in vitro***.

Las técnicas de micromanipulación desarrolladas durante los años 80 permitieron el aislamiento y la fusión *in vitro* de gametas de Angiospermas. La combinación de estas técnicas con métodos de cultivo de células únicas, posibilitaron la **fertilización *in vitro***. Se pudo entonces concretar el desarrollo de cigotos y de endospermas en forma individual, *in vitro*, demostrando que son capaces de autoorganizarse en cultivo, independientemente del tejido materno. Tanto los cigotos obtenidos *in vitro* como los que son aislados después de la polinización *in vivo* desarrollan en embriones normales y posteriormente en plantas fértiles.

Los sistemas de **polinización y fertilización *in vitro*** pretenden salvar las barreras pre y postfertilización para obtener plantas fértiles. Los recientes progresos relacionados con estas metodologías, conjuntamente con los

proyectos de genómica, posibilitarán una mejor comprensión de los procesos de reconocimiento gamético, fusión y activación de señales intracelulares que participan en los eventos tempranos de desarrollo del huevo y formación del cigoto. Estos conocimientos permitirán una aplicación más eficiente de estas técnicas en los programas de fitomejoramiento.

2 Polinización *in vitro*

En algunas especies, las **barreras de pre-fertilización** impiden la autofecundación o el cruzamiento, por diferentes mecanismos genéticos o bioquímicos. La incapacidad del polen de germinar en estigmas propios o extraños se denomina **incompatibilidad**. Esta puede deberse a varias razones: por ejemplo que el tubo polínico se deshaga en el estilo, o a la incapacidad del tubo polínico para alcanzar el óvulo debido a una lenta velocidad de crecimiento, o a una excesiva longitud del estilo. En estos casos, el ovario aborta antes de que el tubo polínico alcance la base del estilo.

Las barreras que obstaculizan los cruzamientos interespecíficos no son demasiado conocidas, aunque es evidente la existencia de interacciones en el proceso de reconocimiento polen-pistilo. Los mecanismos que originan la imposibilidad de los cruzamientos intraespecíficos son mucho más conocidos. Por ejemplo, el de la **autoincompatibilidad**, que involucra interacciones polen-pistilo que determinan la inhabilidad de una planta hermafrodita para producir cigotos, a través de la autopolinización. En este sistema, el intercambio de información entre el polen y el tubo polínico permite al estigma y al estilo discriminar el polen de plantas idénticas del proveniente de otros miembros de la misma especie.

Existen dos grandes sistemas de **autoincompatibilidad**, que se diferencian en sus estrategias moleculares y genéticas:

a) autoincompatibilidad esporifítica, en ella, el resultado de la polinización está determinado por el genotipo de la planta en la que se ha formado el grano de polen. En este tipo de incompatibilidad, presente en la familia de las Brasicáceas, proteínas de bajo peso molecular provenientes del polen, difunden desde la

exina e interactúan de manera alélica con un receptor quinasa, localizado en las células del estigma. Dicha interacción estimula la actividad fosforilante del receptor y se produce el bloqueo de la hidratación específica del grano de polen, impidiendo su germinación.

b) autoincompatibilidad gametofítica en la cual, la ocurrencia de la polinización está determinada por el genotipo haploide del polen. Bajo este sistema se encuentran dos mecanismos diferentes:

- Uno es típico de las Papaveráceas. En este, las señales de autoincompatibilidad se traducen por medio de proteínas, codificadas por un gen específico, que generan la movilización del calcio, fosforilando proteínas del polen que desencadenan la muerte celular del tubo polínico.
- En el otro mecanismo, presente en Solanáceas, un locus específico, el locus S, codifica para RNAsas que actúan sobre los tubos polínicos degradando al ARN del polen propio, inhibiendo su crecimiento.

Para sortear estas incompatibilidades surgieron técnicas de **polinización *in vitro***. La primera, desarrollada en *Papaver somniferum*, ha sido también empleada exitosamente en 14 familias de Angiospermas, resultando más adecuada su aplicación en aquellas especies que poseen ovarios grandes y que contienen muchos óvulos. Dentro de las especies de plantas en las que se abordó la técnica se pueden citar *Dianthus caryophyllus*, *Nicotiana tabacum*, *N. rustica*, *Argemone mexicana*, *Eschechlozia californica*, *Petunia violacea*, *Antirrhinum majus* y *Dicranostigma franchetianum*.

Bajo el nombre de “**polinización *in vitro***” se suele englobar a varias metodologías que surgieron a partir de modificaciones del procedimiento inicial, que si bien poseen puntos en común, difieren en otros. Entre estas metodologías se encuentran:

- **La polinización estigmática**, que consiste en cultivar el pistilo *in vitro* y colocar el polen sobre el estigma.

- **El injerto del estilo**, en la cual los granos de polen germinan en un estilo compatible y luego se los une al ovario de la planta madre que se desea fertilizar.
- **La polinización de óvulos aislados** que se cultivan directamente sobre el medio de cultivo. En esta técnica los óvulos son separados de su placenta; por esta causa es un procedimiento mucho más complicado, que ha sido empleado con éxito sólo en pocas especies de plantas.
- **La polinización placental**, técnica en la cual los óvulos se ponen en contacto con el polen por remoción de la pared del ovario o a través de un corte en la parte superior del mismo. En esta metodología los porcentajes de supervivencia son muy buenos, ya que los óvulos no resultan dañados durante las manipulaciones involucradas en su aislamiento. El cultivo del óvulo junto con la placenta incrementa, en general, las posibilidades de un rápido desarrollo embrionario.

La **polinización placental *in vitro*** se ha utilizado con éxito para salvar las barreras de incompatibilidad precigóticas (autoincompatibilidad e incompatibilidad interespecífica), en varias especies, inclusive cuando, experimentalmente, se intentó el cruzamiento a partir de óvulos de Angiospermas con polen proveniente de Gimnospermas. En este caso, al realizarse el análisis embriológico de los óvulos de la especie *Melandrium album*, fijados tres días después de la polinización con polen de *Pinus wallihiana*, se observó la presencia de remanentes de tubos polínicos y embriones bicelulares en los sacos embrionarios.

- **La polinización con polen mentor** Se ha utilizado, en muchas especies de plantas, una estrategia para salvar las barreras de incompatibilidad, involucrando mezclas de polen no compatible con polen compatible muerto (denominado “mentor”). El rol del polen mentor es proveer alguna función, por ejemplo, a través del aporte de sustancias proteicas,

las que facilitan la polinización del polen incompatible. Algunas de las especies en las que se ha utilizado son: *Populus*, *Malus*, *Petunia* y *Nicotiana*.

Finalmente, en todos los casos, la gameta femenina es fecundada por células espermáticas, liberadas por el tubo polínico, en forma "casi" idéntica a la vía natural, con la consiguiente formación de semilla normal en un medio de cultivo apropiado. En general, todos los medios de cultivo para germinación de los granos de polen poseen altas concentraciones de sacarosa y de ácido bórico.

No obstante, para que los procedimientos anteriormente citados sean exitosos es crucial realizar el aislamiento de los óvulos y del polen en el estado fisiológico adecuado, por lo que es indispensable llevar a cabo la determinación de la duración de los distintos estadios del desarrollo de ambos, como por ejemplo:

a) Determinar los tiempos de antesis, dehiscencia de las anteras y polinización, **b)** Precisar el momento en que el estigma esté receptivo, **c)** Especificar el instante oportuno para la polinización y **d)** Establecer el tiempo adecuado para recoger el polen.

3 Fertilización *in vitro*

Durante años los científicos intentaron imitar los mecanismos de fecundación que acontecen *in vivo*, utilizando técnicas de **fertilización *in vitro*** de gametas aisladas; esta aplicación fue más sencilla en animales y en plantas inferiores pero no pudieron ser aplicadas a las plantas superiores hasta comienzos de la década de los noventa. Esto se debió a que la fertilización *in vivo* en las plantas superiores es un proceso muy diferente al que ocurre en los sistemas animales y de plantas inferiores, donde las gametas son de vida libre.

El primer aislamiento de células espermáticas vivas fue reportado por Cass en 1973, en el cual se aislaron gametos masculinos de cebada por ruptura de granos de polen en una solución de sacarosa al 20%. A partir de este aislamiento se pudieron describir las características celulares de ese gameto. Esto se

repitió luego con éxito en varias especies de Angiospermas. Para el aislamiento de gametas femeninas existe un método que se emplea a menudo y que consiste en un tratamiento con enzimas diluídas para disolver las paredes celulares, acompañado de la micromanipulación para separar las otras células del saco embrionario.

En 1991, Kranz y col. reportaron la primera fusión de gametas de maíz *in vitro*, pudiendo reproducirse actualmente en esta especie el ciclo de vida completo, comenzando con la electrofusión de la célula espermática con la ovocélula, dando como resultado un cigoto, un embrión y finalmente una planta. Pese a que se ha tomado al maíz como sistema vegetal modelo, en el cual estudiar los procesos de fusión de gametas y posterior embriogénesis, también se han realizado trabajos exitosos de fusión de gametas en trigo, donde Kovacs (1995) logró la fusión de gametas *in vitro*, obteniendo como resultado estructuras multicelulares y en algunos casos del tipo de microcallos. En los últimos años se ha logrado finalmente la fusión de gametas en *Nicotiana tabacum*, la que pudiendo ser una especie modelo en dicotiledóneas para estudiar la fertilización *in vitro*, dada su capacidad para la regeneración de plantas, presenta sin embargo el inconveniente de que las gametas no se fusionan fácilmente.

Tradicionalmente, se consideró que todas las células espermáticas tenían igual posibilidad de fusionarse con la célula huevo. Sin embargo, actualmente se sabe que existen mecanismos de fusión preferencial a nivel gamético, donde un determinado morfotipo de célula espermática es reconocido. Cuando está presente este mecanismo hay una identificación de las dos células espermáticas, candidatas para la fusión celular y una elección de la que se fusionará con la ovocélula. La discriminación se basa en las diferencias de las células espermáticas respecto de su heteromorfismo citoplasmático en: tamaño, forma, volumen, superficie, contenido de organelas y asociación física con el núcleo vegetativo. Por otro lado, el contacto del polen con el gameto femenino parece estimular la maduración del mismo, incluyendo la acumulación de calcio necesaria, la organización de la célula huevo, la migración nuclear,

y la progresión del ciclo celular. Este último factor parecería ser crítico en la combinación exitosa de gametas. Además, hay señales, suministradas por el saco embrionario, que permiten estimular el crecimiento y la maduración del tubo polínico.

Para que la fertilización tenga lugar, *in vitro*, no sólo deben aislarse las gametas femeninas y masculinas sino que deben ser inducidas a fusionarse, en ausencia de las células asociadas.

Para obtener un embrión *in vitro*, los pasos a seguir son los siguientes:

Aislamiento y selección de las gametas

Se han desarrollado métodos de aislamiento y selección de gametas para una amplia variedad de especies vegetales, entre ellas: maíz (*Zea mays*), trigo (*Triticum aestivum*), cebada (*Hordeum vulgare*), raygrass (*Lolium perenne*) y algunas brasicáceas. A fin de realizar eficientemente este paso se debe:

Conocer exhaustivamente la morfología floral de la especie a utilizar, con el objetivo de ubicar el saco embrionario y sus células constituyentes. **b)** Aislar las gametas masculinas, a partir de los granos de polen mediante choque eléctrico, osmótico y/o de pH. **c)** Aislar el saco embrionario y las gametas femeninas mediante microdissección individual en asociación con maceración enzimática.

Este paso es crítico y limitante ya que pueden obtenerse pocas gametas femeninas y el proceso de manipulación es muy delicado. El tratamiento de las espigas, previo a la polinización con 2,4-D, que induce a la expansión del ovario, facilita el proceso resultando en ovarios más grandes y óvulos más blandos, incrementando la eficiencia en el aislamiento de las ovocélulas.

Fertilización *in vitro* propiamente dicha

Puede realizarse mediante la microinyección de células espermáticas o núcleos espermáticos aislados, en células individuales obtenidas de los sacos embrionarios, o por electrofusión. En este último caso las gametas se ponen en contacto en una cámara de electrofusión por alineación dielectroforética y se fusionan mediante pulsos eléctricos (**Fig. 2**). Los productos de fusión pueden ser entonces cultivados en

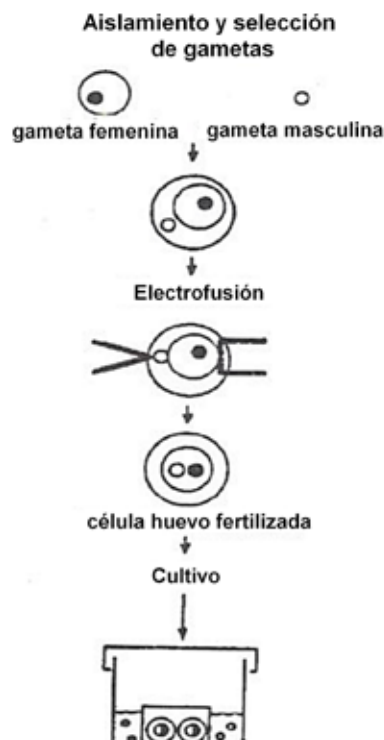


Figura 2. Fertilización *in vitro* mediante electrofusión

una solución con células nodrizas y algunos de ellos desarrollarán en proembriones.

Fusión de las gametas. En maíz, la secuencia de eventos para que se verifique la fusión *in vitro* es la siguiente: las gametas masculinas se obtienen a partir de granos de polen fresco sometidos a un “shock” de pH en una solución 0,5 M de manitol. Las ovocélulas y los protoplastos de las células centrales del saco embrionario se aíslan de los óvulos por tratamiento con enzimas celulolíticas y microdissección manual.

Las dos gametas aisladas se colocan de a pares, bajo condiciones de esterilidad, en un medio de fusión simple compuesto por manitol y cloruro de calcio (CaCl_2). Para realizar este procedimiento se utilizan microagujas de vidrio que permiten poner en contacto las gametas femeninas y masculinas, a fin de facilitar y dirigir la fusión. La adhesión y posterior fusión de las gametas es rápida (aproximadamente 10 segundos). A los 20 minutos de realizada la fusión, deja de visualizarse el núcleo masculino y 20 horas después es posible observar mediante microscopio óptico, con contraste de

fases la presencia de dos núcleos, de manera similar a lo que se observa *in vivo*.

La formación del endosperma ocurre cuando se fusiona el núcleo de la célula espermática con los dos núcleos polares. Los estudios *in vitro*, sobre los primeros eventos después de la fusión de las células y núcleos, indican que las primeras células del endosperma resultante desarrollan un tejido característico capaz de auto-organizarse en forma separada del tejido materno. Este proceso se completa, en esta especie, aproximadamente dos horas después de la fusión *in vitro* de las células que forman el embrión.

4 Cultivo de óvulos y embriones *in vitro*

El **cultivo de óvulos** es un procedimiento muy complejo debido a que la manipulación del material es difícil. El óvulo es una estructura delicada, muy pequeña, altamente hidratada, que puede ser dañada con suma facilidad. Es imprescindible realizar la microcirugía con rapidez para evitar que los tejidos sufran desecación durante el proceso. Pese a las dificultades de la técnica, en algunos cruzamientos interespecíficos como los realizados en papa, algodón y *Hevea brasiliensis*, se comprobó que el cultivo de óvulos completos es más exitoso para el rescate de embriones que el cultivo de los embriones aislados.

El **rescate de embriones** consiste en aislar los embriones de los óvulos de una planta y cultivarlos en un medio estéril que contenga los nutrientes esenciales que les permita concluir su desarrollo normal. Esta técnica es relativamente fácil de llevar a cabo en embriones maduros y sus posibilidades de éxito son muy buenas. Las dificultades se incrementan cuanto más inmaduro sea el embrión a rescatar, ya que los requerimientos nutricionales son más específicos en las etapas tempranas de desarrollo del embrión.

Factores externos que condicionan el cultivo de óvulos y embriones

Entre los factores externos más importantes que afectan el cultivo de óvulos y de embriones se citan: el medio de cultivo, la osmolaridad y los reguladores de crecimiento.

El óvulo presenta una gran cantidad de requerimientos nutricionales, que varían con el estadio de desarrollo del mismo y que es necesario identificar para cada especie en particular. Por consiguiente un aspecto fundamental a tener en cuenta en el rescate de embriones es la selección correcta del medio de cultivo adecuado para cumplir con los requerimientos durante las distintas etapas del desarrollo embrionario, siendo necesario a veces la transferencia de los embriones de un medio de cultivo a otro para garantizar un óptimo crecimiento.

Se pueden reconocer dos fases en el desarrollo embrionario con respecto a la nutrición:

- **la fase heterotrófica** en la que el embrión es dependiente del endosperma y demás tejidos maternos que lo rodean, y
- **la fase autotrófica**, en la cual el embrión es capaz de sintetizar las sustancias requeridas para su crecimiento a partir de sales minerales y azúcares. La etapa crítica de pasaje de una fase a otra varía con las especies.

La introducción de agua de coco y extractos de endospermas en el medio de cultivo han sido muy útiles ya que activan el crecimiento y desarrollo de los embriones en el cultivo de óvulos de algunas especies vegetales. Por otro lado, no existe demasiada evidencia acerca de la absoluta necesidad de los reguladores de crecimiento para el desarrollo de los embriones extraídos, sean inmaduros o maduros, excepto en el rol que cumplen en la ruptura de la dormición.

La concentración osmótica es un factor importante en el desarrollo de óvulos y embriones, dependiendo del estado de madurez de los mismos. La sacarosa presente en los medios de cultivo no sólo provee la fuente de carbono necesaria para el crecimiento sino que además mantiene la osmolaridad requerida para cada etapa del desarrollo. Está demostrado que una presión osmótica elevada previene la germinación precoz de los embriones inmaduros, evitando así la ocurrencia de malformaciones estructurales. A medida que van creciendo, los embriones necesitan ser transferidos a medios con progresivas disminuciones en los niveles de sacarosa.

Respecto de los requerimientos de temperatura, los embriones de la mayoría de las especies presentan un buen crecimiento en un rango de temperaturas que va de los 25° C a los 30° C. Aunque algunos estudios indican que la luz no es crítica para el crecimiento de los embriones, se demostró que en el caso de la cebada la luz disminuye las probabilidades de germinación precoz en los embriones inmaduros. Entre los medios de cultivo más difundidos para el cultivo de óvulos y embriones se pueden citar el de Murashige y Skoog (1962), Monnier (1976), Randolph y Cox (1943), Gamborg y col. (1976), Liu y col. (1993).

5 Aplicaciones de las Técnicas de Fertilización *in vitro*

5.1 Aplicaciones en el Mejoramiento Genético Vegetal

Las técnicas antes mencionadas han sido utilizadas para salvar algunos obstáculos que se le presentan al mejorador de plantas cuando desea realizar cruzamientos, para el logro de ciertos objetivos de mejoramiento. A continuación se mencionan ejemplos de aplicación de las metodologías de polinización y fertilización *in vitro*:

En algunas combinaciones de cruzamientos, la **polinización placental** *in vitro* permitió que se superen las barreras de incompatibilidad precigótica, obteniéndose embriones híbridos y aún plantas híbridas, imposibles de obtener mediante técnicas convencionales. Así se realizaron los cruzamientos de las siguientes especies: *Zea mays* x *Z. mexicana*, *Nicotiana tabacum* x *N. amplexicaulis*, *Melandrium album* x *Viscaria vulgaris*, *M. Album* x *Silene schafta*.

La **polinización *in vitro*** se empleó también como vía para la obtención de plantas resistentes a estreses ambientales, ya que permite seleccionar para la fecundación aquellos granos de polen que tuvieron capacidad de germinar bajo diferentes condiciones de estrés, acelerando así la obtención de plantas resistentes. Esta estrategia se desarrolló en maíz, con polen cosechado de plantas creciendo a temperaturas elevadas y condujo a la obtención de plantas tolerantes a estrés por calor. En *Brassica rapa*, la selección de polen a baja tempe-

ratura tuvo un efecto positivo en el crecimiento de la progenie en condiciones de frío, logrando acumular más peso seco que en progenies obtenidas sin la selección previa del polen.

El **cultivo de óvulos y de embriones** vegetales se emplea en mejoramiento vegetal cuando se desea: rescatar embriones abortivos derivados de la hibridación interespecífica o intergenérica, superar problemas de abscisión precoz del fruto, recuperar embriones de cruza interespecíficas que conducen a la obtención de haploides y acortar el período de latencia que ocurre en algunas semillas por presentarse, en el endosperma o en la cubierta de la misma, inhibidores del desarrollo del embrión.

Los siguientes ejemplos ilustran las diversas aplicaciones:

Durante la producción comercial del triticale, especie obtenida artificialmente mediante el cruzamiento de trigo y centeno, el **cultivo o rescate de embriones** se utilizó para superar el alto grado de incompatibilidad del cruzamiento inicial, ya que los embriones abortaban en estadios tempranos del desarrollo debido a una incompatibilidad con el endosperma. Esta técnica y la aplicación de colchicina en plantas híbridas, fueron de fundamental importancia para salvar los problemas que se presentaron en el cruzamiento inicial y la marcada esterilidad que poseía la F1. El perfeccionamiento de estas dos metodologías fue decisiva para la producción de un gran número de triticales hexaploides y octoploides, cruzando el centeno con trigos duros y harineros, respectivamente, logrando finalmente un alto grado de fertilidad.

Las técnicas de **rescate de embrionario** son necesarias como complemento en la producción artificial de haploides. En ellas, se cultivan embriones que se forman por partenogénesis o por eliminación de cromosomas luego de la hibridación interespecífica o intergenérica. En algunos casos los embriones haploides se distinguen morfológicamente de los normales, de manera que se extraen y se los cultiva *in vitro*, en medios y condiciones adecuados (ver en este libro Parte IV-Capítulo 1). Otras veces es necesario esperar a obtener las plantas para determinar el nivel de ploidía. Esta técnica se ha utilizado con éxito en cebada, trigo y tabaco.

También se emplea el **cultivo de embriones** en casos en que el endosperma no se desarrolla normalmente, como sucede en los cruzamientos de cultivares diploides y tetraploides de *Citrus*, o cuando el mismo se desintegra después de la fecundación, como en *Oenothera biennis* x *O. muricata* o *O. biennis* x *O. lamarckiana*. Esta técnica también es de utilidad para sortear barreras de dormición o en casos donde la viabilidad de la semilla es baja, como en yuca y otras especies del género *Manihot*.

El **cultivo *in vitro* de embriones** es también una alternativa para el intercambio de semilla a través de fronteras internacionales. En un proyecto de mapeo de genes con resistencia al virus del mosaico, en yuca, desarrollado entre CIAT (Centro Internacional de Agricultura Tropical, con sede en Colombia) y IITA (Instituto Internacional de Agricultura Tropical, con sede en Nigeria) fue necesario trasladar “stocks” de semillas desde Sudamérica al continente africano, el cultivo de embriones resultó ser un excelente método para transferir germoplasma con mínimos riesgos fitosanitarios.

El **cultivo de embriones** ha ayudado también al mejoramiento genético de especies leñosas que tienen dificultad en la germinación de sus semillas, como en *Taxus mairei*, o con escasa producción de semillas como es el caso de *Pseudotsuga macrolepis*.

El **cultivo de embriones inmaduros** puede ser aplicado para disminuir el tiempo necesario en la obtención de un nuevo cultivar. Por ejemplo en soja se requieren unos diez años para este fin. Si se consiguen realizar varias generaciones por año, en contraestación, se acelera el proceso. El cultivo de embriones inmaduros ahorraría, además, el tiempo de maduración de la semilla. En este y en cada caso en particular, se debe realizar la evaluación del beneficio económico para decidir la utilización de estas técnicas.

Cultivo de nucelas En las plantas leñosas, los explantos de tejidos maduros pierden la capacidad de regeneración, se ha inducido entonces con éxito la **embriogénesis somática**

a partir de nucelas de óvulos jóvenes. Este es el caso de *Citrus sp*, *Vitis vinifera*, *Malus domestica*, *Psidium guajava* y *Pyrus serotina*.

La técnica de **rescate de óvulos** fecundados se utiliza también en aquellos cruzamientos en los que la barrera de incompatibilidad se encuentra a nivel del ovario como en el cruzamiento *Trifolium repens* x *T. hybridum*.

Las técnicas de **fertilización *in vitro*** pueden complementar, además, las metodologías de transformación de plantas. Por ejemplo, a través de la obtención de un embrión a partir de cigotos transgénicos que han sido manipulados, utilizando un protocolo que involucra la microinyección de genes en el cigoto. Esta técnica evitaría la utilización de antibióticos y genes de resistencia a herbicidas, como marcadores, durante el proceso de selección de las células transformadas.

Otra ventaja de la **fertilización *in vitro*** es la posibilidad de realizar cruzamientos entre plantas que son filogenéticamente distantes, fusionando *in vitro* sus respectivas gametas para producir cigotos híbridos. Se evitan así los inconvenientes que frecuentemente se observan en la hibridación somática, como por ejemplo la ocurrencia de inestabilidad del híbrido respecto del número de cromosomas o las dificultades núcleo e inter-citoplasmáticas (ya que en este caso es la célula huevo la que contribuye con el citoplasma del cigoto híbrido). Además, en la fusión gamética, el desarrollo temprano del cigoto está regulado por genes pertenecientes a la célula huevo, los que brindan señales celulares propias, haciendo que progrese el ciclo celular en forma exitosa con el resultado de proembriones producto de las sucesivas divisiones celulares. Pese a la potencialidad de la técnica de hibridación distante a partir de gametos, es importante la elección de especies parentales adecuadas para minimizar las dificultades que surgen producto de las diferencias filogenéticas, fisiológicas y del ciclo celular.

5.2 Aplicaciones para dilucidar aspectos básicos del desarrollo en plantas

Las dificultades en el aislamiento de los ga-

metos de las plantas superiores ha obstaculizado durante mucho tiempo la comprensión de la fisiología gamética y de los mecanismos que desencadenan la embriogénesis; los embriones cigóticos en su medio natural ofrecen dificultades debido a su tamaño pequeño y al hecho de estar inmersos en el tejido materno.

A partir del aislamiento de células espermáticas, células huevo y cigotas, se han podido realizar estudios moleculares de las células germinales, evitando las interferencias que resultan de la interacción con el tejido somático. Asimismo se ha facilitado el análisis de los efectos genéticos, epigenéticos e interacciones núcleo-citoplasmáticas inherentes a los gametos como también el estudio del desarrollo del embrión y el endosperma. De este modo, la **fertilización *in vitro*** de las plantas superiores se ha convertido en un área de investigación importante, resultando actualmente uno de los campos principales de la biología vegetal.

Los estudios sobre la **embriogénesis somática** también han permitido identificar patrones de expresión génica relacionados con este proceso, que se desencadena a través del cultivo de tejidos. El sistema mejor estudiado, en relación con la embriogénesis somática, es el de suspensiones celulares de zanahoria (*Daucus carota*). En este sistema, la remoción del 2,4-D (ácido 2, 4-diclorofenoxiacético) del medio de cultivo, genera una respuesta embriogénica por la cual los agregados celulares forman embriones que crecen, de a millares, en un medio líquido (ver en este libro Parte II-Capítulo 1). Los embriones somáticos constituyen una excelente herramienta para estudiar los procesos de desarrollo en plantas, ya que facilitan el acceso a gran cantidad de embriones libres.

Las plantas parecen poseer un programa embriogénico preestablecido que se desencadena en respuesta a condiciones específicas. El proceso de fertilización dispara la em-

Tabla 1. Resumen de los avances metodológicos posibilitados por las técnicas de **fertilización *in vitro*** para el estudio del proceso de la doble fecundación de las Angiospermas (Modificado de Wang y col., 2006).

<i>Cultivo in vitro de cigotos y embriones</i>	<i>Fusión in vitro de gametas</i>	<i>Aislamiento de células generativas</i>
↓	↓	↓
<i>Cada una de estas técnicas ha posibilitado:</i>		
Investigar los requerimientos del embrión durante su desarrollo	Investigar los mecanismos de activación del cigoto	Estudiar la ultraestructura de las células generativas
Investigar los aspectos moleculares de la embriogénesis	Hibridar especies distantes	Investigar las diferencias entre las células del saco embrionario
Determinar la receptividad del cigoto para la transformación	Obtener bibliotecas de ADNc de cigotas	Realizar electroforesis de productos de células generativas
		Construir bibliotecas de ADNc de células generativas

brigiogénesis cigótica, cuyos estadios normales de desarrollo se muestran en la **Fig. 3**. Una serie de investigaciones han demostrado que hay requerimientos para que los gametos se fusionen *in vivo*, por ejemplo la presencia de calcio, elemento que posee una actividad altamente fusogénica y que además activaría el desarrollo del cigoto. Además, al estudiar la ultraestructura celular se han encontrado diferencias en la arquitectura de los microtúbulos entre la célula huevo no fertilizada y el cigoto, demostrando que este cambio está inducido por la fertilización.

El cultivo *in vitro* y las tecnologías diseñadas para estudiar la expresión génica han permitido analizar por separado la función de genes presentes de manera específica en las células que participan en el proceso de fertilización. Con la utilización de técnicas de especiales de electroforesis bidimensional se han podido identificar proteínas de células gaméticas y cigóticas, encontrándose pocas diferencias entre los patrones proteicos de embriones somáticos y cigóticos. Ning y colaboradores (2006)

estudiaron la contribución de los genes de las células espermáticas, la célula huevo y la cigota y obtuvieron evidencias de que hay clusters de genes que están presentes en la célula huevo y espermáticas, que persisten en el cigoto, mientras que hay una gran cantidad de genes que son propios del cigoto, produciendo en éste nuevos transcritos.

En el caso particular de la gameta masculina, se sabe que cada una de las funciones para las cuales está destinada (reconocimiento, fusión y adhesión con la gameta femenina), está controlada por la activación de genes. Por ejemplo, Xu y colaboradores (1999) identificaron y caracterizaron dos genes de histonas gCH2A y gCH3 que actúan durante la maduración de la célula espermática y también el gen LGC1 que se expresa exclusivamente en las células gaméticas masculinas. El producto de este último gen (una proteína) fue localizado en la superficie de las células gaméticas masculinas sugiriendo un posible rol en la interacción célula espermática-célula huevo, en el momento del reconocimiento o señalización. Además, este mismo grupo de investigación aisló, a partir de una biblioteca de ADNc, dos genes, NtS1 y NtS2, que codifican para una poligalacturonasa, enzima que tendría la función de modificar la pared celular durante la diferenciación de las células espermáticas.

Pese a las dificultades que presenta el aislamiento de las gametas femeninas (hay menor eficiencia en la obtención de células que en las masculinas), también se han logrado progresos en el esclarecimiento de sus funciones. Por ejemplo, recientes investigaciones han esclarecido detalles acerca de la expresión de genes involucrados en el gameto femenino que determinan la guía del tubo polínico y la maduración de las anteras, como por ejemplo el gen ZmEA1, en maíz, que posee una función en la atracción del tubo polínico a la micrópila. Cuando este gen está regulado negativamente, la señal direccional del tubo polínico a la micrópila es insuficiente y no se produce la fertilización.

En relación a la expresión de genes en la embriogénesis del maíz, se han identificado algunos diferencialmente expresados en la célula basal y apical del embrión bicelular. En esta

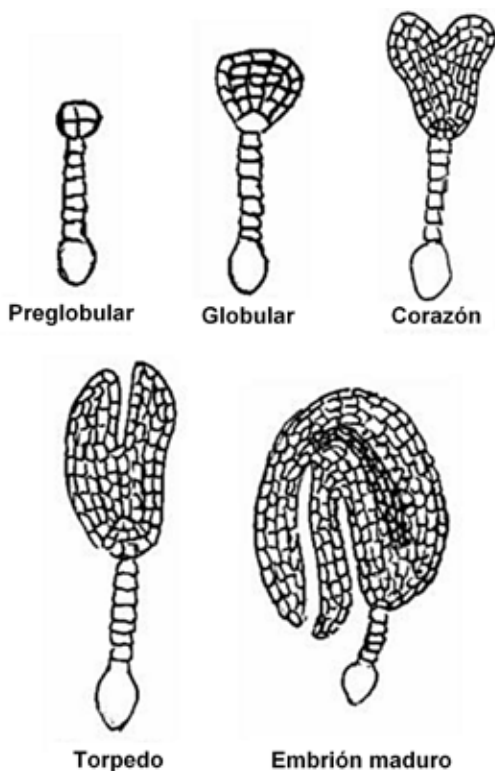


Figura 3. Estadios de la embriogénesis en *Arabidopsis thaliana*

misma especie la célula huevo mostró un incremento en la abundancia de transcriptos que involucran funciones como la comunicación celular, el crecimiento y la división celular, la síntesis de ADN y factores relacionados con estreses y transducción de señales. Por otro lado, las células centrales del saco embrionario muestran una abundancia de transcriptos involucrados con los procesos relacionados con el metabolismo de la energía y la síntesis proteica. En cada caso, estos productos parecerían reflejar categorías funcionales representadas en el futuro desarrollo del embrión y el endosperma. Como en el caso ya citado de la célula espermática, se han identificado también en la célula huevo y la cigota genes de histonas que podrían representar un mecanismo regulatorio de varios genes.

El número de herramientas disponibles en la actualidad para manipular las gametas de las plantas superiores provee numerosas oportunidades para realizar progresos científicos y tecnológicos. La investigación en el área de la biología reproductiva de las Angiospermas ha entrado en una nueva fase, donde los métodos de la biología molecular permiten responder muchas preguntas acerca de los mecanismos fundamentales de la fecundación y activación del desarrollo embriogénico temprano. Un resumen de **las técnicas de fertilización *in vitro*** que han permitido el acceso a nuevas investigaciones en el área molecular de este tema, se muestran en la **Tabla 1**.

El desarrollo de sistemas experimentales en varias especies, particularmente en dicotiledóneas, son necesarios para confirmar los resultados obtenidos en gramíneas, a fin de complementar la información molecular acerca del proceso de fertilización y mejorar los métodos para la producción de plantas regeneradas fértiles, con combinaciones genéticas estables y de alta eficiencia.

6 Lecturas recomendadas

CASS D. 1973. An ultrastructural and Nomarski-interference study of the sperms of barley. *Can J Bot* 51:601-605.
CHEN S.; YANG, Y.; LIAO, J.; KUANG, A.; TIAN, H. 2008. Isolation of egg cells and zygotes of *Torenia fournieri* L. and determination of their surface

charge. *Zygote* 16:179-186 Cambridge University Press.
DUMAS C.; MORGENSEN, H. 1993. Gametes and fertilization: Maize as a model system for experimental embryogenesis in flowering plants. *Plant Cell* 5: 1337-1348.
FAURE J.; DIGONNET, C.; DUMAS, C. 1994. An *in vitro* System for Adhesion and Fusion of Maize Gametes. *Science* Vol 263, pp 1598-1600.
FAURE J.; ALDON, D.; ROUGIER, M.; DUMAS, C. 1996. Emerging data on pollen tube growth and fertilization in flowering plants. *Protoplasma*, Vol 193, Iss 1-4, pp 132-143.
GAMBORG O.; MURASHIGE, T.; THORPE, T.; VASIL, I. 1976. Plant tissue culture media. *In Vitro* 12: 473- 478.
GE L.; TIAN, H.; RUSSELL, S. 2007. Calcium function and distribution during fertilization in Angiosperms. *American Journal of Botany* 94 (6): 1046-1060.
GUEVARA C.; OSPINA, J.; MAFLA, G.; VERDIER V. 1998. Zygotic embryo culture of *Manihot esculenta* Crantz: a practical approach for the safe international movement of cassava seed stocks. *Plant Genetic Resources Newsletter* 115:33-38.
HOLM P.; OLSEN O.; SCHNORF M.; BRINCH-PEDERSEN H.; KNUDSEN, S. 2000. Transformation of barley by microinjection into isolated zygote protoplasts. *Transgenic Res* 9:21-32.
HOWELL S. 1998. Molecular Genetics of Plant Development. Cambridge University Press. ISBN 0521587840, 9780521587846.
KANTA K.; RANGASWAMY, W.; MAHESHWARI, P. 1962. Test tube fertilization in a flowering plant. *Nature* 194:1214-1217.
KOVACS M.; BARNABAS, B.; KRANZ, E. 1995. Electrofused isolated wheat (*Triticum aestivum* L.) gametes develop into multicellular structures. *Plant Cell Rep.* 15:178-180.
KRANZ E.; BAUTOR J.; LÖRZ H. 1991. In vitro fertilization of single, isolated gametes of maize mediated by electrofusion. *Sex Plant Reprod* 4:12-16.
KRANZ E.; DRESSELHAUS, T. 1996. In vitro fertilization with isolated higher plant gametes. *Trends in plant science reviews*. Vol. 1, Nro. 3, pp 82-89.
KRANZ E.; KUMLEHN, J. 1999. Angiosperm fertilization, embryo and endosperm development in vitro. *Plant Science*. Vol. 142, Iss 2, pp 183-197.
LITZ R. 1991. "Cultivo de embriones y óvulos". En *Cultivo de tejidos en la Agricultura. Fundamentos y Aplicaciones*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Roca y Mroginisky editores. pp 295-312.
LIU C.; XU, Z.; CHUA, N. 1993. Proembryo culture

- LORD E.; RUSSELL, S. 2002. The mechanisms of pollination and fertilization in plants. *Annu. Rev. Cell. Dev. Biol.* 2002. 18:81-105.
- MOL R.; MATTHYS-ROCHON, E.; DUMAS, C. 1995. Embryogenesis and plant regeneration from maize zygotes by in vitro culture of fertilized embryo sacs. *Plant Cell Reports*. 14: 743-747.
- MONNIER M 1976 Culture in vitro of embryo immature of *Capsella bursapastoris* Moench (L.) *Rev Cytol Biol Veg* 39: 1-120.
- MURASHIGE T.; SKOOG, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture. *Physiol. Plant*. 15: 473-497.
- NING J.; PENG X.; QU, L.; XIN, H.; YAN, T.; SUN, M. 2006. Differential gene expression in egg cells and zygotes suggests that the transcriptome is restricted before the first zygotic division in tobacco. *FEBS Lett* 580:1747-752.
- OKAMOTO T.; HIGUCHI, K.; SHINKAWA, T.; ISOBE T.; LÖRZ, H.; KOSHIBA, T.; KRANZ, E. 2004. Identification of Major Proteins in Maize Egg Cells. *Plant Cell Physiol*. 45(10): 1406-1412.
- PONYA Z.; BARNABAS, B. 2001. Microinjected fluorescent phalloidin *in vivo* reveals F-actin dynamics in isolated egg cells of wheat (*Triticum aestivum*, L.) developed *in situ* and fertilised *in vitro*. *Journal of Plant. Physiology*. Vol 158 (12): 1527-1539.
- PONYA, Z.; TIMAR, I.; SZABO, L.; KRISTOF, Z. 1999. Morphological characterisation of wheat (*Triticum aestivum* L.) egg cell protoplast isolated from immature and covered caryopses. *Sex Plant Reprod*. 11: 357-359.
- RANDOLPH L., COX L. 1943 Factors influencing the germination of Iris seed and the relation of inhibiting substances to embryo dormancy. *Proc. Amer. Soc. hort. Sci.* 43: 284-300.
- ROUGIER M.; ANTOINE, A.; ALDON, D.; DUMAS, C. 1996. New lights in early steps of *in vitro* fertilization in plants. *Sexual Plant Reproduction*. Vol 9, Iss 6, pp 324-329.
- RUSSELL S. 1985. Preferential fertilization in *Plumbago*: Ultrastructural evidence for gamete-level recognition in an angiosperm (cytoplasmic heritable organelles/male gamete/sexual reproduction). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 82, pp. 6129-6132.
- TIAN H.; YUAN, T.; RUSSELL, S. 2005 Relationship between double fertilization and the cell cycle in male and female gametes of tobacco. *Sex Plant Reprod* 17:243-252.
- WANG Y; KUANG A.; RUSSELL S.; TIAN, H. 2006. In vitro fertilization as a tool for investigating sexual reproduction of angiosperms. *Sex Plant Reprod*. 19: 103-115.
- XU H.; SWOBODA I.; BHALLA, P.; SINGH M. 1999. Male gametic cell-specific gene expression in flowering plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. Vol. 96, pp. 2554-2558.
- ZENKTELER M. 1999. In vitro pollination of excised ovaries. *Acta Biologica Cracoviensia Series Botanica*. Vol.41, pp 31-38.

II CAPÍTULO 2

Hibridación Somática

Pablo Polci y Pablo Friedrich

1 Introducción

La mejora genética de las plantas cultivadas en procura de incrementar la producción viene siendo practicada por el ser humano desde hace miles de años, seguramente desde el inicio mismo de la agricultura. Para ello, el hombre ha empleado los cruzamientos con el fin de incrementar la variabilidad genética, paso inicial en el proceso de mejoramiento. De esta manera la hibridación entre especies diferentes permitió aumentar de modo significativo la productividad de diversos cultivos, como por ejemplo los cereales. Sin embargo, en otros cultivos esta estrategia no resultó exitosa a causa de esterilidad sexual o incompatibilidad genética.

La hibridación somática, es decir, la obtención de plantas híbridas a partir de la fusión de células o de protoplastos derivados de células somáticas, surgió hace unos 30 años como una herramienta muy promisoría para sortear problemas de incompatibilidad precigótica..

Esta técnica, si bien presenta algunas limitaciones, como una elevada esterilidad o imposibilidad de regenerar plantas en algunos casos, demostró ser útil en la mejora genética de plantas, principalmente por permitir la introgresión limitada de genes de especies silvestres en los cultivos. Se utiliza, por ejemplo, cuando se quiere transferir resistencia a enfermedades o tolerancia a estreses. También permite la obtención de citoplasmas híbridos (cíbridos). La hibridación asimétrica y cibridización sirve como puente para la transferencia de genes individuales

La técnica de fusión de protoplastos se desarrolló en la década de 1950-60, a partir de la observación de que ciertos virus pueden inducir la fusión de células animales. Sin embargo, recién en la década de 1980-90 tuvo un mayor auge debido a la aparición de métodos químicos y eléctricos más apropiados para la fusión de células vegetales. La pared presente en estas células representa una barrera que normalmente impide la fusión entre ellas. Por

ello, la obtención de plantas híbridas somáticas requiere del previo aislamiento de protoplastos mediante la digestión enzimática de las paredes celulares, para luego proceder a la fusión de protoplastos de distintos tipos parentales (distintos genotipos) y posterior regeneración de plantas a partir de los productos de fusión. La hibridación somática en plantas comenzó a desarrollarse a principios de 1970 con la aplicación de métodos químicos de fusión, y se extendió en los '80 con el empleo de métodos de electrofusión.

Es relevante destacar que, a los fines del mejoramiento genético, el sistema de protoplastos no sólo se emplea para la obtención de híbridos somáticos, sino que también constituye un material apropiado para la incorporación de ADN exógeno. Asimismo, la fusión de protoplastos tiene un uso mucho más amplio que el estrictamente de interés agronómico; en tal sentido, es de gran utilidad en estudios de biología celular así como para otras aplicaciones biotecnológicas, por ejemplo, la producción de anticuerpos monoclonales.

2 Hibridación somática vs. hibridación sexual

En relación a su potencialidad para producir híbridos, existen diferencias importantes entre la fusión de protoplastos somáticos y el cruzamiento sexual:

- La hibridación sexual entre organismos de diferentes especies está limitada por barreras de incompatibilidad. En algunos casos estas barreras son precigóticas, es decir, no permiten que se produzca la fecundación. Tal limitante no existe en la fusión de protoplastos, dado que este proceso es no-específico, permitiendo la fusión de células de orígenes muy diversos, incluso de organismos muy distanciados filogenéticamente (por ejemplo, células animales y vegetales). Ello no significa que pueda regenerarse un organismo viable y fértil a partir de cualquier tipo de combinación entre células. De hecho, la búsqueda de híbridos de interés agronómico ha demostrado que el principal aporte de esta metodología es

la introgresión, en los cultivos, de genes provenientes de plantas silvestres emparentadas.

- La hibridación sexual ocurre normalmente por fusión de células haploides ($n + n$), mientras que en la hibridación somática se fusionan dos protoplastos con sus genomas completos ($2n + 2n$) o con uno de ellos conteniendo sólo parte de su genoma.
- Otra diferencia está dada por la herencia de los genes extranucleares, esto es, plastídicos y mitocondriales. Mientras que en la reproducción sexual el genoma citoplasmático es aportado casi exclusivamente por la gameta femenina, en la hibridación somática se combinan organelas de ambos progenitores, produciendo nuevas combinaciones de genes citoplasmáticos.

3 Hibridación somática vs. transformación genética

La preponderancia que han tomado las técnicas de transformación genética ha relegado a la hibridación somática a un papel de menor significación como herramienta biotecnológica aplicada al mejoramiento de los cultivos. Comparando ambas metodologías, podemos destacar las siguientes diferencias:

- En la transformación genética se incorporan uno o pocos genes exógenos en una planta, mientras que en la hibridación somática el número de genes introducidos es mayor dado que se transfieren cromosomas de una especie a otra o se combinan dos genomas completos.
- La hibridación somática permite transferir caracteres sin necesidad de contar con un conocimiento detallado de los mecanismos moleculares que determinan la expresión de dichos caracteres. Por el contrario, la transformación genética requiere la previa identificación y aislamiento de los genes que determinan la expresión del carácter de interés.
- Caracteres tales como productividad, tolerancia a ciertos tipos de estrés, resis-

tencia horizontal a enfermedades y otros son poligénicos, por lo que su transferencia es factible por hibridación somática pero no por transformación genética. Sin embargo, en la actualidad, con las nuevas herramientas aportadas por la genómica se está avanzando en el conocimiento de todos los genes involucrados en diversas vías metabólicas. Estos podrían ser transferidos en conjunto vía transgénesis.

4 Tipos de híbridos somáticos

Cuando se realiza la fusión de protoplastos se obtienen células con el aporte de cromosomas de dos o más núcleos. Si los protoplastos involucrados en la fusión proceden de distintos tipos parentales se originan “**heterocarios**”, y si proceden del mismo tipo parental se originan “**homocariones**”. Cuando en el heterocarión ocurre la fusión de los núcleos (cariogamia), se forma una “**célula híbrida**”.

A partir de una célula híbrida, que contiene dos genomas completos, se puede regenerar una planta que, según cual haya sido el destino del material genético nuclear durante las divisiones celulares que siguen a la fusión, puede ser de tres tipos:

1. **Híbrido simétrico**, que tiene el genoma nuclear completo de cada tipo parental.
2. **Híbrido asimétrico**, que tiene el genoma nuclear completo de uno de los parentales y sólo una parte del genoma nuclear del otro parental.
3. **Cíbrido**, que contiene el genoma nuclear completo de uno de los parentales, reteniendo sólo material genético extranuclear del otro parental.

Es usual que en el proceso de regeneración de plantas híbridas ocurra una eliminación gradual de cromosomas de uno de los tipos parentales, produciéndose de este modo híbridos asimétricos o cíbridos. La práctica de la hibridación somática en plantas demostró que, en general, los híbridos asimétricos y cíbridos son más valiosos que los simétricos producidos entre plantas alejadas filogenéticamente. Por esta razón se han desarrollado métodos para

inducir la hibridación asimétrica o cibridación, alterando el genoma de uno de los protoplastos parentales. En este caso se dice que se transfiere parte del genoma de un protoplasto donante a uno receptor. Por lo tanto, teniendo en cuenta el material de partida empleado para la fusión, pueden producirse tres tipos de células híbridas:

1. **Células híbridas simétricas**, por fusión de dos protoplastos con sus genomas completos.
2. **Célula híbrida asimétrica**, por fusión de un protoplasto conteniendo su genoma completo con otro conteniendo su núcleo inviable o sólo una parte de su genoma nuclear. Los protoplastos donantes son irradiados con rayos X o Gamma, lo que provoca la fragmentación de los cromosomas. Una vez producida la fusión, dichos fragmentos tienden a eliminarse en las sucesivas mitosis, pero algunos de ellos pueden integrarse con el genoma del receptor produciendo un híbrido asimétrico. El tratamiento de irradiación parece no tener efectos deletéreos o mutagénicos sobre los genomas de organelas, probablemente debido a que cada célula posee varias copias de ellas. También puede producirse una célula híbrida asimétrica fusionando protoplastos receptores con microprotoplastos, conteniendo uno o pocos cromosomas. Los microprotoplastos se obtienen induciendo la formación de micronúcleos por tratamientos con agentes antimicrotúbulos.
3. **Cíbridos**, por fusión de un protoplasto conteniendo su genoma nuclear completo con un protoplasto enucleado o con su núcleo inviable. Los protoplastos enucleados o citoplastos pueden obtenerse centrifugando los mismos a alta velocidad en un gradiente de densidad isosmótico. Asimismo, el método de irradiación con rayos X o Gamma puede generar cíbridos en casos en que se produzca la eliminación total de los fragmentos cromosómicos. Los protoplastos que poseen su genoma nuclear completo (receptores), pueden ser tratados pre-

viamente con inhibidores metabólicos. En este caso sólo pueden sobrevivir, por complementación metabólica, los heterocariones conteniendo el núcleo del receptor y el citoplasma del donante enucleado.

La segregación de los plástidos y mitocondrias de los dos tipos parentales también constituye una fuente importante de variabilidad en la regeneración de plantas híbridas. Es frecuente que ocurran recombinaciones de los genomas mitocondriales de ambos tipos parentales, pero ello es poco común entre plástidos. Dado que las organelas segregan independientemente unas de otras, la regla es que al cabo de pocas divisiones mitóticas las células formadas contengan plástidos provenientes de uno u otro tipo parental. Así, una célula híbrida origina una colonia de células que exhiben diferentes combinaciones de genes citoplasmáticos, pero con una mayor frecuencia de células que poseen mitocondrias recombinantes y plástidos de uno u otro tipo parental. El destino que sufre el material genético nuclear y extranuclear durante las divisiones celulares determina que, a partir de una población de células híbridas similares, se puedan regenerar plantas con diferentes combinaciones de genes nucleares, plástídicos y mitocondriales.

La Figura 1 muestra un esquema de las etapas involucradas en la hibridación somática, las cuales son tratadas a continuación.

5 Aislamiento de protoplastos

El desarrollo de métodos enzimáticos de aislamiento a partir de 1960 brindó la posibilidad de obtener grandes cantidades de protoplastos vegetales. Ello tuvo gran influencia en diferentes áreas de la biología y la biotecnología de plantas, dada la utilidad de los protoplastos como sistema experimental para estudios fisiológicos, bioquímicos y moleculares, así como para su aplicación al mejoramiento genético.

Los protocolos de aislamiento emplean enzimas fúngicas con actividad celulasa y pectinasa, siendo necesario en algunos casos el agregado de hemicelulasas. Las celulasas y hemicelulasas degradan la pared celular, en

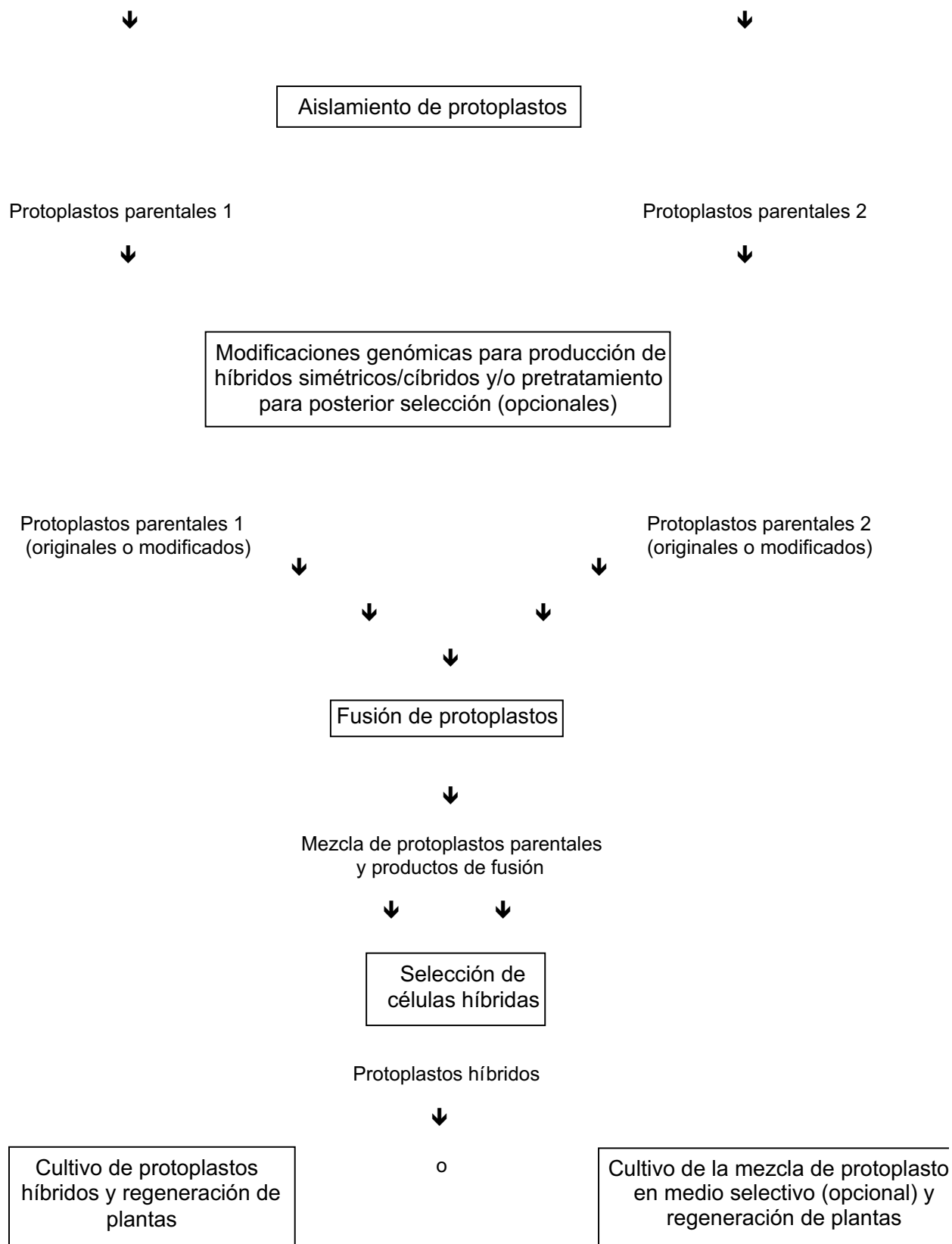


Figura 1: Materiales y procesos involucrados en la hibridación somática.

tanto que las pectinasas digieren la matriz de pectina que mantiene adheridas a las células. El uso de enzimas disponibles comercialmente posibilitó el aislamiento de protoplastos de prácticamente cualquier tejido vegetal, siempre que el mismo no esté lignificado. Se ha podido aislar protoplastos de una gran cantidad de especies vegetales y regenerar plantas a partir de los mismos, permitiendo el uso de este sistema para la propagación clonal y la modificación genética de plantas.

El número de protoplastos aislados, su viabilidad y la pureza de la suspensión obtenida dependen de varios factores, debiendo establecerse en forma empírica las condiciones óptimas para un sistema determinado. Las etapas del aislamiento y los factores a considerar en cada una de ellas se describen a continuación:

1. **Selección del material de partida.** Influye en el resultado del aislamiento así como en el proceso de regeneración posterior. Generalmente se emplean hojas y células en cultivo líquido o sólido. Cuando se emplean hojas, la edad y las condiciones de cultivo de la planta afectan el rendimiento. Se obtienen mejores resultados con hojas jóvenes totalmente expandidas que con hojas viejas (Fig. 2A). Para facilitar el contacto de las enzimas con las células, las hojas suelen cortarse en trozos pequeños, muy finos en el caso de las monocotiledoneas. Algunas veces se extrae la epidermis inferior antes de colocar la hoja en la solución enzimática, como sucede con las dicotiledoneas. Cuando se emplean células en suspensión, se obtienen mejores resultados si se encuentran en la fase exponencial de crecimiento.
2. **Tratamiento enzimático.** La concentración de la enzima y el tiempo de incubación requeridos para lograr la liberación de los protoplastos dependen del producto comercial utilizado. El pH generalmente se ajusta en un rango de 4,7 a 6, y la temperatura entre 25 y 30 °C. La duración del tratamiento enzimático y la relación volumen de solución/cantidad de tejido influyen en el rendimiento.

Durante el aislamiento se produce la lisis de algunas células, que liberan enzimas hidrolíticas y compuestos oxidantes que pueden dañar los protoplastos, por lo que se suelen agregar inhibidores de proteasas y antioxidantes tales como el Polivinilpirrolidona-10. El agregado de un estabilizador osmótico a la solución enzimática es esencial para evitar la ruptura de los protoplastos a medida que son liberados, siendo más estables si la solución es ligeramente hipertónica. Para ello se utilizan solutos osmóticamente activos, comúnmente manitol o sorbitol, en concentraciones que varían entre 0,3 a 0,8 M según el tipo de protoplasto. La solución enzimática es generalmente suplementada con sales, comúnmente CaCl_2 , que incrementan la estabilidad de la membrana (Fig. 2B).

3. **Limpieza y purificación de los protoplastos.** Una vez lograda la liberación de los protoplastos, se procede a la remoción de las enzimas y de los restos de tejido y de células rotas. La suspensión se pasa por un filtro de nylon o metáli-



Figura 2: Aislamiento de protoplastos de tabaco. **A.** Eliminación de las nervaduras centrales y seccionado de la hoja en trozos pequeños. **B.** Digestión enzimática de las paredes celulares. **C.** Centrifugación y obtención de protoplastos libres de restos de tejidos vegetales.

co con un diámetro de poro (30-100 μm) que permita el paso de los protoplastos y retenga los restos de tejido y grupos de células no digeridas. Posteriormente, se efectúan 3 ó 4 lavados centrifugando la suspensión por 5 minutos a baja velocidad (50-100 g). Finalmente, los protoplastos sedimentados se resuspenden en una solución salina que contenga un estabilizador osmótico. De este modo se eliminan las enzimas y restos celulares. Para lograr una mayor pureza de la suspensión es conveniente centrifugarla en un gradiente de densidad (Fig. 2C). Para el recuento de protoplastos se emplea un hemocitómetro. La viabilidad se determina generalmente empleando colorantes que son incorporados (rojo neutro, diacetato de fluoresceína) o excluidos (azul de Evan) por las células viables; también pueden evaluarse la actividad fotosintética (emisión de fluorescencia) y la respiratoria (consumo de O_2).

6 Métodos de fusión

6.1 Métodos químicos

Los primeros casos informados de fusión controlada y reproducible de protoplastos vegetales y de regeneración de híbridos somáticos se produjeron a principios de la década de 1970, empleando nitrato de sodio como agente fusógeno. La frecuencia de formación de heterocariones en tales casos era muy baja. Posteriormente, se lograron mejores resultados fusionando protoplastos de células del mesófilo de *Nicotiana* en un medio conteniendo alta concentración de Ca^{++} (50 mM) y pH elevado (10,5). Sin embargo, el fusógeno que alcanzó mayor aceptación es el polietilenglicol (PEG) debido a que, en comparación con los otros agentes químicos, produce mayor proporción de heterocariones y, para muchos tipos celulares, resulta menos tóxico. Además, el tratamiento con PEG genera una mayor proporción de heterocariones binucleados, con menor ocurrencia de fusiones entre más de dos protoplastos.

El procedimiento de fusión con PEG más ampliamente utilizado es esencialmente una

combinación del método original del PEG y el de Ca^{++} y pH elevados. Los protoplastos de dos tipos parentales se mezclan en una solución conteniendo 15 a 45 % de PEG (peso molecular de 1500 a 6000), durante 15 a 30 minutos. La temperatura de incubación óptima para inducir la fusión es de 35 a 37 °C pero, en la práctica, suele ajustarse a 24 °C. La densidad de protoplastos adecuada para la formación de heterocariones es de 4 a 5 % (volumen de protoplastos/volumen de suspensión). La remoción del PEG se lleva a cabo en forma gradual, siendo esto fundamental para asegurar una elevada frecuencia de heterocariones. Para ello, la suspensión se somete a sucesivos lavados con una solución alcalina (pH 9-11) de CaCl_2 10-50 mM, disminuyendo progresivamente la concentración de PEG con cada lavado.

En la fusión de los protoplastos ocurren, en forma sucesiva, los siguientes eventos: (1) las membranas plasmáticas de protoplastos adyacentes entran en íntimo contacto, (2) se producen alteraciones en sitios localizados de las mismas, formándose puentes citoplasmáticos entre protoplastos vecinos, y (3) las interconexiones citoplasmáticas se expanden, provocando la fusión. La carga negativa neta de la superficie de las membranas produce la repulsión entre ellas; el tratamiento con Ca^{++} y pH elevados neutraliza las cargas superficiales, favoreciendo el contacto entre protoplastos. El PEG actuaría como un puente molecular causando alteraciones en las membranas plasmáticas que promueven la adhesión y formación de puentes citoplasmáticos entre protoplastos vecinos, produciéndose finalmente la fusión.

6.2 Electrofusión

En 1973 se descubrió que pulsos de elevado potencial eléctrico en un rango muy estrecho de intensidad y duración conducen a un incremento reversible, experimentalmente controlable, de la permeabilidad de la membrana celular. Este efecto se denominó ruptura eléctrica reversible para enfatizar la habilidad de la membrana para reparar tales perturbaciones. El voltaje mínimo para un protoplasto (umbral) con el cual se produce la formación de poros disminuye a mayor duración del pulso eléctrico.

Este fenómeno de ruptura reversible también es aplicado en la técnica de electroporación, con la que se pueden introducir en las células construcciones de ADN y otras moléculas de alto peso molecular.

El método de electrofusión en esencia involucra dos pasos:

Los protoplastos, colocados en un medio de baja conductividad entre dos electrodos se ponen en contacto al aplicar corriente alterna de alta frecuencia (0,5 a 1,5 MHz) en un campo eléctrico no uniforme. Las cargas se separan dentro de las células formando un dipolo y generando, por lo tanto, un potencial de membrana. La fuerza del campo a ambos lados de una célula es diferente (campo no uniforme), dando origen a una fuerza neta que la empuja a una región de mayor intensidad de campo (hacia uno de los electrodos). Este proceso se denomina **dielectroforesis**. La polaridad de la célula incrementa el campo local no uniforme, atrayendo a las células vecinas. Luego, los protoplastos se aproximan unos a otros y forman cadenas paralelas a las líneas de campo aplicadas (Fig. 3A).

La fuerza ejercida sobre la célula bajo condiciones dielectroforéticas depende (1) de la intensidad de campo eléctrico, (2) del gradiente del campo, (3) del volumen del protoplasto, y (4) de la diferencia entre las constantes dieléctricas de la célula y su ambiente (así como la correspondiente diferencia entre sus conductividades).

El segundo paso consiste en la aplicación de uno o más pulsos cortos de corriente directa de 15 a 100 μ seg. con una intensidad de campo elevada (1 a 3 Kv/cm), suficiente para causar la ruptura reversible de la membrana. Para que esto ocurra es necesario que el voltaje crítico de membrana sea alcanzado en cuestión de nanosegundos a microsegundos. Ocurre entonces la **fusión** de las dos células cuyas membranas están en estrecho contacto (1 a 2 nanómetros de distancia). El proceso de resellado es principalmente atribuido a las moléculas lipídicas debido a que su coeficiente de difusión es dos órdenes de magnitud mayor que el de las proteínas. Durante este proceso pue-

den formarse puentes lipídicos entre las membranas de las dos células. En otras palabras, las membranas no se vuelven a sellar separadamente en la zona de contacto. Los puentes formados de esta manera, con continuidad citoplasmática entre las dos células, conducen a un radio de curvatura muy pequeño y a altas tensiones superficiales. Como consecuencia se forma una nueva célula esférica, ya que el proceso es favorecido energéticamente (Fig. 3B y C). La ruptura es reversible si el número y tamaño de los poros es pequeño en relación al total de la superficie de la membrana. Fuerzas de campo supracríticas, así como largos períodos de exposición, rompen áreas mayores de membrana y pueden producir la destrucción total de la célula.

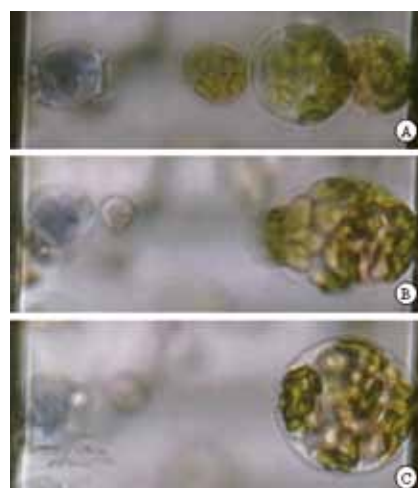


Figura 3: Electrofusión de protoplastos de mesófilo de pasto llorón. **A.** Dielectroforesis de células. Las diferencias en intensidad de campo eléctrico hacen que las células se muevan hacia la zona cercana al electrodo. **B.** Aplicación de pulsos cortos de corriente directa, que inducen la formación de poros en la membrana, generando puentes entre las membranas de las células adyacentes. **C.** Los puentes con continuidad citoplasmática poseen un radio de curvatura muy pequeño. Las altas tensiones superficiales generadas en ese sector conducen a la formación de una nueva célula esférica.

- La frecuencia de fusión depende de varios factores:
- El genotipo.
- La procedencia de los protoplastos dentro del mismo genotipo. Diferentes poblaciones de protoplastos exhiben frecuencias de fusión diferentes, aún cuando provengan del mismo genotipo. En general, los protoplastos obtenidos a partir de hojas se fusionan más fácilmente que los provenientes de raíz o de cultivos celulares.
- El tamaño de los protoplastos. Los más grandes se fusionan más fácilmente.
- La densidad de los protoplastos.
- El número, la duración y la fuerza de los pulsos de corriente directa. La duración del pulso eléctrico es de 15 a 50 μ seg. El tiempo requerido para la fusión que sigue a la aplicación de un pulso varía desde pocos segundos a varios minutos. Esto probablemente esté relacionado a la diferencia de fluidez de la membrana en los distintos tipos celulares y a las propiedades del citoesqueleto dentro de la célula.
- El medio de fusión. Un factor limitante en la agregación dielectroforética de las células es la conductividad eléctrica del medio; si ésta es muy alta, hay mucho flujo de corriente en la solución y se producen calentamientos y turbulencias que impiden la formación de cadenas.
- El potencial osmótico del medio de fusión. La inclusión de iones en el medio puede incrementar el porcentaje de fusión. Sin embargo, existe la limitación de que la dielectroforesis debe realizarse en un medio de baja conductividad; el medio de fusión usualmente consiste en manitol (cuya concentración se ajusta según los protoplastos empleados) y CaCl_2 1 mM. Valores bajos de presión osmótica en el medio de suspensión de los protoplastos puede favorecer el proceso de fusión.
- La longitud de las cadenas de protoplastos formadas durante la dielectroforesis, que además depende de factores como la densidad de protoplastos, fuerza del

campo eléctrico y tiempo durante el cual es aplicado. Cadenas más largas darán mayor frecuencia de fusión que las cadenas cortas. Pulsos de corriente más largos y de mayor voltaje producen un aumento de los eventos de fusión múltiple; obviamente, pulsos muy largos y voltajes muy elevados pueden matar a los protoplastos.

- La composición y propiedades de la membrana plasmática pueden ser afectadas por la actividad metabólica de los protoplastos y por el tipo de enzimas empleadas en el proceso de aislamiento, influyendo en consecuencia en el proceso de fusión.

Las condiciones experimentales deben ajustarse de modo de obtener la mayor frecuencia de fusión posible (número de protoplastos fusionados sobre el total de protoplastos), intentando maximizar la proporción de heterocariones (productos de la fusión de protoplastos diferentes) formados por sobre la de homocariones (productos de la fusión de protoplastos del mismo tipo parental), y minimizando la ocurrencia de eventos de fusión múltiple (fusión de más de dos protoplastos). La proporción de cada uno de los dos tipos de protoplastos en la suspensión puede fijarse a fin de incrementar la formación de heterocariones por sobre la de homocariones. El tipo de protoplasto con mayor tendencia a fusionar se mezcla con el de menor tendencia a fusionar en una relación de 1:5 a 1:10. Así, durante la formación de cadenas, los protoplastos más fusionables estarán mayoritariamente en contacto con los menos fusionables, y éstos a su vez estarán ligados entre ellos mismos. Seleccionando las condiciones -duración y voltaje de los pulsos- que promuevan sólo la fusión de los protoplastos más fusionables, los productos serán mayormente heterocariones.

Sin embargo, aún cuando las condiciones de fusión puedan fijarse de modo de incrementar la frecuencia de fusión y la proporción de heterocariones formados, la fusión de protoplastos a gran escala (macrofusión), tanto por métodos químicos como eléctricos, resultará en una

mezcla de protoplastos parentales, homocariaciones y heterocariaciones. Esto conlleva la necesidad de emplear métodos de selección de los híbridos somáticos obtenidos. Una técnica alternativa que ofrece la ventaja de no requerir una posterior selección de heterocariaciones, aunque demanda mayor manipulación, es la microfusión o electrofusión de pares de protoplastos. Esta técnica se basa en los mismos principios que la electrofusión a gran escala pero está diseñada para inducir la fusión en pares seleccionados de protoplastos. Este sistema emplea microelectrodos de platino fijados a un soporte montado debajo del condensador de un microscopio invertido. Los pares de protoplastos seleccionados se colocan en microgotas de medio de fusión sobre un soporte, recubiertas por aceite mineral. En cada evento de fusión, los microelectrodos se posicionan a cada lado de una microgota conteniendo un par de protoplastos, y se aplican los pulsos eléctricos. Después de la fusión, los heterocariaciones resultantes son transferidos a gotas con medio de cultivo para la posterior regeneración de plantas híbridas. La tasa de fusión es de aproximadamente 30 pares de protoplastos fusionados y transferidos a medio de cultivo por hora, pudiendo alcanzarse frecuencias de fusión cercanas al 50 %.

Ventajas de la electrofusión:

1. El proceso entero puede ser seguido bajo microscopio por lo que los híbridos pueden ser fácilmente identificados y transferidos a un medio nutritivo o selectivo.
2. Puede preseleccionarse el número de células a ser fusionadas. Las formaciones de dos células son favorecidas por bajas densidades en la acanaladura entre los electrodos. Para obtener productos de multifusión deben emplearse elevadas densidades.
3. El proceso de fusión es sincrónico, ya que el pulso provoca la fusión de todas las células expuestas al campo.
4. Se obtienen elevadas plasmogamia (80 - 100 %) y cariogamia.
5. La viabilidad de las células fusionadas es muy buena.
6. Este método ofrece ventajas sobre otros

como el del PEG, que: - requiere condiciones no fisiológicas, - las frecuencias de formación heterocariaciones binucleadas son bajas y variables, - resultan tóxicos para diversos tipos celulares, - el fusógeno debe ser removido antes del cultivo de los protoplastos y - bajo rendimiento de células fusionadas.

7 Selección de heterocariaciones

La fusión de protoplastos a gran escala produce una mezcla de tipos parentales y productos de fusión. Si no se efectúa una previa selección de las células híbridas, la regeneración de plantas y la posterior identificación de los híbridos demandará mucho trabajo y recursos. Dicha selección es particularmente necesaria cuando se emplean métodos químicos, que producen una baja proporción (<10%) de células híbridas. Por el contrario, los métodos eléctricos no requieren necesariamente del posterior proceso de selección dado que normalmente producen frecuencias de fusión muy elevadas o porque, en el caso de la microfusión, no se generan mezclas heterogéneas de protoplastos debido a que se fusionan dos células por vez. Cualquiera sea el caso, la condición de híbrido debe verificarse en la planta regenerada mediante diferentes análisis que se explican más adelante.

La selección de células híbridas puede llevarse a cabo empleando los siguientes métodos:

- **Selección en base a caracteres morfofisiológicos.** En ciertos casos es posible diferenciar los callos híbridos de los parentales. Por ejemplo, en algunos cruzamientos, los callos híbridos poseen un color intermedio al de los parentales. Cuando se produce un cruzamiento entre un parental con capacidad para regenerar planta con uno recalcitrante, los híbridos somáticos normalmente regeneran plantas, ya que este carácter se comporta como dominante. Si los protoplastos del genotipo respondedor son tratados con inhibidores metabólicos irreversibles (iodoacetamida, dietilpirocarbamato, etc.) no sobrevivirán, y solamente podrán regenerarse los híbridos.

- **Selección por complementación.** La selección se produce porque el medio de cultivo resulta restrictivo para el crecimiento de los parentales pero no para el de los híbridos. La complementación puede lograrse por las siguientes vías:

a) Empleando dos parentales con defectos metabólicos o genéticos no alélicos. Si dichos caracteres son recesivos, la fusión produce una célula híbrida en la que los defectos se anulan por complementación. Por ejemplo, la fusión de dos variedades albinas no alélicas (nucleares) de tabaco, permitió obtener plantas verdes.

AAbb (albina) x aaBB (albina)



AaaaBBbb (verde)

Asimismo, a partir de dos líneas mutantes no alélicas de tabaco deficientes en nitrato reductasa, se obtuvieron colonias capaces de crecer en un medio conteniendo nitrato como única fuente de nitrógeno.

b) Fusionando parentales que expresan caracteres dominantes tales como resistencia a antibióticos o herbicidas. Para ello se emplea una línea resistente a cierta droga, y otra resistente a una segunda droga, efectuándose la selección de las células híbridas en un medio conteniendo ambas drogas a concentraciones que resultan letales para las líneas parentales.

c) Una línea que presente una mutación autotrófica (por ejemplo: albinismo, deficiencia a nitrato reductasa) y un carácter dominante (por ejemplo resistencia a antibióticos o herbicidas) es de gran utilidad para la selección. Los híbridos producidos por el cruzamiento de estos parentales con cualquier genotipo silvestre pueden ser seleccionados en medio mínimo suplementado con el antibiótico o herbicida, que no permite el crecimiento de los parentales.

- **Selección por aislamiento de los heterocariones o células híbridas.** Es el sistema más confiable y de más amplio espectro de aplicación. El aislamiento puede realizarse de dos maneras:

a) Selección mecánica directa utilizando téc-

nicas de micromanipulación con micropipeta. Puede realizarse cuando los protoplastos parentales presentan rasgos que los distinguen al microscopio, permitiendo reconocer las células híbridas. Por ejemplo al fusionar protoplastos del mesófilo (verdes) con protoplastos de suspensiones celulares (incolores). También pueden colorearse las células de ambos progenitores con diferentes colorantes vitales, como el rojo neutro y azul brillante de cresilo.

b) Citometría de flujo. Los protoplastos parentales se marcan con diferentes colorantes fluorescentes, por ejemplo, rodamina (rojo) y fluoresceína (verde amarillento). El aislamiento de los heterocariones marcados con ambos colorantes se realiza utilizando un citómetro de flujo (FACS, fluorescence-activated cell sorter), que es preciso y muy rápido. El equipo posee fotocélulas que detectan fluorescencia, pudiendo separar los protoplastos marcados con un solo fluorocromo (parentales) de aquellos doblemente marcados (híbridos).

8 Cultivo de protoplastos

La habilidad para regenerar plantas a partir de células y tejidos en cultivo es un componente esencial en la biotecnología para la manipulación genética y el mejoramiento vegetal. Esto resulta relativamente fácil para las dicotiledóneas herbáceas, pero ha sido bastante difícil para las monocotiledóneas, particularmente las gramíneas.

Los protoplastos se cultivan en cajas de Petri en medio líquido o semisólido, rico en compuestos orgánicos e inorgánicos, suplementado con reguladores del crecimiento, y en presencia de un estabilizador osmótico. Suelen ser cultivados en cajas de Petri con medio agarificado, donde se mezcla la solución de protoplastos con un medio de cultivo líquido a 40°C conteniendo 1,2% de agar, preferentemente agarosa (Fig. 4A). Los protoplastos quedan, así, atrapados en el medio semisólido y, luego de varios días, se ven las colonias formadas (Fig. 4B). Sin embargo, el medio líquido da mejores resultados por varias razones: (a) los protoplastos de varias especies solo pueden dividirse en medio líquido, (b) la presión osmótica del medio puede ser fácilmente reducida a los pocos días en cultivo, (c) la densidad celular puede

ser modificada agregando medio de cultivo o las células con especial interés pueden ser aisladas y cultivadas a alta densidad, (d) la degradación de algunos componentes del medio por la población de protoplastos puede producir algunas sustancias citotóxicas, cuya concentración alrededor de las células será menor en el medio líquido. Una técnica muy eficiente que combina medio sólido y líquido es la de cultivo en perlas de agarosa, donde los bloquecitos con los protoplastos inmovilizados en agarosa son cortados en cuatro mitades y colocados en medio líquido, donde se cultivan en continua agitación.

Los protoplastos regeneran la pared celular luego de uno a cuatro días en cultivo. La presencia de pared es esencial para lograr una división regular. Luego de dos a tres semanas, producto de mitosis sucesivas, se forman microcolonias derivadas cada una de una célula, que dos semanas después se pueden ver a simple vista. Estos callos son transferidos a un medio de cultivo y a condiciones apropiadas para regenerar plantas (Fig. 4).

Los principales factores a tener en cuenta para el cultivo de protoplastos son:

- Los requerimientos nutricionales: se han utilizado en muchos casos los mismos medios de cultivo que se utilizan en el cultivo de células y tejidos, pero en general son enriquecidos con vitaminas, azúcares, aminoácidos, reguladores de crecimiento y también con aditivos inespecíficos como leche de coco, hidrolizado de caseína, extracto de levadura, etc.
- El potencial osmótico del medio de cultivo: los protoplastos requieren de protección osmótica antes de regenerar la pared celular. Normalmente se ajusta con el agregado al medio de cultivo de manitol o sorbitol.
- La densidad celular: la densidad inicial de protoplastos varía de 10^4 – 10^5 protoplastos/ml de medio de cultivo. Los cultivos con altas densidades producirán, a partir de cada protoplasto, colonias que deberán separarse tempranamente para evitar quimeras. Si deseamos colonias bien separadas para asegurar que provengan de un solo protoplasto, la densidad inicial debe ser baja, de 100 – 500 protoplastos/ml. Hay protoplastos de varias especies y tipos que no logran dividirse a bajas

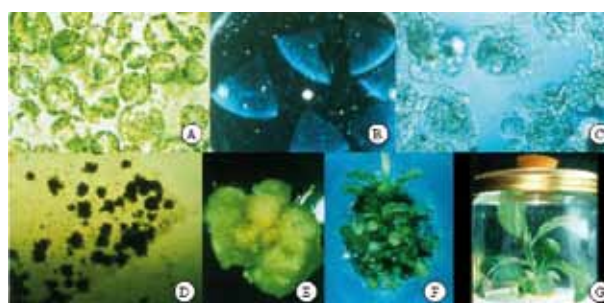


Figura 4: Cultivo de protoplastos de tabaco. **A.** Protoplastos de mesófilo. **B y D.** Cultivo de los protoplastos en perlas de agarosa suspendidas en medio líquido. **C.** Detalle de la formación de callo a partir de protoplastos. **E.** Callo en medio de regeneración. **F.** Desarrollo de plantas a partir de callos de protoplastos. **G.** Planta regenerada.

densidades de cultivo. Para estos casos se desarrolló la técnica de cultivo con células nodrizas o alimentadoras. Esta técnica consiste en exponer una suspensión de 10^6 protoplastos/ml a rayos X a dosis que inhiben la división celular pero que quedan metabólicamente activas. Estas células se plaquean en un medio agarificado, y luego se colocan por sobre éstas los protoplastos sin irradiar, de los cuales se formarán las colonias. También suele utilizarse papel de filtro para separarlas de las células nodrizas. Otra técnica utilizada es el cultivo en microgota, donde se puede cultivar hasta un solo protoplasto. Cada microgota contiene entre 0,25 - 25 μ l de medio de cultivo, logrando densidades de $2 - 4 \times 10^3$ protoplastos/ml. Con ayuda de un micromanipulador se coloca la célula y se la cubre con aceite mineral para evitar la deshidratación del medio.

- Los tratamientos físicos: tratamientos de choque eléctrico y térmico estimulan la división de los protoplastos..
- Las condiciones de cultivo: en general los protoplastos son sensibles a la luz, por lo cual durante el cultivo se los mantiene en oscuridad o bajo luz muy tenue.
- El origen de los protoplastos: el estado fisiológico del tejido del cual provienen y la calidad de los protoplastos son muy importantes para obtener una elevada eficiencia en la respuesta al cultivo.

9 Identificación de las plantas híbridas

La condición de híbrido debe verificarse en la planta regenerada aún cuando se haya efectuado algún tipo de selección para el cultivo de las células híbridas. A tal fin es conveniente efectuar diferentes evaluaciones, lo que permite una mejor caracterización del híbrido. Comúnmente se llevan a cabo los siguientes estudios:

1. **Morfológicos.** Los híbridos somáticos pueden presentar rasgos morfológicos característicos. Los mismos pueden ser intermedios a los de los parentales, la suma de ellos, u otros completamente nuevos.
2. **Citológicos.** El análisis del complemen-

to cromosómico permite revelar si el híbrido posee el total de cromosomas de cada parental, si se han fusionado más de dos protoplastos, el grado de aneuploidía y posibles translocaciones intergenómicas. Mediante hibridación *in situ* empleando sondas de ADN repetitivo específico de especie puede evaluarse con más profundidad la contribución de los genomas parentales y reestructuraciones cromosómicas en el híbrido.

3. **Isoenzimáticos.** El patrón de bandas isoenzimáticas del híbrido debe mostrar bandas de ambos parentales, pudiendo haber otras bandas que resultan de nuevas combinaciones de las subunidades enzimáticas. Habitualmente se analizan los patrones de glucosa-6-fosfato deshidrogenasas, fosfoglucoisomerasas, glutamato oxalacetato transaminasas, esterases, peroxidases y fosfatases ácidas. Las isoenzimas son extremadamente variables entre tejidos vegetales, por lo que para el análisis se deben emplear los mismos tejidos u órganos, y en el mismo estadio fenológico.
4. **A nivel de ADN.** La demostración de la presencia de ADN de ambos parentales es la prueba más directa de la hibridación. El análisis de ADN es independiente del tejido empleado y de la edad de la planta. Puede llevarse a cabo por RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción), RAPD (polimorfismos en el ADN amplificado al azar) o Southern blot, empleando sondas de ADN repetitivo específico de especie o de genes de ARN ribosomal.

10 Logros y tendencias de la hibridación somática

La hibridación somática ha permitido producir híbridos que no se habían podido obtener por cruzamientos sexuales, incrementando así el flujo de genes en los cultivos. La tabla 1 muestra algunos ejemplos de híbridos somáticos que presentan algunas ventajas agronómicas.

En sus inicios, algunos esperaban que la hibridación somática permitiera producir nuevas

Tabla 1: Ejemplos de híbridos somáticos que exhiben algún carácter de interés agronómico

Híbrido	Carácter
Híbridos simétricos	
<i>Solanum tuberosum</i> x <i>S. brevidens</i>	Resistencia al virus del enrollamiento de la hoja de papa (PLRV), al hongo <i>Phytophthora infestans</i> y a la bacteria <i>Erwinia cartovora</i> .
<i>S. tuberosum</i> x <i>S. circaeifolium</i>	Resistencia a <i>P. infestans</i> y al nemátodo <i>Globodera pallida</i> .
<i>S. tuberosum</i> x <i>S. phureja</i>	Mayor productividad de tubérculo.
<i>S. melongena</i> x <i>S. integrifolium</i> / <i>S. saintwongseis</i>	Resistencia a la bacteria <i>Pseudomonas solanacearum</i>
Híbridos asimétricos	
<i>Brassica oleracea</i> x <i>B. campestris</i>	Resistencia al hongo <i>Phoma lingam</i>
<i>B. napus</i> x <i>B. carinata</i> / <i>B. juncea</i>	Resistencia a <i>P. lingam</i>
<i>Nicotiana tabacum</i> x <i>N. Repanda</i> / <i>N. glutinosa</i>	Hipersensibilidad al virus del mosaico del tabaco (TMV).
Cíbridos	
<i>B.campestris</i> (silvestre) x <i>B.napus</i> / <i>B. campestris</i> (cultivar)	Resistencia al herbicida atrazina y esterilidad masculina citoplasmática (CMS).

especies que expresaran las características deseadas de ambos progenitores. Por ejemplo, por hibridación entre tomate y papa, se buscó producir plantas que desarrollaran tomates en la parte aérea y tubérculos en la raíz (pomato). La experiencia mostró que difícilmente puedan lograrse estos híbridos espectaculares, debiéndose más bien dirigir la técnica hacia la introgresión de pocos genes silvestres en las especies cultivadas mediante hibridación asimétrica o cibridación, manteniendo las características generales del cultivo.

Uno de los factores que dificulta la obtención de híbridos simétricos es la progresiva pérdida de cromosomas de uno de los parentales que normalmente ocurre durante la regeneración. Si bien la fusión de protoplastos permite sortear las barreras precigóticas, siguen existiendo barreras genómicas que resultan en la eliminación espontánea de cromosomas durante las divisiones celulares. El mecanismo que determina la eliminación de cromosomas no está bien comprendido, pero generalmente se retienen los cromosomas del parental que tiene el ciclo celular más corto. Uno de los factores que puede producir incompatibilidad ge-

nómica es el estado de diferenciación de los tipos celulares involucrados en la fusión. Por ejemplo, cuando se fusionan células en fase de crecimiento activo con células del mesófilo, que no se dividen, generalmente se pierden los cromosomas de estas últimas.

Los híbridos somáticos o sexuales entre especies silvestres y cultivadas contienen muchas características no deseadas de la primera, además de aquéllas deseadas. El retrocruzamiento con la especie cultivada es requerido para remover los genes no deseados del parental silvestre, pero ello no siempre es posible debido a que los híbridos suelen ser estériles. La hibridación asimétrica y la cibridación tienen la ventaja de incorporar sólo uno o pocos caracteres provenientes del parental silvestre en la especie cultivada, y producir plantas con mayor fertilidad..

Algunos caracteres deseables están codificados por el genoma extranuclear, tales como la androesterilidad citoplasmática y ciertos tipos de resistencia a enfermedades y a herbicidas. Para estos casos es de particular utilidad la cibridación dado que es un método simple para transferir estos genes.

11 Algunos ejemplos

Se han obtenido híbridos intergenéricos de *Panicum maximum* (+) *Pennisetum americanum* (Ozias-Atkins *et al.*, 1986), *Saccharum officinalis* (+) *Pennisetum americanum*, *Oriza sativa* (+) *Echinochloa oryzicola*, *Triticum monoccum* (+) *Pennisetum americanum*, *Festuca arundinacea* (+) *Lolium multiflorum*. El primer caso de regeneración de plantas maduras de híbridos intergenéricos (simétricos y asimétricos) en gramíneas fue el *Festulolium*.

A pesar de los esfuerzos realizados, la aplicación de esta estrategia no ha conducido a la obtención de nuevos híbridos de especies importantes, fundamentalmente debido a problemas de baja o nula fertilidad. Los métodos actuales de transferencia de genes aislados han desplazado el interés en la hibridación somática. Sin embargo son una excelente herramienta para estudiar las interacciones núcleo-citoplasmáticas entre genomas.

12 Lecturas recomendadas

- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. 1996. Protoplast isolation and culture. Somatic hybridization and cybridization. En: Plant Tissue Culture: Theory and Practice, Capítulos 12 y 13. S.S. Bhojwani y M.K. Razdan (eds.) Elsevier, Amsterdam. pp.337-406.
- Lindsey y Jones, 1992. Biología celular de la ingeniería genética. En: Biotecnología vegetal agrícola, Capítulo 6. Editorial ACRIBIA, S.A., Zaragoza. Pp.105-142.
- Matsumoto, K. 2001. Híbridos somáticos. Biotecnología Ciencia & Desarrollo, 20, mayo / junio: 26-28.
- Zimmermann, U. 1983. Electrofusion of cells: principles and industrial potential. Trends in Biotechnology, 1,5:149-156.

II CAPÍTULO 3

Epigenética y evolución

R.W. Masueli y C.F. Marfil

1. Introducción

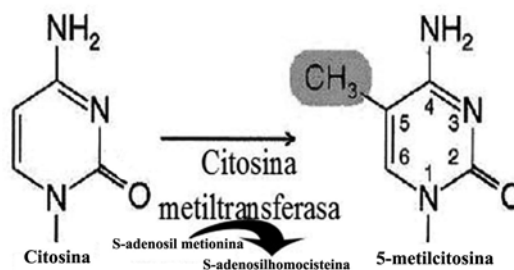
Uno de los principios básicos de la biología es que la variabilidad genética es un pilar fundamental de la evolución. Sin variabilidad la selección natural no podría actuar y la uniformidad genética conduciría a la población o especie a un callejón sin salida en el proceso evolutivo. Este concepto propuesto por Charles Darwin en 1859 fue corroborado por el redescubrimiento de las leyes de Mendel y por trabajos de genetistas un siglo después. Sin embargo, la noción de que la variabilidad genética se encuentra asentada únicamente en la secuencia de nucleótidos ha sido puesta en tela de juicio en los últimos años. Trabajos recientes especialmente en el área de la Genética Molecular muestran que la variabilidad heredable también se explica por cambios que no necesariamente implican alteraciones en las secuencias de bases del ADN. Variaciones heredables en los patrones de expresión génica se pueden producir debido a “mecanismos epigenéticos” con total ausencia de variabilidad genética. El término “epigenética” se refiere a cambios heredables en el fenotipo, y por lo tanto en la regulación génica, que no son causados por alteraciones en la secuencia del ADN. Se han descrito tres mecanismos de codificación de la información que no están basados en la secuencia de ADN. Estos son: a) Metilación del ADN, fundamentalmente de citosinas; b) Modificaciones post-traduccionales de histonas (acetilación, fosforilación, metilación, etc) y c) Mecanismos basados en el ARN. A su vez estos tres mecanismos actúan en forma conjunta para mantener el grado de compactación de la cromatina. En esta sección nos referiremos específicamente a como la hibridación interespecífica y la poliploidía inducen cambios en los patrones de metilación y dan lugar a nuevas fuentes de variabilidad.

2. La metilación del ADN

Uno de los mecanismos epigenéticos más estudiados en eucariotas es la incorporación al

ADN de un grupo metilo en la posición 5' del anillo de citosina (^{5m}C) (Figura 1a). En plantas la ^{5m}C se distribuye en sitios donde se encuentran dinucleótidos del tipo CG o trinucleótidos CNG (donde N es cualquiera de los cuatro nucleótidos). A su vez la metilación del ADN puede dividirse en metilación de sitios simétricos y asimétricos. En el primer caso la metilación se produce en sitios CG y CNG donde las citosinas metilables se encuentran de a pares ubicadas en hebras opuestas, mientras que la metilación en sitios asimétricos se produce en citosina ubicadas en un contexto diferente en el ADN. La metilación simétrica es la más común y permite que los patrones de metilación se mantengan a través de la enzima ADN metiltransferasa que cataliza la transferencia de un grupo metilo de la S-adenosil metionina a las citosinas del ADN. En *Arabidopsis thaliana* los genes *CMT3* y *MET1* codifican para las enzimas Cromometiltransferasa 3 y Metiltransferasa 1, respectivamente, la primera metila los grupos CNG y la segunda los sitios CG. Después de la replicación del ADN sólo la hebra

1.A.



1.B.

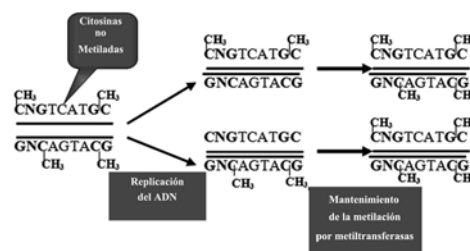


Figura 1. A. Agregado del grupo metilo al carbono 5' de la citosina. **B.** Mantenimiento de los patrones de metilación del ADN por las enzimas ADN metiltransferasas durante la replicación del ADN.

molde mantiene el patrón de metilación original. Las enzimas ADN metiltransferasas se encargan de metilar la hebra nueva de acuerdo al patrón de metilación de la hebra molde en los sitios CG y CNG (Figura 1b). Este mecanismo permite que se hereden los patrones de metilación tanto entre células (mitóticamente) como entre generaciones (meióticamente). La proteína DDM1, la cual es un factor remodelador de la cromatina, también participa en el mantenimiento de patrones de metilación específicos a lo largo del genoma. Los mutantes de *Arabidopsis ddm1* (*Deficient in DNA Methylation*) tienen una reducción del 70% en los niveles de ^{5m}C, lo cual provoca una amplia variedad de defectos en el desarrollo de las plantas al inducir cambios heredables en otros loci. Si bien los patrones de metilación son heredables, se ha demostrado que no son estáticos y que el estado de desarrollo de la planta y condiciones ambientales alteran estos patrones. Por otro lado, la metilación está asociada a cambios en la expresión génica. En general el incremento en la metilación (hipermetilación) de un locus no solo produce la reducción en la expresión o el total silenciamiento del mismo, sino que también reprime transcripcionalmente e inactiva transposones capaces de movilizarse a través del genoma. Se demostró que anulando (*knock out*) los genes *CMT3* y *MET1* se desmetila el genoma activándose elementos transponibles y genes que se encontraban silenciados. Estos estudios mostraron que la pérdida de metilación produce aberraciones tales como cambios morfológicos en hojas y flores, como así también en el tiempo de floración.

3. Métodos para analizar la variación epigenética

Los métodos comúnmente utilizados para analizar la variabilidad genética, tales como AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*), RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) o SSR (*Microsatélites*) no son adecuados para medir la variabilidad epigenética. Una modificación de la técnica de AFLP, llamada MSAP (*Methylation Sensitive Amplified Polymorphism*), en la que se reemplaza la enzima de corte frecuente *MseI* por los

isoesquizómeros *HpaII* y *MspI*, sensibles a la metilación, que permiten detectar la metilación externa o interna de las citosinas en el sitio de reconocimiento 5'-CCGG-3' de las enzimas (Figura 2). Otro método desarrollado que permite analizar la metilación es la secuenciación previo tratamiento del ADN con bisulfito, que convierte las citosinas no metiladas en uracilo quedando las citosinas metiladas intactas. Luego la secuencia tratada se amplifica por PCR reemplazando los uracilos por timinas para su posterior secuenciación. A través de estos métodos es posible analizar el estado de metilación de secuencias aleatorias (MSAP) o secuencias específicas (secuenciación por bisulfito) y determinar la variación epigenética en poblaciones naturales.

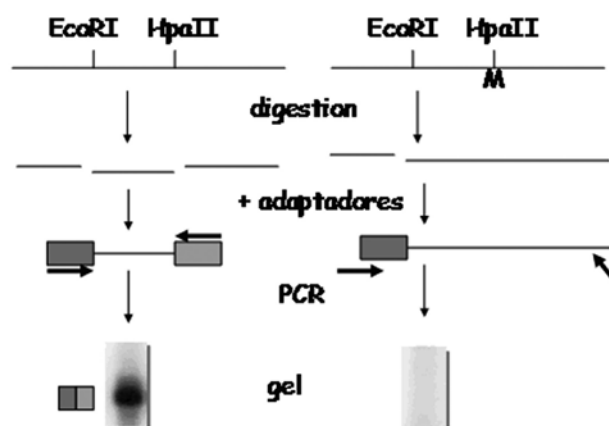


Figura 2. Esquema que representa el análisis de metilación del ADN a través de la técnica de MSAP (*Methylation Sensitive Amplified Polymorphism*). El ADN se corta con las enzimas de restricción *EcoRI* y *HpaII*/*MspI*, luego se ligan adaptadores específicos para las enzimas y se amplifican los fragmentos con primers que reconocen la secuencia de los adaptadores. Si las citosinas del sitio de reconocimiento de *HpaII* (CCGG) se encuentran metiladas, esquema de la derecha, la enzima no corta y por lo tanto no se amplifica el fragmento generando polimorfismo.

4. Epigenética y variación natural

El grado de metilación de genes puede variar entre plantas produciendo cambios en la expresión y nuevos fenotipos que son heredables. A las secuencias génicas que difieren en

el grado de metilación se les llama “alelos epigenéticos o epialelos”. Se han descrito varios ejemplos de epialelos que ocurren naturalmente. Un ejemplo clásico es el gen *CYCLOIDEA* en *Linaria vulgaris*, que codifica para un activador de la transcripción cuyo efecto es la presencia de un fenotipo floral de simetría radial y otro de simetría bilateral. A través del análisis molecular de este gen se demostró que en la naturaleza existían dos epialelos, uno más metilado que produce la simetría radial y otro con menor metilación asociado a la simetría bilateral. Mediciones de los patrones de metilación entre introducciones de *Arabidopsis thaliana* muestran variaciones en los patrones de metilación de más del 34% siendo menores al 1% las variaciones en metilación entre plantas dentro de una misma introducción. En una población natural de la especie silvestre de papa *Solanum ruiz-lealli* se encontró que plantas que tenían una variación genética menor al 1% (medida por AFLP) presentaban variaciones en los patrones de metilación (medida por MSAP) superiores al 18%. Estas variaciones no son producidas por polimorfismo de nucleótidos sino por variaciones en los patrones de metilación. Resultados similares se obtuvieron analizando introducciones de algodón donde la diversidad detectada por MSAP fue superior a la obtenida analizando patrones de RFLP.

5. Cambios epigenéticos producidos por hibridación interespecífica y poliploidía

La hibridación interespecífica y la poliploidía son dos mecanismos profundamente relacionados que han jugado roles muy importantes en la evolución vegetal. Una de sus características más sobresalientes es la capacidad de generar una amplia variación fenotípica de gran importancia en la microevolución adaptativa. La poliploidización implica la generación de un organismo con un número aumentado de complementos genómicos completos. Los juegos cromosómicos adicionales pueden provenir de la misma especie (autopoliploidía) o de una especie divergente (alopoliploidía), implicando en este último caso un proceso de hibridación interespecífica. A su vez, la hibridación interespecífica se define como la formación de un nuevo organismo por cruzamiento entre dos

especies diferentes aunque relacionadas. Tanto en el caso de la aloploidía como en la hibridación interespecífica dos genomas divergentes se unen en un núcleo híbrido, desencadenando una serie de cambios genéticos y epigenéticos que dan lugar a una gran variabilidad fenotípica (Figura 3). En híbridos aloploidios sintéticos de *Arabidopsis* se demostró que se producen inestabilidades fenotípicas asociadas con cambios en la metilación y en la expresión génica. Por otro lado en generaciones tempranas de híbridos aloploidios de trigo y *Brassica* se reportaron cambios genéticos estructurales tales como eliminacio-

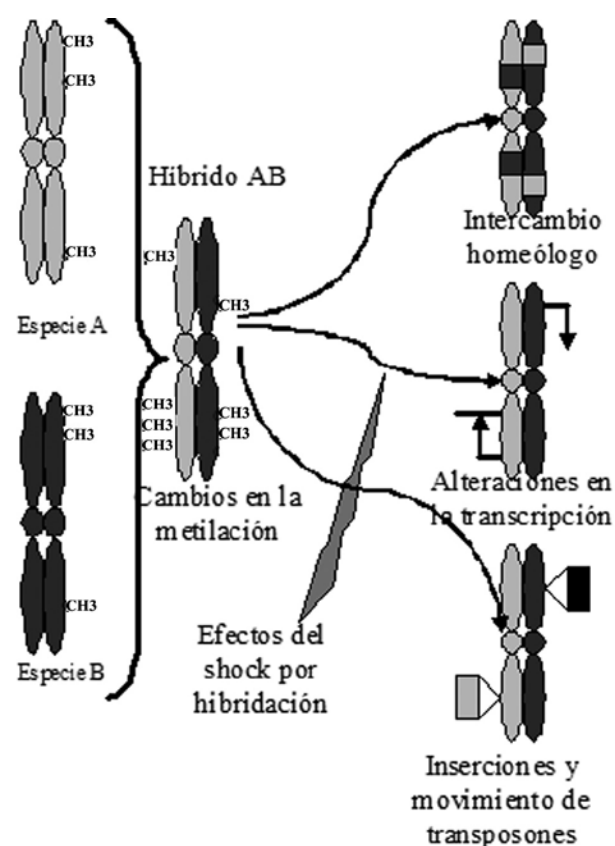


Figura 3. Esquema que representa el “estrés o shock genómico” producido por efecto de la hibridación interespecífica. El cruzamiento de dos especies que han divergido induce alteraciones en los patrones de metilación en el núcleo híbrido que producen cambios en la transcripción y reestructuraciones genéticas tales como: movimiento de transposones, rearrreglos cromosómicos y cambios en la cromatina.

nes de secuencias. En nuestro Laboratorio se obtuvo un híbrido interespecífico entre un haploide de la papa cultivada *Solanum tuberosum* ($2n=2x=24$) y la especie silvestre *Solanum kurtzianum* ($2n=2x=24$). Algunas plantas híbridas presentaban malformaciones florales, similares a las descritas en *Arabidopsis*, que incluían cambios en la morfología floral, pétalos disectados, anteras atrofiadas y estilos retorcidos entre otras. Por otro lado, los híbridos presentaban nuevos fragmentos de AFLP y RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) que no estaban presentes en los padres. Así mismo, el análisis de la metilación por MSAP

mostró cambios en los patrones de metilación de las plantas híbridas en relación a las especies progenitoras. Estos resultados obtenidos en distintos híbridos interespecíficos sugieren que existe una correlación entre la remodelación general de la metilación del genoma híbrido, los cambios genéticos y la alteración de la actividad génica y el fenotipo.

En resumen, tanto la poliploidía como la hibridación interespecífica inducen cambios genómicos como producto del estrés generado por la duplicación génica o por la reunión de dos genomas divergentes en un núcleo híbrido. Además de la metilación del ADN otros me-

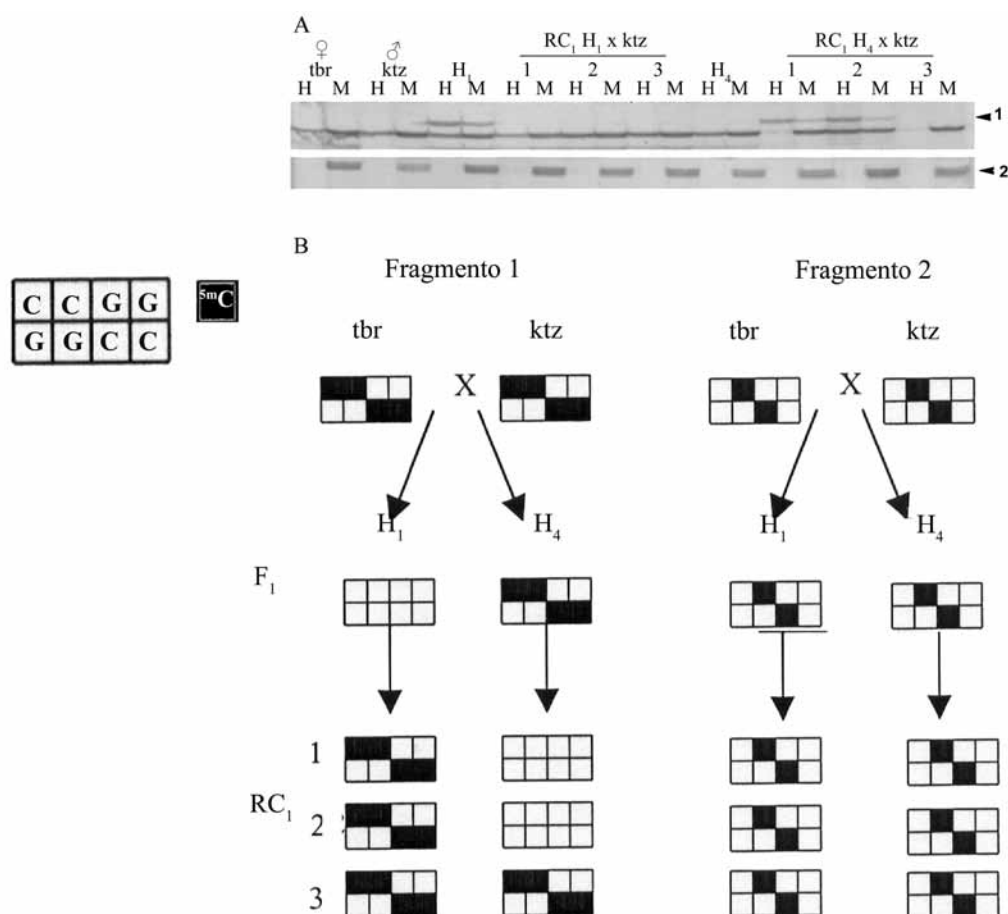


Figura 4. Análisis de la segregación de los patrones de metilación en plantas de las generaciones F₁ y RC₁. A, porción de los patrones de amplificación MSAP de *S. tuberosum* (tbr), *S. kurtzianum* (ktz), dos híbridos F₁ (H₁ y H₄) y tres plantas de la retrocruza 1 (RC₁) H₁ x *S. kurtzianum* y H₄ x *S. kurtzianum*. El ADN extraído fue digerido con *EcoRI/HpaII* (H) y *EcoRI/MspI* (M). El Patrón de metilación del fragmento 1 cambia en las progenies sucesivas. El fragmento 2 muestra un patrón de metilación altamente conservado. B, interpretación gráfica de los fragmentos MSAP 1 y 2 del panel A. Los cuadrados representan el sitio de reconocimiento doble cadena (CCGG) de los isoesquizómeros *HpaII/MspI*. Cuadrados negros indican citosinas metiladas.

canismos tales como, acetilación y metilación de histonas, activación de transposones y regulación por pequeños ARNs y ARN de interferencia pueden causar cambios en la expresión génica de híbridos y poliploides.

6. Herencia de los patrones de metilación

La obtención de mutantes que afectan la metilación del ADN ha permitido un amplio desarrollo de esta área. Las anormalidades en el desarrollo observadas en mutantes *ddm1* de *Arabidopsis* son transmitidas a la progenie, inclusive en líneas que segregan respecto a la mutación *ddm1*. Estas observaciones morfológicas de plantas *ddm1* se correlacionan con datos moleculares, ya que la reducción en la metilación que afecta a la mayoría de las secuencias del genoma de estas plantas, tanto repeticiones como secuencias de bajo número de copias, pueden ser heredadas establemente a través de la mitosis y meiosis. Esto indica que la información epigenética, en forma de metilación diferencial del ADN, puede ser transmitida en plantas a través de generaciones de reproducción sexual. Otro modelo experimental que ha permitido obtener importante información acerca de la dinámica en los patrones de metilación es la obtención de alopoliploides e híbridos interespecíficos sintéticos. La obtención de progenies a través de cruzamientos sexuales controlados permite una comparación precisa entre la generación parental y la descendencia. En la Figura 4 se ejemplifica cómo a través de análisis MSAP se pueden inferir los patrones de metilación de secuencias CCGG. Estudiando generaciones sucesivas de reproducción sexual (Filial 1-F1; Retrocruza 1- RC1; etc.) se puede evidenciar si ocurren cambios en la metilación y qué estabilidad tienen los mismos. Datos obtenidos en híbridos interespecíficos sintéticos diploides y poliploides de varias especies indican que en el genoma de las plantas existen secuencias particularmente sensibles a remodelar su metilación (Fragmento 1 de la Figura 4). Por otro lado, hay secuencias con patrones de metilación altamente conservados evolutivamente, ya que especies diferentes comparten un mismo patrón, el cual a su vez se hereda invariablemente en todas las plantas obtenidas en generaciones sucesi-

vas de reproducción sexual (Fragmento 2 de la Figura 4). Desde un punto de vista evolutivo la variabilidad generada por mecanismos epigenéticos amplía la variabilidad genética ya que aparecen nuevos epialelos que pueden ser seleccionados en poblaciones naturales. Además, las variantes epialélicas son potencialmente reversibles y generarían fenotipos más flexibles que se adaptarían a ambientes cambiantes. A partir de este tipo de evidencias, un concepto que está ampliamente documentado para fenómenos genéticos, debe ser ampliado de manera que abarque la información epigenética: en cada generación se reconstituye un reservorio epigenético enteramente nuevo, del cual surgen los individuos que son los blancos de la selección natural en esa generación.

6. Lecturas recomendadas

- Adams K.L. and Wendel J.F. 2005. Novel patterns of gene expression in polyploid plants. *Trends in Genetics* 21:569-543.
- Jablonka E. and Lamb M. 1995. Epigenetic inheritance and evolution. The Lamarckian dimension. Oxford University Press, New York, 346 pp.
- Kalisz S. and Purugganan M.D. 2004. Epialleles vs DNA methylation: consequences for plant evolution. *Trends in Ecology and Evolution* 19:309-314.
- Madlung A. and Comai L. 2004. The effect of stress on genome regulation and structure. *Annals of Botany* 94:481-495.
- Marfil C.F., Camadro E.L. and Masuelli R.W. 2009. Phenotypic instability and epigenetic variability in a diploid potato of hybrid origin, *Solanum ruiz-lealii*. *BMC Plant Biology* 9:21.
- Rapp R.A. and Wendel J.F. 2005. Epigenetics and plant evolution. *New Phytologist* 168:81-91.
- Riddle N.C. and Birchler J.A. 2003. Effects of reunited diverged regulatory hierarchies in allopolyploids and species hybrids. *Trends in Genetics* 19:597-600.

II. CAPÍTULO 4

Mutagénesis, TILLING y EcoTILLING

Alberto Prina, Alejandra Landau,
María Gabriela Pacheco y Esteban H Hopp

3.1. Mutagénesis clásica

3.1.1. Introducción

El concepto de mutación en Biología fue introducido a principios del siglo pasado por de Vries, para designar a los cambios heredables de aparición súbita. Hoy en día las mutaciones se explican por alteraciones en el ADN, que van desde cambios en una o unas pocas bases (mutaciones de punto) hasta pérdidas, adiciones o translocaciones de grandes porciones de ADN (cambios estructurales) o incluso cromosomas y genomas enteros; también podrían incluirse entre ellas las alteraciones heredables de naturaleza epigenética, por ejemplo los cambios en la metilación del ADN (ver Grant-Dwonton y Dickinson, 2005). Las mutaciones son el origen primario de la variabilidad genética y, por lo tanto, cierto control sobre su frecuencia y/o espectro puede considerarse una herramienta de gran valor para el mejoramiento de las plantas cultivadas. A fines de la década del 20, Stadler desarrolló magistralmente las bases de la mutagénesis experimental en plantas cultivadas, hecho que fue contemporáneo a los trabajos pioneros de Muller sobre mutagénesis en *Drosophila*. El primer éxito comercial consistió en una mutante de tabaco de hoja clara y de gran calidad obtenida por Tollenar (Holanda) que llegó a cubrir una importante área de cultivo en Indonesia a mediados de la década del 30. Hoy en día existen en el mundo miles de cultivares inscriptos obtenidos por esta metodología. Se incluyen en esta lista, cultivos de gran importancia económica, como los principales cereales, oleaginosas, así como, numerosas especies de hortalizas y cultivos industriales. Los caracteres que han sido mejorados son muy diversos: tolerancia a herbicidas, a estrés bióticos o abióticos, calidad nutricional, industrial, etc. (para más información ver IAEA 1995, Datta 2005). Además, la ampliación de la variabilidad disponible por medio de las mutaciones inducidas

ha contribuido considerablemente a dilucidar procesos biológicos fundamentales para la vida vegetal y para la productividad de los cultivos.

Las investigaciones en busca de mejorar la efectividad y la especificidad de los tratamientos mutagénicos sobre las plantas cultivadas, y de procedimientos de manejo y selección más eficientes, tuvieron un gran auge en las décadas del 50, 60 y 70.

Hoy existe un renovado interés por esta temática al que sin duda contribuyó el enorme conocimiento generado por la biología molecular, que alejó viejos fantasmas sobre la variabilidad inducida, y el reciente desarrollo de técnicas moleculares de gran capacidad de análisis como la técnica de genética reversa denominada TILLING (del inglés, *Targeting Induced Local Lesions in Genomes*).

A continuación se discuten los principales factores a tener en cuenta para la aplicación eficiente de la metodología clásica de mutaciones inducidas en plantas cultivadas. La descripción detallada de protocolos puede consultarse por ejemplo en: Neuffer, 1993; IAEA, 1995; Koornneef, 2002.

3.1.2. Tratamientos mutagénicos

3.1.2.1. Agentes mutagénicos

Los agentes artificiales utilizados en mutagénesis clásica pueden dividirse según su naturaleza en dos grandes grupos: físicos o químicos. Otra manera artificial de incrementar la tasa de mutaciones es a través de las condiciones especiales del cultivo *in vitro* de células o de tejidos (variación somaclonal). También existen factores de naturaleza biológica que causan algún tipo de inestabilidad genética mayor a la habitual de la especie, como la producida por ejemplo por genes relacionados con los sistemas de reparación de ADN o por la activación de transposones.

Agentes físicos

Entre éstos tenemos distintos tipos de radiaciones ionizantes como los rayos X, los rayos gamma, los neutrones, los protones y las partículas alfa, cada una de ellas con diferente poder de ionización y de penetración.

Las radiaciones ionizantes al atravesar la materia producen iones radicales inestables y electrones libres, que a su vez originan una

serie de reacciones químicas directas (por ionización de un átomo en una molécula), o indirectas (por reacción de las macromoléculas con productos radiolíticos, mayormente con los radicales OH del agua). Entre otros cambios químicos que afectan el ADN ocurre la deaminación de bases y producción de 8-hidroxiadenuína y de varios glicoles de timina, oxidación de alcoholes de la desoxirribosa y roturas de las uniones carbono-carbono. Los tratamientos con radiaciones ionizantes implican habitualmente altos niveles de daño cromosómico, originando roturas simples y dobles de las cadenas de ADN, y efectos fisiológicos deletéreos, que conducen a una alta letalidad celular y a una alta esterilidad de las plantas de la primera generación, todo lo cual limita la obtención de una alta tasa de mutaciones en la segunda generación.

La magnitud y el tipo de daño ocasionado por las radiaciones ionizantes son marcadamente influidos por ciertas características del material tratado, como el estado metabólico y el contenido de agua y de oxígeno. Así también, los efectos de determinada dosis pueden variar de acuerdo al mayor o menor tiempo en que se aplica (tasa de irradiación), desde unos pocos segundos o minutos (irradiación aguda) hasta meses o años (irradiación crónica). Los efectos letales de determinada dosis pueden disminuirse, por ejemplo, cuando se aplica repartida en distintos momentos, con intervalos de uno o varios días de recuperación o incluso dividida en aplicaciones agudas realizadas en años sucesivos (tratamientos recurrentes).

Las radiaciones ionizantes que más se han utilizado para inducir variabilidad con fines de fitomejoramiento son los rayos X y los gamma, con longitudes de onda del orden de fracciones de nanómetros (nm) a varios nm. Si bien los rayos gamma tienen mayor poder de penetración que los X, los dos pueden penetrar desde varios milímetros a centímetros, siendo por lo tanto adecuados para tratamientos aplicados sobre semillas o yemas vegetativas. Ambas son radiaciones de origen electromagnético de baja energía lineal liberada al atravesar la materia, por lo que son clasificadas como no densamente ionizantes, en contraposición con las densamente ionizantes, como por ejemplo

los neutrones ligeros. Las consecuencias genéticas típicas de las radiaciones ionizantes son las aberraciones cromosómicas, como las deleciones y translocaciones, que han resultado de utilidad para la ubicación de numerosos genes sobre los cromosomas. Las deleciones producidas por las radiaciones densamente ionizantes son de mayor tamaño y se agrupan, formando *clusters*, siendo más difíciles de reparar. Las de mayor tamaño difícilmente sortean el filtro de la gametogénesis, por lo que en muchos casos no son transmitidas sexualmente a las progenies. Las deleciones conducen a *knock outs* génicos y han sido utilizadas por ejemplo para inactivar genes que promueven la susceptibilidad a algunas enfermedades en trigo. En combinación con la tecnología de microarreglos pueden permitir la identificación de genes candidatos cuya expresión pueden cambiar drásticamente. En muchos casos, las deleciones pueden ser localizadas por medio de *Southern blot* o PCR (reacción en cadena de la polimerasa).

Por otro lado, las propiedades de las radiaciones ionizantes para romper los cromosomas y permitir así translocaciones han sido utilizadas desde hace más de 50 años para transferir segmentos cromosómicos entre distintas especies; técnica que se ha utilizado para mejorar la resistencia a enfermedades en trigo.

La luz ultravioleta es también una radiación de origen electromagnético, pero a las longitudes de onda habitualmente utilizadas no se considera ionizante. Su longitud de onda es varios miles de veces superior a la de los rayos X y gamma, y por su baja penetración sólo es utilizable sobre materiales muy delgados, como por ejemplo granos de polen y cultivos celulares o de tejidos. La luz ultravioleta origina un daño muy específico sobre el ADN, constituido mayormente por la formación de dímeros de timina que a su vez son eficientemente reparados por sistemas celulares muy especializados. Su efecto biológico varía considerablemente de acuerdo a la longitud de onda, siendo la de mayor absorción por el ADN aquella en el rango de 250 a 290 nm.

Agentes químicos

Las primeras investigaciones sobre la capacidad mutagénica de las sustancias químicas

datan de principios del siglo pasado, pero su uso en fitomejoramiento se concretó muchos años después a través de los trabajos que facilitaron el uso al disminuir los requerimientos en equipamientos e instalaciones.

Existen muchas sustancias con capacidad mutagénica, sin embargo los más utilizados con fines prácticos son los denominados supermutágenos, entre ellos varios agentes alquilantes y la azida sódica, que pueden aumentar varios cientos de veces las tasas de mutación espontánea.

A diferencia de los tratamientos con radiaciones ionizantes donde las moléculas son afectadas indiscriminadamente, los mutágenos químicos suelen ser más específicos. Los ejemplos clásicos son el ácido nitroso y los análogos de bases, productores de sustituciones del tipo transición, y las acridinas que producen mutaciones de desfase de lectura. Los mutágenos químicos que más se han utilizado en fitomejoramiento son los agentes alquilantes, denominados así por incorporar grupos alquilo a las macromoléculas. A este grupo pertenecen los alquil alcanos sulfonatos, como el etil metano sulfonato (EMS) y el metil metano sulfonato (MMS), los dialquil sulfatos, como el dimetilsulfato (DMS) y el dietilsulfato (DES); y los compuestos nitrosos, como la N-metil-N-nitroso-urea (MNU o MNH) y la N-etil-N-nitroso-urea (ENU). Se trata de compuestos electrofílicos que reaccionan con átomos que tienen un par de electrones libres como S, N y O (en ese orden, de mayor a menor fuerza nucleofílica), y de esta manera actúan sobre las bases y los grupo fosfatos del ADN y también sobre las proteínas. Los agentes de mayor reactividad, como el MMS y el DMS, tienen afinidad por los centros más nucleofílicos y en el ADN atacan mayormente el nitrógeno 7 de la guanina (N7-G) y muy poco al O6-G o al grupo fosfato. Por el contrario, los agentes de menor reactividad como ENU, tienen un mayor espectro de sitios de alquilación y afectan en mayor proporción al O6-G. Esto tiene su importancia si consideramos que la O6-alquilG sería la principal causa de apareamientos erróneos de G con T, mientras que la N7-alquilG origina depurinación y errores de reparación, que tienden a derivar en roturas cromosómicas y ocasionalmente en

deleciones de pares de bases. La MNU, también de baja reactividad, además de las alquilaciones mencionadas, forma mayor cantidad de fosfodiésteres, los que pueden derivar en roturas de cadenas de ADN y contribuir a la letalidad. El mutágeno químico que más se ha utilizado es el EMS, que habitualmente se asume como productor de mutaciones de punto del tipo transición G/C a A/T. En relación a esto es interesante advertir que hay 5 aminoácidos que en sus codones sólo tienen G o C en posiciones sinónimas, por ejemplo lisina (AAA o AAG) y tirosina (UAU o UAC), por lo que no podrían ser cambiados por otros aminoácidos mediante transiciones del tipo G/C a A/T.

Un mutágeno muy eficiente en algunas plantas cultivadas, como cebada, arveja, trigo y arroz, es la azida sódica. Esta droga no es de por sí mutagénica sino que necesita de la vía de la síntesis de L-cisteína para transformarse en el metabolito mutagénico azido-alanina. La azida no se ha visto como mutagénica en mamíferos y por lo tanto desde el punto de vista de la bioseguridad, no sería peligrosa como mutágeno en humanos, más allá de su reconocida toxicidad como veneno de la respiración oxidativa. En cebada, la azida sódica induce esencialmente sustituciones de bases, en su mayor parte transiciones, existiendo resultados divergentes en la bibliografía sobre su tipo: G/C a A/T o viceversa.

Tanto la azida como el EMS, por su propiedad de inducir mutaciones de punto, son mutágenos indicados para la obtención de series alélicas y ambos han sido utilizados para generar poblaciones para análisis de genética reversa como el TILLING (ver más adelante). Actualmente, las técnicas de TILLING están aportando una enorme cantidad de información sobre el efecto molecular de los mutágenos. Esto ha permitido detectar que más del 50 % de las mutaciones inducidas por EMS o azida sódica son de sentido cambiado, y más del 20 % son mutaciones silenciosas. En términos generales aplicando estos agentes en varias plantas cultivadas se han identificado polimorfismos en nucleótidos simples (SNPs) con una frecuencia que va de 1/50 a 1/500 kb.

Se cree importante señalar que además de las propiedades particulares de los mutágenos

hay factores biológicos que influyen sobre la tasa y el espectro de mutaciones, como la fase en que se encuentre la célula en el momento de ser tratada (G1, S o G2), la composición de bases y el tamaño del gen y, dependiendo del tipo de daño, la eficiencia de los distintos sistemas de reparación celular y las condiciones en que estos actúen. Todo esto hace que dosis similares de un mismo mutágeno puedan tener efectos biológicos muy dispares.

3.1.2.2. Materiales tratados

Órganos seleccionados para el tratamiento

En el caso de especies propagadas por semillas, éstas han sido el órgano preferido a tratar, ofreciendo la ventaja de un manejo sencillo que permite trabajar con grandes cantidades de material en condiciones relativamente fáciles de controlar. La principal dificultad del tratamiento de semillas radica en la constitución multicelular del embrión, que hace que los individuos originados a partir de la semilla tratada resulten quiméricos, es decir compuestos por células o clones celulares de distinta constitución genética. Esto es así porque en cada célula, los cambios genéticos o mutaciones que potencialmente puede producir el mutágeno pueden tener muchísimas alternativas diferentes, haciendo cercana a cero la probabilidad de que un grupo de células meristemáticas muten simultáneamente en el mismo gen y posición nucleotídica. Los clones celulares que forman la planta adulta tienen un crecimiento irregular de difícil predicción que complica el diseño de un manejo eficiente del material experimental. A pesar de esto, el tratamiento de semillas ha dado numerosísimos éxitos aplicados al mejoramiento de diversos cultivos. Como se señaló anteriormente los tratamientos físicos de semillas deben hacerse con radiaciones que tengan suficiente penetración, por ejemplo rayos X, rayos gamma, o neutrones ligeros, así como también se deberá prestar atención a los diversos factores que influyen en el efecto biológico de las radiaciones. Por otro lado, los tratamientos químicos de semillas se aplican mediante inmersión en solución acuosa y con agitación constante durante varias horas. Los tratamientos cortos suelen aplicarse después de un remojo en agua que potencia marcadamente el

efecto de los mutágenos. Luego del tratamiento químico, la semilla se lava cuidadosamente y se seca, y una vez eliminada la humedad superficial estará lista para la siembra. En la semilla tratada se inicia la generación M1, esta nomenclatura denota la primera generación de mutantes y se diferencia de una F1 en que NO es resultado de un cruzamiento, sino de un tratamiento mutagénico.

En las plantas de propagación vegetativa los equivalentes a las semillas son los órganos de multiplicación como yemas, rizomas, etc. Éstos son también órganos multicelulares y la complejidad de crecimiento de los sectores mutados es aún mayor que en las semillas. No obstante, esto no ha sido impedimento para que, en la práctica, se hayan obtenido numerosos cultivares mejorados. En general los órganos vegetativos son más sensibles que las semillas a los efectos tóxicos de los mutágenos químicos y resulta más difícil lograr aplicaciones homogéneas. Por ello, las radiaciones ionizantes con suficiente penetración han sido las más utilizadas en estos casos. Por medio de irradiación de yemas con altas dosis puede reducirse el número de células del vástago y así tender a la obtención de vástagos mutantes no quiméricos.

El problema del quimerismo de las plantas M1 puede evitarse tratando órganos unicelulares como óvulos, polen o proembriones unicelulares, y en el caso de plantas de multiplicación vegetativa, por tratamiento de yemas adventicias o de cultivos *in vitro* de células o tejidos. La utilización de mutagénesis inducida en combinación con el cultivo *in vitro* presenta además la ventaja de permitir una selección sobre un gran número de células mutagenizadas. Si bien esta selección está limitada a caracteres que puedan ser evidenciados en estas condiciones, son varios los casos que han resultado exitosos, por ejemplo con respecto a mejorar la tolerancia a temperaturas extremas y resistencia a algunas enfermedades y herbicidas.

Elección de los genotipos parentales

La filosofía de la mutagénesis inducida aplicada al mejoramiento es en cierta medida similar a la de la retrocruza, en el sentido que se

busca cambiar un gen (o unos pocos) conservando un fondo genético determinado. Por otro lado, se diferencia claramente de ella en que la variante alélica de interés es generada *de novo* y, por lo tanto, puede ser una variante no presente en el germoplasma actual de la especie. Es aconsejable partir de genotipos con un buen fondo genético, de manera que puedan ser mejorados por cambios en uno o unos pocos genes. Por ejemplo, puede mejorarse la resistencia genética a determinada enfermedad conservando un fondo genético de buenas características agronómicas y/o de calidad industrial o comercial. También por cambios en un solo gen puede adaptarse un genotipo a una nueva región mediante mutantes para el largo de ciclo, o por ejemplo cambiar drásticamente la calidad industrial por mutantes en las características del aceite de la semilla.

3.1.3. Evolución de los daños de los tratamientos mutagénicos

3.1.3.1 Desarrollo de los sectores mutantes

Tal como se ha descrito, el tratamiento de órganos multicelulares originará plantas M1 quiméricas en las que las mutaciones inducidas sólo ocuparán un sector. El tamaño y la forma de estos sectores mutantes dependerán de varios factores:

A) *Factores inherentes al material tratado*, como el estado de desarrollo y la estructura del embrión o del meristema vegetativo y la ontogenia de la especie. Esto ha sido estudiado principalmente mediante marcadores clorofílicos y mutantes del polen, y más recientemente por técnicas basadas en la recombinación de ADN para activar marcadores específicos. En plantas con alta capacidad de macollaje, como cebada o trigo, la tendencia general es que el tejido germinativo de las espigas principales provenga de varias células iniciales (generalmente de 4 a 12) mientras que puede encontrarse que más de una espiga lateral provenga de la misma célula inicial.

B) *Factores relativos al tratamiento* como el tipo de mutágeno, dosis y condiciones de aplicación. En general los tratamientos que inducen alta letalidad celular, como por ejemplo altas dosis de radiaciones ionizantes, reducirán el número de células meristemáticas a partir de

las cuales se formará la planta M1 y por lo tanto en éstas tenderá a aumentar el tamaño de cada uno de los clones celulares.

C) *Factores relativos al mutante inducido*, especialmente en lo que se refiere a su expresión y competitividad. En especies reproducidas sexualmente los sectores mutantes tendrán que sortear dos tipos de filtros selectivos para llegar a la segunda generación (M2). En esta generación, salvo excepciones, las plantas tendrán una constitución genética homogénea en todo el soma. En el caso de plantas autóгамas, la segregación de homocigotas mutantes en M2, permitirá la observación de los alelos mutantes que tengan expresión recesiva. En el caso de las alógamas para que esto ocurra será necesario realizar la autofecundación forzada de las plantas M1. En el maíz, por ser una planta diclino monoica en la que los clones celulares que forman las flores femeninas y masculinas se originan en distintas células iniciales de la semilla, la autofecundación de las plantas M1 sólo servirá para el control genealógico pero no para la segregación de homocigotas mutantes en la M2. Esto hace que la aplicación de mutágenos sobre órganos unicelulares que evitan la formación de plantas quiméricas, como el polen, resulte especialmente interesante en maíz.

Volviendo a los filtros selectivos, primero ocurrirá la selección somática o diplóntica a nivel de los tejidos quiméricos del soma de la planta M1. La competencia de un sector mutante con su entorno puede comenzar muy temprano a nivel de la célula mutante original. Luego a nivel de la gametogénesis de las plantas M1 ocurrirá la selección gamética o haplóntica. Lo arriba mencionado es válido para los genes localizados en el núcleo, pero en el caso de genes localizados en las organelas citoplasmáticas (plástidos y mitocondrias), que obedecen a reglas de la herencia más flexibles, el desarrollo de las quimeras es más complejo que para los nucleares, sumado a que la competencia del alelo mutante también puede ocurrir a nivel intracelular entre los distintos genomas de una organela. Una representación esquemática que ilustra la evolución en uno y otro caso puede encontrarse en Kirk y Tilney-Bassett (1978).

En las plantas multiplicadas vegetativamente, la selección gamética y la recombinación

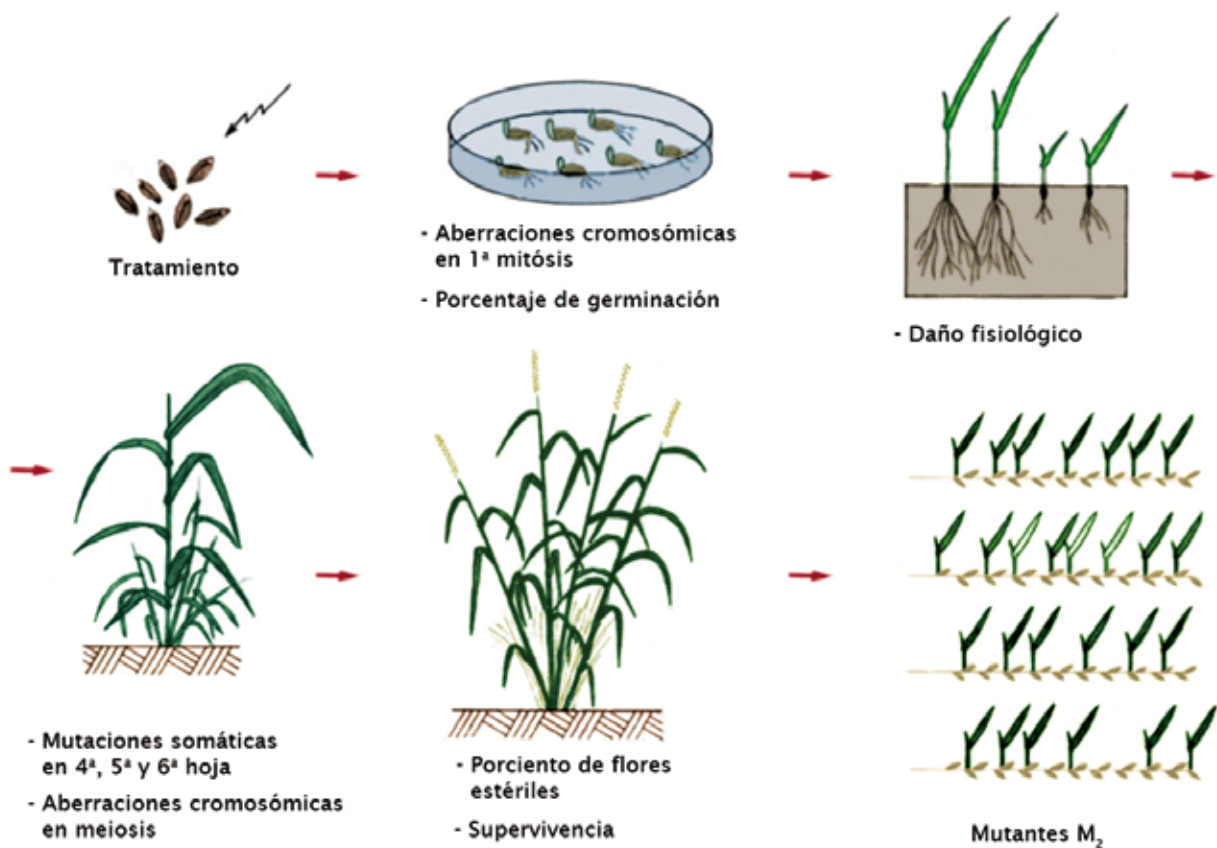
sexual estarán ausentes, a lo que se agrega que en las yemas, las células meristemáticas tienen una organización del tipo *tunica corpus*, es decir que están organizadas en capas histogénicas que cubren un cuerpo central y que al crecer se comportan, en cierta manera, como independientes. Por otro lado, estas plantas son comúnmente poliploides y con un alto nivel de *loci* heterocigotas, todo lo cual hace que un espectro muy diferente de mutantes puede estar disponible para el mejoramiento vegetal. La influencia de los genes al estado heterocigota sobre la expresión de los sectores mutantes a nivel somático fue estudiada por Prina y Favret (1988) utilizando como modelo la cebada.

Por otro lado, la poliploidía puede influir notablemente la expresión y vitalidad de las mutantes, los genotipos poliploides tienen mayor capacidad de soportar cambios drásticos como grandes deleciones de cromosomas o incluso

de cromosomas enteros. En éstos habitualmente se observa una menor proporción de cambios fenotípicos drásticos que en los diploides.

3.1.3.2. Expresión de los distintos daños

El esquema de la Figura 1 indica los distintos momentos en que pueden observarse los daños producidos por el tratamiento de semillas (para más detalles ver Prina, 1989). Las proporciones de los distintos daños tienen tendencias definidas de acuerdo al mutágeno y la manera en que se aplique. Si comparamos mutágenos como el EMS y la azida sódica con los rayos X, a iguales niveles de daño en las plantas M1 (sectores somáticos, aberraciones cromosómicas, letalidad), con los primeros tendremos tasas de mutaciones muy superiores en la generación M2. Tal información es útil para la elección de las dosis más adecuadas en base a observaciones en las plantas M1. En



Esquema de las principales etapas en que se registran los efectos de los tratamientos mutagénicos.

principio puede pensarse que a mayores dosis se obtendrá un mayor número de mutantes en la M2, pero la elección no es tan sencilla. En el caso de las radiaciones ionizantes suele recomendarse el uso de la dosis letal 50, buscando un compromiso entre la cantidad de plantas sobrevivientes en la M2 y la cantidad de mutaciones que ellas porten. Con los químicos los efectos letales suelen no tener una correlación directa con los efectos mutagénicos. Con variaciones importantes entre especies e incluso entre genotipos de una misma especie, las más recomendables son las concentraciones intermedias. En los tratamientos de azida se ha visto una influencia muy marcada del pH de la solución. Con estos mutágenos, el daño más limitante suele ser la esterilidad de la M1. Es importante señalar que no siempre es recomendable utilizar los tratamientos que den las más altas tasas de mutaciones en M2, ya que si bien esto aumenta la probabilidad de obtener una mutante buscada analizando una determinada cantidad de material, también aumenta la probabilidad de inducir mutaciones simultáneas en una misma célula lo que luego puede requerir un trabajo considerable para eliminar por retrocruza los alelos no deseados.

3.1.4. Manejo y selección

La semilla M1 usualmente se siembra a campo semilla por semilla para permitir la individualización de las plantas a la cosecha. En lo posible, debe realizarse en lote aislado, geográfica y/o temporalmente de otras parcelas del cultivo. Para mutantes de efecto marcado que son fácilmente distinguibles a nivel de individuos habitualmente la selección comienza en la M2. En el caso de mutantes que conducen a cambios fenotípicos leves o cuya expresión tiene una importante influencia ambiental, es más confiable realizar la selección entre familias de generaciones más avanzadas.

En forma simplificada podemos describir tres tipos básicos de manejo del material mutagenizado para pasar de M1 a M2:

1-Manejo genealógico por progenies de espigas, panojas o ramas: fue propuesto por Stadler en 1930, en los albores de la mutagénesis experimental. Implica un mayor trabajo inicial, pero tiene el beneficio de que permite recono-

cer las mutaciones inducidas por el tratamiento mutagénico de otras preexistentes, o de las originadas por mezcla de semillas o de polen. Por otro lado, en el caso de hallarse mutantes idénticas permite evaluar la probabilidad de que se hayan originado en el mismo o en distintos eventos mutacionales.

2- Manejo por conjunto o pool de 1 semilla por espiga, panoja o rama: en este caso la cosecha se limita a una semilla de cada una de las inflorescencias principales de las plantas M1 con las que se formará un conjunto (*pool*). Se basa en que cada una de las semillas del *pool* provendrá de células iniciales diferentes, y por lo tanto en un mismo *pool* no se encontrarán mutantes provenientes de un mismo evento mutacional. La formación de varios *pools* como el descrito aumentará la probabilidad de aislar una mutante determinada pero, por otro lado, no permitirá distinguir sobre el origen mutacional de mutantes idénticas que aparezcan en *pools* diferentes. Este manejo es adecuado cuando se quiere seleccionar mutantes de efectos moderados y/o de expresión altamente influida por el ambiente para lo que es recomendable comenzar la selección en familias de la generación M3.

3-Manejo en masa: se cosechan en masa o *bulk* todas las plantas M1 de un mismo tratamiento. También puede limitarse el tamaño de los *bulks* haciendo varios por tratamiento. Para este manejo se recomienda una siembra densa para limitar el crecimiento de las plantas M1 y así aumentar el número de los sectores M1 que serán analizados en M2 los que, de esta manera estarán más homogéneamente representados. Este manejo sólo es aplicable cuando se dispone de una metodología de selección individual barata y de aplicación masiva. Al principio es menos laborioso que los anteriores, pero no distingue la variabilidad inducida de la preexistente, ni las mezclas de semilla o polen. Además, puede incrementar notablemente el trabajo posterior si es que se obtienen muchas mutantes similares y se quiere distinguir si se originaron de manera independiente, o si provienen del mismo evento mutacional.

En cuanto a la cantidad de material a tratar es obvio que a mayor cantidad de sectores mutantes representados en el momento de la

selección, será mayor la chance de aislar una mutante determinada. Cada uno de los manejos mencionados estará limitado en forma diferente por el trabajo de conducción. Los cálculos teóricos sobre la cantidad de material a manejar en M1 y M2 son de relativa validez dada la multiplicidad de factores a tener en cuenta, muchos de los cuales son sólo parcialmente controlables o predecibles. Habitualmente estos cálculos se basan en probabilidades de *knock out* génicos, considerando a todos los genes con igual chance de ser afectados. La crianza de la M1 habitualmente requiere poco esfuerzo y espacio en comparación con las otras etapas, por lo que es recomendable criar material adicional para asegurar una población M2 suficientemente grande, lo que además puede permitir seleccionar entre tratamientos de acuerdo a observaciones sobre la M1. Algunos autores señalan que al trabajar con *Arabidopsis*, a menudo se prefiere criar gran cantidad de plantas M1 y luego someter a la selección unas 2000 a 125000 plantas M2. Mientras que en el caso del maíz, que por ser alógama requiere una autofecundación controlada para poder seleccionar mutantes recesivos, se considera que 1000 plantas M1 no quiméricas obtenidas por tratamientos de polen, pueden ser suficientes para tener chance de obtener al menos una mutante recesiva por *locus*. En autógamias, donde obviamente la autopolinización de las plantas M1 no insume un trabajo adicional, es recomendable incrementar el número de plantas M1 que pasan a la generación M2 a varios miles.

3.1.5. Conclusiones

Podemos señalar entonces, tres pasos fundamentales y complementarios en la mutagénesis inducida aplicada al fitomejoramiento, ellos son:

- 1) Realizar tratamientos mutagénicos apropiados para originar una importante cantidad de células mutantes, pero en lo posible con una o unas pocas mutaciones cada una (evitando la multiplicidad de cambios mutacionales en una misma célula) y, adicionalmente, con bajos niveles de otros daños que afecten la viabilidad y/o vitalidad de las células y/o de los individuos mutantes.

- 2) Hacer un manejo eficiente del material

mutagenizado en función del crecimiento de los sectores mutados en las plantas de la primera generación y, de ser posible, con un control genealógico adecuado, que permita distinguir sobre el origen de mutantes similares.

- 3) Una vez que los alelos mutantes puedan ser detectados, aplicar una metodología de selección eficiente que permita analizar grandes cantidades de material.

Si bien la mutagénesis inducida tradicional es un proceso con un amplio espectro de resultados posibles y dependiente de múltiples factores, que pueden ser relativamente controlados, lejos está de ser una técnica que depende totalmente del azar. Al éxito de esta metodología contribuirán los conocimientos de la biología de la especie y del genotipo particular a tratar, la información disponible sobre su respuesta a los tratamientos mutagénicos, el conocimiento de las bases genéticas del carácter a mejorar, etc. Sin duda que los resultados de esta metodología se verán potenciados por un trabajo multidisciplinario de genetistas, fisiólogos y mejoradores, sin descartar el aporte que puedan hacer muchas otras especialidades. El potencial de la mutagénesis clásica sin duda se ve hoy en día enormemente acrecentado por su uso en combinación con las nuevas técnicas de la biología molecular y la biotecnología.

3.2. TILLING y EcoTILLING

TILLING (del inglés *Targeting Induced Local Lesions in Genomes*) es una técnica de búsqueda de mutaciones focalizada en un gen o secuencia nucleotídica conocida, que permite el análisis de muestras de muchos individuos que provienen de una población previamente mutagenizada en forma artificial; o que pueden portar variación natural sin necesidad de tratamientos mutagénicos, en este último caso se la denomina EcoTILLING. Dado que se la utiliza para averiguar la función de un gen o secuencia incógnita, se la considera como una técnica de genética inversa (a partir de modificaciones genotípicas se evalúan los efectos fenotípicos de las mismas para descifrar la funcionalidad de la secuencia), con ventajas sobre el *knock out* tradicional porque los sistemas de reemplazo alélico son ineficientes en plantas superiores. Otra ventaja es que la mutagénesis con

mutágenos como el EMS o la azida sódica no necesariamente anulan completamente la función del gen, como sí lo hace el *knock out* o el *knock down* que se obtiene cuando se utiliza ARN interferente o cuando se utilizan radiaciones ionizantes que producen deleciones (como tratamiento mutagénico). Esto, potencialmente, permite evaluar los efectos de reemplazo de cada uno de los nucleótidos individuales del gen.

El TILLING permite identificar estas mutaciones puntuales aunque para poder utilizarlo se requiere conocer previamente la secuencia nucleotídica del gen o segmento genómico que se desea estudiar; sin embargo, no es necesario conocer la secuencia completa del genoma. El método fue desarrollado originalmente en *Arabidopsis thaliana* y su uso se extendió posteriormente a plantas cultivadas como el maíz, la papa, el trigo, la soja, el tomate, la lechuga y el girasol. Ha sido muy utilizada con fines de mejoramiento agronómico porque tiene la ventaja de que no conlleva las regulaciones a las que están sometidas las plantas genéticamente modificadas. Entre los genes estudiados están los relacionados a la calidad de almidón en granos (en mutantes con mayor amilopectina como los *waxy*), senescencia, enanismo, resistencia a oidios, larga vida en estante (en tomate y lechuga), reducción de isoflavonas y alérgenos en soja, modificación de la composición de aceites en girasol, etc.

El EcoTILLING en cambio, se orientó a la utilización de ecotipos como fuente de diversidad para estudiar genes relacionados a la resistencia a estrés abiótico (como por ejemplo los codificantes para dehidrininas) o para encontrar nuevos marcadores moleculares funcionales de tipo SNP (polimorfismos de un solo nucleótido, ver capítulo correspondiente en este mismo libro).

La técnica consiste esencialmente de dos pasos: 1) la aplicación de mutagénesis química inducida tradicional como se describió en este capítulo, usualmente empleando EMS (etilmetanosulfonato); y 2) la utilización de una novedosa estrategia de búsqueda y detección de las mutaciones inducidas sobre un determinado gen o secuencia nucleotídica de interés. En la Figura 2 ilustra el proceso. Usualmente se

mutagenizan semillas o granos de polen para inducir la aparición de mutaciones puntuales a lo largo del genoma. Las plantas derivadas de estas semillas tratadas con mutágenos se denominan M1 y, como ya se mencionó, suelen ser quiméricas y las mutaciones inducidas se encuentran en heterocigosis. Usualmente a las plantas M1 se las endocría dejándolas autofecundar en el caso de autógamias, o se procede a la autopolinización forzada en alógamas para poder tener control de las genealogías y asegurar su conservación. Usualmente se cosecha una semilla por planta M1 para pasar a la próxima generación, pero esto bien puede hacerse con una semilla por inflorescencia principal con muy bajo riesgo de repetir en la muestra dos mutantes provenientes del mismo evento mutacional. Por la endocría de las plantas M1 los genes mutados tenderán a hacerse homocigotas, sin embargo no es imprescindible que alcancen la homocigosis para que puedan ser detectados por TILLING. La generación M2 es segregante: cada individuo podrá ser homocigota mutante, heterocigota u homocigota salvaje en cada uno de los genes afectados, pero serán de constitución genética homogénea en todo su soma, es decir no quiméricos. De cada planta M2, que debe ser debidamente identificada, se extrae ADN de las hojas para el análisis de el/los gen/es de interés. Por otro lado, se guardan sus semillas para poder disponer en el futuro de sus descendencias (poblaciones M3). De este modo es posible conservar las mutaciones detectadas mediante el análisis de ADN, y adicionalmente disponer de poblaciones que puedan distribuirse internacionalmente entre los consorcios de investigación de cada especie (es común que se comparta el material de las poblaciones mutantes de las especies más estudiadas, como *Arabidopsis* y maíz, entre los consorcios internacionales). Para reducir costos, los ADNs procedentes de distintas plantas M2 (usualmente entre 2 y 10) se pueden mezclar para su análisis en un mismo tubo. Sobre una parte de la mezcla se realizará una amplificación por PCR, utilizando oligonucleótidos con secuencias flanqueantes al segmento genómico de interés (previamente diseñados en base a la secuencia conocida). Los productos de amplificación, que consis-

tirán en una mezcla de secuencias normales y mutadas, se desnaturalizan sometiéndolos a alta temperatura y se les permite rehibridar entre sí bajando la temperatura. Algunas de las cadenas rehibridadas podrán ser heteroduplexas, es decir, una de las cadenas provendrá de una secuencia mutada y otra de una normal produciendo una doble cadena que contiene bases mal apareadas por falta de complementariedad. Estas bases mal apareadas serán reconocidas por la enzima endonucleasa *Cell*, produciendo un corte donde encuentra la anomalía. Los productos de la digestión con *Cell* se resuelven por electroforesis en geles de poliacrilamida, y si los oligonucleótidos utilizados en la PCR fueron previamente marcados con fluoróforos (de fluorescencia rojo y verde en la figura), los productos del corte podrán ser identificados por su menor tamaño comparado con los ADNs no cortados (ver figura). La utilización de 2 fluoróforos, en lugar de uno, ayuda a reducir el número de falsos positivos.

Sobre esta técnica básica se introdujeron modificaciones como, por ejemplo, la utilización de geles no desnaturalizantes de poliacrilamida o agarosa y tinción con bromuro de etidio, que funcionó muy bien en trigo. En los casos en que se utiliza irradiación X o gamma para la inducción de mutaciones, el paso de digestión se saltea y se analiza en geles de secuenciación.

A medida que se van reduciendo los costos de secuenciación y se convierta en rutina la detección de SNPs, posiblemente reemplacen el tratamiento con *Cell* en la técnica de TILLING. Al día de hoy las publicaciones de *ultra-deep sequencing* en virus, permiten detectar genomas con variaciones en mezclas que contienen muchísimos genomas no mutados. Otra variante utilizada es la DHPLC (del inglés, *denaturing high-performance liquid chromatography*) basada en la utilización de columnas para cromatografía líquida de alta presión que permiten diferenciar ADN heterodúplex del homodúplex. Para reducir el número de muestras analizadas, varios productos de PCR y posterior digestión con *Cell* se siembran en el mismo carril de un gel (por ejemplo toda una columna). Por otro lado se siembra también toda una fila. De esta manera, la aparición de bandas de

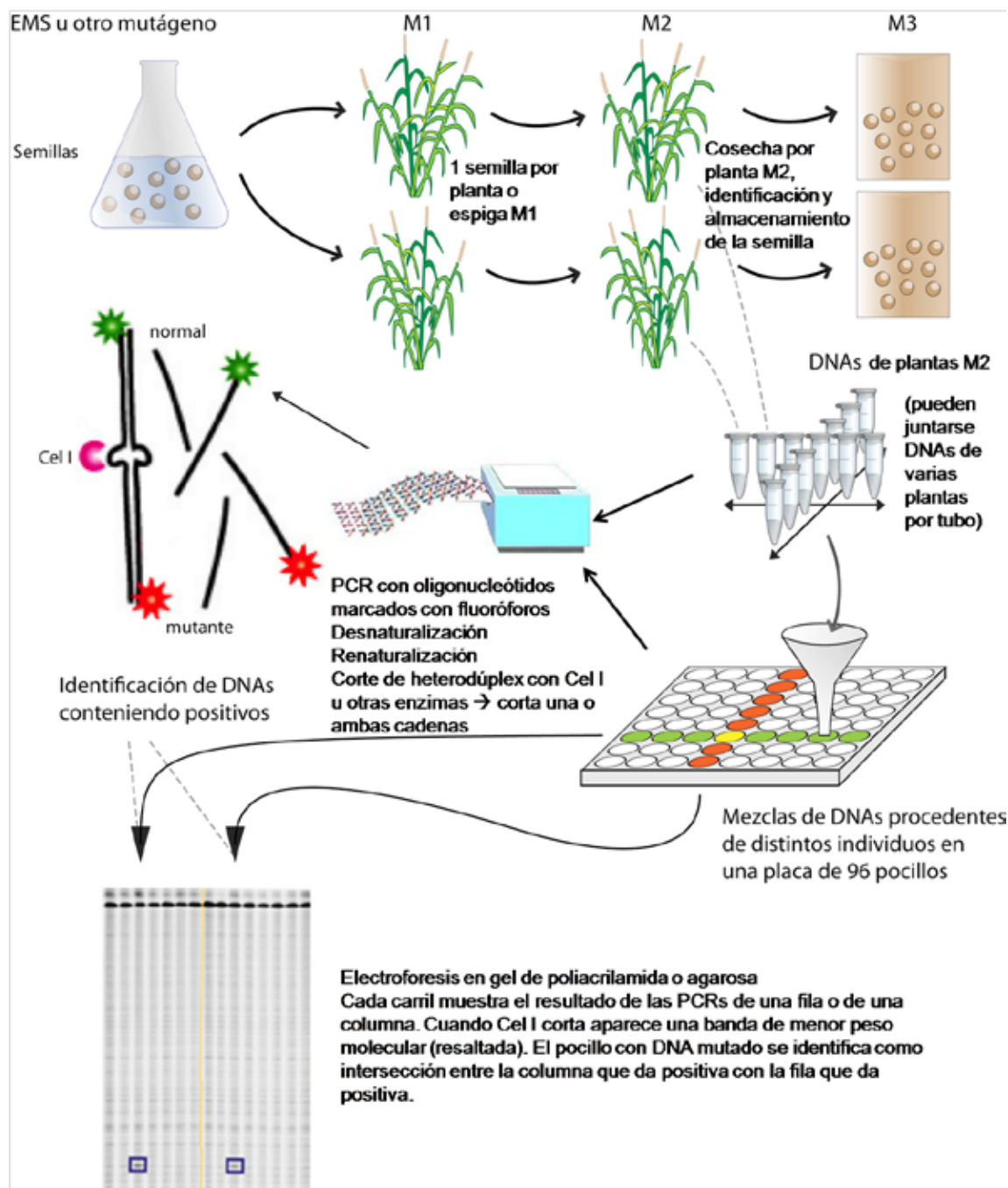
igual tamaño en carriles pertenecientes a columnas y filas permite identificar la intersección en la que se encuentra el pocillo con el ADN mutado (de un modo similar al esquema que se propone en la Figura 2).

En el EcoTILLING, menos utilizado que el TILLING, en lugar de analizar poblaciones provenientes de mutagénesis inducida, los materiales de partida que se utilizan como fuente de variabilidad suelen ser los almacenados en bancos de germoplasma, o bien ecotipos de especies no domesticadas. Los problemas de este enfoque alternativo son varios: el acceso al material puede ser limitante, los fondos genéticos son demasiado variables, las mutaciones que disminuyen la adaptación de una planta no suelen estar representadas porque son eliminadas por selección natural o artificial, etc.

3.3. Mutagénesis de inserción con transposones y ADN-T

Otro sistema utilizado en genética inversa para el análisis funcional de genes consiste en la activación de transposones endógenos (siendo el Ac-Ds de maíz el más emblemático), mediante cruzamientos entre genotipos que resulten en la activación de dichos transposones o mediante la introducción de transposones foráneos por ingeniería genética (por ejemplo, el sistema Ac de maíz fue introducido en papa, el *Enhancer* o *SPM* de maíz en *Arabidopsis* o el mutador Robertsomiano *Mu* en maíz).

Una de las grandes ventajas de esta técnica es que el elemento insertado proporciona un marcador molecular de secuencia conocida (*tag*) en el sitio de inserción (sitio de *knock out*), que puede facilitar el aislamiento del gen mutado por pérdida o ganancia de función debido a que la inserción es reversible. Las desventajas principales de esta aproximación son: que las mutaciones pueden ser inestables (revertir), y que la transposición tiene frecuencias bajas y no siempre la inserción es totalmente azarosa. Para potenciarla se pueden colocar promotores fuertes como el 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV) para controlar la expresión del gen de la transposasa. Las ventajas de hacer esto se reflejan en un aumento significativo en la tasa de mutación (hasta 1×10^{-4} en maíz, por ejemplo), y en que provee una secuencia



foránea conocida en el sitio de inserción, lo cual facilita el posterior clonado molecular.

Existen algunas variantes de esta técnica como la captura de genes o de promotor (*gene o promotor trapping*), en este caso se pueden incluir secuencias foráneas de genes reporteros como *uidA* (GUS), *gfp* (GFP) y sus variantes de otros colores, o genes involucrados en la síntesis de antocianinas (Lc), con o sin pro-

motores funcionales. Si el gen indicador que no contiene promotor se inserta al azar bajo el control de algún promotor endógeno, entonces se activará su expresión y se visualizará fácilmente. Otra ventaja de esta aproximación es la identificación sencilla sin necesidad de disponer de un fenotipo mutante, lo cual es útil cuando existen genes redundantes, heterocigosis o cuando se analizan genes activos

en distintos estadios de desarrollo. La función génica puede caracterizarse posteriormente en las mismas líneas si la inserción ha producido un *knock out*.

La mutagénesis de inserción con ADN-T (segmento T de transferencia del plásmido Ti) consiste en aprovechar la propiedad del sistema basado en *Agrobacterium tumefaciens*, para la transformación genética de plantas. El segmento T se inserta teóricamente al azar en cualquier sitio de la eucromatina de las plantas, permitiendo así generar colecciones de mutantes de inserción con las características ya mencionadas anteriormente para los transposones; pero con mayor estabilidad que éstos y menor preferencia por el sitio de inserción. Sin embargo, como las frecuencias de mutación son extremadamente bajas, sólo se utilizan actualmente en combinación con transposones. Es decir que se incluye un transposón activo dentro del segmento T para inducir mutagénesis por transposición en la especie transformada. Una de sus desventajas, es que su uso estará limitado a aquellas especies que son transformadas por agrobacterias.

Lecturas Recomendadas

- Birky C.W. Jr. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: Laws, mechanisms, and models. *Ann Rev Genet*, 35, 125-148.
- Bouchez, D. and H. Höfte. 1998. Functional Genomics in Plants. *Plant Physiol*, 118, 725-732
- Datta S.K. 2005. Role of classical mutation breeding in crop improvement. Daya Publishing House, India. 314 p.
- Dong C, J Dalton-Morgan, K Vincent, P Sharp A Modified TILLING Method for Wheat Breeding *Plant Gen.* March 2009 2:39-47
- Draper B.W., McCallum C.M., Stout J.L., Slade A.J., Moens C.B. 2004. A high-throughput method for identifying N-ethyl-N-nitrosourea (ENU)-induced point mutations in zebrafish. *Methods Cell Biol*, 77, 91-112.
- Grant-Downton R.T. and Dickinson H.G. 2005. Epigenetics and its implications for plant biology. 1. The epigenetic network in plants. *Annals of Botany*, 96, 1143-1164.
- IAEA. 1995. Manual on mutation breeding Second Edition. Technical Reports Series No 119. Joint FAO/IAEA Division of Atomic Energy in Food and Agriculture, Vienna 1995. 288 p.
- Kirk J.T.O. and Tilney-Bassett R.A.E. 1978. The plastids. Elsevier, North-Holland, Amsterdam, 960 p.
- Koornneef M. 2002. Classical mutagenesis in higher plants. In: PM Gilmartin and C. Bowler (eds) *Molecular Plant Biology: Practical Approach series* Number 258. Vol.1. pp 1-11.
- May, BP, H Liu, E Vollbrecht, L Senior, PD Rabinowicz, D Roh, X Pan, L Stein, M Freeling, D Alexander, R Martienssen 2003 Maize-targeted mutagenesis: A knockout resource for maize *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 11541-11546.
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. 2000 Targeted screening for induced mutations. *Nat Biotechnol.* 18:455-7.
- McCallum CM, Comai L, Greene EA, Henikoff S. 2000 Targeting induced local lesions IN genomes (TILLING) for plant functional genomics. *Plant Physiol.* 123: 439-42.
- Neuffer M.G. 1993. Mutagenesis. En: *The Maize Handbook* (Freeling M. and Walbot V. eds.). pp 212-219.
- Prina A.R. 1989. Consideraciones sobre la aplicación eficiente de la mutagénesis inducida en fitomejoramiento. *Mendeliana*, 9 (1), 5-49.
- Prina A.R. 1993. La mutagénesis inducida en el mejoramiento vegetal. *Bol. Genet. Inst. Fitotéc. Castelar*, 17, 9-22.
- Prina A.R. and Favret E.A. 1988. Influence of marker genes on the expression of somatic mutations in barley. *J Hered.* 79, 371-376.
- Ramachandran, S y S Venkatesan. 2001. Transposons as tools for functional genomics. *Plant Physiol. Biochem.* 39: 243-252
- Slade AJ, Fuerstenberg SI, Loeffler D, Steine MN, Facciotti D. 2005 A reverse genetic, nontransgenic approach to wheat crop improvement by TILLING. *Nat Biotechnol.* 23:75-81.
- Stadler L.J. 1930. Some genetic effects of X-rays in plants. *J. Hered.*, 21 (1), 3-19.
- Uauy, C; F Paraiso, P Colasuonno, R K Tran, H Tsai, S Berardi, L Comai, J Dubcovsky 2009 A modified TILLING approach to detect induced mutations in tetraploid and hexaploid wheat, *BMC Plant Biology* 9:115
- van Harten A.M.. 2002. Mutation breeding of vegetatively propagated ornamentals. *Breeding for Ornamentals: Classical and Molecular Approaches* In: A. Vainstein (ed.) Kluwer Academic Publishers, The Netherlands 2002. pp 105-127.

II. Capítulo 5

Variación somaclonal

Susana Cardone, Sofía Olmos y
Viviana Echenique

1 Introducción

El cultivo *in vitro* representa un momento de estrés para las células y tejidos vegetales y puede desencadenar procesos mutagénicos durante el establecimiento del explanto, la inducción de callo y la formación de embriones o vástagos durante el proceso de regeneración de plantas. Algunos de los cambios genéticos ocurridos en las plantas regeneradas pueden resultar variantes atractivas, con utilidad potencial en el mejoramiento vegetal para el desarrollo de nuevas variedades.

Larkin y Scowcroft (1981) llamaron **variación somaclonal** a los cambios ocurridos en las plantas regeneradas y que son transmitidos a la progenie. Asimismo cabe citar la ocurrencia *in vitro* de cambios reversibles que pueden modificar la expresión de ciertos genes. Estos cambios que no implican alteración en la secuencia nucleotídica se denominan “epigenéticos” (Madlung y Comai, 2004). Algunos autores los consideran variantes somaclonales mientras que otros sólo incluyen en la misma aquellos cambios que no revierten en ciclos sucesivos de reproducción sexual.

Los mecanismos por los cuales ocurre la variación somaclonal no han sido completamente dilucidados. Sin embargo, se han propuesto varias causas de posible incidencia en la ocurrencia de la misma. Entre esas causas se citan: el genotipo, la fuente de explanto, el tiempo en cultivo, las condiciones y composición del medio de cultivo y la vía de regeneración. La comprensión de estas causas ayudaría a mejorar la interpretación de los procesos celulares de respuesta al estrés y permitiría definir como actúan en los procesos de evolución.

Entre los fenómenos que ocurren durante el cultivo *in vitro* se mencionan alteraciones en el cariotipo, mutaciones puntuales, recombinación somática e intercambio de cromátidas hermanas, rearrreglos génicos somáticos, activación de elementos genéticos transponibles,

amplificación y metilación del ADN y cambios en el ADN de las organelas. Por ello, aunque los caracteres morfológicos (como por ejemplo el hábito de crecimiento, la morfología floral, etc.) son fáciles de evaluar, otros cambios no se manifiestan en variantes morfológicas evidentes. Una diferencia estructural en un producto génico puede no alterar su actividad biológica lo suficiente como para producir un fenotipo modificado, por lo tanto, la variación debe analizarse a varios niveles.

Los cambios producidos son generalmente indeseables, pero la aparición ocasional de variantes no encontradas en las poblaciones naturales y que representan una ventaja desde el punto de vista agronómico, permite utilizar este fenómeno en programas de mejora vegetal. Se ha utilizado, en algunos casos, para conferir caracteres deseables a cultivares de importancia económica, entre los que se incluyen: resistencia a enfermedades, tolerancia a suelos ácidos y a salinidad. El desarrollo de nuevos cultivares por esta técnica involucra un balance entre la cantidad de variación inducida y el mantenimiento de los caracteres agronómicos del cultivar. Como ejemplo puede citarse el caso de somaclones de pasto bermuda, *Cynodon dactylon*, donde se encontró resistencia a la oruga militar en un cultivar que reunía otras buenas características, dando origen al cultivar Brazos-R3.

Si bien desde el punto de vista práctico no es una técnica muy eficiente, dado que no es posible predecir ni dirigir el tipo de variación y se hace menester trabajar con poblaciones grandes de plantas, es necesaria la comprensión del mecanismo para evitarlo en casos donde se requiere fidelidad genética, como en la micropropagación, la conservación de germoplasma y la transformación de plantas.

En algunos casos puede representar una fuente de variación rápida y de fácil acceso para ser utilizada en programas de mejoramiento, especialmente para especies con sistemas genéticos limitados o de base genética estrecha, como en el caso de la apomixis, donde la variabilidad dentro de las poblaciones naturales o cultivadas puede ser limitada.

Los primeros casos de variación somaclonal se registraron en plantas de reproducción agámica como la caña de azúcar y la papa,

pero el fenómeno ha sido observado en monocotiledóneas como trigo, maíz, avena, arroz, pasto miel (*Paspalum dilatatum*) y pasto llorón (*Eragrostis curvula*) y en dicotiledóneas como tabaco, tomate, zanahoria y col, entre muchas otras especies.

2 Factores relacionados con la aparición de variación somaclonal

Hemos mencionado, previamente, algunos de los posibles factores que tienen influencia en la aparición de variación somaclonal. En este punto trataremos cada uno por separado.

Genotipo. En general se asume que la frecuencia de cambios dependerá de variaciones preexistentes en el genotipo y de las interacciones que surgen entre el mismo y el proceso de cultivo. En arroz, ciertas variedades estables muestran niveles de variación que oscilan entre el 0 y el 1%, mientras que en otras, consideradas inestables, oscilan entre el 10 y el 27%. En *Kalanchoe*, especie ornamental, la variación somaclonal es genotipo dependiente y se la utiliza como una herramienta para la obtención de variedades. El nivel de ploidía del genotipo es otro factor a tener en cuenta. Por ejemplo en raigrás y en papa se observó que, durante el cultivo de tejidos, las variedades diploides muestran estabilidad, mientras que las tetraploides tienden a generar aneuploidías. La explicación más razonable para este hecho es que los poliploides, con más de dos juegos completos de cromosomas, están “tamponados”, y por lo tanto toleran la ganancia o pérdida de cromosomas, pudiendo así cumplir con los requisitos impuestos por la regeneración. En los diploides, la pérdida o la alteración de cromosomas que llevan genes vitales impedirá la regeneración de las plantas, llegando con éxito a esta etapa sólo aquellos explantos que tengan su complemento cromosómico completo. Existen evidencias de una mayor inestabilidad en híbridos interespecíficos cultivados *in vitro*, si se los compara con las especies parentales. Como ejemplo puede citarse el caso de los híbridos obtenidos de la cruce de *Hordeum vulgare* x *Hordeum jubatum*, donde el cultivo *in vitro* genera entre un 5% y un 10% de regenerantes haploides que suelen contener sólo el genoma de *Hordeum vulgare*.

Explantos. La variación observada entre plantas regeneradas puede ser una consecuencia de quimerismo en el explanto original. Las quimeras son mosaicos genéticos. Esto significa que dentro de una misma planta existen diferentes linajes celulares, esto se debe a una serie de cambios en el ADN nuclear de ciertos tipos celulares producidos durante el desarrollo. Si estos tejidos se utilizan como explantos y sus células son inducidas a dividirse y rediferenciarse, las diferentes líneas celulares pueden dar origen a plantas genéticamente diferentes. Por lo tanto, la utilización de explantos con tejidos quiméricos preexistentes puede resultar en una fuente “extra” de variación. Sin embargo, la recuperación de quimeras a partir de explantos no quiméricos es un fenómeno frecuente que puede ocurrir, a partir de procesos organogénicos, o por causas desconocidas. La utilización de explantos con tejidos organizados, como esquejes radicales o caulinareos, es una buena opción si es necesario mantener estabilidad genética durante el cultivo *in vitro*. Sin embargo, diferentes genotipos reaccionan de manera distinta, aún con explantos “seguros”. El cultivo de meristemas aislados minimiza el riesgo de variación somaclonal. Esto no debe tomarse como regla, ya que utilizando técnicas moleculares fue posible detectar variación en plantas de frutilla y paraíso obtenidas a partir de meristemas. El cultivo de protoplastos parecería inducir inestabilidad genética, como fue observado en papa y tabaco; esto se ha asociado a los mayores **tiempos en cultivo** involucrados en la regeneración de plantas a partir de explantos tan pequeños.

La **vía de regeneración** también tiene un rol importante en la ocurrencia de alteraciones en plantas obtenidas *in vitro*. En especies de los géneros *Pennisetum*, *Panicum*, y *Lolium* la variación observada en cultivos embriogénicos fue relativamente menor que la que obtenida en cultivos organogénicos. Esto probablemente se debe a la gran presión de selección impuesta en la formación de los embriones, mayor que la requerida en la formación de vástagos. Se cree que el gran número de genes requeridos para la iniciación y maduración de embriones cigóticos y somáticos impediría la acumulación de mutaciones deletéreas. Sin

embargo, también se observaron variantes en plantas de café, apio y caña de azúcar regeneradas a través de embriogénesis somática. En estos casos se advirtió que algunos fenotipos anormales de embriones somáticos se asemejan a los mutantes del desarrollo embrionario obtenidos en *Arabidopsis* y maíz.

La mayor parte de la variación obtenida *in vitro* parece provenir de la **fase de callo**. Los mecanismos de iniciación de un callo parecen ser similares a la respuesta de las plantas a heridas, que se sabe que activan elementos transponibles y estimulan la inducción de enzimas y productos específicos de situaciones de estrés. La desdiferenciación que ocurre durante la inducción del callo, altera procesos celulares que resultan en cambios genómicos, uno de los más frecuentes es la inestabilidad cromosómica. La **naturaleza del callo** también puede afectar el nivel de variación obtenida. Un callo verdadero es una masa de células desdiferenciadas que proliferan desorganizadamente, lo cual probablemente genera considerable variación. En varias monocotiledóneas el callo representa, a menudo, una masa de órganos suprimidos o proembriones más que un tejido completamente desorganizado. Este tipo de callo mantiene un alto grado de estabilidad genética, como se ha observado en espárrago. En un estudio realizado en *Cymbopogon* se observó que muchas de las plantas regeneradas a partir de callos provenientes de semillas fueron anormales, mientras que las obtenidas por callos de inflorescencias fueron muy semejantes a las plantas de las cuales provenían los explantos. En ocasiones, también fue posible observar variación en plantas obtenidas por regeneración directa, es decir, sin que medie un proceso previo de desdiferenciación celular ni formación de callo.

El estado físico del **medio de cultivo** también influye en el nivel de variación obtenida. Un mismo explanto puede tener diferente comportamiento si se lo cultiva en medio sólido o en medio líquido. Otro factor importante es la **temperatura**, que puede inducir inestabilidad cariotípica y/o incrementar el número de plantas albinas y también la **deficiencia de oxígeno** que se genera durante el transcurso del cultivo. La tensión de oxígeno a la que están

expuestas las células superficiales del callo es diferente a la de las células situadas en profundidad. La anaerobiosis resultaría en la producción de etanol, el cual podría comportarse como un mutágeno. Un efecto similar podría tener la **acumulación de metabolitos** producidos por las propias células durante el cultivo.

Los **reguladores de crecimiento**, principalmente el 2,4-D (ácido 2,4 diclorofenoxiacético), han sido señalados como inductores de inestabilidad. Estos ejercen profundos efectos sobre la respiración celular, el consumo de azúcares y en el control de la división celular. Por ello se especula acerca de su rol indirecto en la inducción de cambios en el metabolismo celular y tisular de plantas creciendo *in vitro*. Aparentemente el 2,4-D induce desdiferenciación y provoca un incremento sustancial en la transcripción. Esto puede alterar la estructura de la cromatina, por lo cual se lo utiliza en gramíneas como inductor de aneuploidías. La relación auxina:citosina también suele afectar en este sentido. El 2,4-D, el AIA (ácido indolacético) y el ANA (ácido naftalenacético) han sido señalados como los responsables de los incrementos en la metilación de las citosinas, que tienen lugar durante el cultivo *in vitro*. Los sectores del ADN donde las citosinas se encuentran metiladas en posición 5 son considerados puntos calientes de mutación, ya que la desaminación de una 5-metilcitosina resulta en un cambio de citosina a timina. Un estudio realizado en papa indicaría que el tipo y la concentración de los reguladores de crecimiento en los estadios iniciales de cultivo *in vitro* no generaría variación genética. Los efectos serían más importantes durante el crecimiento del callo y la iniciación de los vástagos. Estos datos sugieren que la fase de callo sería un período sensible en el cual la manipulación hormonal afecta la estabilidad de las plantas regeneradas; de manera que las hormonas inducirían inestabilidad genética sin ser, necesariamente, el origen de la misma.

La **deficiencia o exceso de minerales** en el medio de cultivo podrían ser causa de variación. Este fenómeno se ha observado también en plantas creciendo en condiciones de campo. Un ejemplo típico lo constituyen plantas de lino sometidas a exceso o deficiencias de

azufre, nitrógeno, fósforo, calcio y magnesio. En estas plantas se observaron cambios genómicos estables y heredables. En este caso los cambios fueron inducidos por una fertilización excesiva del suelo, obteniéndose así líneas estables, denominadas "genotrofos", caracterizadas por diferente contenido de ADN nuclear y citoplasmático.

La **edad del cultivo** es otro factor que afecta el nivel de variación, aumentando la proporción de variantes en cultivos envejecidos y también en plantas obtenidas a través de varios subcultivos. Esto se ha observado en ajo, maíz, avena, tabaco, triticale y raigrás triploide. La variación puede minimizarse realizando subcultivos frecuentes de explantos jóvenes. El número óptimo de subcultivos podría estimarse empíricamente luego de realizar pruebas de fidelidad genética en las plantas regeneradas, a través de subcultivos subsecuentes. Una observación común es que en los períodos prolongados de cultivo hay una pérdida de totipotencia y que esto sucedería debido a la acumulación de mutaciones y a la alteración de los genes que son responsables de la regeneración. Sin embargo, un estudio realizado por nuestro grupo de trabajo en la UNS, en colaboración con el IBO-NE, demostró que en plantas micropropagadas de paraíso gigante las variaciones se producen al azar en los diferentes subcultivos, no habiendo una relación lineal entre el número de subcultivos y la cantidad de variación obtenida. La variación en este caso se detectó mediante la técnica de RAPDs a lo largo de de 10 subcultivos (Olmos y col., 2002).

3 Cambios genómicos producidos durante el cultivo de tejidos

Las plantas poseen una amplia capacidad de acomodarse a las situaciones cambiantes de su entorno, pero en algún momento esa capacidad de amortiguación se vuelve deficiente y los organismos caen en un estado de crecimiento subóptimo que parece inducir mecanismos de cambios genómicos. Las bases metabólicas de la interacción entre el estrés y estos cambios son desconocidas. Sin embargo, en la literatura se menciona la posibilidad de ocurrencia de alteraciones a nivel del ADN a consecuencia de diferentes estreses ambientales, depen-

diendo de la intensidad del estrés y del estado de diferenciación de las células, en el momento de experimentarlo. Estos cambios ocurrirían, en parte, debido a una pérdida del control del ciclo celular. Entre las alteraciones genéticas se citan **mutaciones puntuales, cambios en la estructura o el número de cromosomas y activación de elementos genéticos transponibles**. Estos últimos causan reorganizaciones moleculares, no solo por su transposición, sino también porque generan amplificaciones y deleciones. El cultivo *in vitro* también incrementa la frecuencia de intercambio entre cromátidas hermanas o "crossing over" somático.

Varias hipótesis han intentado explicar y relacionar la serie de eventos que tienen lugar durante el cultivo *in vitro*, como son las perturbaciones del ciclo celular, las aberraciones cromosómicas estructurales y numéricas, la activación de transposones y las mutaciones génicas. Kaeppler y Phillips (1993) proponen la existencia una base molecular común para todos estos eventos mutagénicos que comprendería una alteración en los patrones de metilación del ADN. Estos cambios en la metilación podrían afectar la expresión de genes específicos, incluyendo elementos transponibles o podrían afectar la estructura de la cromatina de una manera más global, involucrando, por lo tanto, a un gran número de genes. El mecanismo por el cual suceden estos cambios no ha sido totalmente dilucidado pero se los ha vinculado con una replicación tardía de la heterocromatina que también provocaría eventos de ruptura cromosómica. Los cambios en los modelos de metilación causados por el cultivo de tejidos no serían aleatorios y en raigrás se ha propuesto la existencia de puntos calientes de inestabilidad en el ADN genómico.

Kaeppler y Phillips (1993) indican que plantas bajo estrés severo de nutrientes o de agua no experimentan el mismo tipo de cambios encontrados en los regenerantes de cultivo *in vitro*. El cultivo de tejidos podría representar, por lo tanto, un tipo muy particular de estrés, que podría inducir una respuesta única y un perfil particular de mutación. Un posible efector de esta variación podrían ser los reguladores de crecimiento.

En cuanto a los cambios en el número de cromosomas, la **poliploidía** es el más común de estos fenómenos, y estaría relacionada con

fallas en la mitosis, mientras que la aneuploidía puede surgir por segregación desigual en la mitosis o por fragmentación nuclear, seguida de mitosis. A veces estos cambios en el número cromosómico pueden afectar el fenotipo. En papa, se observaron fenotipos aberrantes por aneuploidía o por duplicación cromosómica; sin embargo, no todos los regenerantes aneuploides o poliploides presentaban cambios fenotípicos evidentes.

La variación somaclonal también puede afectar el **genoma de los plástidos y las mitocondrias**. En plantas de sorgo androestériles obtenidas *in vitro* se observó restauración parcial de la fertilidad y en plantas androestériles de maíz con citoplasma “ T ” (que eran, además, susceptibles a *Helminthosporium maydis*) hubo reversión de la androesterilidad y de la susceptibilidad al patógeno. Estos cambios se correspondían con mutaciones en el ADN mitocondrial. Otro caso de variación debida al cultivo *in vitro* es el albinismo, problema que se presenta frecuentemente en el cultivo de anteras de Gramíneas. En plantas albinas de trigo obtenidas por cultivo de anteras se observaron deleciones y rearreglos en el ADN de los cloroplastos. Si bien parecería que los tejidos somáticos son menos sensibles a la variación, también se ha observado albinismo en plantas regeneradas a partir de los mismos.

4 Niveles de detección de la variación somaclonal

Los mecanismos que operan para inducir variación son numerosos y diversos y, probablemente, actúan en simultáneo, conduciendo a cambios en caracteres cuali y cuantitativos. Detectar y analizar los distintos niveles de modificaciones genómicas generadas por cultivo *in vitro* reviste interés desde un punto de vista práctico, ya que las mismas podrían ser potentes fuentes de material para seleccionar variantes de interés y desde un punto de vista teórico, ya que posibilitarían realizar estudios básicos acerca de las causas de la variación y el posible control de la misma.

La ocurrencia de variación somaclonal puede detectarse con marcadores morfológicos, bioquímicos y moleculares. La correlación de dichos marcadores con caracteres agronómi-

cos es un requisito relevante para su implementación en los programas de mejoramiento.

La utilización de **marcadores morfológicos** para detectar variantes somaclonales ha sido exitosa desde el punto de vista del mejoramiento y citada en varios trabajos de investigación. El examen visual y la utilización de un analizador de imágenes posibilitaron la diferenciación entre fenotipos normales y aberrantes en *Pelargonium*. También se detectaron cambios en altura, tamaño de hojas, número y peso de semillas de plantas de maní obtenidas *in vitro*. En ananá se observaron cambios estables en el color y textura de las hojas, tamaño de los frutos y tasa de proliferación de vástagos; el cultivo de tejidos de violeta africana resultó en un 67% de variación en el color de las flores de plantas regeneradas.

A **nivel fisiológico**, tanto en cereales como en frutales se detectaron y seleccionaron variantes que presentaron resistencia a enfermedades, tolerancia a herbicidas, sales y condiciones de acidez en el suelo, entre otros. Estos estudios se basaron en la utilización de altas presiones de selección durante la regeneración, mediante la adición de agentes selectivos en el medio de establecimiento y regeneración, como inóculos, toxinas, herbicidas, condiciones de pH extremas o concentraciones salinas elevadas.

El estudio del **cariotipo** permite revelar cambios en el número de cromosomas (poliploidías, aneuploidías) y en la estructura de los mismos (translocaciones, inversiones, deleciones y duplicaciones). Las alteraciones cariotípicas constituyen una fuente importante de variación, que muchas veces es subestimada cuando se trabaja con métodos tradicionales de conteo cromosómico. Las técnicas de bandeo cromosómico brindan más información acerca de la estructura cromosómica y las alteraciones que pueden surgir en este sentido. Por ejemplo, en plantas de *Brachycome dichromosomatica* regeneradas a partir de suspensiones celulares, esta técnica permitió detectar reordenamientos cromosómicos, mientras el número cromosómico permaneció estable. La hibridación *in situ* es otra de las técnicas que permiten examinar los cariotipos de una forma más exacta y resulta particularmente útil para revelar anomalías en la estructura de los cromosomas.

Entre los **marcadores bioquímicos** utilizados para analizar plantas regeneradas y sus progenies, se encuentran las isoenzimas. Las mismas permitieron detectar variación en plantas de *Populus tremuloides* regeneradas a través de callos. El análisis se realizó mediante electroforesis en geles de almidón, utilizando los sistemas isocitrato deshidrogenasa (IDH) shiquimato deshidrogenasa (SKDH), malato deshidrogenasa (MDH), fosfogluco-isomerasa (PGI) y 6-fosfogluconato - deshidrogenasa (6-PGD). Los patrones electroforéticos permitieron diferenciar las plantas control de las variantes, sin embargo, las plantas albinas obtenidas en este ensayo no presentaron polimorfismos en los loci estudiados. Tampoco se encontraron variantes cuando se estudiaron líneas de callos derivadas de embriones cigóticos y somáticos de abeto. Los 25 loci analizados, utilizando 15 sistemas isoenzimáticos, mostraron fenotipos isoenzimáticos normales. Otro ejemplo, utilizando esta metodología, se llevó a cabo en líneas isogénicas de *Trifolium pratense* L. que diferían en su capacidad de regeneración. En este caso los patrones isoenzimáticos de esas líneas resultaron idénticos para los sistemas de peroxidasas (PRX), glutamato deshidrogenadas (GDH), alcohol deshidrogenasas (ADH) y esterases (EST).

Si bien las isoenzimas aportan información útil acerca de la variación generada *in vitro*, su análisis refleja los productos de genes expresados, cuya regulación puede estar en cierta medida afectada por factores ambientales o fisiológicos. Por otro lado, sólo se transcribe y traduce una pequeña proporción del genoma. Los **marcadores moleculares** presentan varias ventajas sobre las isoenzimas ya que permiten detectar mutaciones en diferentes tipos de secuencias y además, porque no son influenciados por el ambiente, ni por los estadios fenológicos.

Los **RAPDs** (fragmentos polimórficos de ADN amplificados al azar) permitieron detectar la existencia de polimorfismos en plantas de *Triticum tauschii* obtenidas de callo. Estos marcadores también se utilizaron para evaluar la fidelidad genética en plantas regeneradas de pino, abeto, festuca, roble y gingseng. En caña de azúcar, los marcadores RAPDs permi-

tieron comprobar la susceptibilidad diferencial del genotipo al pasaje por cultivo *in vitro*, además de reunir información para encarar nuevos cruzamientos en programas brasileiros de mejoramiento de esta especie.

Existen numerosos ejemplos que indican que la variación molecular no siempre se expresa a nivel fenotípico y viceversa. Por ejemplo en el género *Musa*, la técnica de RAPDs reveló polimorfismos en plantas micropropagadas de fenotipo normal. Del mismo modo, plantas regeneradas de palmera datilera que presentaban fenotipos florales anormales, tuvieron patrones moleculares normales.

Otros marcadores útiles son los **AFLP** (polimorfismo en la longitud de fragmentos amplificados de ADN), que permitieron detectar la existencia de diferencias moleculares entre plantas de banana con fenotipos normales y aberrantes. Los **microsatélites o SSRs**, iniciales de su nombre en inglés "simple sequence repeats", son altamente informativos, ya que son abundantes y están dispersos a través del genoma. Estos marcadores se utilizaron para el análisis de plántulas de álamo, obtenidas por micropropagación, donde se observaron microsatélites polimórficos, en plantas fenotípicamente normales.

A veces, para detectar una variante obtenida *in vitro* es necesario realizar pruebas específicas. Por ejemplo, cuando se evaluaron somaclones de *Cynodon dactylon* en laboratorio, invernáculo y a campo, para resistencia a la oruga militar. Un somaclón, el Brazos-R3, tenía un rendimiento equivalente al del cultivar madre, pero además era resistente a dicho insecto. Esto se debe a que produce niveles más bajos de un estimulante para la alimentación del insecto. Es decir que mantenía los caracteres agronómicos positivos del cultivar parental, pero tenía un cambio en la producción de un metabolito secundario que confería resistencia a la oruga.

5 La variación somaclonal y su aplicación en el mejoramiento genético

La base del mejoramiento genético es la optimización de las interacciones génicas. Para lograr combinaciones génicas óptimas o superiores se requiere de diversidad genética. Esta

diversidad, que se encuentra normalmente en las poblaciones de individuos, puede provenir de cruzamientos sexuales, mutaciones inducidas (físicas o químicas o producidas por ADN-T, por elementos transponibles o retrotransposones), hibridación somática y transformación genética. La variación somaclonal proporcionaría una fuente adicional de variabilidad genética, potencialmente útil en programas convencionales de mejoramiento.

Algunas de las **ventajas** que presenta la variación somaclonal pueden resumirse de la siguiente manera:

- Es una técnica poco costosa: requiere de un laboratorio de rutina y facilidades de campo.
- Constituye una forma rápida de generar variabilidad genética, particularmente para cultivos con base genética estrecha y que son difíciles de mejorar a través de técnicas tradicionales.
- Es exitosa para eliminar uno o pocos defectos en cultivares bien adaptados.
- Puede utilizarse para mejorar especies de propagación sexual y vegetativa.
- Las tasas de mutación son relativamente elevadas si se comparan con las tasas de mutaciones espontáneas. La variación somaclonal ocurre con una frecuencia de 1 mutación cada 100 plantas regeneradas, en contraste con la tasa esperada de mutación espontánea de 10^{-7} – 10^{-9} mutaciones por par de nucleótidos por generación.
- El conocimiento de las condiciones que generan inestabilidad genética durante el cultivo *in vitro*, permitiría utilizar el fenómeno como estrategia de mejoramiento y permitiría eludirlo en aquellos casos en que se requiera estabilidad genética.
- El nivel de cambios no deseados es menor que cuando se utilizan mutágenos químicos o físicos, ya que, en el caso de la variación somaclonal, la mayoría de los cambios deletéreos producidos son eliminados por el filtro que representa la regeneración de plantas.

Entre las **desventajas** cabe mencionar:

En algunos casos, las variantes somaclonales no han avanzado de la etapa de laboratorio o invernáculo, probablemente debido a que el material seleccionado tiene poca importancia práctica.

- La baja tasa de regeneración de plantas en cultivos de largo término. Generalmente en estos casos existe pérdida de la capacidad morfogénica.
- La regeneración está limitada a genotipos específicos que pueden no ser de mucho interés para los mejoradores.
- Algunos somaclones son inestables (variación epigenética).
- Algunos presentan alteraciones no deseables como aneuploidía, esterilidad, etc.

Desde el punto de vista **productivo y comercial**, una variante somaclonal debería cumplir los siguientes requisitos:

- Involucrar caracteres agronómicamente útiles.
- El nivel de expresión del carácter debe superar al de sus progenitores.
- El carácter mejorado debe estar combinado con todos los otros caracteres agronómicos de la variedad que son importantes para el cultivo.
- La variación debe ser heredable y estable (sin reversión) en la progenie. En general, los mejoradores buscan en los somaclones caracteres de importancia práctica. El recurso es utilizar cultivares altamente adaptados para modificar unos pocos caracteres, ya que resulta más sencillo mejorar selectivamente una variedad de uso corriente que crear una nueva.

5.1 Estrategias para la selección de variantes útiles

Las estrategias que se han utilizado para obtener variación somaclonal comprenden:

a) Obtención de plantas por cultivo de células o tejidos, que luego son analizadas para el carácter deseado.

La **Figura 1** resume los pasos a seguir para la obtención de un cultivar por variación somaclonal. Para este fin se cultiva la mejor variedad disponible y se seleccionan, entre las plantas

regeneradas, aquellas que expresen el carácter de interés. Estas plantas (generación R0) se emplean para generar progenies sexuales (en el caso de plantas con este tipo de repro-

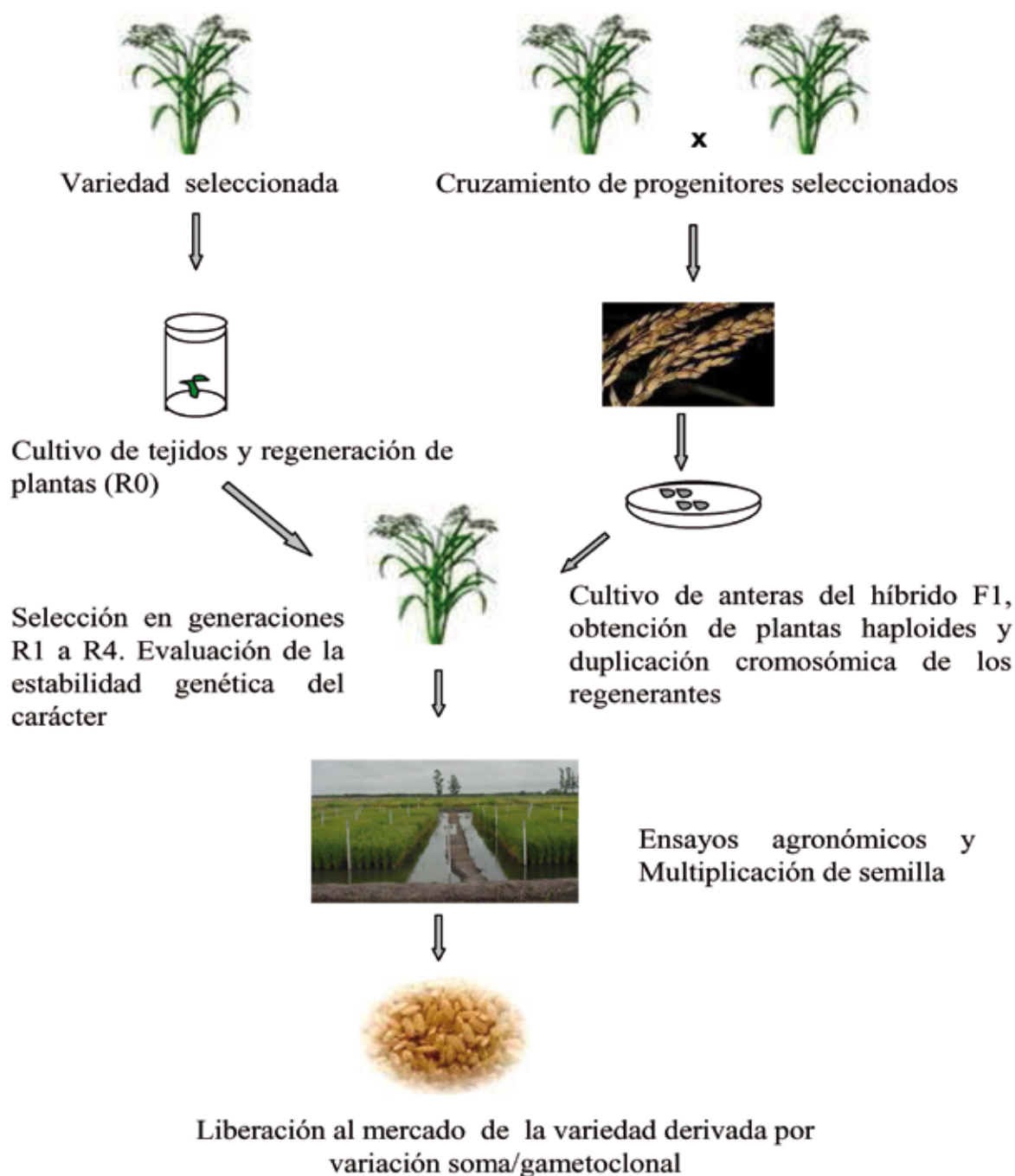


Figura 1. Estrategia para la producción comercial de variantes somaclonales (izquierda) y gametoclonales (derecha), en arroz.

ducción), sobre las cuales se vuelve a realizar la selección para el carácter agronómico buscado, tratando de mantener a la vez todas las características favorables de la variedad. En plantas autógamias, como trigo, arroz y cebada, se considera aceptable la evaluación de la estabilidad del carácter hasta la generación R4. A partir de este momento pueden realizarse cruzamientos de las plantas R4 selectas, con las líneas parentales a fin de determinar mediante el análisis de segregación, la base genética del carácter mejorado. Posteriormente, cuando se tenga semilla disponible, se realizarán pruebas agronómicas en diferentes ambientes, al menos en dos años distintos, para evaluar los efectos del componente ambiental en la expresión del carácter. El programa finaliza con la etapa de multiplicación de semillas para el lanzamiento de la variedad nueva al mercado.

Una modificación para la producción de nuevas variedades está basada en el empleo de variantes gametoclonales (**Fig. 1**). Si se utilizan células haploides de plantas F1, como fuente de explanto, las variantes obtenidas se denominan variantes gametoclonales. Los gametoclonos se refieren a genotipos haploides, derivados del cultivo de anteras. Por medio de esta metodología se podrían recuperar caracteres recombinados de ambos parentales, además de los que pudieran surgir *in vitro*. Las plantas haploides obtenidas son duplicadas mediante la exposición al alcaloide colchicina. Las evaluaciones a campo se realizan en forma conjunta a medida que los nuevos materiales van siendo multiplicados, de manera de aumentar las replicas bajo diferentes condiciones ambientales.

b) Selección a nivel celular o selección *in vitro*. Se realiza con el objetivo de obtener resistencia a estreses bióticos o abióticos y se utiliza generalmente para caracteres tales como resistencia a: toxinas fúngicas, herbicidas, concentraciones salinas elevadas y temperaturas extremas.

Mediante esta práctica pueden cultivarse explantos de distintos genotipos y observarse el comportamiento de los callos frente al agente selectivo, en condiciones de laboratorio. Una vez seleccionados los genotipos resistentes se

procede a la regeneración de las plantas, que son analizadas para ver si expresan la resistencia a campo y luego son introducidas en el programa de mejoramiento. La selección efectuada sobre cultivos celulares, *in vitro*, puede llevarse a cabo mediante dos modalidades:

- **Selección directa** en un solo paso, donde el agente de selección es utilizado en concentraciones dobles o triples de la MIC (concentración mínima que produce un 100 % de inhibición).

- **Selección en varios pasos**, donde la concentración del agente selectivo es gradualmente incrementada en cultivos sucesivos y frecuentes.

El primero es un método simple y efectivo, ya que las células sensibles al agente morirán, permitiendo el crecimiento de las tolerantes. Sin embargo, elevados niveles de estrés serán deletéreos a nivel celular, eliminando materiales que tal vez, con un mayor nivel de diferenciación tisular hubiesen sido capaces de regenerar plantas tolerantes. La elección de un método u otro dependerá de un monitoreo preliminar que brinde información acerca de la reacción del tejido vegetal a las concentraciones letales y subletales del agente selectivo.

En la **Figura 2** se representan las etapas de la selección *in vitro*. En el ejemplo, diferentes variedades de arroz son evaluadas para tolerancia al aluminio. La inducción y la proliferación de callo en el medio de cultivo al que se ha adicionado aluminio, es indicadora de la tolerancia del genotipo al metal en cuestión. Una vez regeneradas las plantas, se requieren evaluaciones posteriores realizadas a campo, en suelos con concentraciones elevadas de aluminio, a fin de corroborar la tolerancia demostrada *in vitro*.

La búsqueda de variantes a nivel celular permite verificar y seleccionar fenotipos adecuados entre millones de células, con una inversión menor en tiempo, espacio y dinero y ha sido extensamente utilizada en diferentes especies entre las que pueden citarse: arroz, clavel, cártamo, banana, vid, frutilla y trigo. Sin embargo, no existe total garantía de que la resistencia manifestada *in vitro* se expresará a nivel de la planta entera. Hay diferentes expli-

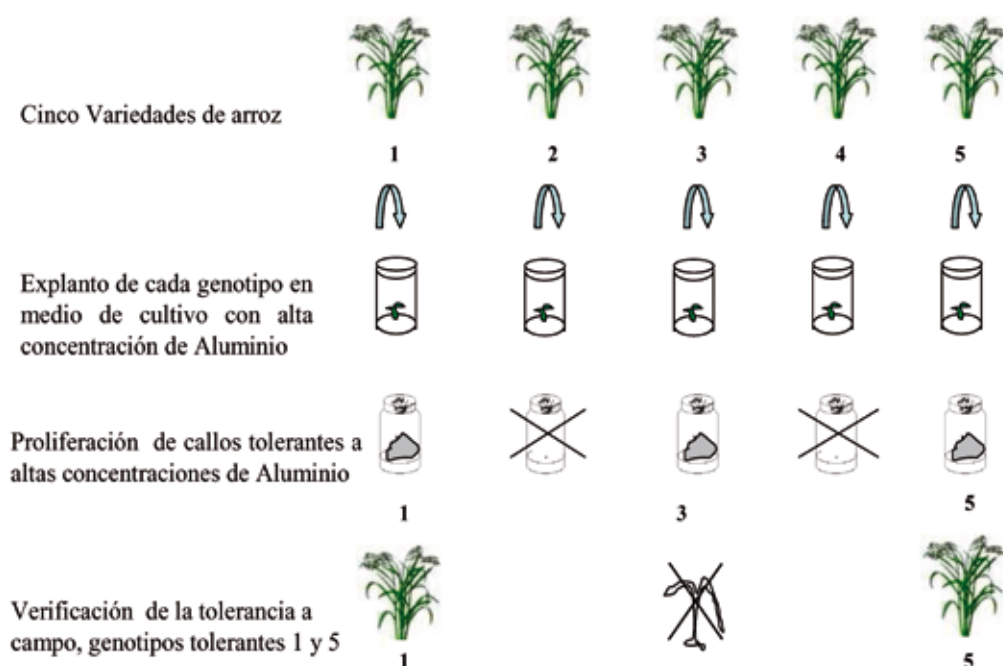


Figura 2. Selección in vitro de plantas de arroz tolerantes a altas concentraciones de aluminio.

caciones para este fenómeno, como por ejemplo que la resistencia o tolerancia observada se deba a cambios epigenéticos, a la naturaleza quimérica del material, al uso de toxinas no específicas (en el caso de resistencia a enfermedades), a la complejidad del carácter a ser seleccionado (como por ejemplo la resistencia a salinidad o sequía) o a la imposibilidad de las células para expresar el carácter cuando se diferencian. Para las dos estrategias que se citaron previamente, **a** y **b**, la obtención de resistencia sólo será posible si ésta existe en la población original (entonces el cultivo *in vitro* sólo serviría para recuperar los genotipos útiles) o bien si surge por variación somaclonal durante el proceso de cultivo.

6 Variantes somaclonales liberadas comercialmente

Dentro de los primeros registros de variación somaclonal en cultivos de importancia económica se encuentra la variación registrada en arroz, donde se informó en detalle la variación obtenida en la progenie derivada de la autose-

lección de plantas regeneradas. Se lograron avances en el mejoramiento de esta especie en caracteres cuali y cuantitativos. Ejemplos en éste y otros cultivos importantes, con variedades comerciales obtenidas por esta técnica, se detallan en la **Tabla 1**.

Además, se pueden mencionar logros en otros cultivos, por ejemplo:

En **papa**, se logró resistencia a *Phytophthora infestans*, a *Alternaria solani* y a la colonización por áfidos que transmitían el virus Y (PVY), y el virus del enrollamiento de la hoja (PLRV). En este caso la resistencia surgió a través del cultivo de protoplastos provenientes de suspensiones celulares cromosómicamente variables del cultivar "Russet Burbank".

En **banana** se obtuvo resistencia a *Fusarium* en cultivares que no habían podido ser mejorados por métodos tradicionales. No obstante, para lograr una variedad con rendimiento equiparable a las variedades no resistentes, se necesitó un trabajo posterior que permitió combinar ambas características en un somaclón.

Especie	Carácter	Origen
Geranio	Arquitectura floral	Purdue Univ., USA
Batata	Calidad de raíces y arquitectura del canopeo	North Carolina Research Service, USA
Caña de azúcar	Resistencia a estrés abiótico y a enfermedades	Sugarcane Research Centre, Fiji
Maíz	Contenido de triptófano	Molecular Genetic, USA
Tomate	Contenido de materia seca	DNA Plant technology of New Jersey, USA
Apio	Contenido de materia seca	DNA Plant technology of New Jersey, USA
Arroz	Resistencia a enfermedades	Plantech Research Institute, Japan Univ. Agricultural Sciences, Hungary
Mostaza	Rendimiento	ICAR, India

Tabla 1. Especies con variedades obtenidas por la estrategia de variación somaclonal.

En **tabaco**, se obtuvieron cultivares tolerantes a aluminio y resistentes a herbicidas.

También, mediante la aplicación de esta estrategia se obtuvieron cambios interesantes para su explotación comercial en especies ornamentales. Variaciones en el color de las flores, la arquitectura de la planta y el número de flores por planta se citaron en **gerbera, clavel, crisantemo, tulipán, violeta africana y begonia**.

Dentro de las **especies forrajeras**, se han observado variaciones en plantas de **alfalfa** regeneradas por cultivo *in vitro*, para caracteres como altura y resistencia a *Fusarium oxysporum*. En **gramíneas forrajeras** como *Lolium* y *Festuca arundinacea* se han citado cambios, en varios caracteres como por ejemplo: morfología de planta, forma y tamaño de hoja y espiga, desarrollo floral, vigor y supervivencia, y en pasto bermuda (*Cynodon dactylon*), resistencia al moteado de la hoja

En el laboratorio de Genética del Dpto. de Agronomía de la UNS se llevó a cabo un pro-

yecto para obtener somaclones de pasto llorón. Se trabajó con varios cultivares de esta gramínea apomíctica y luego de la evaluación de un gran número de plantas se seleccionaron los siguientes materiales:

- Una planta diploide sexual, obtenida a partir de un cultivar tetraploide apomíctico. Este material fue registrado en el Instituto Nacional de Semillas.

- Utilizando un tratamiento de duplicación cromosómica, se trató semilla, de una planta R₁ derivada de la planta anterior obteniendo un genotipo tetraploide, altamente sexual, también registrado.

Estos dos materiales se utilizan actualmente para realizar estudios básicos acerca del modo de reproducción (apomixis) y en la generación de poblaciones de mapeo para el análisis del modo reproductivo y de caracteres agronómicos de importancia.

- Dos plantas heptaploides apomícticas a partir de un cultivar tetraploide apomíctico. Una

de dichas plantas fue registrada como cultivar Don Luis, en honor al Ing. Luis Mroginski. Este cultivar presenta buenas características agromónicas.

La obtención de variación *in vitro*, en **trigo**, y en otros cereales como **cebada** es altamente dependiente del genotipo. En trigo, se ha obtenido resistencia a *Helminthosporium sativum*. En **cebada** se encontró tolerancia en somaclones regenerados en medios conteniendo el herbicida glifosato. En **sorgo**, se obtuvo variación estable para altura, número de macollos, mayor producción de granos y tolerancia a suelos ácidos y a sequía. En plantas regeneradas de **triticale y trigo** se informaron variaciones a nivel del ADN mitocondrial y de proteínas de la semilla, como las gliadinas. En ambas especies se informaron cambios estables en varios caracteres como por ejemplo: longitud de la espiga, número de granos por espiga, peso de granos, densidad y biomasa de la espiga, contenido de proteína en grano, altura de la planta, fertilidad, número de macollos, color del grano, tiempo de espigazón, dureza, sensibilidad al ácido abscísico y color de las glumas. Las mutaciones observadas fueron de dominantes a recesivas y viceversa.

El único antecedente en nuestro país de búsqueda de variación somaclonal en trigo, es un estudio acerca de la estabilidad *in vitro* de tres cultivares con elevados niveles de inestabilidad cariotípica espontánea. Se evaluaron caracteres tales como estructura cromosómica, patrón de gliadinas, color del grano y de las glumas, tipo de aristas, niveles de clorofila y morfología de la planta. Sólo se detectó, como consecuencia del cultivo *in vitro*, una translocación no descrita previamente y un patrón diferente de gliadinas. En este caso, se concluyó que la técnica no fue efectiva para inducir variación que pudiera ser utilizada en programas de mejoramiento (Franzone y col., 1996).

La variación somaclonal ha sido vastamente registrada y tratada en la bibliografía. Sin embargo, su utilización como estrategia para la obtención de variantes agrónomicamente aprovechables, es discutida. No obstante, además de su aplicación en la generación de variabilidad genética (que resulta particular para cada grupo de plantas, especie, genotipo y condicio-

nes), es un fenómeno a considerar cuando se requiera utilizar cultivo de tejidos para regenerar plantas genotípicamente estables.

7 Lecturas recomendadas

- BREGITZER P.; HALBERT, S.; LEMAUX, P. 1998. Somaclonal variation in the progeny of transgenic barley. *Theor. Appl. Genet.* 96: 421-425.
- BREGITZER P.; S. ZHANG; M.-J. CHO; P. G. LEMAUX. 2002. Reduced Somaclonal Variation in Barley Is Associated with Culturing Highly Differentiated, Meristematic Tissues. *Crop Sci.* 42:1303-1308.
- CASSELLS A.C.; CROKE, J.T.; DOYLE, B.M. 1997. Evaluation of Image Analysis, Flow Cytometry, and RAPD Analysis for the Assessment of Somaclonal Variation and Induced Mutation in Tissue Culture Derived *Pelargonium* Plants. *Angew. Bot.* 71: 125-130.
- CARDONE S.; POLCI P.; SELVA JP.; MECCHIA M.; PESSINO, S.; HERMANN, P.; CAMBI, V.; VOIGT, P.; SPANGENBERG G.; V. ECHENIQUE. 2006. Novel genotypes of the subtropical grass *Eragrostis curvula* for the analysis of apomixis (diplospory). *Euphytica* 151 (2): 263-272.
- CROUGHAN S.; S. QUISENBERRY; M. EICHHORN; JR., P. COLYER; T. BROWN. 1994. Registration of Brazos-R3 bermudagrass germplasm. *Crop Science.* 34: 542.
- DA SILVA C.; C. MANGOLIN; A. MOTT; M. MACHADO. 2008. Genetic diversity associated with *in vitro* and conventional bud propagation of *Saccharum* varieties using RAPDS analysis. *Plant Breeding.* Vol 127 (2): 160-165.
- EASTMAN P.; WEBSTER, F.; PITEL, J.; ROBERTS, D. 1991. Evaluation of somaclonal variation during somatic embryogenesis of interior spruce (*Picea glauca engelmannii* complex) using culture morphology and isozyme analysis. *Plant Cell Reports* 10: 425-430.
- EVANS D.; SHARP, W. 1983. Single gene mutations in tomato plants regenerated from tissue culture. *Science.* 221: 949-951.
- FRANZONE P.; SUAREZ Y; SOLARI R; FAVRET A; RÍOS R; DÍAZ PALEO A. 1996. Somaclonal variation in three Argentinean varieties of *Triticum aestivum* with different karyotypic instability. *Plant Breed.* 115: 89-93.
- GALLEGO F.; MARTÍNEZ, I.; CELESTINO, C.; TORIBIO, M. 1997. Testing somaclonal variation using RAPDs in *Quercus suber* L. somatic embryos. *Int. J. Plant Sci.* 158(5): 563-567.
- GAUTO ACOSTA M. 2008. Evaluación a campo de somaclones de *Lolium perenne* y sus progenies

- de medios hermanos. Trabajo de intensificación para optar al grado de Ingeniero Agrónomo. Facultad de Agronomía. (UBA). 73 pp.
- GEIER T. 1991. Chromosome variability in callus produced plants. In Genetics and Breeding of Ornamental Species. 79-106. Harding & Mol. eds.
- KAEPLER S. M.; PHILLIPS, R. L. 1993. In Vitro Cell Dev.Biol. 29: 125-130.
- JAIN S. Micropropagation of selected somaclones of *Begonia* and *Saintpaulia*. 1997 J. Biosci. Vol. 22, Number 5 (585-592).
- KRIKORIAN A. 1991. Estabilidad genotípica en células, tejidos y plantas derivados del cultivo in vitro. En Cultivos de tejidos en la Agricultura. CIAT. Roca W. y Mroginsky L. Eds.
- LARKIN P.; SCOWCROFT. W. 1981. Somaclonal variation - a novel source of variability from cells cultures from plant improvement. Theor. Appl. Genet. 60, 197-214.
- LINACERO R.; FREITAS ALVES E.; VASQUEZ A. 2000. Hotspots of DNA instability revealed through the study somaclonal variation in rye. Theor Appl Genet. 100: 506-511.
- MADLUNG A.; COMAI, I. 2004. The effect of stress on genome regulation and structure. Annals of Botany. 94:481-495.
- OLMOS S.; G. LAVIA, M. DI RENZO, L. MROGINSKI; V. ECHENIQUE. 2002. Genetic analysis of variation in micropropagated plants of *Melia azedarach* L. In Vitro Cellular & Developmental Biology Plant. 38: 617-622.
- PESCHKE V.M.; PHILLIPS, R.L. 1992. Genetic implications of somaclonal variation in plants. Adv. Genet. 30: 41-75. Scandalios & Wright eds.
- PODWYSZYNSKA M. 2005. Somaclonal variation in micropropagated tulips based on phenotype observation. Journal of Fruit and Ornamental Plant Research. Vol 13: 109-122.
- SVABOVA L; LEBEDA A. 2005. In Vitro Selection for Improved Plant Resistance to Toxin-Producing Pathogens. Journal of Phytopathology. Vol 153: 52-64.
- UMBECK P.; B. GENGENBACH. 1983. Reversion of male sterile T cytoplasm maize to male fertility in tissue culture. Crop. Science. 23: 584-588.
- VENUTO BC, CROUGHAN SS, PITMAN WD, JESUP RW, RENGANAYAKI K, BURSON BL. 2007. Variation among hexaploid *Paspalum dilatatum* Poir. regenerants from tissue culture. Australian Journal of Experimental Agriculture. 47:1109-1116
- ZALEWSKA M., LEMA-RUMINSKA, J.; MILER, N. 2007. In vitro propagation using adventitious buds technique as a source of new variability in *Chrysanthemum*. Scientia Horticultural. Vol. 113: 70-73.

II. CAPÍTULO 6

Aplicación de la transformación genética al mejoramiento vegetal

Marina L. Díaz, Diego C. Zappacosta,
Pascual M. Franzone y Raúl D. Ríos

1 Introducción

El mejoramiento genético vegetal se originó hace aproximadamente 10.000 años, cuando el hombre se hizo agricultor y comenzó la domesticación de las plantas. En el siglo XX, con la incorporación de los cruzamientos sexuales, el conocimiento de la biología floral de las especies, el desarrollo de la genética y de la estadística experimental, entre otros avances, se conformaron los métodos de mejoramiento actualmente utilizados. El mejoramiento genético convencional se basa en la existencia de variabilidad genética para los caracteres que se desea mejorar y la manipulación de la misma mediante la reproducción sexual. Esto hace que el aprovechamiento de la variabilidad este restringido por barreras de compatibilidad reproductiva. El reciente desarrollo de métodos de transferencia de genes que no implican cruzamientos, como la transformación genética, permite superar esta limitación, abriendo nuevas perspectivas en el mejoramiento de las plantas.

La transformación genética o transferencia de genes, técnica también conocida como ingeniería genética, permite introducir en plantas genes provenientes no solo de otras especies vegetales muy alejadas desde el punto de vista evolutivo sino incluso de hongos, virus, bacterias y animales. Asimismo, a través de esta tecnología es posible modificar la expresión de genes presentes en el genoma de la planta. Si bien se suele denominar OGMs (organismos genéticamente modificados) a las plantas obtenidas mediante esta metodología, es oportuno considerar que todas las plantas que han sido mejoradas por el hombre a partir de su domesticación, han sido modificadas genéticamente por lo cual son OGMs y consideramos más apropiado utilizar para las plantas obtenidas mediante transformación genética la deno-

minación de plantas transgénicas. Conviene destacar que la transformación de plantas es una tecnología que aporta variabilidad genética conocida sin alterar el fondo genético por lo que puede ser considerada como una metodología conservativa de mejoramiento, similar, en ese sentido, a la mutagénesis inducida o a la retrocruza. Este último aspecto es de gran importancia ya que la creación de cultivares es un proceso acumulativo, es decir, que se desea introducir características favorables sin perder las mejoras logradas anteriormente. El germoplasma transgénico es posteriormente incorporado al proceso de mejoramiento el cual dependerá de la especie y del tipo de cultivar a obtener.

En 1983 se informaron los primeros experimentos de expresión de un transgen (gen introducido por vía asexual) en células vegetales y al año siguiente se obtuvieron las primeras plantas transgénicas (tabaco y petunia). Desde entonces se ha extendido la aplicación de esta tecnología a más de 120 especies. Las plantas transgénicas se obtienen por diversos métodos, los que han sido modificados para cada especie en particular, aumentándose de esta forma la eficiencia de los mismos.

Entre sus aplicaciones de interés agropecuario se encuentran la obtención de plantas con resistencia a estreses bióticos (virus, insectos, hongos y bacterias), a estreses abióticos (salinidad, sequía, etc.), tolerancia a herbicidas para facilitar el control de malezas y modificación de la calidad nutricional de los cultivos entre otras. La transformación genética también constituye una herramienta útil para estudios básicos que permiten conocer y/o profundizar acerca de la estructura y función de genes específicos, aspecto particularmente relevante en la era genómica.

2 Requerimientos para la obtención de plantas transgénicas

Para todas las técnicas de transformación desarrolladas hasta el momento es necesario disponer del **transgen** a introducir (éste consiste en secuencias regulatorias y codificante clonadas en un vector de transformación) y de una metodología eficiente para su transferencia al genoma vegetal. Luego se induce el de-

sarrollo de plantas mediante distintas técnicas de cultivo de tejidos y se procede al análisis molecular de las plantas regeneradas *in vitro* para identificar aquellas que porten y expresen el o los transgenes en los niveles deseados. Finalmente, mediante experimentos de campo y laboratorio se estudia el comportamiento de los individuos transgénicos y su descendencia.

Por lo tanto, los elementos básicos que se requieren en trabajos de transformación genética en plantas son:

1. Un sistema eficiente de cultivo de tejidos que permita regenerar plantas completas y fértiles.
2. Vectores apropiados, que permitan el clonado del gen de interés y su transferencia al tejido blanco de transformación.
3. Un protocolo de transformación, es decir, un sistema de transferencia de genes y de selección del material transformado.
4. Herramientas de análisis molecular para detectar la presencia del transgen y los productos del mismo en la planta.

Antes de iniciar la descripción de los ítems anteriores, resulta importante destacar que para lograr una planta transgénica deben ocurrir tres procesos en una misma célula:

- a) El transgen debe ser transferido al interior de la célula,
- b) El transgen debe integrarse al ADN celular y
- c) Se debe regenerar una planta completa a partir de la célula transgénica en la que se verificaron los procesos a y b.

Dado que las células tienen diferente competencia o capacidad de respuesta para cada uno de estos procesos, la puesta a punto de un protocolo eficiente de transformación genética requiere maximizar la cantidad de células competentes para todos ellos de manera simultánea.

2.1 Cultivo de tejidos vegetales

Los métodos de transformación más utilizados actualmente se basan en la obtención de células transgénicas y posterior recuperación de plantas completas y fértiles a partir de las mismas a través del cultivo y selección *in vitro*. Esto es posible gracias a la propiedad de

totipotencia expresada por las células vegetales. En la mayoría de las especies se observa una importante influencia del genotipo en la respuesta al cultivo *in vitro*, razón por la cual es frecuente que se utilicen genotipos modelo (de alta respuesta) con fines experimentales los cuales no necesariamente presentan interés agronómico. Por ello, cuando se usa esta tecnología con fines de mejoramiento genético es muy importante conocer la respuesta morfo-genética de distintos genotipos con adaptación local, de modo de poder transformar directamente genotipos con valor agronómico. Por otra parte, en el cultivo *in vitro*, un prolongado período de subcultivos puede inducir la aparición de variación somaclonal no deseable ya que es conveniente introducir solo las modificaciones que se desean y en forma controlada.

2.2 Construcción del vector

Para introducir un transgen es necesario que el mismo sea incorporado previamente en un vector (por ejemplo un plásmido). Para ello, mediante la tecnología del ADN recombinante, se digiere el ADN extraído de un organismo, cualquiera sea su origen, con enzimas de restricción. Estas endonucleasas tienen la capacidad de reconocer en el ADN secuencias específicas compuestas por pocos nucleótidos y posteriormente producir cortes en las mismas. Los fragmentos de restricción así obtenidos pueden ser ligados enzimáticamente a vectores de clonado, obteniéndose, de este modo, clones de ADN recombinante (ver parte I). Alternativamente, se puede utilizar una tecnología de clonado basada en el mecanismo de recombinación sitio-específica del fago lambda conocida como sistema GATEWAY (Invitrogen).

Un transgen está compuesto por una secuencia codificante (región traducible comprendida entre los codones de iniciación y terminación de la traducción) y por secuencias regulatorias que determinan tanto el momento del desarrollo de la planta como el tejido y el nivel en el que se expresará. Muchas veces los genes utilizados provienen de bacterias (procariotas) y usualmente no pueden expresarse eficientemente en células eucariotas. Por lo tanto, resulta necesario reemplazar las secuencias regulatorias bacterianas por otras aptas para su

expresión en células vegetales. En este contexto, la secuencia más importante es la correspondiente al promotor, sitio del ADN al cual se une la enzima ARN-polimerasa para iniciar el proceso de transcripción (**Fig. 1**). En la elección del promotor a utilizar en la construcción del transgen, hay que considerar la especie vegetal a transformar, ya que su nivel y patrón de expresión pueden variar al ser utilizados en especies distintas a la de origen del mismo. Dentro de los promotores se distinguen aquellos constitutivos, que permiten la expresión del gen en toda la planta en forma continua, los inducibles, que responden a factores ambientales y finalmente los específicos de tejido que permiten la transcripción en órganos y tejidos particulares (**Tabla 1**). Los promotores pueden ser modificados con el fin de aumentar la expresión de los genes que regulan. Así, pueden truncarse, adicionárseles un intrón o unírseles secuencias de otros promotores. Además, es necesario que el transgen disponga de una re-

gión no traducida en el extremo 3' del mismo, que incluya la señal de corte y poliadenilación (terminador), necesaria para el correcto procesamiento del transcripto correspondiente.

Por otra parte, el nivel y patrón de expresión del gen también puede estar afectado por la posición del mismo en el genoma de la planta, fenómeno conocido como “efecto de posición”. Esto puede deberse a la presencia de otras secuencias regulatorias cercanas como intensificadores y silenciadores, a la estructura de la cromatina, al patrón de metilación, etc. Este aspecto es particularmente relevante considerando que con los métodos de transformación genética nuclear utilizados actualmente, las inserciones de los transgenes en el genoma de la planta son al azar. Así, la cantidad de proteína producida por un transgen comúnmente varía más de 100 veces entre individuos transformantes obtenidos en el mismo experimento. La solución para evitar los “efectos de posición” es dirigir la secuencia de interés a sitios específi-



Figura 1: Estructura molecular del transgen

Tabla 1: Promotores usados en la transformación genética de plantas

Promotores	Constitutivos	<i>nos</i> (nopalina sintetasa de <i>Agrobacterium</i>) 35 S (virus del mosaico del coliflor) <i>Ubi</i> (ubiquitina de maíz) <i>Act 1</i> (actina de arroz)
	Específicos de tejido	<i>TA 29</i> (tapete de la antera de tabaco) faseolina (cotiledones de poroto) <i>TobRB 7</i> (raíz de tabaco) patatina (tubérculo de papa) glutenina (endosperma de trigo)
	Inducibles	subunidad pequeña de Rubisco (luz) alcohol deshidrogenasa-1 (anaerobiosis) proteína de shock térmico (calor)

cos del genoma vegetal, elegidos por su patrón de expresión adecuado y estable. Esto podría lograrse usando sistemas de recombinación heteróloga sitio-específicos o mediante reemplazo génico por recombinación homóloga.

2.3 Métodos de transformación

La pared celular constituye un obstáculo para la entrada del ADN a la célula que todos los métodos de transformación genética tienen que superar de algún modo. Estos métodos pueden dividirse en:

a) Transformación mediada por *Agrobacterium*, vector biológico que participa del proceso de transferencia.

b) Métodos de transformación genética directa, también llamados físicos, mediante los cuales, por distintos mecanismos no biológicos, se introduce el ADN en la célula.

2.3.1 Transformación mediada por *Agrobacterium*

Las bacterias del género *Agrobacterium* son Gram-negativas, aeróbicas obligadas y viven en el suelo. Ellas son capaces de desarrollar un crecimiento saprofítico o parasítico. El género comprende cuatro especies fitopatogénicas, dos de ellas ampliamente estudiadas (*A. tumefaciens* y *A. rhizogenes*). Ambas especies son capaces de infectar una amplia variedad de especies de dicotiledóneas. La patogénesis se inicia a partir de heridas, provocando la proliferación de las células individuales infectadas. Así, *A. tumefaciens* causa tumores, enfermedad que se conoce como ‘agalla de la corona’ y *A. rhizogenes* induce la proliferación de raíces dando lugar a la enfermedad denominada ‘raíz en cabellera’. La capacidad patogénica de estas bacterias está asociada a la presencia de megaplásmidos (150-200 kilo pares de bases o Kb) llamados Ti (por ‘tumor-inducing’ o inductor de tumores) o Ri (por ‘root-inducing’ o inductor de raíces), presentes en algunas de las agrobacterias. Se demostró que durante la patogénesis un fragmento de estos plásmidos llamado T-ADN (por ‘transfer-DNA’), es transferido a la célula vegetal, donde se integra al ADN cromosómico y cuya expresión causa proliferación de células de la planta a través de la síntesis y alteración de la respuesta a hormonas

vegetales. El T-ADN contiene genes, llamados oncogenes, que se expresan eficientemente en la célula vegetal infectada y producen síntesis de hormonas vegetales, responsables de la proliferación anormal del tejido. Además, contiene los genes responsables de la síntesis de opinas (fuente de carbono y nitrógeno para la bacteria).

El sistema mediado por *A. tumefaciens* es el más estudiado y utilizado en la transformación de plantas. El T-ADN está delimitado por dos repeticiones directas imperfectas de 25 pares de bases (pb) que lo flanquean, llamadas bordes derecho e izquierdo (**Fig. 2**). Estos bordes son los únicos elementos en *cis* necesarios para dirigir el procesamiento del T-ADN. Cualquier fragmento de ADN ubicado entre estos bordes puede ser transferido a la célula vegetal. Contrariamente a lo que sucede con otros tipos de secuencias móviles de ADN, como los transposones autónomos, el T-ADN no codifica los productos que median su transferencia. El T-ADN es una región relativamente grande (ca. 20 Kb) que contiene genes con secuencias regulatorias (promotores y señales de poliadenilación) típicamente eucarióticas que permiten su expresión eficiente en células vegetales.

Desde la década de 1950 se sabe que los tumores de la agalla de la corona se desarrollan si hay *A. tumefaciens* patogénicas en presencia de heridas. Un aspecto destacable de esta bacteria es que usa la respuesta de la planta a las heridas (cicatrización y defensa) como quimioatractivo y activador del proceso de patogénesis. Luego de la adhesión de la bacteria a la célula vegetal, etapa en la que están involucrados genes cromosómicos bacterianos (*chv A*, *chv B*, *chv E*, *cel*, *psc A* y *att*), se produce el procesamiento y la transferencia del T-ADN, mediados por los genes *vir* (por virulencia) que son inducidos por azúcares y compuestos fe-

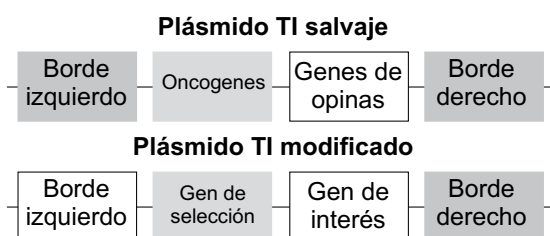


Figura 2: Estructura del T-DNA

nólicos, como la acetosiringona, producidos por células vegetales heridas. Se conoce con mucho detalle la etapa de la patogénesis que ocurre en la bacteria (ver revisión de Gelvin, 2000). La región de virulencia (de alrededor de 30 Kb) está organizada en operones esenciales para la transferencia del T-ADN (*vir A*, *vir B*, *vir D*, *vir G*) o que permiten incrementar la eficiencia de la transformación (*vir C*, *vir E*). El conocimiento de la interacción de *Agrobacterium* con las plantas se profundizará a partir de la disponibilidad (2001) de la secuencia nucleotídica completa del genoma de esta bacteria.

El desarrollo de la patogénesis causada por *Agrobacterium* representa una situación única en la naturaleza: la transferencia de un elemento genético (T-ADN) de un organismo procariota a un organismo eucariota superior, con su subsiguiente integración y expresión en el genoma hospedante. Este mecanismo de ingeniería genética natural es aprovechado para la transferencia de genes de interés a las plantas. Para ello, los oncogenes y los genes de síntesis de opinas presentes en el T-ADN, son reemplazados por un marcador seleccionable y el gen a transferir (**Fig. 2**). El método llamado 'del explante' (Horsch *et al.*, 1984), consiste en inocular un explante (órgano vegetal) con *A. tumefaciens*, dejar la bacteria en contacto con el mismo durante un cierto tiempo en el cual se produce la transferencia del T-ADN modificado. Posteriormente se transfieren los explantes a un medio de cultivo que contiene un antibiótico que actúa como bacteriostático para detener el desarrollo de *Agrobacterium* y el agente selectivo correspondiente al gen marcador seleccionable utilizado. Una vez completado el protocolo de cultivo y selección *in vitro* se recuperan las plantas transgénicas (**Fig. 3**). El análisis por hibridación molecular de plantas transgénicas y su progenie ha demostrado que el T-ADN se incorpora al ADN cromosómico y se hereda en forma estable.

Los plásmidos Ti sin oncogenes se denominan 'desarmados', son de gran tamaño y resulta difícil introducir genes en su T-ADN usando técnicas habituales de ADN recombinante. Por esta razón se han desarrollado dos sistemas de vectores para introducir genes en *Agrobacterium*: los vectores cointegrados, y los bina-

rios. En los vectores cointegrados la inserción del ADN que contiene los transgenes dentro del T-ADN de un plásmido Ti desarmado, se logra por recombinación homóloga. En el sistema alternativo, sobre la base de la capacidad de los genes de virulencia de actuar en *trans*, movilizándolo el T-ADN presente en otro plásmido, se construyen los denominados vectores binarios que contienen un T-ADN no oncogénico en un plásmido pequeño con un origen de replicación funcional en un amplio espectro de hospedantes, características que permiten su fácil manipulación genética en *E. coli*. La introducción de un vector binario a una cepa de *Agrobacterium* que contenga un plásmido llamado 'helper' de virulencia (con la región *vir* intacta y sin T-ADN), la hace apta para la transferencia del T-ADN a las células vegetales. Si bien ambos tipos de vectores son herramientas eficientes para la transformación se aprecia una notable preferencia por el uso de vectores binarios.

La integración del T-ADN en el ADN cromosómico de la planta se produce al azar, por recombinación ilegítima, preferencialmente en regiones genómicas con actividad transcripcional y mediado por proteínas de la bacteria y de la planta. Este sistema de transformación permite transferir fragmentos de ADN de hasta 150 Kb. Para ello se utilizan vectores especiales que tienen características tanto de cromosomas artificiales de bacterias (BACs) como de vectores binarios. El uso de estos vectores permite clonar fragmentos de ADN de gran tamaño y posteriormente transferirlos al genoma vegetal vía *A. tumefaciens*. Esta tecnología es de gran utilidad para el clonado posicional de genes.

Más de 600 especies vegetales son hospedantes naturales de *A. tumefaciens*. Estas son en su mayoría dicotiledóneas y gimnospermas y más raramente monocotiledóneas. Para muchas de ellas se han puesto a punto protocolos de transformación genética basados en este vector. El interés en el desarrollo de este tipo de tecnología hizo que se expandiera el rango de hospedantes de *A. tumefaciens* a especies que no son susceptibles a este patógeno en condiciones naturales. Esto fue posible debido al amplio conocimiento que se tiene de la interacción *Agrobacterium*/célula vegetal. Así, se

ha puesto énfasis en la utilización de *A. tumefaciens* como vector de transformación en gramíneas y se han desarrollado protocolos en varias especies de este grupo (arroz, maíz, cebada, trigo y gramíneas forrajeras). Cabe notar que su aplicación es rutinaria en arroz y maíz.

La transformación con *A. rhizogenes* tiene fundamentalmente dos aplicaciones: la producción de raíces con alta tasa de crecimiento capaces de sintetizar metabolitos secundarios como productos farmacéuticos, aditivos alimentarios y cosméticos y por otra parte representa una valiosa herramienta para la estimulación de la rizogénesis en especies recalcitrantes, por ejemplo leñosas.

2.3.2 Transformación directa o por métodos físicos

La primer metodología de transformación genética de plantas desarrollada fue la de *A. tumefaciens*, pero no resultó inicialmente de utilidad para abordar la transformación de especies de gran importancia económica como los cereales, debido a que éstos no son hospedantes naturales de esta bacteria. Esta situación condujo al desarrollo de los métodos físicos de transformación. En ellos el transgen es introducido en la célula vegetal mediante distintas técnicas que se detallan a continuación:

Transformación de protoplastos

La introducción y expresión de ADN foráneo en protoplastos fue el primer método de transferencia directa claramente demostrado en plantas. Se disponía, para algunas especies, de procedimientos eficientes para la regeneración a partir de protoplastos, células que carecen temporariamente de pared celular que es la principal barrera para la introducción de ADN en las células vegetales. Los protoplastos pueden ser aislados en forma mecánica o por un proceso enzimático que digiere la pared. Así se obtiene una suspensión que contiene millones de células individuales lo que favorece la transformación de células aisladas.

Los protoplastos pueden ser transformados utilizando polietilenglicol (PEG), electroporación, microinyección o liposomas. La transformación de protoplastos mediada por PEG es el método más comúnmente usado. Tanto el

PEG como la electroporación producen poros en la membrana plasmática por alteración de la polaridad de la misma y por ellos penetra el ADN foráneo. En el último caso se somete a los protoplastos a un campo eléctrico. Ambas técnicas permiten el tratamiento simultáneo de un gran número de protoplastos. La microinyección es un método difícil y laborioso que consiste en la introducción de ADN dentro de protoplastos individuales mediante el uso de capilares de inyección y micromanipulador y con esta metodología es posible lograr un alto grado de integración del ADN foráneo.

Cabe notar que el cultivo de protoplastos es la metodología más sofisticada de cultivo *in vitro* de plantas por lo cual representa gran complejidad experimental y no está disponible más que para algunas especies y dentro de ellas particularmente en genotipos modelo. Por ello se desarrollaron metodologías alternativas de transformación directa como la electroporación de tejidos, el uso de fibras de carburo de silicio para facilitar la entrada del ADN a las células en cultivo y el bombardeo con microproyectiles o micropartículas siendo este último el más utilizado actualmente dentro de los métodos físicos.

Bombardeo de micropartículas

Es un proceso por el cual micropartículas cubiertas con ADN son aceleradas por un gas comprimido e introducidas en células vegetales. Inicialmente la fuerza impulsora de las partículas estaba dada por pólvora, pero luego fue reemplazada por el sistema de helio comprimido que brinda una mejor regulación de la fuerza, distribución de microproyectiles y mayor reproducibilidad entre bombardeos. Se utilizan microproyectiles de oro o tungsteno (químicamente inertes) cuyos tamaños van desde 0,5 a 3 µm, que al ser disparados a grandes velocidades pueden atravesar pared y membranas de la célula vegetal bombardeada sin causarle daños significativos (Klein *et al.*, 1987). Como blanco de bombardeo se pueden emplear diversos tipos de explante vegetal, desde células o protoplastos hasta plántulas completas, pasando por tejidos organizados en embriones y meristemas. El explante es generalmente sometido a un tratamiento osmótico pre y post bombardeo que produce plasmólisis celular,

evitando que el impacto y la penetración de las partículas dañen las células (**Fig. 3**). Los vectores plasmídicos que se usan en este tipo de procedimiento solo requieren un origen de replicación que permita un alto número de copias de los mismos en *E. coli*, aspecto que facilita en la práctica la preparación del ADN necesario en grandes cantidades para la transformación genética por este método.

Esta técnica, sin embargo, tiene limitaciones. Algunas especies oponen una resistencia natural a la penetración de las partículas, dada por cutículas endurecidas, paredes celulares lignificadas o superficies vellosas. Sin embargo la principal limitación del método continúa siendo la baja relación entre el total de células sometidas al bombardeo y el número de células que logran incorporar de manera permanente el transgen. A pesar de esta limitación, la versatilidad de la aceleración de partículas para introducir transgenes ha superado muchas de las barreras asociadas a otros métodos de transformación, como son el rango de huéspedes de *Agrobacterium* y las dificultades inherentes al cultivo y regeneración de protoplastos. Este método, conocido también como biolística, ha demostrado ser una buena opción para la producción de plantas transgénicas de

soja, sorgo, papaya, espárrago, caña de azúcar y trigo, entre otras.

2.3.3 Transformación directa vs. indirecta

Con el transcurso de las investigaciones se ha logrado optimizar los protocolos de transformación para muchas especies vegetales. Ambas vías de transformación presentan ventajas y desventajas que las hacen más o menos convenientes para los distintos fines. En la **Tabla 2** se presenta una comparación entre la transformación del genoma nuclear mediada por *A. tumefaciens* y el método biolístico como representante de los métodos de transformación directa.

Uno de los procesos necesarios para obtener plantas transgénicas, es la integración del transgen al ADN cromosómico. Con relación a este proceso existen diferencias entre ambos métodos. *A. tumefaciens* posee un mecanismo natural muy eficiente para transferir, al núcleo celular, el T-ADN que contiene el transgen y producir una integración aleatoria en regiones cromosómicas con actividad transcripcional. Generalmente, los patrones de inserción de transgenes son más sencillos en comparación a los producidos por el método biolístico. Así el número de copias que se incorpora es bajo

Tabla 2: Comparación entre métodos de transformación del genoma nuclear

	<i>Agrobacterium</i>	Método biolístico
Especies a transformar	dicotiledóneas y algunas monocotiledóneas	sin limitaciones
Eficiencia de transformación	alta	baja
Tipo de integración en el genoma vegetal	aleatoria en regiones con transcripción bajo número de copias independientes precisa	aleatoria multicopia en tandem imprecisa
Construcción de vectores	compleja	simple
Dependencia del genotipo vegetal	mayor	menor

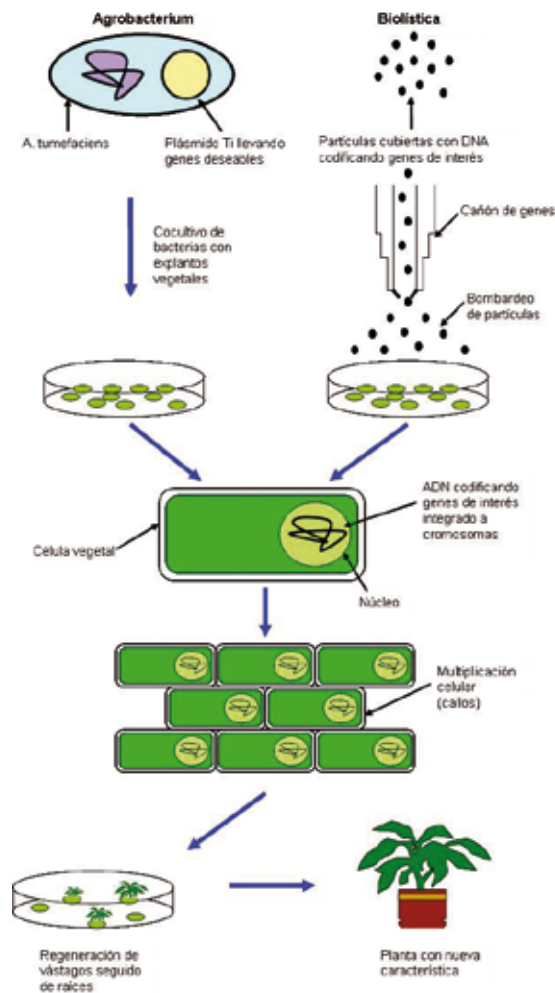


Figura 3: Comparación de técnicas de transformación directa e indirecta

y cuando hay más de una copia, éstas suelen distribuirse en loci independientes, lo que facilita la posterior eliminación de las copias no deseadas por segregación. Por otra parte, el mecanismo involucrado hace que se transfiera un segmento de ADN definido: el T-ADN, acompañado de proteínas que lo protegen de la acción de nucleasas. Por el contrario, en el método biolístico el ADN transferido no está asociado a proteínas, por lo que al ser parcialmente degradado solo parte del mismo llega al núcleo donde se produce, con baja eficiencia, la integración al azar en el ADN cromosómico. En este método es común que se produzcan inserciones de varias copias del transgen en

un mismo sitio del genoma con distinto grado de reordenamiento de la secuencia del transgen. Este último aspecto es considerado como una desventaja ya que tanto desde el punto de vista de la percepción pública como el de la optimización de la expresión de los transgenes, es deseable disponer de inserciones simples y bien definidas molecularmente. Esto es particularmente relevante cuando se tiene por objetivo el desarrollo de productos comerciales. Así, el fenómeno de silenciamiento de transgenes (pérdida de su expresión), observado en algunos casos, puede resultar de la presencia de varias copias del transgen. Por otra parte, cuando se utiliza el método biolístico, el seg-

mento de ADN plasmídico que se integra al ADN cromosómico no está definido como en el caso de T-ADN, sino que es de longitud variable.

La construcción de vectores es mucho más sencilla en el caso del método biolístico. Este aspecto puede resultar importante en el contexto del desarrollo de proyectos de investigación, en los cuales muchas veces se requiere utilizar un número considerable de vectores diferentes.

Es conveniente destacar que en ambos métodos la integración del transgen en el genoma se produce al azar, como consecuencia de ello, diferentes plantas transgénicas provenientes de un mismo experimento, presentan inserciones en distintos sitios del genoma receptor. Así, la expresión fenotípica de un transgen será diferente en distintas plantas transgénicas que contienen el mismo transgen, por lo cual para clarificar la situación se considera a cada una de ellas como eventos de transformación distintos.

La eficiencia de aplicación de cualquiera de estos métodos de transformación al mejoramiento vegetal, depende en gran medida de la disponibilidad de genotipos con muy buena respuesta al cultivo *in vitro*. Finalmente, cabe mencionar que en el caso de *A. tumefaciens*, debido a que se trata de una interacción biológica planta/bacteria, la dependencia del genotipo es mucho más acentuada ya que influyen también en la eficiencia de transformación, tanto el genotipo de la planta como el de la bacteria.

2.3.4 Genes de selección e informadores

En el proceso de obtención de plantas transgénicas, los genes marcadores seleccionables (**Tabla 3**), generalmente de origen bacteriano, cumplen un rol de relevancia ya sea en forma individual para poner a punto un protocolo de transformación o como acompañantes del gen de interés que se desea introducir. El gen marcador seleccionable otorga a las células transgénicas que lo expresan una importante ventaja, con respecto a las células no transgénicas, al permitirles crecer en un medio de cultivo que contiene el agente selectivo correspondiente. Entonces, si el gen marcador codifica para una proteína que confiere resistencia a agentes fitotóxicos como antibióticos o herbicidas, las células que lo expresen podrán crecer y desarrollarse en medio de cultivo que contenga dichos agentes selectivos mientras que las células no transgénicas no lo harán (selección negativa). En otros casos, la ventaja estará dada por la posibilidad de utilizar diferencialmente un sustrato. Así, el gen *man A* de *E. coli* permite a las células vegetales que lo expresan utilizar la manosa como fuente de carbono, lo cual no es posible para las células no transgénicas (selección positiva). Es necesario tener en cuenta que algunas especies pueden poseer una resistencia natural a los agentes selectivos antes mencionados. Por ello, es importante evaluar este aspecto cuando se elige el gen de selección a utilizar, así como el agente selectivo y las concentraciones del mismo.

Marcadores	
Seleccionables (Agente selectivo)	Visualizables (Fenotipos asociados)
<i>npt II</i> (kanamicina, paromomicina, G418)	<i>gus A</i> (color azul índigo)
<i>hph</i> (higromicina)	<i>luciferasa</i> (luminiscencia)
<i>pat</i> o <i>bar</i> (phosphinotricina, bialaphos)	<i>gfp</i> (fluorescencia verde)
<i>CP 4</i> (glifosato)	
<i>man A</i> (manosa 6 fosfato)	

Tabla 3: Genes marcadores utilizados comúnmente en transformación de plantas

En la puesta a punto de las metodologías de transferencia de genes son asimismo de gran utilidad los genes marcadores visualizables o informadores que posibilitan la observación directa de las células que los expresan (**Tabla 3**). Estos genes codifican para proteínas que no están presentes en las células vegetales y producen un fenotipo característico de fácil y rápida observación. Así, el gen *gus A* proveniente de *E. coli* codifica para la enzima β -glucuronidasa. Esta proteína puede ser detectada cualitativamente por tinción histoquímica. En esta técnica, en presencia de un sustrato específico esta enzima cataliza la producción de un precipitado azul-índigo de fácil visualización. Este marcador también puede ser detectado cuantitativamente usando técnicas fluorométricas. Como ejemplo de la aplicación de estos métodos de detección, podemos mencionar el estudio de la expresión de promotores en plantas. Para ello se puede construir un vector con la secuencia codificante de *gus A* bajo el control del promotor en estudio y una secuencia de terminación de transcripción, y obtener plantas transgénicas. El estudio de las mismas permite conocer el patrón de expresión espacio-temporal del promotor (en que tipo de células y cuando se expresa) por tinción histoquímica y su nivel de expresión por fluorometría.

Por otra parte, el gen de la proteína fluorescente verde, *gfp* ("green fluorescent protein"), aislado de una medusa, se ha convertido en un gen marcador visualizable *in vivo* muy utilizado. Cuando se ilumina con luz ultravioleta o luz azul, tejidos que contienen células que expresan este gen, se observa un brillo verde fluorescente. Al ser este un ensayo no destructivo, es decir que permite conservar vivo el material en estudio, representa una herramienta de utilidad para visualizar diferentes etapas del proceso de transformación.

2.4 Técnicas de detección del transgen y sus productos

Luego de la selección *in vitro*, las plantas regeneradas deben ser analizadas por métodos moleculares para identificar aquellas que porten y expresen los transgenes en los niveles deseados. Para ello se emplean técnicas como:

- **Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR):** con el uso de 'primers' homólogos a la secuencia del transgen se puede determinar la presencia del mismo. Esta técnica permite hacer un 'screening' rápido de las plantas regeneradas, aunque tiene algunas limitaciones. Así, un resultado positivo indica solamente que en la muestra existe una secuencia que amplifica con los 'primers' utilizados pero no demuestra que el transgen se encuentre incorporado al genoma de la planta. Para esto último se requiere un estudio de hibridación molecular o el estudio de la transmisión sexual del transgen. La robustez de esta prueba se maximiza utilizando temperaturas de "annealing" o apareamiento de "primers" altas (más de 60 °C) y "primers" relativamente largos (más de 20 nucleótidos). Una variación de esta técnica, PCR en tiempo real, resulta de utilidad para evaluar el número de copias del transgen incorporadas al genoma de la célula vegetal (ver parte I).

- **Hibridación molecular o 'Southern blotting':** es una de las herramientas moleculares más poderosas para caracterizar las plantas transgénicas. Además de indicar la presencia o no de la secuencia de interés, da información acerca de la integración de la misma en el genoma de la célula huésped (número de copias integradas y número de loci en los cuales se produjo la integración). En la **Figura 4** se representa el análisis de un caso hipotético de transformación mediante *Agrobacterium*, aunque este es aplicable también a plantas obtenidas por métodos directos. El esquema 4-a representa parte del vector que contiene el gen de interés y el gen marcador. Si se utiliza como sonda el T-ADN completo y la digestión del ADN genómico se realiza con enzimas de restricción que no cortan dentro del T-ADN, el número de bandas del patrón representa el número de sitios de inserción. El tamaño de las bandas será mayor que el T-ADN ya que se están utilizando enzimas que cortan por fuera de este. Plantas transgénicas obtenidas en forma independiente tendrán patrones de hibridación diferentes (4-b). Por otra parte, si la enzima tiene un sitio de corte único dentro del T-ADN, utilizando la sonda antes mencionada, esta dará dos señales de hibridación

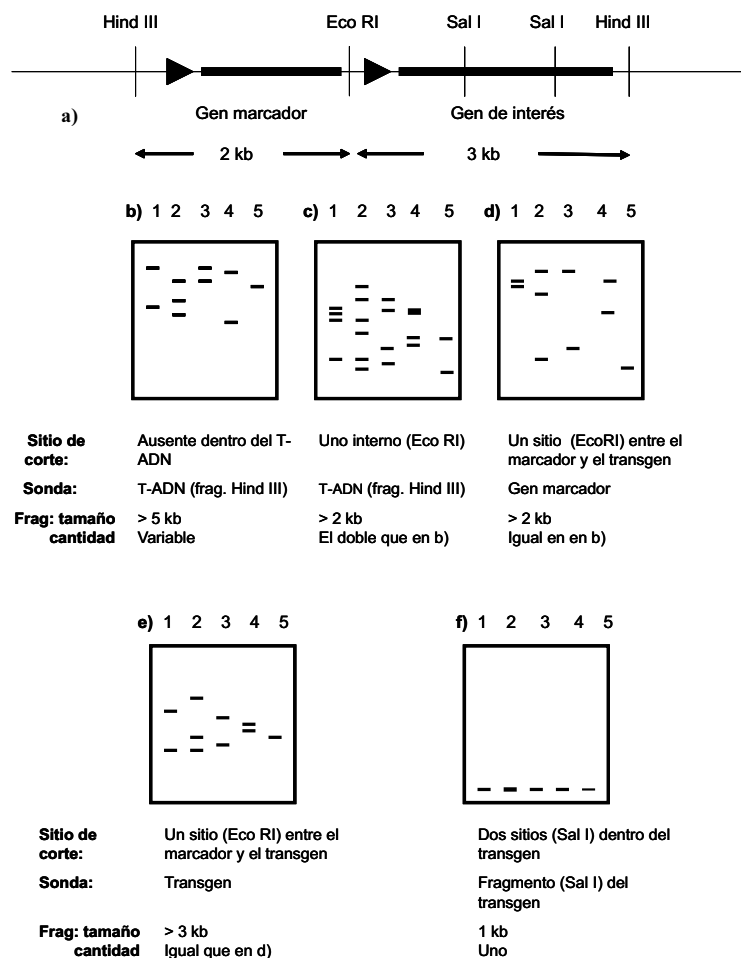


Figura 4: Patrones de Hidridación de Southern Blot (Tomado de Bhat y Srinivasan, 2002)

para cada sitio de inserción independiente del T-ADN (4-c). La aparición de un número impar de bandas indica que en un mismo sitio se insertaron múltiples copias, ocurrieron rearrreglos o se produjo el truncado del T-ADN. Si se digiere la muestra con una enzima de restricción que posee un sitio único de corte entre el gen marcador y el gen de interés y utilizando como sonda el gen marcador, se obtendrá una sola banda por cada inserción independiente (4-d). Si la membrana se hibrida con el gen de interés (4-e) aparecerá un patrón que tendrá el mismo número de bandas que el anterior. La ausencia de una banda indica la inserción de una copia truncada de uno de los genes y la

pérdida del sitio de corte. La aparición de una banda del tamaño del T-ADN puede indicar la presencia de repeticiones en tandem. Para estimar el número de copias del transgen en un locus transgénico, se deben utilizar enzimas de restricción con sitios flanqueantes del transgen y como sonda el transgen. Se observará una sola banda del tamaño del transgen, sin embargo la intensidad de la señal variará entre las distintas plantas analizadas de acuerdo al número de copias del mismo (4-f). Para realizar esta comparación es necesario utilizar simultáneamente estándares conteniendo un número conocido de copias del transgen. Esta determinación no es del todo precisa ya que puede

existir variabilidad en los resultados debido a diferencias en la digestión de las muestras y a la posible degradación del ADN.

En lo que respecta a la cuantificación, esta técnica ha sido reemplazada en gran medida, en los últimos años, por la PCR en tiempo real o “real time PCR”, antes mencionada, dado que esta última resulta menos costosa en reactivos y tiempo y requiere menos cantidad de material vegetal para realizar el análisis.

- Análisis de ARN: Tanto las técnicas de RT-PCR (transcripción reversa seguida de PCR) como la hibridación de ARN o “Northern blotting” pueden resultar valiosas herramientas para detectar los transcritos de interés presentes en la muestra. La RT-PCR presenta algunas ventajas frente al Northern blotting: se requiere poca cantidad de material, posee una alta sensibilidad y la muestra es de fácil preparación. Por otra parte, la hibridación del ARN utiliza como sonda el transgen, ofrece información sobre el tamaño del transcripto y permite su cuantificación. Cabe destacar que la RT-PCR puede también ser utilizada como técnica de cuantificación de transcritos.

- ELISA y “Western blotting”: aquellas plantas que poseen la secuencia de interés y la expresan como transcripto, pueden ser analizadas con estas técnicas inmunológicas a fin de determinar la presencia de la proteína codificada por el transgen.

La actividad de la proteína codificada por el transgen debe ser medida, ya sea por ensayos bioquímicos o por bioensayos, a fin de interpretar correctamente el fenotipo de la planta obtenida. Además, es conveniente confirmar la estabilidad meiótica de los transgenes estudiando su transmisión sexual a la generación siguiente.

Estas técnicas se encuentran descriptas detalladamente en la parte I y su aplicación para el análisis de plantas transgénicas en Register (1997) y en Bhat y Srinivasan (2002).

Finalmente el comportamiento de los individuos transgénicos se estudia en laboratorio, invernáculo y campo. Cabe aclarar que para realizar experimentos de invernáculo y de campo en Argentina es necesario contar con

autorización de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) (ver parte VII).

3 Aporte de la transformación genética a la variabilidad genética

Como ya se mencionó, la transformación genética permite introducir variabilidad genética novedosa en las diferentes especies vegetales. Este aporte puede ser realizado de diferentes maneras:

a) La expresión de secuencias codificantes no existentes en la especie (ejemplo: proteínas insecticidas de origen bacteriano).

b) La expresión de nuevas formas alélicas de genes que ya están presentes en el genoma (ejemplo: tolerancia al glifosato en soja).

c) La expresión de secuencias codificantes presentes en el genoma pero bajo el control de nuevas secuencias regulatorias que modifican su nivel o patrón de expresión (ejemplo: proteínas relacionadas a la patogénesis).

d) La inhibición de la expresión de genes residentes en el genoma.

Para lograr la inhibición de la expresión génica se pueden usar diferentes técnicas: cosupresión, ARN antisentido y la denominada interferencia del ARN. Todas ellas se basan en un proceso denominado silenciamiento génico que involucra la degradación del ARN mensajero producido por un gen determinado (ver capítulo siguiente).

Un inconveniente que se encuentra tanto en el mejoramiento convencional como en la ingeniería genética es la incorporación de múltiples genes. A esto se lo llama piramidización de genes y es necesario para la expresión de características complejas de naturaleza poligénica (por ej. vías biosintéticas), la obtención de resistencia a enfermedades más duradera donde se requiere más de un gen para evitar la caída de la resistencia, para otorgar resistencia conjunta a varios patógenos o la incorporación de múltiples características.

Algunas estrategias para alcanzar este objetivo son las siguientes:

a) cruzamiento de dos plantas transgénicas con distintos transgenes

b) re-transformación en eventos consecutivos

c) co-transformación en el mismo evento

La co-transformación es la alternativa más utilizada y ventajosa, ya que los transgenes co-transformados tienden a co-integrarse en la misma posición en el genoma en la mayor proporción de los eventos transgénicos. Esto aseguraría la no segregación de los genes, lo cual es muy útil cuando se quiere incorporar una característica poligénica.

La mayoría de los procesos metabólicos que pueden ser sujetos a manipulación dependen de la interacción entre numerosos genes y el flujo dentro de las vías bioquímicas es a veces coordinado con otras vías, por lo que la manipulación efectiva sólo puede ser alcanzada coordinando el grado de expresión de los distintos transgenes. Coordinar la expresión de múltiples transgenes sobre una misma vía metabólica es muy difícil de alcanzar, ya que la expresión de los transgenes depende del lugar donde se inserten en el genoma. Existen algunas estrategias elegidas para la manipulación de estas características:

- transgenes policistronicos (un promotor con varios transgenes)
- poliproteínas

El avance técnico en esta área es uno de los mayores desafíos de la biotecnología vegetal, ya que las nuevas generaciones de transgénicos requieren de la incorporación de múltiples características.

4 Obtención de plantas transplastómicas

Las células vegetales contienen tres genomas: el nuclear, el plastídico y el mitocondrial. Los métodos presentados en las secciones precedentes tienen como blanco de transformación al genoma nuclear. Sin embargo en los últimos años la obtención de plantas transplastómicas ha recibido notable atención. Así, el genoma de los plástidos (plastoma) se ha convertido en un blanco atractivo para la ingeniería genética ya que esta tecnología ofrece una serie de ventajas sobre la transformación del genoma nuclear:

1. Se pueden obtener altos niveles de expresión de los transgenes y elevados niveles de acumulación de las proteínas

codificadas por ellos (hasta el 47% de las proteínas solubles totales). Cabe notar que el nivel de acumulación observado a partir de transgenes nucleares es generalmente inferior al 1%.

2. Es posible expresar un transgen "operón" con varias secuencias codificantes bajo el control de un mismo promotor.
3. No se observa efecto de posición debido a que la integración del transgen está dirigida a un sitio particular del plastoma. Esto hace que no sea necesario obtener una gran población de transformantes, a diferencia de lo que actualmente ocurre con las plantas transgénicas nucleares.
4. No se observa silenciamiento de transgenes.
5. Para las especies que tienen transmisión materna de los plástidos (la mayoría). Se minimiza la dispersión de los transgenes por el polen debido a la baja de transmisión de los plástidos por el mismo.
6. A pesar de la naturaleza eminentemente procariota del sistema genético de los plástidos, se ha demostrado que estas organelas pueden procesar proteínas eucariotas permitiendo su correcto plegamiento y la formación de puentes disulfuro gracias a la presencia de proteínas chaperonas y sistemas enzimáticos endógenos.

Los protocolos existentes para la obtención de plantas transplastómicas se basan en la transferencia de genes por el método biolístico, un eficiente proceso de cultivo y selección *in vitro*, y la utilización de vectores con secuencias homólogas al genoma del cloroplasto. A diferencia de lo que ocurre en la transformación del genoma nuclear, la integración dirigida de los transgenes en el plastoma se realiza mediante recombinación homóloga. Para lograr esto, los vectores contienen los transgenes de interés flanqueados por secuencias con alta homología al ADN plastídico. La homología entre el ADN del vector y del ADN del cloroplasto determina la potencialidad del plásmido para ser utilizado en la transformación genética del plastoma. En este contexto, la existencia de secuencias altamente conservadas en el

plastoma de varias especies es explotada para el diseño de vectores universales, potencialmente útiles en la transformación de los cloroplastos de numerosas especies. La expresión exclusivamente plastídica de los transgenes queda asegurada a través de la utilización de promotores específicos del cloroplasto, cuya transcripción tiene características típicamente procarióticas.

5 Perspectivas

La continuidad en el desarrollo de tecnología de transferencia de genes en plantas es importante tanto para ampliar el rango de especies a transformar como el de genotipos dentro de cada especie. En los últimos años se nota un creciente interés en el control del nivel de expresión de transgenes así como de su regulación espacial y temporal. La expresión de los genes nucleares eucarióticos está controlada en varios niveles que involucran la transcripción propiamente dicha, el procesamiento, transporte y estabilidad de los transcriptos y su traducibilidad, así como la estabilidad, modificación y compartimentalización del producto proteico final. Por otra parte, es necesario aprovechar la experiencia acumulada en cuanto a la expresión de transgenes, de modo de diseñar protocolos de transferencia que minimicen las posibilidades de silenciamiento génico. En este contexto, está recibiendo notable atención el estudio de la recombinación homóloga como mecanismo para la transformación del genoma nuclear.

Del análisis comparativo de métodos presentado cabe destacar tres aspectos actualmente en desarrollo. Por un lado, continúa el interés en extender el uso de la transformación mediada por *A. tumefaciens* a especies que no son hospedantes naturales de la bacteria. Por otro lado, como fuera anteriormente mencionado, los métodos de transformación genética actualmente en uso requieren de genotipos con una excelente respuesta al cultivo *in vitro*, lo cual resulta en una clara limitación cuando se desea aplicar esta tecnología a los materiales usados por los mejoradores, los que generalmente no poseen esta característica. Por ello, se está tratando de reducir y si es posible evitar la fase de cultivo *in vitro* durante el proceso de

transformación, lo que permitirá ampliar el rango de genotipos a los cuales se podrá aplicar esta moderna tecnología. Así, se desarrolló un método eficiente y reproducible de transformación *in planta* para *Arabidopsis thaliana*. Este consiste en infiltrar con vacío plantas adultas de esta especie, con una suspensión de *A. tumefaciens* de modo que los tejidos y órganos reproductivos sean invadidos por la bacteria. Posteriormente se propuso una simplificación de este método que consiste en reemplazar el tratamiento de vacío y sumergir la inflorescencia en una suspensión bacteriana que incluye un surfactante. Las plantas transgénicas que se obtienen por autofecundación de las plantas así transformadas, son hemigotas y se demostró que esta metodología produce la transformación de la gameta femenina. Finalmente, debido a la importante restricción que puede significar la utilización de métodos de transformación genética protegidos por patentes, se ha está estudiando el desarrollo de métodos que utilizan, a partir de herramientas derivadas de *Agrobacterium*, otras bacterias como vectores alternativos de transformación.

El logro de determinados objetivos como puede ser el redireccionamiento de una ruta metabólica o la modificación de un carácter complejo de interés agronómico como por ejemplo la resistencia durable a enfermedades fúngicas, requiere de la integración de múltiples transgenes y de la expresión coordinada de los mismos en la planta. Este tema está recibiendo notable atención.

Los métodos de transformación que hemos descrito se basan en la utilización de genes marcadores seleccionables. Sin embargo, hay razones por las cuales la presencia del marcador no es deseable en plantas transgénicas que se liberan al ambiente. Hay un manifiesto rechazo por parte del público con respecto a la utilización de genes de resistencia a antibióticos y en determinadas situaciones, el uso de genes de resistencia a herbicidas puede ser inconveniente. Por otra parte, desde un punto de vista experimental puede ser necesario transformar una misma planta varias veces con distintos transgenes y con la metodología convencional no hay más que un número limitado de genes marcadores disponibles. Por ello se

consideran estrategias alternativas para la obtención de plantas transgénicas libres de marcadores (Puchta, 2003). La estrategia que ha recibido más esfuerzo hasta ahora, plantea la remoción vía cruzamiento sexual del marcador seleccionable luego de haber obtenido la planta transgénica. Una posibilidad para ello es cotransformar. Esto implica que el transgen de interés y el marcador seleccionable estén presentes en vectores distintos y que posteriormente se separen los genes por segregación luego de la reproducción sexual. Sin embargo, esta puede ser una alternativa poco atractiva en circunstancias particulares como cuando no se dispone de un protocolo eficiente de cotransformación o cuando no se desea reproducir sexualmente la planta transgénica. Otra opción dentro de esta línea es la utilización del sistema de recombinación sitio-específica de origen viral Cre/lox. Esta estrategia requiere primero la obtención de plantas transgénicas portadoras del gen de la recombinasa (cre) y posteriormente la introducción del transgen flanqueado por sitios lox de reconocimiento. Más recientemente se ha propuesto como estrategia alternativa el desarrollo de métodos de transformación que no usen marcadores seleccionables. La idea subyacente es incrementar la frecuencia de transformación a través del uso de genes que promuevan la regeneración.

Finalmente, las plantas transgénicas actualmente cultivadas comercialmente, en su mayoría resistentes a herbicidas y a insectos, nos permiten ganar experiencia y acumular el conocimiento necesario para desarrollar nuevas y mejores generaciones de productos. A pesar de estos avances en el desarrollo de esta tecnología, su aplicación comercial se ve limitada por el elevado costo que tiene el pasaje por el estricto sistema de controles que regula su aplicación. Esto restringe notoriamente las especies a ser usadas en transformación y los caracteres a mejorar mediante la misma.

6 Lecturas recomendadas

- Bhat S., Srinivasan S. 2002. "Molecular and genetics analyses of transgenic plants: considerations and approaches". *Plant Science* 163:673-681.
- Birch R. 1997. "Plant transformation: Problems and strategies for practical applications". *Annu. Rev. Plant Physiol.Plant Mol.Biol.* 48: 297-326.
- François I, Broekaert W., Cammue B. 2002. "Different approaches for multi-transgene-stacking in plants". *Plant Science* 63: 281-295.
- Gelvin S. 2003. "Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the "Gene-Jockeying" Tool". *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, Mar. 2003: 16-37.
- Gepts P. 2002. "A Comparison between Crop Domestication, Classical Plant Breeding, and Genetic Engineering". *Crop Sci.* 42:1780-1790.
- Halpin C. 2005. "Gene stacking in transgenic plants – the challenge for 21st century plant biotechnology". *Plant Biotechnology Journal*, 3:141-155.
- Hanin M., Paszkowski J., 2003. "Plant genome modification by homologous recombination". *Current Opinion in Plant Biology* 6: 157-162.
- Horsch R., Fraley R., Rogers S., Sanders P., Lloyd A., Hoffman N. 1984. "Inheritance of functional foreign genes in plants". *Science* 223: 496-498.
- Klein T., Wolf E., Wu R., Sanford J. 1987. "High velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells". *Nature* 327: 70-73.
- Lee L. y Gelvin S. 2008. "T-DNA Binary Vectors and Systems". *Plant Physiology Vol.* 146: 325-332.
- Maliga P. 2004. "Plastid transformation in higher plants". *Annu. Rev. Plant Biol.* 55:289-313.
- Puchta H. 2003. "Marker-free transgenic plants". *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 74: 123-134.
- Register J (1997) "Approaches to evaluating the transgenic status of transformed plants". *TiBTech*, 15:141-6.
- Small I., 2007. "RNAi for revealing and engineering plant gene functions". *Current Opinion in Biotechnology* 18:148-153.

II. CAPÍTULO 7

Usos del silenciamiento génico para el análisis funcional de genes candidatos.

Cecilia Vazquez Rovere, Ariel Bazzini,
Cecilia Rodríguez, Natalia Almasia y
Sebastián Asurmendi

El progreso de las disciplinas genómicas ha generado una rápida acumulación de información biológica relacionada a la estructura de los genomas, su organización, su composición en número de genes, su grado de homología y sus relaciones evolutivas. Esta información puede ser aprovechada para el análisis funcional de genes promoviendo un gran avance en diferentes aspectos como el fitosanitario o el de respuestas a estreses ambientales, entre otros. Para el estudio de la funcionalidad de genes candidatos existen diversas estrategias. La más antigua (no por eso menos efectiva o utilizada) consiste básicamente en sobre-expresar un gen, es decir aumentar la expresión del gen de interés a niveles tan altos que su función o actividad puede aumentar y así ser medible u observable mediante técnicas moleculares o simplemente fenotípicamente. Por ejemplo, la sobreexpresión de genes del metabolismo puede producir un aumento importante en el crecimiento de una planta. La segunda estrategia es antagónica a la primera y consiste en disminuir los niveles de expresión del gen en estudio. Esta reducción (total o par-

cial) puede también mostrar cambios visibles o medibles, los cuales permiten evidenciar la actividad del gen. Por ejemplo si uno reduce la expresión de un gen involucrado en la síntesis de pigmentos, dicha planta puede presentar una disminución en la coloración de sus hojas. Esta disminución dependerá del grado de reducción en la expresión del gen, pudiendo presentar desde pequeñas manchas amarillentas o hasta la falta total de coloración foliar (Figura 1). Este capítulo considerará únicamente esta segunda estrategia de reducción de la expresión génica mediada por el mecanismo denominado silenciamiento génico. Los métodos basados en el silenciamiento génico presentan varias ventajas respecto a otros empleados en el campo de la genómica funcional. Una de ellas es la posibilidad de silenciar varios o todos los miembros de una familia multigénica simultáneamente. Esto es altamente relevante cuando se realizan estudios de genómica en organismos poliploides, como por ejemplo en el caso del trigo en el cual existe una gran redundancia genética (Travella y col., 2006). Otra de las ventajas es que permite obtener distintos grados de silenciamiento del gen (débil, intermedio y fuerte) siendo útil para el análisis de fenotipos asociados a genes cuya disminución total resultaría letal. Finalmente, también se puede mencionar la capacidad de generar un silenciamiento eficiente a partir de secuencias de pequeño tamaño permitiendo el estudio de genes cuya secuencia completa se desconoce (Lu y col., 2003).

Actualmente existen diversas metodologías basadas en el silenciamiento génico. Algunas de las mismas requieren de la generación de



Figura 1. Foto mostrando el blanqueo del tejido de plantas en las cuales se silenció el gen PDS en las especies *Nicotiana benthamiana*, *Nicotiana tabacum*, *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* respectivamente de izquierda a derecha

plantas transgénicas portadoras de una construcción capaz de silenciar al gen candidato, mientras que en otras el silenciamiento se desencadena a partir de la replicación de un virus que porta en su genoma un fragmento del gen a silenciar. Dependiendo del problema específico a resolver se deberá considerar la tecnología disponible más adecuada. Es importante destacar que no todas las herramientas moleculares pueden utilizarse en todas las especies, es decir que en la elección de la metodología deberá tenerse en cuenta la especie con la que se esté trabajando. Una de las metas de la ciencia actual es masificar estas técnicas, es decir que independientemente del organismo (girasol, papa, hongo, etc.) uno pueda optar por una variedad de técnicas moleculares para solucionar el problema planteado de la forma más adecuada. Asimismo, es importante mencionar que el silenciamiento génico es un mecanismo ampliamente distribuido en los procesos naturales de los seres vivos. Todos los organismos regulan la expresión de sus genes dependiendo de su información génica, del ambiente y del estado de desarrollo, y en los organismos superiores una de las formas de regular negativamente (disminuir) la expresión de sus genes es mediante el silenciamiento. En los últimos 15 años el estudio de este mecanismo natural, ha permitido utilizarlo de forma dirigida a fin de disminuir la expresión de genes endógenos a elección.

En este capítulo se introducirán los conceptos básicos del mecanismo de silenciamiento y se desarrollarán las distintas metodologías más frecuentemente empleadas en la actualidad para determinar la función de los genes y/o analizar su diversidad funcional.

1. Silenciamiento génico

El silenciamiento génico hace referencia a diversos procesos que producen la reducción secuencia-específica de la expresión génica y en los cuales la molécula involucrada es el RNA. Las moléculas de RNA que participan del silenciamiento génico presentan un rango de tamaño de 20 a 30 bases nucleotídicas por lo que se las denomina “small” RNAs (sRNAs por su siglas en inglés) o bien “silencing” RNAs debido a su participación en este fenómeno

(Baulcombe, 2004 y Ossowski y col., 2008). Distintas clases de sRNAs han sido descritas dado que se originan por diferentes vías y que poseen funciones celulares diversas (ver tabla 1). A pesar de estas diferencias, los procesos de silenciamiento comparten numerosas etapas en común. En todos los casos al inicio se produce la formación de una molécula de RNA doble cadena (dsRNA), la cual es específicamente clivada por una enzima perteneciente a la familia de las RNasas tipo III (similar a Dicer – DCL por su siglas en inglés (Fire y col., 1998) la cual genera fragmentos de 21 a 25 nucleótidos de ambas polaridades (Baulcombe y col., 2004 y Dorokhov y col., 2007). Las dos cadenas de los fragmentos resultantes son luego separadas presumiblemente por una helicasa y una de las cadenas, denominada hebra guía, es incorporada al complejo enzimático endógeno RISC (por sus siglas en inglés “RNA-induced silencing complex”) el cual es capaz de producir el silenciamiento de aquellos genes que presenten homología con la secuencia de dicha cadena incorporada. Dentro de este mecanismo general pueden existir variaciones a nivel de la formación del dsRNA, de la clase de DCL involucrada en el clivaje del RNA y de las moléculas efectoras que reclutan a los sRNAs para luego ejercer su acción. Dicha acción puede ser la modificación del nivel de metilación de las secuencias regulatorias del gen blanco, la degradación del RNA mensajero (mRNA) o bien la reducción específica de su traducción. En consecuencia, el silenciamiento génico es un mecanismo regulatorio que puede actuar en distintos niveles: transcripcional (denominado silenciamiento transcripcional, TGS), post-transcripcional (silenciamiento post-transcripcional, PTGS) y traduccional (Chapman y Carrington, 2007).

A continuación se explicarán brevemente los mecanismos de silenciamiento mencionados:

1.1 Silenciamiento transcripcional

En el silenciamiento transcripcional, su acción está dirigida hacia las secuencias regulatorias y como consecuencia el gen río abajo de dicha región deja de transcribirse. En este proceso los sRNAs dirigen modificaciones en el DNA o en las proteínas asociadas a él, por

Clase*	Descripción	Biogénesis y origen genómico	Función
miRNA	Micro RNAs	Transcriptos de genes miRNAs forman estructuras secundarias de RNA doble cadena que son procesados por Dicer o por RNAsas tipo III	Regulación post transcripcional de los transcritos de un amplio rango de genes
siRNAs primarios	sRNAs pequeños interferentes	Procesamiento de RNA doble cadena o de estructuras secundarias Por miembros de la familia Dicer	Unión a RNAs targets complementarios, guía para la iniciación de siRNAs secundarios
siRNAs secundarios	sRNAs pequeños interferentes	Se forman por la actividad de RNA polimerasas RNA dependientes, las cuales generan RNAs doble cadena	Regulación post transcripcional de los transcritos, formación y mantenimiento de la heterocromatina.
tasi RNAs (Trans acting siRNAs)	sRNAs que actúa en trans	Transcriptos de genes TAS son clivados por un mecanismo dependiente de miRNAs, luego son convertidos en RNA doble cadena por RdRP, seguido del procesamiento por Dicer	Regulación post transcripcional de los transcritos.
natsi RNAs (natural antisense transcript-derived siRNAs)	siRNAs derivados de transcritos antisentidos naturales	Pares de transcritos sense y antisense son procesados por Dicer	Regulación post transcripcional de la expresión de genes involucrados en mecanismos de defensa y respuesta a stress
piRNAs (Piwi - interacting siRNAs)	RNAs que interaccionan con Piwi	El mecanismo de biogénesis no se conoce completamente, sería dependiente de argonauta e independiente de Dicer	Supresión de transposones y retroelementos en líneas germinales de moscas y de mamíferos.

Tabla 1. Clases de sRNAs y su función.* se han mantenidos las siglas en inglés. RdRP: sigla en Inglés para RNA polimerasa – RNA dependiente. Tabla adaptada de Carrington y col., 2007.

ejemplo produciendo la metilación de los residuos de citosina de DNA y la consecuente modificación de la cromatina. Sin embargo la metilación *per-sé* no es suficiente en todos los casos para el establecimiento del silenciamiento. A modo de ejemplo puede citarse la existencia de mutantes de los genes *sil1* y *mom1*, para los cuales se ha reportado la pérdida del TGS a pesar de que las secuencias se encuentran metiladas (Furner y col., 1998 y Amedeo

y col., 2000). Vaucheret y sus colaboradores propusieron al silenciamiento transcripcional como un sistema de control de la expresión génica de transposones y accidentalmente de transgenes con características similares a ellos (2001).

1.2 Silenciamiento post-transcripcional

El silenciamiento génico post-transcripcional (PTGS) es un mecanismo inducible y especí-

fico en el cual la molécula blanco es el RNA mensajero. Se ha propuesto que el PTGS evolucionó como un sistema de defensa antiviral en plantas dado que restringe la acumulación o la diseminación de los virus dentro de las mismas (Vance y Vaucheret 2001; Dunoyer y col., 2004). Como se mencionara previamente el PTGS se desencadena contra una molécula de RNA mediado por la homología de secuencia del sRNA, pudiendo reconocer tanto un RNA del propio individuo como el de un organismo patógeno, por ejemplo un virus. Cuando se produce el reconocimiento del RNA viral durante la infección se produce la degradación del mismo que con lleva al fracaso de la infección. Este mecanismo es también responsable del fenómeno de co-supresión de genes endógenos, del silenciamiento de los transge-

nes y recientemente también se lo ha ligado a procesos de regulación de genes endógenos. Si bien se describió por primera vez en plantas, ha sido reportado en hongos (donde se denomina "quelling"), y en sistemas animales como nematodos, insectos o mamíferos (donde se lo denomina interferencia mediada por RNA o RNAi). En plantas el PTGS es desencadenado eficientemente por intermediarios de dsRNA que pueden tener su origen en: transgenes nucleares cuyos transcritos forman naturalmente estructuras tipo horquilla o "hairpin" (hpRNAi), genes que se expresan en altos niveles, transcritos aberrantes que pueden ser reconocidas como dsRNA o estructuras de dsRNA que se generen durante la replicación de un virus. Cualquiera sea su origen, una vez formadas las estructuras de dsRNA, las mis-

mas son reconocidas por una enzima RNasa DCL y procesadas dando lugar a siRNAs de 21 a 25 pb. Estos siRNAs se asocian al complejo RISC, el cual es capaz de degradar específicamente todo aquel RNA que comparta homología con la secuencia que desencadenó el proceso y también pueden ser utilizados como templado por las polimerasas celulares dependientes de RNA (RdRps) para sintetizar la segunda hebra del gen a silenciar amplificando de esta forma la señal de silenciamiento (Figura 2).

1.2.1 Amplificación y movimiento del PTGS

Una de las características del mecanismo de silenciamiento en plantas es la capacidad de ser sistémico, es decir de poder propagar a toda la planta la reducción del gen el cual resultara inicialmente disminuido en un único tejido. Por ello se ha propuesto la existencia de una señal de silenciamiento capaz de moverse a través del organismo propagando el mismo. Estas vías de movimiento de la señal se clasifican según la distancia que alcancen. Así, en la vía de movimiento de corta distancia los siRNAs generados en una célula son capaces de migrar directamente a células adyacentes a través de los plasmos-

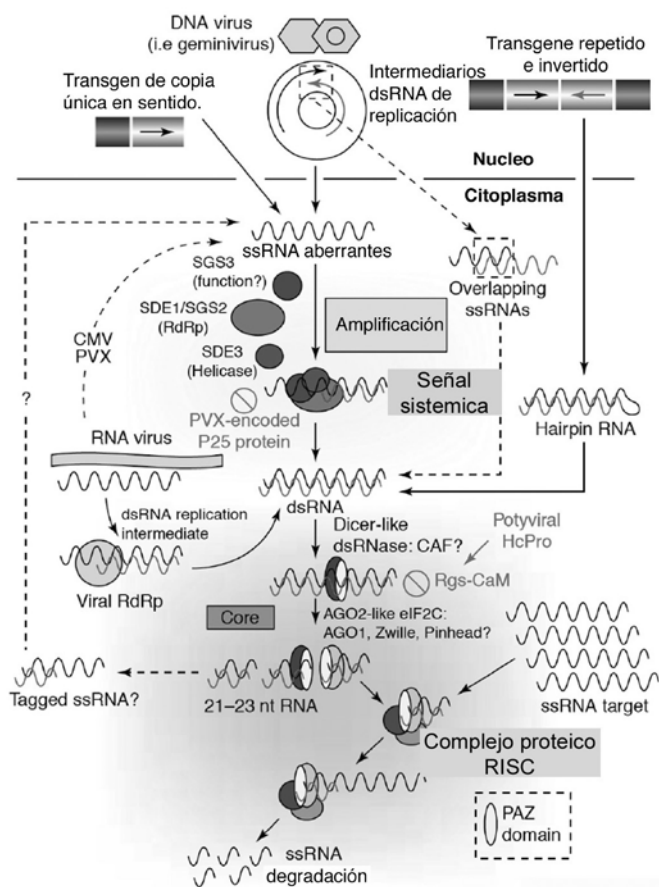


Figura 2. Esquema del silenciamiento génico inducido por virus, por sobre expresión de transgén o expresión de secuencias duplicadas invertidas. Se detalla como el RNA es procesado en siRNA de 21-25 pb (Figura adaptada de Voinnet 2001)

desmos (conexiones directas entre células) y establecer en estas últimas el silenciamiento. Una vez que en la célula adyacente es degradado el mRNA homólogo al siRNA, se generan nuevos siRNAs, amplificando así la señal que se trasladará por toda la planta. Se ha reportado asimismo que esta amplificación se genera a partir de la síntesis de dsRNA mediada por una RNA polimerasa RNA dependiente RdRp (Baulcombe, 2004). En la vía de movimiento de larga distancia la señal se traslada a través del floema permitiendo el movimiento a partes muy distantes del lugar de origen. Esto fue demostrado mediante experimentos que emplean injertos en los que plantas silenciadas para un dado transgen son capaces de producir el silenciamiento de ese transgen en plantas no silenciadas. Si bien aún no se conoce cuál es la señal de silenciamiento de larga distancia, es

muy probable que sea distinta de la señal que migra de célula en célula debido a que los dos procesos pueden ser separados farmacológica o genéticamente (Dunoyer y Voinnet 2008).

La dispersión del silenciamiento tiene una gran importancia principalmente en la defensa frente a virus, ya que a partir del sitio inicial de infección, donde se indujo el silenciamiento, se produce una señal que genera la defensa antiviral en los tejidos adyacentes que de resultar previa a la llegada del virus limitará la propagación del mismo al resto de la planta.

1.3 Regulación génica por microRNAs

Como hemos mencionado, el silenciamiento es un mecanismo natural por el cual se regula la expresión de genes. En particular, los microRNAs (miRNAs) son un tipo específico de moléculas de RNA de bajo peso molecular (21 pb) que controlan la acumulación de mRNA endógenos al regular finamente la expresión de diferentes genes. A diferencia de los siRNAs los miRNAs

son codificados por genes endógenos, por lo tanto difieren en su biogénesis. Los miRNAs son genes endógenos completos, con la única particularidad de que no codifican para ninguna proteína, sino que su RNA mensajero es procesado generando una pequeña molécula de 21 pb aproximadamente. Los miRNAs han sido descritos sólo en organismos eucariontes, desde plantas a humanos (Bartel 2004). Resumidamente, los miRNAs se originan a partir de transcritos que se pliegan sobre sí mismos dando lugar a una estructura precursora de RNA doble cadena (denominadas pre-miRNAs), las cuales son procesados de manera que se produce una única cadena de miRNA de pequeño tamaño (21-22 nt) mientras que la cadena complementaria, denominada miRNA*, es degradada. En la Figura 3A se muestran ejemplos de estructuras secundarias






Construcción genética	Estructura del transcripto de RNA	% PTGS	n
Gen candidato en sentido		7	27
Gen candidato en antisentid		4	25
hpRNA (brazos de gen candidato, gen GUS como secuencia espaciadora)		58	43
hpRNA (brazos de gen candidato, intrón en antisentido como secuencia espaciadora)		65	34
hpRNA (brazos de gen candidato, intrón en sentido como secuencia espaciadora)		96	23

Figura 3. A) Se representan las típicas estructuras de rulo o "stem-loop" de los miRNAs. miR164 de Arabidopsis y sus homólogos de Oryza y Populus. El segmento correspondiente al miRNA maduro se muestra en color rojo (adaptado de Jones-Rhoades y col. 2006). **B)** Esquema del pre-miR164a de Arabidopsis y el pre-miR-GFP sintético. En rojo se encuentra el miR164 maduro y en verde la porción reemplazada para generar el miR artificial miR-GFP maduro. Se muestra la energía libre (ΔG) y la entalpía (ΔU) del ensamblado.

de los miRNAs. Una vez que el transcripto del miRNA es procesado y el miRNA maduro resultante es incorporado al complejo RISC, el cual al dirigirse contra el mRNA blanco reprime su expresión génica ya sea mediante degradación específica o inhibición de la traducción. En las plantas el proceso de degradación es el más común, mientras que en el reino animal la inhibición de la traducción es el proceso más frecuente. (Hutvagner y Zamore, 2002; Doench y col. 2003; Zeng y col. 2003). Estas pequeñas moléculas son extraordinariamente importantes en la regulación o modulación de los procesos celulares, un solo miRNA puede regular la expresión muchos genes por lo tanto incidir en la regulación de múltiples procesos ya que muchos de los genes blancos son factores de transcripción, porejemplo la alteración de la expresión de un único miRNA en plantas puede cambiar totalmente el fenotipo de la misma.

2. Métodos que emplean el mecanismo de silenciamiento para disminuir la expresión génica en plantas

Varios métodos han sido desarrollados para disminuir la expresión de un gen en estudio

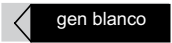



basados en el mecanismo de silenciamiento génico. Entre los mismos se encuentra el uso de moléculas antisentido, de moléculas con estructura de horquilla (hpRNAi), de miRNAs artificialmente diseñados y el silenciamiento génico inducido por virus (ver Tabla 2).

A continuación se exponen algunos de los métodos más usados en la actualidad para lograr establecer el silenciamiento génico. Cada uno de estos métodos presenta ventajas y desventajas que determinan que sean más o menos aptos para el estudio particular del gen asilenciar y en la especie que se desea emplear, con lo que resulta de suma importancia evaluarlas antes de elegir la metodología. Estas metodologías pueden a su vez agruparse en dos categorías principales de acuerdo a que involucren la producción de plantas transgénicas o no. Siendo ésta una metodología un tanto lenta y laboriosa.

2.1 Metodologías para el análisis de genes candidatos que implican transgénesis.

La transformación estable con construcciones capaces de inducir el silenciamiento de un gen candidato es quizá la aproximación más

Tabla 2: Métodos basados en el mecanismo de silenciamiento génico, para disminuir la expresión de un gen.

Construcción empleada	Antisentido	HpRNAi	miRNAs artificiales	VIGS
Requerimiento de transgénesis para obtener un silenciamiento sistémico	Si	Si	Si	No
Construcción empleada				
Origen de dsRNAs que luego son procesados por DCL.	Formación de dsRNA por apareamiento del transcripto sentido y del antisentido.	Formación de dsRNA por apareamiento del transcripto sentido y del antisentido.	Explota a los precursores de miRNAs endógenos para generar sRNAs.	Los dsRNAs se forman durante la replicación viral o bien por estructuras secundarias que adquiere el virus.

simple y antigua del uso de silenciamiento génico para el análisis funcional de genes. Si bien estos métodos tienen la desventaja de requerir la producción de plantas transgénicas, la obtención de las mismas permite que el silenciamiento sea estable siendo incluso posible identificar líneas transformantes con diferentes niveles de expresión del gen en estudio. Más aún, el uso de promotores específicos y/o inducibles permiten el estudio de genes cuya disminución total sería letal en etapas tempranas del desarrollo vegetal.

2.1.1 Silenciamiento mediante moléculas con estructura de horquilla

Un desarrollo reciente y efectivo para desencadenar silenciamiento génico en plantas es el uso de largos precursores que formen estructuras de horquilla, es decir moléculas de doble cadena de RNA (dsRNA). Para ello se han diseñado y utilizado construcciones genéticas con secuencias repetidas e invertidas del gen a silenciar y que al ser transcritas dan lugar a

largos fragmentos de dsRNA que son eficientes precursores de siRNAs y en consecuencia del silenciamiento génico (Chuang y Meyerowitz, 2000, Wesley y col., 2001). La utilización de esta estrategia requiere un estudio minucioso de la variabilidad de secuencia del gen que se quiere silenciar, por ejemplo si éste forma parte de una familia génica se debe considerar si desea disminuir la expresión de sólo un miembro de la misma o, por el contrario, silenciar a todos los miembros de la familia. Es decir que es muy importante la elección de la secuencia que se va a utilizar en la construcción ya que ésta debe ser muy conservada, de un tamaño no menor a 100 pb y no debe presentar homología con secuencias de genes que no se desean silenciar. Una vez elegida la secuencia, ésta se coloca en sentido y en antisentido de manera que la dsRNA se forme fácilmente (Ver tabla 2). Mediante trabajos sistemáticos en los que se estudian las características de las distintas construcciones capaces de desencadenar el silenciamiento se ha demostrado que aquellas

construcciones que llevan repeticiones invertidas de un fragmento del gen candidato, separadas a su vez por un pequeño intrón, son las más eficientes (ver Tabla 3) (Wesley y col., 2001). Esta estrategia ha sido ampliamente probada en distintas especies de plantas tanto dicotiledóneas como monocotiledóneas y a tal punto que actualmente existen plásmidos genéricos disponibles para la generación de diversas plantas transgénicas (<http://www.pi.csiro.au/rnai/>).

2.1.2 Silenciamiento mediante miRNA artificial.

Un miRNA sintético o artificial es un pre-miRNA al cual se le permutaron las 21-22 pb del miRNA maduro y del miRNA* por otras del gen de interés pero manteniendo las características estructurales lo más parecidas posibles al original. En estas construcciones es muy impor-






Construcción genética	Estructura del transcripto de RNA	% PTGS	n
Gen candidato en sentido		7	27
Gen candidato en antisentido		4	25
hpRNA (brazos de gen candidato, gen GUS como secuencia espaciadora)		58	43
hpRNA (brazos de gen candidato, intrón en antisentido como secuencia espaciadora)		65	34
hpRNA (brazos de gen candidato, intrón en sentido como secuencia espaciadora)		96	23

Tabla 3. Evaluación de la eficacia de las estructuras disparadoras del silenciamiento génico. Adaptado de Wesley y col., 2001

tante realizar un estudio de la energía libre y de la entalpía del pre-miRNA sintético ya que determinarán la estructura y en consecuencia el reconocimiento de la maquinaria del procesamiento. De esta manera el miRNA sintético es capaz de reconocer y controlar al gen blanco que se desea silenciar. Utilizando esta estrategia se han reportado el control de transgenes (Parizotto y col. 2004), de genes endógenos que originalmente no eran blancos de miRNAs (Schwab y col. 2006) e incluso se ha logrado conferir resistencia a virus (Niu y col. 2006) (Ver capítulo sobre obtención de plantas resistentes a virus). En particular nuestro grupo de trabajo ha diseñado un vector de miRNA artificial basado en la estructura del miR164a de *Arabidopsis thaliana* (Figura 3B) logrando controlar la expresión del gen reportero GFP en *Nicotiana benthamiana* (Fig 4).

Si bien esta estrategia requiere de construcciones genéticas más complejas, posee una

gran ventaja frente al silenciamiento clásico ya que minimiza los riesgos de reducción de la expresión de genes no deseados al emplear solamente 21 pb. Asimismo, si se desea silenciar un gen único dentro de una familia de varios genes muy similares la utilización de miRNAs artificiales es más adecuada que la técnica de silenciamiento por horquilla ya que es más fácil hallar 21 pb específicas que grandes porciones (mayores a 100 pb) de secuencias únicas. Para alcanzar mayores niveles de silenciamiento con esta técnica se puede recurrir a tándems de miRNAs artificiales de diferentes porciones de la secuencia blanco del gen a silenciar, aunque esto aumenta la complejidad de las construcciones genéticas necesarias. Para finalizar, la utilización de miRNA artificiales en plantas cultivadas es compatible con su uso a bajas temperatura (menor a 15C), mientras que el PTGS por horquilla podría resultar inhibido a estas temperaturas.

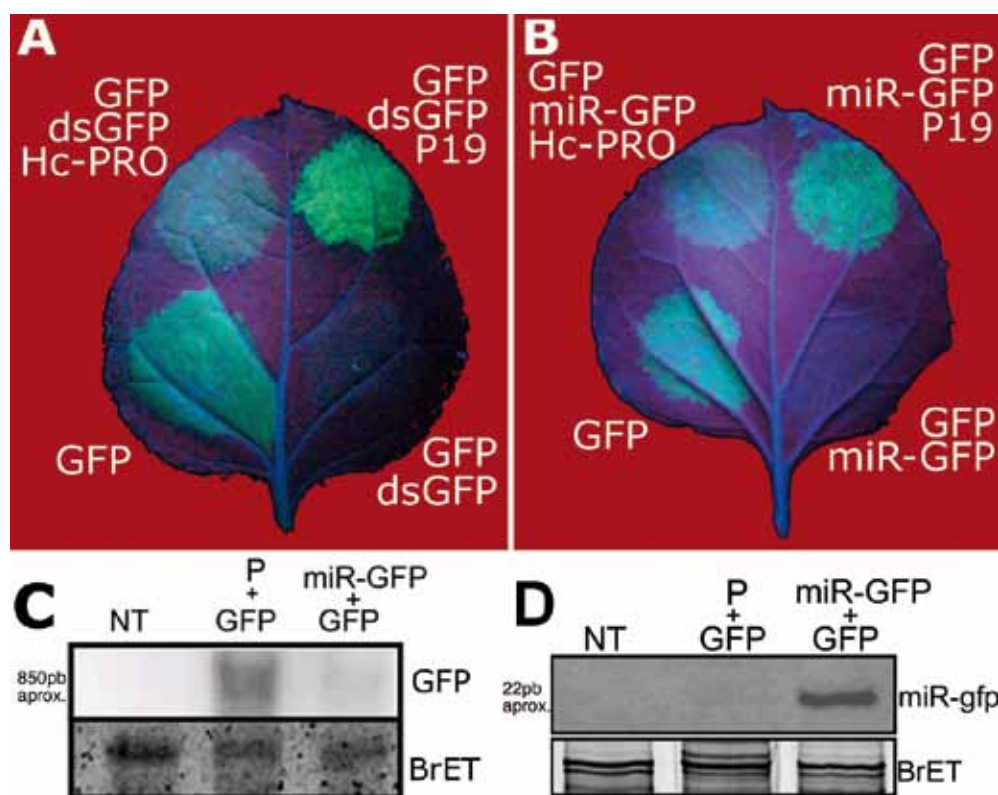


Figura 4. (A) y (B) Hoja de *N. benthamiana* agroinfiltrada con distintas combinaciones de GFP o dsGFP, Hc-Pro, P19 y miR-GFP (micro artificial) observada bajo luz UV. (C) "Northern blot" de RNA total extraído de las zonas infiltradas utilizando una sonda que reconoce al mRNA de GFP. (D) Detección del miR-GFP en gel de poliacrilamida de material extraído de las zonas infiltradas. P= vector vacío.

2.2 Determinación de la actividad de vectores aptos para el silenciamiento de forma transitoria vía agroinfiltración

Dado que obtener plantas transgénicas es una labor dificultosa y de larga duración, se pueden realizar aproximaciones útiles previas al desarrollo de las mismas. Así, para analizar la eficacia de una horquilla de silenciamiento o el correcto procesamiento de un miRNA artificial se puede realizar un test de silenciamiento local utilizando *Agrobacterium tumefaciens*. Esta técnica consiste en realizar co-agroinfiltraciones generalmente de hojas de *N. benthamiana* con diferentes agrobacterias transformadas; una conteniendo un plásmido expresando el gen blanco y otra conteniendo el plásmido silenciador a evaluar, es decir la misma secuencia blanco (o parte de la misma) repetida e invertida o el miRNA artificial. Una vez transcurrido el tiempo necesario para el establecimiento del silenciamiento se analizan, por ejemplo mediante la técnica de “Northern blot”, los indicadores del silenciamiento en la zona agroinfiltrada. Dichos indicadores son en primer lugar una reducción en el nivel de acumulación esperado del gen blanco y en segundo lugar la aparición de sRNAs homólogos al gen blanco. En la Figura 4B se muestra un típico ensayo de inducción de PTGS mediante agroinfiltraciones de hojas de *N. benthamiana* utilizando como gen blanco el reportero GFP y como plásmidos silenciadores una construcción con estructura de horquilla que posee la secuencia de GFP en sentido y antisentido separada por un intrón (dsGFP) o bien una construcción que expresa el miRNA artificial que posee 22 pb de la secuencia de GFP (miR-GFP). Para mayor información acerca de la realización de experimentos de silenciamiento empleando la técnica de agroinfiltración se puede consultar el trabajo de Bazzini y col. (2007). http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0717-34582007000200002&lng=es&nrm=iso. ISSN 0717-3458

2.3 Metodología para el análisis de genes candidatos que no requiere transgénesis: silenciamiento génico inducido por virus (VIGS).

El término VIGS (silenciamiento génico indu-

cido por virus, por su sigla en inglés) se aplica a la técnica que emplea virus recombinantes a fin de disminuir la expresión génica de un gen endógeno. La construcción de vectores virales que portan en su genoma insertos derivados de secuencias génicas vegetales permite silenciar específicamente la secuencia endógena homóloga al inserto introducido en el vector viral. VIGS es una metodología que no requiere de transgénesis por lo tanto es rápida y versátil, siendo ideal para estudios a gran escala. En los últimos años ha ido adquiriendo una gran relevancia debido a la necesidad de analizar la abundante información surgida de los proyectos genómicos. Sin embargo, su mayor desventaja radica en que el nivel de silenciamiento es variable y que depende mucho de la especie a utilizar.

Brevemente, la metodología de VIGS consiste en el clonado del gen candidato en un vector viral, la incorporación de este último en *Agrobacterium* y finalmente en la inoculación de plantas con el cultivo bacteriano para lo cual existen diversos métodos. Uno de los métodos mayormente empleados es la agroinfiltración que consiste en inyectar mediante una jeringa sin aguja la solución de *Agrobacterium* en la cara abaxial de la hojas de una planta. Otro de los métodos es el denominado “agrodrench” que consiste en regar la planta a la altura del tallo con la solución deseada (Ryu y col., 2004). Tras la agroinoculación de las plantas los vectores virales son incorporados a las células vegetales donde forman nuevos genomas virales causando la infección sistémica de la planta. En cada una de las células infectadas se produce la replicación viral induciendo el silenciamiento del gen candidato (Ruiz y col., 1998; Liu y col., 2002). Existen varios vectores virales desarrollados para VIGS (que se resumen en la tabla 4), sin embargo el sistema de VIGS basado en el virus TRV es una de los más utilizados en la actualidad ya que presenta ciertas ventajas frente a otros vectores virales. Este virus ocasiona un nivel menor de síntomas en las plantas, puede infectar meristemas y tiene un amplio rango de hospedantes. TRV es un virus de RNA de polaridad positiva con un genoma bipartito. Uno de esos RNAs genómicos fue modificado de modo de eliminar

Tabla 4: Vectores virales para su uso en VIGS .Tabla adaptada de Godge y col., 2008.

Virus	Género	Hospedantes naturales importantes	Probado en	Genes silenciados	Referencias
Tobacco Mosaic Virus	Tobamovirus	Nicotiana tabacum	Nicotiana benthamiana, Nicotiana tabacum	PDS, PSY	Kumagai et al (1995)
Tobacco Rattle virus	Tobravirus	Amplio rango de hospedantes	N. benthamiana, Arabidopsis, Tomate, especies de Solanum, pimiento	Varios genes PDS, PSY, GFP, EDS, RAR, NPR1	Liu et al (2002b) Ratcliff et al (2001)
Potato Virus X	Potexvirus	Solanum tuberosum Brassicca Campestris	N. bentahmiana, Solanum tuberosum	PDS, GFP	Ruiz et al (1998)
Barley stripe mosaic virus	Hordeivirus	Trigo, cebada, maíz	Trigo, cebada	PDS	Holzberg et al (2002) Scofield et la (2005)
Tomato goleen mosaic virus	Begomovirus	Lycopersicum sculetum	N. benthamiana	Su(Sulfur gene)	Peele et al (2001)

las proteínas no esenciales e incorporar un sitio múltiple de clonado en donde se puede introducir el fragmento del gen candidato que se desea silenciar, dejando las regiones no traducibles y la región codificante de la proteína de la cápside intactas. Posteriormente este vector fue mejorado por el grupo del Dr. Dinesh Kumar mediante la incorporación del promotor 35S duplicado el cual incrementa la transcripción, del terminador de la nopalina sintetasa y de la secuencia de una ribozima que permite simular el final 3' del genoma viral de forma más adecuada (Liu y col., 2002).

Así, la base del silenciamiento inducido por virus puede explicarse fundamentalmente mediante el mecanismo de PTGS. Estudios realizados en *N. benthamiana* empleando un transgén de la proteína reportera GFP muestran que el mecanismo de VIGS puede ser separado en

dos etapas, una de iniciación y otra de mantenimiento. La primera sería absolutamente dependiente de la presencia del virus, siendo los genes blancos silenciados sólo si la planta es infectada por el virus. Mientras que la segunda etapa sería independiente del mismo. (Ruiz y col., 1998, Jones y col., 1999).

Consideraciones finales

A lo largo de este capítulo se describieron algunas de las metodologías empleadas frecuentemente para estudios de genética reversa basados en el silenciamiento génico. Como se mencionó al inicio del capítulo el empleo de estas metodologías presenta ciertas ventajas respecto a otras, sin embargo una de las consideraciones que hay que tener en cuenta al usar los métodos basado en silenciamiento génico es la especificidad del mismo con el fin de

evitar que se altere la expresión de otros genes no deseados. Estudios realizados en *Arabidopsis thaliana* indican que al emplear como inserto la región completa de un gen se alteran aproximadamente la expresión de 4 genes no deseados (Ping Xu y col., 2006). En el último tiempo han surgido varios trabajos en donde se proponen distintos modos de controlar y/o disminuir estos efectos no deseados, entre ellos se encuentran el uso de programas bioinformáticos que permiten analizar cuál es la mejor región a emplear de modo de obtener un silenciamiento lo más específico posible (Qiu y col., 2006 y Ping Xu y col., 2006). Sin embargo estas herramientas sólo son útiles cuando el genoma del organismo ha sido completamente secuenciado o bien si al menos se dispone de gran parte de su secuencia. Por otro lado también se ha desarrollado una estrategia experimental para validar la información obtenida la cual emplea genes sintéticos que codifican para el gen candidato, pero que no resultan blanco de la acción de siRNAs, de este modo si el gen silenciado es el responsable del fenotipo observado, la expresión de los mismos permitiría la recuperación el fenotipo salvaje (Kumar y col., 2006).

Brevemente, no hay una técnica mejor que otra para reducir la expresión génica, sino que cada una posee sus ventajas y desventajas y queda a merced del investigador elegir la/las más correcta/s para su sistema, considerando principalmente los tiempos, el costo, la especie a utilizar, las condiciones del ambiente y el grado de reducción del silenciamiento con el que uno desea trabajar.

Un mensaje final para involucrarse y leer más sobre este tema, es que si bien el silenciamiento es un mecanismo de regulación negativa de la expresión génicas, se ha tornado uno de los temas más importantes de las últimas décadas en biología molecular, a tal punto que los descubrimientos iniciales de este mecanismo les permitieron a los científicos Dr Andrew Z. FIRE y Dr Craig C. Mello obtener el Premio Nobel de Fisiología o Medicina en el año 2006. Actualmente se están desarrollando numerosos estudios en los cuales mediante silenciamiento génico se logra obtener plantas inmunes a infecciones virales o bacterianas, disminuir la

alergenicidad de vegetales comestibles y estudiar la función de los genes.

Bibliografía:

- Amedeo, P., Habu Y, Afsar K, Mittelsten Scheid O, Paszkowski J. 2000. Disruption Of The Plant Gene *Mom* Releases Transcriptional Silencing Of Methylated Genes. *Nature*, 405 (6783): P. 203-6.
- Bartel D.P. 2004. MicroRNAs: Genomics, biogenesis, mechanism and function. *Cell*: 116:281–297.
- Baulcombe, D.C. 2004. RNA Silencing In Plants. *Nature*, 431 (7006): P. 356-63.
- Bazzini, A.A., Mongelli, V.C., Hopp, H.E., Del Vas, M. And Asurmendi, S. 2007. A Practical Approach To The Understanding And Teaching Of Rna Silencing In Plants. *Electronic Journal Of Biotechnology*, 10 (2): 178-190. eISSN: 0717-3458.
- Chapman E. J., Carrington J. C. 2007. Specialization And Evolution Of Endogenous Small Rna Pathways *Nat Rev Genet*. Nov;8 (11):884-96
- Chuang, C.F. And Meyerowitz, E. M. 2000. Specific and heritable genetic interference by double-stranded RNA in *Arabidopsis thaliana*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97, 4985-4990.
- Doench J.G., Petersen, C.P., And Sharp, P.A. 2003. siRNAs can function as miRNAs. *Genes & Dev*.17: 438–442.
- Dorokhov Iu, L. 2007. Gene Silencing In Plants. *Mol Biol (Mosk)*, 41(4): P. 579-92.
- Dunoyer P., Lecellier C.H., Parizotto E.A., Himber C., Voinnet O. 2004. Probing the microRNA and small interfering RNA pathways with virus-encoded suppressors of RNA silencing. *Plant Cell* 16:1235–1250.
- Dunoyer, P. And O. Voinnet. 2008. Mixing And Matching: The Essence Of Plant Systemic Silencing? *Trends Genet*, 24(4): P. 151-4.
- Fire, A., Xu, S., Montgomery, M. K., Kostas, S. A., Driver, S. E. And Mello, C. C. 1998. "Potent And Specific Genetic Interference By Double-Stranded Rna In *Caenorhabditis Elegans*." *Nature*, Vol. 391, No. 6669, P. 806-11.
- Furner, I.J., M.A. Sheikh, And C.E. Collett. 1998. Gene Silencing And Homology-Dependent Gene Silencing In *Arabidopsis*: Genetic Modifiers And Dna Methylation. *Genetics*, 149(2): P. 651-62.
- Godge MR, Purkayastha A, Dasgupta I, Kumar PP. 2008. Virus-induced gene silencing for functional analysis of selected genes. *Plant Cell Rep*. 27(2):209-19.
- Jones, L. Hamilton A.J, Voinet O, Thomas C.L, Maule, A.J Y Baulcombe D.C 1999. Rna-Dna Interactions And Dna Methylation In Post-Tran-

- scriptional Gene Silencing. *Plant Cell*, 11(12): P. 2291-301.
- Jones-Rhoades, M.W., Bartel, D.P., Bartel, B. 2006. MicroRNAs and their regulatory roles in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 57:19–53.
- Hutvagner G. And Zamore, P.D. 2002. A microRNA in a multiple-turnover RNAi enzyme complex. *Science* 297: 2056–2060.
- Kumar, D., C. Gustafsson, D. F. Klessig. 2006. Validation of RNAi Silencing Specificity Using Synthetic Genes: Salicylic Acid-binding Protein 2 is required for Innate Immunity in Plants. *The Plant Journal* 45(5): 863-868
- Liu, Y., M. Schiff, Y S.P. Dinesh-Kumar. 2002. Virus-Induced Gene Silencing In Tomato. *Plant J*, 31(6): P. 777-86.
- Lu R., Martin- Hernandez A.M, Peart J.R., Malcuit I. Y Baulcombe D.C. 2003. Virus-Induced Gene Silencing In Plants. *Methods*, 30(4): P. 296-303
- Niu, Q. W., Lin, S. S., Reyes, J. L., Chen, K. C., Wu, H. W., Yeh, S. D. And Chua, N. H. 2006. "Expression Of Artificial Micromnas In Transgenic Arabidopsis thaliana Confers Virus Resistance." *Nat Biotechnol*, Nov, Vol. 24, No. 11, P. 1420-8.
- Ossowski, S., R. Schwab, And D. Weigel. 2008. Gene Silencing In Plants Using Artificial MicroRNAs And Other Small Rnas. *Plant J*, 53(4): P. 674-90.
- Parizotto, E. A., Dunoyer, P., Rahm, N., Himber, C. And Voinnet, O. 2004. In Vivo Investigation Of The Transcription, Processing, Endonucleolytic Activity, And Functional Relevance Of The Spatial Distribution Of A Plant Mirna. *Genes Dev*, Sep 15, Vol. 18, No. 18, P. 2237-42.
- Ping Xu, Yuanji Zhang, Li Kang, Marilyn J. Roossinck, And Kirankumar S. Mysore. 2006. Computational Estimation And Experimental Verification Of Off-Target Silencing During Posttranscriptional Gene Silencing In Plants. *Plant Physiol.* Oct;142(2):429-40.
- Peng Qiu, Z. Jane Wang , K. J. Ray Liu , Zhang-Zhi Hu And Cathy H. Wu. 2006. Dependence network modeling for biomarker identification. *Bioinformatics* 23(2):198-206
- Ruiz, M.T., O. Voinnet, And D.C. Baulcombe. 1998. Initiation And Maintenance Of Virus-Induced Gene Silencing. *Plant Cell*, 10(6): P. 937-46.
- Ryu, C.M., Anad A., Kang L., Mysore K.S. 2004. Agrodrench: A Novel And Effective Agroinoculation Method For Virus-Induced Gene Silencing In Roots And Diverse Solanaceous Species. *Plant J*, 40(2): P. 322-31.
- Travella S., Klimm T. E., And Keller, B. 2006. RNA Interference-Based Gene Silencing As An Efficient Tool For Functional Genomics In Hexaploid Bread Wheat. *Plant Physiology* 142:6-20 (2006)
- Vance V., Vaucheret H. 2001. RNA silencing in plants: Defense and counterdefense. *Science* 292:2277–2280.
- Vaucheret, H. And M. Fagard. 2001. Transcriptional Gene Silencing In Plants: Targets, Inducers And Regulators. *Trends Genet.* Jan;17(1):29-35
- Voinnet, O. 2001. RNA silencing as a plant immune system against viruses. *Trends Genet* 17, 449–459.
- Wesley, S. V., Helliwell, C. A., Smith, N. A., Wang, M. B., Rouse, D. T., Liu, Q., Gooding, P. S., Singh, S. P., Abbott, D., Stoutjesdijk, P. A., Robinson, S. P., Gleave, A. P., Green, A. G. And Waterhouse, P. M. 2001. Construct Design For Efficient, Effective And High - Throughput Gene Silencing In Plants." *Plant J*, Vol. 27, No. 6, P. 581-90.
- Zeng, Y., Yi, R., And Cullen, B.R. 2003. MicroRNAs and small interfering RNAs can inhibit mRNA expression by similar mechanisms. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 100: 9779–9784.

II. CAPÍTULO 8

Análisis de Experimentos Biológicos

Sofía Olmos; Miguel Di Renzo;
Mercedes Ibañez; Nélida Winzer

1 La variación biológica

La **variabilidad genética** es un hecho universal en las poblaciones reproductivas y una condición preliminar necesaria para el cambio evolutivo y para la respuesta al mejoramiento genético mediante selección o hibridación. Por otra parte son conocidos los peligros que implica la uniformidad y la falta de diversidad en las especies cultivadas y en los animales domésticos, como consecuencia de la erosión genética.

La variación que presentan los individuos de una población puede ser discontinua o continua. Los **caracteres cualitativos** de variación discontinua, como los marcadores moleculares, permiten clasificar a los individuos sin ambigüedades, ya que estos caracteres están regidos por uno o por pocos genes y el ambiente no tiene efecto en su manifestación fenotípica. En cambio, los **caracteres cuantitativos**, representados por la mayoría de los caracteres de interés agronómico, presentan variación continua y los fenotipos, que están determinados por poligenes y por efectos ambientales, son difíciles de clasificar en categorías discretas. Para su análisis deben emplearse métodos biométricos, que no miden el efecto de genes individuales o de segmentos cromosómicos específicos, sino de todo el genoma.

Durante los últimos años ha surgido un consenso entre los mejoradores y genetistas moleculares sobre la conveniencia del uso de marcadores moleculares para asistir a la selección de caracteres cuantitativos (MAS, Marker Assisted Selection). La biotecnología ha colaborado mediante la construcción de mapas genéticos saturados, esto es, con innumerables marcadores moleculares a lo largo de los cromosomas, que permiten ubicar regiones de actividad cuantitativa (QTLs, Quantitative Trait Loci). De esta manera un carácter de variación

continua puede ser manejado como si se tratara de un carácter de herencia mendeliana mediante la introgresión de un fragmento de cromosoma conteniendo un QTL por retrocruzamientos sucesivos en las variedades comerciales. Los QTLs representan un nuevo sistema de enfocar el estudio básico y el manejo práctico de los sistemas poligénicos y de la genética cuantitativa.

2 Experimento científico

La ciencia, que tiene como objetivo la explicación y la predicción de los hechos, cuenta con el **método científico** como un procedimiento que contempla **un proceso en flujo desde los hechos observados hasta la proposición de hipótesis explicatorias**. Un requisito fundamental en toda ciencia fáctica es la **contrastación de las hipótesis planteadas**, poniendo a prueba las mismas mediante una confrontación con la experiencia. El **diseño experimental** crea artificialmente las condiciones para la contrastación de la hipótesis y brinda la metodología estadística correspondiente para el análisis de los datos.

El **experimento científico**, que como queda dicho es un ensayo destinado a probar la validez de una hipótesis, se basa en la reproducción de ciertos fenómenos bajo condiciones controladas con el objeto de medir el efecto que produce la modificación de uno o varios factores en estudio (tratamientos) sobre la variable dependiente.

El **ensayo**, cuidadosamente diseñado, deberá ser lo más simple posible, evitando los errores tendenciosos y sistemáticos (bias=sesgo) de manera tal que los datos recabados provean conclusiones con un amplio rango de validez. Por otra parte, para magnificar el efecto de los tratamientos y disminuir el error experimental, se procura minimizar el efecto de otros factores no controlados que ejercen influencia en las observaciones. Esto se logra utilizando materiales y condiciones experimentales lo más homogéneas posibles. De esta manera, las variaciones observadas se deberán casi exclusivamente a los tratamientos.

Para conocer el efecto de los **factores controlados** y el de los **factores no controlados** (error experimental) sobre el material experi-

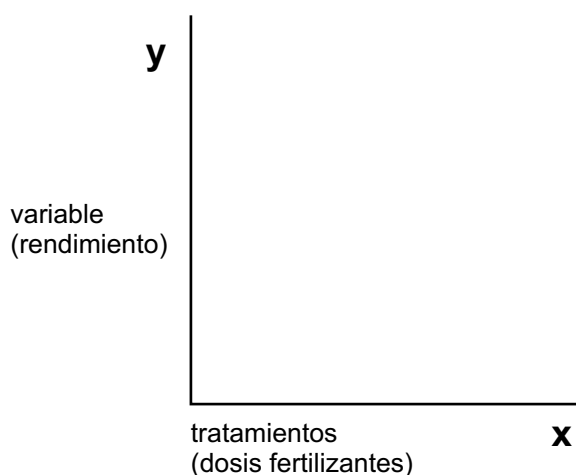
mental es necesario formular claramente una hipótesis, utilizar un diseño experimental apropiado y analizar e interpretar los resultados obtenidos.

Por ejemplo, la aplicación de distintos tratamientos (ej.: distintas dosis de fertilizante = causa), producen variaciones sobre una característica de interés (ej. rendimiento = efecto):

relación causal

causa: \Rightarrow **efecto:**
tratamientos \Rightarrow cambios en la variable de interés

Esto puede graficarse de esta manera:



$$Y = f(x)$$

rendimiento = f (dosis fertilizante)

Terminología

- **Factor:** Es la causa cuyo efecto se quiere medir (ej. fertilizante, insecticida, medio de cultivo, genotipo, ambiente)

- **Nivel:** Es cada una de las categorías o alternativas del factor en estudio (ej. dosis de un fertilizante, dosis de insecticida, sales y pH de los medios de cultivo, variedades, diferentes años y localidades).

- **Tratamiento:** Es cada nivel del factor en estudio. Si se estudia el factor fertilizante, cada dosis (o nivel) es un tratamiento distinto. Si se prueba el efecto de concentraciones crecientes de un fertilizante los tratamientos tendrían un orden natural (*discreto ordinal*); pero si se probaban distintas combinaciones de fertilizantes

(NPK), no habría un orden entre los tratamientos (*discreto nominal*). Cuando se estudian dos (o más) factores simultáneamente, los distintos tratamientos resultan de la combinación de cada nivel de un factor con cada nivel del otro factor. Por ejemplo, si se estudia el efecto de fertilizante y competencia, cada tratamiento resulta de la combinación de una dosis de fertilizante y una densidad de siembra determinada.

- **Variable independiente:** es la causa que afecta los resultados del experimento y está representada por los distintos niveles del factor cuyo efecto se quiere medir (tratamientos) o que se quiere controlar (bloques).

- **Variable dependiente:** variable respuesta o simplemente «variable» es el carácter de interés (datos u observaciones) cuya variación permite cuantificar el efecto de la variable independiente. Ejemplos de variables dependientes: a) rendimiento (kg/ha) y diámetro de colonia (mm): cuantitativas continuas, b) tiempo a panojamiento (días), tamaño de camada, número de colonias (número): cuantitativas discretas, c) marcadores moleculares (presencia/ausencia): cualitativa binaria, d) grado de respuesta a un estrés o a un patógeno (tolerante, intermedio, susceptible): cualitativa ordinal.

- **Unidad experimental:** es un individuo o grupo de individuos, objetos, porción de material o terreno (parcela) al que se le asigna un tratamiento experimental y sobre la cual se observa una respuesta.

- **Repetición:** es el número de unidades experimentales a las que se les asigna el mismo tratamiento.

3 Hipótesis Estadística

Como se indicara previamente, el experimento científico es un ensayo destinado a probar la validez de una hipótesis. Las hipótesis estadísticas plantean supuestos referentes a algún parámetro poblacional. Por lo general se utiliza la **hipótesis nula** (H_0), que se refiere a la igualdad entre los parámetros probados. Frente a la H_0 se plantea una **hipótesis alternativa** (H_a).

Para determinar si un tratamiento tuvo algún efecto, se considera a la H_0 como la ausencia de efectos, lo que equivale probar la igualdad entre las medias de los tratamientos. La

Ha plantea que al menos una de las medias difiere significativamente del resto o sea que al menos uno de los niveles del factor probado tiene efecto sobre la variable de interés. Las hipótesis estadísticas también prueban otras características poblacionales, como por ejemplo la igualdad entre varianzas o entre coeficientes de regresión.

El ensayo y las pruebas de significancia permiten calcular probabilidades bajo el supuesto de que la hipótesis nula sea cierta. Si la probabilidad calculada es igual o mayor que un nivel de significancia preestablecido (de 0,05 por ejemplo) la H_0 no se rechaza y se infiere que no hay diferencias significativas entre las medias de los tratamientos. Se concluye que los tratamientos no tienen efecto significativo en la variabilidad del carácter estudiado y las diferencias observadas no son mayores que las que se producirían por azar. En cambio si la probabilidad calculada es pequeña ($P \leq 0,05$) se rechaza la H_0 y se infiere, de acuerdo con la H_a , que hay diferencias significativas entre los tratamientos. Si $P \leq 0,01$ se dice que las diferencias son altamente significativas.

	Ho verdadera	Ho falsa
Rechazo H_0	erro tipo I	correcto
No rechazo H_0	correcto	error tipo II

El *nivel de significancia*, generalmente designado por α , representa hasta qué punto, en términos de probabilidad, estamos dispuestos a aceptar un error de tipo I, es decir, rechazar una H_0 que sea verdadera. Esto conlleva a que aceptemos una H_0 como verdadera con una probabilidad 1-. Si se fija $\alpha=0.05$ estamos dispuestos a aceptar el error tipo I aproximadamente una de cada 20 veces.

4 Análisis univariado

Los análisis univariados emplean una variable dependiente, mientras que los análisis multivariados comparan muestras sobre la base de varias variables que están relacionadas.

La significancia estadística de una diferencia entre dos medias puede verificarse mediante una prueba t o mediante una prueba F. Ambas

son equivalentes, $t^2 = F$. La prueba F, que es un cociente de varianzas, es una generalización de la prueba t, especialmente útil cuando se comparan más de dos tratamientos. En el análisis de la varianza (ANOVA), por ejemplo, se utiliza la prueba F para verificar la igualdad de medias.

Prueba F

Una prueba F consiste en un cociente entre dos varianzas:

$$F = s^2_{\text{entre}} / s^2_{\text{dentro}}$$

Para realizar la prueba F resulta necesario descomponer la varianza total (s^2_{total}) en dos componentes: s^2_{entre} y s^2_{dentro}

El análisis de la varianza es un procedimiento aritmético que permite la descomposición de la varianza total en varianzas parciales. El cociente entre las varianzas permite obtener un valor de F calculado (F_c) el cual se compara con un F de tabla (F_t) para un determinado nivel de significación (por ejemplo $\alpha=0.05$) y los grados de libertad de los tratamientos y del error. Los programas estadísticos estiman directamente el P, la probabilidad de obtener un valor de F mayor que F_c si H_0 fuera cierta.

Los supuestos básicos en que se fundamenta el ANOVA son errores independientes, normalmente distribuidos, aditividad de efectos y varianzas homogéneas para todos los tratamientos. Cuando no se cumplen se ve afectado el nivel de significación, la sensibilidad de la prueba de F y la discrepancia real de la H_0 .

Varianza total

Se puede considerar a la variación total como la resultante de dos fuentes de variación: una fuente de variación debida a las diferencias entre grupos o tratamientos, señaladas por los promedios de éstos y otra debida a la diferencia dentro de los tratamientos (entre repeticiones), que se calcula en base a las diferencias entre las observaciones o repeticiones de cada tratamiento.

Varianza entre tratamientos

Para aislar la variación entre los grupos ne-

cesitamos suprimir la variación dentro de los tratamientos (entre repeticiones). Podemos obtener este resultado haciendo a todos los individuos de un mismo grupo iguales entre sí e iguales a la media del grupo. Mediante esta operación, la variación entre los grupos no se modifica mientras que toda la variación dentro del grupo queda anulada.

Varianza dentro de tratamientos

Para obtener la varianza dentro de los grupos debemos tener en cuenta solamente la variación entre las observaciones de un mismo tratamiento (entre repeticiones). La variación dentro de un tratamiento se debe a las desviaciones que presentan los valores individuales en ese grupo en relación con la media de ese grupo.

5 Análisis multivariado

El análisis multivariado brinda los métodos estadísticos para el análisis conjunto de varias variables que pueden estar interrelacionadas. Esta rama de la estadística comprende procedimientos y técnicas para la síntesis, la presentación y el análisis multidimensional de variables, tanto cualitativas como cuantitativas, obtenidas a partir de un número de individuos, OTU (**Operational Taxonomic Unit**), objetos o tratamientos.

Debido a que las variables se consideran en forma simultánea estas técnicas permiten realizar interpretaciones más complejas a las que surgen mediante la utilización de métodos univariados. El análisis multivariado colabora en la comprensión más adecuada y completa de las ciencias biológicas, por tal motivo en este capítulo se brindará un panorama simplificado y algunos comentarios sobre las técnicas más usuales con la finalidad de poder discernir y elegir la metodología más apropiada para analizar la información que se disponga.

Hay algunas razones que justifican el análisis conjunto de diferentes variables en lugar de analizar cada variable separadamente por métodos univariados. Por ejemplo, cuando se trata de probar hipótesis mediante procedimientos de inferencia estadística. En este caso, la aplicación del análisis univariado a cada una de las variables aumenta el error Tipo I mien-

tras que la aplicación del análisis multivariado preserva el valor de α y aumenta en muchos casos la potencia del test. El análisis multivariado utiliza las relaciones (correlaciones) entre las variables o entre los objetos que el método univariado directamente no considera. El análisis multivariado aprovecha estas relaciones para buscar en los datos patrones o estructuras enriqueciendo así la descripción de los mismos. En el capítulo siguiente se desarrollarán en más detalle algunas metodologías multivariadas, seleccionándose aquellas que se utilizan con mucha frecuencia y que no requieren demasiados conocimientos previos.

Análisis exploratorio y confirmatorio

Con los datos provenientes de observaciones realizadas sobre un hecho en particular es necesario, en primer lugar, realizar un **análisis exploratorio**. Posteriormente, mediante las inferencias realizadas a partir de este análisis y con la información que se pueda disponer acerca de los mecanismos que originan el proceso biológico, es posible desarrollar un **análisis confirmatorio** y así plantear un modelo descriptivo de causalidad el que, a su vez, es confirmado mediante una prueba de bondad de ajuste.

En otras palabras, toda investigación llevada a cabo especialmente en áreas nuevas, donde existen pocos antecedentes, comienza con una exploración de los datos con el objeto de reconocer cualquier estructura o patrón no aleatorio que requiera una explicación. En una segunda etapa, es posible que surja la necesidad de formular **la pregunta**, lo cual es a menudo más interesante que buscar **la respuesta** subsiguiente, ya que el objetivo primordial es, en primer lugar, generar hipótesis interesantes que promuevan estudios más avanzados. En este caso, los métodos que están diseñados para responder a preguntas específicas no serían necesarios. En cambio resultarían apropiados aquellos métodos que puedan detectar un patrón de comportamiento no previsto en los datos y que, además, abran un amplio campo de posibles explicaciones del proceso. Estas técnicas generalmente se caracterizan por el énfasis puesto en la utilización de representaciones visuales y gráficas y por la carencia de modelos

estocásticos, donde la significación estadística de los resultados pierde importancia.

La aplicación de los análisis confirmatorios se vuelve mas apropiada cuando el investigador tiene en mente hipótesis bien definidas. Es aquí donde las pruebas de significación estadística son necesarias. Sin embargo, no existe una división muy estricta entre técnicas exploratorias y confirmatorias. Por ello sería importante que el investigador tenga una perspectiva flexible y pragmática para analizar sus datos y una experiencia suficiente que le permita elegir la herramienta analítica adecuada. El error más grave que se podría realizar en este sentido sería arribar a conclusiones que expliquen causas a partir de datos exploratorios y descriptivos sin haber realizado ningún tipo de diseño experimental para probarlos. Se plantea como causa probable de esta tendencia generalizada el mal uso semántico entre las terminologías estadísticas y las biológicas. El uso estadístico de términos como “**efectos**” o “**variable independiente**” no implica causalidad.

Síntesis de métodos: objetivos y limitaciones

Los análisis multivariados más comúnmente adoptados, en orden decreciente, son: análisis de componentes principales (ACP), análisis de funciones discriminantes (AD), análisis de agrupamientos (conglomerados o clusters), regresión múltiple (RM), análisis multivariado de la varianza (MANOVA), análisis de correspondencia (AC), análisis de coordenadas principales (ACOO), análisis factorial (AF), correlación canónica (CC), modelos logarítmicos lineales (LOGL), escalamiento multidimensional (EMD) y la regresión logística múltiple (RL).

En la **Tabla 1** se mencionan los objetivos generales de los métodos de análisis multivariado más utilizados. Los procedimientos numerados del 1 al 7 utilizan **combinaciones lineales** de las variables, estos métodos son más eficientes con variables continuas, mientras que aquellos métodos numerados del 8 al 11, comprenden **métodos no lineales** y son más apropiados cuando se cuenta con variables cualitativas y el método 12 es adecuado para variables cuantitativas, cualitativas o la mezcla de ambas.

Los **métodos lineales** son apropiados cuando se quiere interpretar combinaciones óptimas de variables (por ejemplo, componentes principales en el análisis de componentes principales, factores en el análisis factorial, funciones discriminantes en el análisis discriminante. Quienes aplican métodos lineales usualmente asumen que los valores de las variables incrementan o decrecen regularmente y que entre ellas no hay interacciones. Estas relaciones no lineales en el análisis multivariado de la varianza aparecen en los términos de las interacciones y pueden revelar efectos no lineales importantes en el análisis de datos experimentales.

Para examinar con mayor eficiencia datos binarios (presencia/ausencia) y datos en rangos, se pueden usar otros modelos, donde las variables se relacionan mediante **funciones no lineales**. Cuando se utilizan combinaciones de variables hay que considerar que el coeficiente que afecta a una variable representa la contribución de esta variable a la combinación lineal y que este valor depende de las otras variables incluidas en el análisis. No se considera correcto el empleo de estos coeficientes individuales para la interpretación de dichas contribuciones.

Antes de aplicar cualquier técnica de análisis resulta imprescindible realizar un examen inicial de los datos. El examen inicial, básicamente, consiste en la evaluación de datos faltantes y la representación gráfica de los datos, lo que permite la identificación de «outliers» (datos fuera del rango o fuera de tipo), tendencias y/o agrupamientos preliminares e hipotetizar posibles modelos para su análisis. Además, cuando el análisis multivariado a emplear así lo requiera, se debe verificar si se cumplen los supuestos básicos de normalidad multivariada, homogeneidad en la estructura de variación y covariación, independencia de errores y linealidad.

Por otro lado, y al igual que en el análisis univariado, hay que tener cuidado con el uso del nivel de significancia (α) que se adopte, de las subsiguientes inferencias estadísticas y de las conclusiones a que se arriba luego del análisis. Las conclusiones confirmatorias solamente se justifican si los estudios estuvieron basados en un muestro apropiado. Esto significa que la inferencia está justificada en relación a la forma

Tabla 1. Objetivos y limitaciones de los 12 tipos de análisis multivariados más comúnmente utilizados.

Análisis	Objetivos	Limitaciones
1. Regresión múltiple (RM)	<p>Estudiar la relación funcional entre una variable dependiente (Y) y varias variables independientes (X1, X2 ... Xn).</p> <p>Predecir una variable dependiente a partir de variables independientes.</p> <p>Si los modelos están basados en experimentación, investigar causalidad y efectos.</p>	<p>Una buena predicción no habilita por sí sola a hacer inferencias sobre causalidad.</p> <p>La predicción debe ser realizada sólo en situaciones similares a aquellas de donde el modelo fue derivado (dentro del dominio de los valores experimentados).</p> <p>El procedimiento sólo considera funciones lineales de las variables analizadas.</p> <p>La RM es apropiada para variables Y continuas e independientes; en el caso que se busque realizar inferencias estadísticas, los errores deben ser normales, las varianzas homogéneas el muestreo debe ser aleatorio.</p>
2. Análisis multivariado de varianza (MANOVA)	<p>Explorar la relación entre distintas variables independientes cualitativas (tratamientos) y varias variables dependientes cuantitativas.</p> <p>Es un método básicamente inferencial.</p>	<p>El MANOVA debe cumplir con los supuestos de independencia de las observaciones, homogeneidad de matrices de varianza y covarianza para todos los grupos de tratamientos y distribución normal multivariada para todas las variables dependientes. En algunos casos con un gran número de variables dependientes el poder estadístico del ANOVA excede al obtenido con un simple MANOVA.</p>
3. Análisis discriminante (AD)	<p>Describir las situaciones multigrupales, encontrar las combinaciones lineales óptimas entre variables que permitan discriminar grupos de objetos. La ecuación de la función discriminante lineal puede ser usada para clasificar observaciones o para predecir a que grupo pertenece una nueva observación.</p>	<p>El procedimiento está indicado para variables independientes continuas, siendo ineficiente para variables que no están corregidos por varianzas o covarianzas. Con AD sólo se encontrarán las combinaciones de variables que sean lineales. Los grupos deben ser definidos a priori.</p>
4. Análisis de componentes principales (ACP)	<p>Describir una matriz de datos de objetos y variables en una dimensión más reducida, usualmente mediante una representación gráfica (biplot); fijar combinaciones lineales no correlacionadas de las variables originales maximizando sus varianzas.</p> <p>Sugerir nuevas combinaciones de variables para estudios posteriores.</p>	<p>El procedimiento es propuesto principalmente para variables continuas, es ineficiente para datos que no están corregidos por varianzas o covarianzas. Con ACP sólo se encontrarán las combinaciones de variables que sean lineales.</p>
5. Análisis de coordenadas principales (ACOP)	<p>Describir los datos mediante la reducción de las dimensiones entre objetos y mostrarlas mediante una representación gráfica. Se puede hacer con variables cuantitativas, cualitativas o con la mezcla de ambas.</p>	<p>Los resultados dependen del índice de distancia elegido. El análisis produce un nuevo sistema coordenado que, a diferencia de otros métodos, no puede indicar combinaciones de variables porque sólo emplea la matriz de distancia entre objetos.</p>
6. Análisis Factorial (AF)	<p>Reproducir una matriz de correlación entre variables originales suponiendo la existencia de uno o más factores no evidentes (latentes). Descubrir estructuras subyacentes en grupos de datos mediante la interpretación de estos factores.</p>	<p>Los métodos exploratorios de análisis de factores son tan estructurados que las interpretaciones son subjetivas. El procedimiento es ineficiente para datos que no están corregidos mediante correlaciones, por lo que no resulta ideal para relaciones no lineales o datos binarios.</p>
7. Análisis de correlaciones canónicas (CC)	<p>Analizar la correlación existente entre dos grupos de variables del mismo grupo de objetos. Esto se hace en forma simultánea en lugar de calcular correlaciones de a pares.</p>	<p>El análisis es ineficiente para datos que no están corregidos mediante correlaciones o combinaciones lineales, por lo que no resulta ideal para relaciones no lineales o datos binarios. No se pueden hacer rotaciones como en el caso del AF lo cual dificulta la interpretación de las combinaciones lineales encontradas. Brinda una estimación de la</p>

		varianza entre combinaciones lineales y no de la varianza extraída de las variables.
8. Regresión logística (RL)	Modelar la relación entre una variable respuesta binaria (Y) y una o más variables X cuantitativas y/o categóricas. La RL también sirve para investigar la asociación entre una variable X con otra variable en la presencia de otras variables X. Si los modelos de causalidad están basados en experimentación se podría estudiar causas y efectos. La RL brinda una alternativa para el AD entre dos grupos cuando las variables son categóricas.	Una buena predicción por sí sola no permite hacer inferencias de causalidad. Las predicciones sólo deberían ser llevadas a cabo en situaciones similares a aquellas utilizadas por el modelo propuesto (dentro del dominio de los valores experimentados).
9. Modelos logarítmicos lineales LOGL	Investigar las relaciones conjuntas entre variables categóricas.	Las variables deben ser categóricas o bien se requiere una transformación a categóricas.
10. Análisis de correspondencia AC	Explorar gráficamente las relaciones contenidas en las tablas de contingencia. El AC permite sugerir nuevas combinaciones de variables para estudios posteriores.	Es una técnica descriptiva aconsejable para análisis exploratorios. Es muy sensible a la presencia de "outliers".
11. Escalamiento multidimensional EMD	Describir los datos mediante la reducción de las dimensiones a través de una representación gráfica, con el objetivo de encontrar relaciones no lineales entre objetos.	El análisis solamente utiliza información que está ordenada en rangos.
12. Análisis de agrupamientos o conglomerados	Clasificar objetos o variables por su semejanza o diferencias en base a mediciones de similitud o distancia. Los agrupamientos se representan en un dendrograma.	Si bien este método puede ser usado para las variables cuantitativas y/o cualitativas, los resultados dependen de las medidas de distancias y de los algoritmos elegidos para formar los agrupamientos.

en que los datos fueron tomados y en que el experimento fue realizado, más que en la técnica de análisis en sí misma.

Las inferencias sólo están justificadas cuando los datos son tomados de una muestra grande y bien definida. Cuando esto no ocurre los valores de probabilidad tal vez directamente no se deberían informar y las conclusiones a las que se arriba sólo deberían limitarse a los datos utilizados y a las condiciones en las que se desarrolló el experimento. De la misma manera resulta poco aconsejable elaborar generalizaciones demasiado amplias cuando los estudios se realizan sobre casos particulares o específicos que no son representativos.

A menudo sucede que el investigador prefiere o necesita interpretar las variables en forma separada cuando maneja un grupo de variables correlacionadas. En estos casos sería más apropiado utilizar métodos univariados, con el complemento de pruebas de Bonferroni ajustadas. Sin embargo, cuando sea posible, la consideración conjunta de las variables, mediante la

aplicación del análisis multivariado, puede brindar conclusiones más fuertes que las logradas a través de un grupo de comparaciones simples. Si se tiene cuidado durante el proceso de interpretación de resultados, las combinaciones de variables (componentes, factores, etc.) podrían ser de significativa importancia para estudiar un proceso. El uso racional de la estadística multivariada, el ajuste de un modelo y el conocimiento biológico pueden ayudar al investigador a diseñar con criterio un experimento crucial y a llegar a conclusiones consistentes.

Como dijimos anteriormente, el análisis multivariado aprovecha las relaciones entre las variables para buscar patrones o estructuras en los datos. En este sentido, podría encontrarse un origen de patrones cuando se realizan mediciones sobre grupos de objetos similares. Pueden existir casos donde no se conoce *a priori* si los grupos están ya formados, cuantos son, o cuales objetos pertenecen a cada grupo, es allí donde habría que ver que tipo de análisis es más apropiado.

En general, en esta etapa se podrían usar métodos como los de ordenamiento de objetos (donde se logra la reducción de dimensiones entre las variables o entre objetos a una o pocas dimensiones). Otra posibilidad es hacer análisis de agrupamientos donde los objetos se clasifican en categorías jerárquicas sobre la base de matrices de similitud entre los mismos. En el primer caso, los objetos son representados en un espacio gráfico en los cuales los ejes constituyen gradientes de combinaciones de variables. El método de **análisis de componentes principales**, que es un ejemplo de análisis por ordenamiento, utiliza para tal fin las estructuras de los autovectores (también llamados *eigens* ó raíces latentes) de la matriz de correlación o bien de una matriz de varianza-covarianza entre las variables originales.

El **análisis de componentes principales** y el **análisis factorial** tienen como objetivo encontrar una estructura más simple reduciendo la dimensionalidad de las variables sin perder información. Para simplificar el análisis de los datos se reduce el número de variables a un pequeño número de índices o factores. Algunas diferencias entre estas dos técnicas son que las componentes principales están definidas como una combinación lineal de las variables originales y no están basadas en un modelo estadístico particular y por lo tanto no se requiere el cumplimiento de supuestos previos. En el análisis factorial las variables están expresadas como una combinación de factores, está basado en un modelo especial y requiere el cumplimiento de distintos supuestos. Por otra parte mediante el análisis de componentes principales se busca explicar una gran parte de la varianza total, mientras que con el análisis factorial se enfatiza el estudio en las relaciones entre las variables explicadas con las covarianzas o correlaciones. El análisis factorial resulta apropiado cuando el objetivo consiste en encontrar un grupo de variables similares, altamente correlacionadas, y postular que esas similitudes provienen del hecho de que éstas son variables "latentes o factores" que actúan en forma particular sobre el proceso estudiado.

El análisis de componentes principales es muy utilizado para el análisis de ensayos multiambientales comparativos de rendimiento,

donde a partir de la interacción genotipo-ambiente y QTL-ambiente se pueden identificar adaptaciones específicas, estabilidad, ideotipos y subregiones o mega-ambientes. Los gráficos biplot acompañan los resultados del análisis de componentes principales, y a través de estos se grafican de manera simultánea la variabilidad de las observaciones y de las variables.

El investigador interesado en definir grupos homogéneos de objetos o de variables, basados en la similitud o diferencias, y estudiar la estructura natural de las observaciones o de las variables puede aplicar el **análisis de agrupamientos**. Este análisis ha sido tradicionalmente utilizado para propósitos exploratorios. Dado que no es una técnica de inferencia estadística, para que los grupos exhiban la mayor homogeneidad interna y la mayor diferenciación entre grupos sólo se requiere que la muestra sea representativa y que las variables no sean multicolineales. En este análisis, se deben incluir aquellas variables que contribuyan a caracterizar los objetos y que se encuentren relacionadas con los objetivos del análisis. Se recomienda que un análisis de agrupamientos sea posteriormente complementado con un **análisis de funciones discriminantes** sobre los grupos previamente identificados.

El **escalamiento multidimensional**, involucra una serie de técnicas que ayudan al analista a identificar dimensiones subyacentes en la evaluación de objetos. Es especialmente utilizado en ciencias del comportamiento, ya que permite identificar dimensiones no conocidas que afectan el comportamiento. Se basa en evaluaciones comparativas de objetos cuando las bases de comparación son desconocidas o indefinibles. Se transforma el comportamiento de quienes perciben los objetos en distancias, las que finalmente se representan en un espacio multidimensional. Si bien mediante el **análisis de agrupamientos** los objetos se agrupan de acuerdo a sus características, con el escalamiento multidimensional no se enfoca el interés en los objetos en sí sino más bien, en como estos son percibidos. Esta técnica mide la correlación o covarianza de los estímulos derivados de las características de los objetos a ser evaluados. Así, las representaciones grá-

ficas enfatizan las relaciones entre los estímulos que se estudian.

El **análisis de correspondencia** es un procedimiento de ordenación apropiado para datos de tablas de contingencia (frecuencias). Las observaciones multivariadas se grafican en planos (biplot) para identificar las asociaciones de mayor peso entre las modalidades de varias variables cualitativas.

El **análisis de funciones discriminante** se utiliza cuando los objetos o individuos se reúnen en dos o más grupos, definidos *a priori*, frecuentemente se plantea el problema de cómo describir las diferencias entre grupos sobre la base de un conjunto de variables. El propósito básico del análisis de funciones discriminantes es estimar la relación que existe entre una variable dependiente cualitativa (machos vs hembras o genotipos resistentes vs genotipos susceptibles) y entre un grupo de variables independientes cuantitativas con distribución normal. Lo mismo que en el caso de análisis de componentes principales y análisis factorial, el análisis de funciones discriminantes se basa en la posibilidad de encontrar una combinación lineal de las variables originales. Como característica, el análisis de funciones discriminantes permite identificar aquellos grupos ya formados a los cuales pueden ser asignados nuevos objetos en estudio (individuos, genotipos). Posibilita además la identificación de cual o cuales de las variables independientes contribuye más a la diferenciación entre grupos.

El **análisis multivariado de la varianza** es un procedimiento de inferencia estadística usado para evaluar la significancia de la diferencia entre los grupos, que se hallan delimitados sobre la base de las distintas variables independientes discretas o tratamientos. Es una extensión del ANOVA, sólo que las diferencias se establecen teniendo en cuenta varias variables dependientes cuantitativas de distribución normal. Por ello este análisis es particularmente útil cuando los datos provienen de diseños experimentales. También puede ser considerado como una extensión del análisis de funciones discriminantes, aunque en éste la única variable dependiente es categórica y las variables independientes son cuantitativas, mientras que el análisis multivariado de la varianza involucra un grupo de varia-

bles dependientes cuantitativas y las variables independientes son cualitativas.

Las **correlaciones canónicas** reducen las dimensiones de dos grupos de variables provenientes de un mismo conjunto de objetos o individuos de manera que se puedan estudiar las relaciones conjuntas entre los grupos. Es similar al análisis de funciones discriminantes sólo que en las correlaciones canónicas las variables (no los objetos o individuos) son divididas en grupos por lo que el interés se centra sobre las relaciones entre los grupos de variables. Por ejemplo, las correlaciones canónicas se pueden utilizar cuando interesa conocer la relación existente entre los patrones de marcadores moleculares, que representan diferentes genotipos, y algunas características ambientales donde viven los individuos muestreados.

La **regresión múltiple** se considera el método apropiado cuando se presume que los valores de una variable continua dependen de los valores que tomen las otras variables. Esta técnica, que explora todo tipo de relaciones dependientes, tiene como objetivo predecir los cambios en una variable dependiente cuantitativa en respuesta a los cambios en las distintas variables independientes o predictoras. Los modelos de regresión múltiple constituyen la base para la estimación de parámetros en genética cuantitativa. Son ejemplos de su aplicación la descomposición del valor genotípico en el efecto medio de cada alelo y las interacciones debidas a dominancia y epistasia, el cálculo de la estabilidad de los genotipos mediante la descomposición de la interacción genotipo ambiente, el parecido entre parientes, la ubicación y la utilización de QTL mediante marcadores moleculares.

La ecuación de regresión es una combinación lineal de las variables independientes que mejor predicen la variable dependiente. La selección de las variables con mayor poder de predicción se realiza mediante aproximaciones secuenciales, llamadas estimaciones "stepwise" (pasos inteligentes). Mediante los coeficientes de regresión estandarizados es posible determinar la importancia relativa de cada variable predictora. Las variables independiente y dependiente deben ser cuantitativas si bien, mediante transformaciones previas, es posible

incluir variables independientes no métricas.

La aplicación del análisis **regresión logística** permite predecir una variable dependiente binaria (0,1) empleando tanto variables categóricas como cuantitativas. Es importante tener en cuenta que para asignar causalidad en forma justificada es necesario disponer de una cantidad adecuada de datos biológicos experimentales.

Si se cumplen los supuestos básicos, en especial la normalidad de las variables, no hay mayores diferencias entre la regresión logística y el análisis de funciones discriminantes, sólo que en el caso que sea posible formar más de dos grupos, este último resulta el más apropiado. Los **modelos logarítmicos lineales** comprenden a otros análisis que permiten mostrar las relaciones que existen entre variables categóricas.

6 Estudio de la interacción QTL-ambiente con ANOVA y ACP

La selección asistida por marcadores es una inmediata aplicación de la biotecnología que puede ser usada por los mejoradores para localizar un gen específico o un segmento de cromosoma que regula el fenotipo estudiado y que está presente en un individuo o en la población de interés.

En algunas poblaciones de mapeo (poblaciones segregantes con desequilibrio de ligamiento entre los marcadores genéticos y los QTLs) tales como las RIL (líneas endocriadas recombinantes) y en especial las DH (doblehaploides) es posible multiplicar genotipos prácticamente sin variabilidad genética y probarlos en ensayos multiambientales. Los ensayos multiambientales en general brindan la posibilidad de explorar las interacciones genotipo-ambiente (GE) y QTL-ambiente (QE). Si bien el efecto de algunos QTLs explica una alta proporción de la varianza fenotípica estimada en los diferentes ambientes, el efecto de otros QTLs es detectado de manera poco consistente debido a la asociación con ambientes específicos, generando una fuerte interacción QTL-ambiente.

Se ha encontrado que en el maíz tropical las temperaturas de los diferentes sitios afectan la expresión de distintos QTLs, adaptación específica debida, al menos en parte, al efecto de

la selección artificial y a la sustitución alélica ocurrida en diferentes loci. El análisis de los patrones de interacción QTL-ambiente, permite visualizar los efectos principales de los QTLs (Q) dentro y a través de los ambientes o mega-ambientes, e identificar aquellos que aumentan la efectividad de la selección y la retrocruza asistida por marcadores. Frecuentemente, los modelos que se aplican para estudiar la interacción QTL-ambiente son los mismos o similares a los utilizados para estudios de interacción genotipo-ambiente, tales como el modelo AMMI (Additive Main Effects and Multiplicative Interaction) o el modelo SREG (Sites Regression). El análisis SREG combina la técnica del ANOVA y del ACP en un sólo modelo. El ANOVA permite estudiar el efecto principal de ambiente, mientras que la interacción genotipo-ambiente más el efecto principal de genotipo (G) es tratado de forma multivariada mediante el ACP.

De manera análoga con el método GGE biplot (evaluación simultánea del G + GE), se describe el QQE biplot (Q + QE) que reduce la dimensionalidad de la información obtenida sobre múltiples QTLs en múltiples ambientes. En este método se representan los patrones de interacción QTL-ambiente a partir de una tabla de dos vías (QTLs y ambientes) y por lo tanto es posible visualizar los efectos de los QTLs dentro y a través de ambientes o mega-ambientes. Esta tabla se descompone en componentes principales y los dos primeros componentes principales se grafican para QTLs y ambientes en la forma de un biplot. El resultado del QQE biplot contiene información sobre los efectos principales de los QTLs o efecto aditivo, resumido como el efecto medio a través de ambientes e información sobre la interacción QTL-ambiente relacionada con la estabilidad de los QTLs. El primer análisis de los QQE biplot consiste en determinar si existen diferentes mega-ambientes. Si es así, se podrán generar múltiples QQE biplots y los patrones de interacción se investigarán en cada mega-ambiente.

Para interpretar la metodología del QQE biplot se utilizó una tabla QTL-ambiente (Yan y Tinker, 2005), con ocho QTL (Q1 a Q8) y ocho ambientes (E1 a E8) (Tabla 2). El biplot fue realizado con el programa Infogen (Balzarini y Di

Rienzo, 2004) en base al efecto aditivo de los QTLs.

Tabla 2. Efectos aditivos de ocho QTLs (Q1 a Q8) en ocho ambientes (E1 a E8).

	E1	E2	E2	E3	E4	E5	E6	E7	E8
Q1	1	2	2	2	2	1	1	0	1
Q2	-2	-2	-2	-3	-4	2	3	4	6
Q3	2	-2	-2	-1	-2	-3	-2	-1	-2
Q4	2	4	4	3	1	1	4	2	1
Q5	3	-2	-2	-2	-3	-4	-3	-3	-3
Q6	0	0	0	0	0	-3	-4	-5	-6
Q7	-6	-5	-5	-4	-3	0	0	0	0
Q8	3	-3	-3	4	4	3	-3	4	-4

El efecto principal de Q, de E, y de la QE explicaron 40, 3 y 57% de la variación total, respectivamente. El biplot de las CP1 y CP2 explicaron el 79% de la variación total (Figura 1). El QQE biplot permite visualizar distintos temas relacionados con la evaluación y utilización de los QTL.

QTLs mayores vs menores: La distancia de los QTLs al origen permite visualizar la magnitud de sus efectos. Así, Q2, Q6, Q7, Q5 y

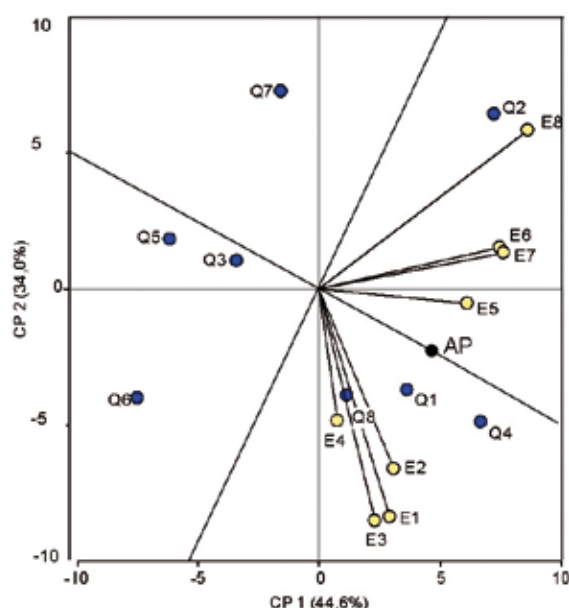


Figura 1. QQE biplot obtenido con los efectos aditivos de la Tabla 2.

Q4 pueden ser considerados QTLs con efectos mayores. Los restantes no son necesariamente menores porque sus efectos podrían aparecer en la CP3 o CP4.

Similitud entre QTLs: La distancia y el ángulo entre dos QTLs es un indicador de la similitud en sus respuestas a los ambientes. Así por ejemplo, Q6 es muy diferente de Q2, Q4 y Q7. Los QTLs con patrones similares pueden ser tratados de la misma forma en la selección asistida por marcadores.

Similitud entre ambientes y clasificación de mega-ambientes: La distancia y el ángulo entre dos ambientes miden la similitud en la expresión de los QTLs. En la Figura 1 se observan dos grupos de ambientes, E1 a E4 vs E5 a E8. Los ambientes dentro de cada grupo son similares (ángulos pequeños) pero los dos grupos son independientes (ángulo recto). Por lo tanto, se identifican dos mega-ambientes. Esto implica, que la selección de genotipos en un mega-ambiente es independiente del otro, y que las estrategias de selección requeridas en cada mega-ambiente deben ser distintas.

Efecto principal y estabilidad de los QTL a través de ambientes: El punto que representa el ambiente promedio (AP) se obtiene con la media de los coeficientes CP1 y CP2 a través de los ambientes. La línea que pasa a través del ambiente promedio y el origen del biplot es llamada eje x del ambiente promedio y las proyecciones sobre este eje cuantifican el efecto de los QTLs. Así, los efectos principales de los QTLs a través de ambientes son: Q4 > Q1 > ... > Q7 > Q5. La línea perpendicular al AP que pasa por el origen se llama eje y del ambiente promedio. Las mayores proyecciones de los QTLs sobre el eje y indican poca estabilidad de los mismos. Así Q2, Q7 y Q6 son poco estables y Q1, Q3, Q4 y Q5 son relativamente estables a través de los ambientes. Para una mejor interpretación de Q8 que toma valores intermedios, se podría realizar un gráfico complementario con las CP3 vs CP4.

Uso de los QTLs en la selección asistida por marcadores en diferentes mega-ambientes: El biplot QQE también indica la mejor combinación de los alelos de los QTLs para la máxima expresión de los caracteres en cada mega-ambiente. Por ejemplo, la Figura 1 su-

giere que para la máxima expresión del carácter en el mega-ambiente que contiene de E1 a E4 deben ser seleccionados los alelos Q1 y Q4 del parental 1, ya que presentan los valores más altos y positivos. Los mega-ambientes pueden ser examinados en biplots separados para una mejor interpretación.

Utilidades del biplot QQE: Los caracteres cuantitativos y aquellos regidos por pocos genes están sujetos a interacciones QE. Las plantas portadoras de genes para resistencia a enfermedades o para enanismo son ejemplos clásicos de genotipos adaptados para responder a ambientes específicos, por ejemplo la presencia de patógenos o altas tasas de fertilizante. Por lo tanto, es necesario entender los patrones de los QTL-ambiente antes de usar los QTL en la selección asistida por marcadores.

Lecturas recomendadas

- Balzarini, M.; Di Rienzo, J. 2004. Info-Gen: Software para análisis estadístico de datos genéticos. Universidad Nacional de Córdoba. Córdoba. Argentina.
- Everitt, B.S.; Dunn, G. 1991. Applied Multivariate Data Analysis. E. Arnold, London.
- Hair, J.F.; Anderson, R.E.; Tatham, R.L.; Black, W.C. 1995. Multivariate Data Analysis. 4ta. Ed. Prentice Hall - Upper Saddle River, New Jersey.
- James, F.C.; McCulloch, C.E. 1990. Multivariate analysis in ecology and systematic: Panacea or Pandora's box?. Annual review of ecology and systematics, 21: 129-166.
- Manly, B.F. 1986. Multivariate Statistical Methods. A Primer. Chapman and Hall, London.
- Rencher, A.C. 1995. Methods of Multivariate Analysis. J. Wiley and Sons, Inc. New York.
- Yan, W.; Tinker, N.A. 2005. A biplot approach for investigating QTL-by-environment patterns. Molecular Breeding 15: 31-43.

II. CAPÍTULO 9

Métodos multivariados para estimar variabilidad genética

Nélida Winzer, Miguel Di Renzo, Sofía Olmos, Mercedes Ibañez.

1 Introducción

La información procesada a partir de las técnicas que se desarrollan en este libro puede ser de diversos tipos y puede tratarse por otro lado, del análisis de una sola variable o de varias variables evaluadas en cada individuo o muestra.

Los análisis estadísticos a utilizar dependen de estos dos aspectos, tipo de datos y número de variables, y, además, de qué objetivo se haya planteado el investigador.

Si se trata de una sola variable se podrán aplicar las técnicas aprendidas en un curso básico de estadística (comparación de dos medias, Análisis de la Varianza, Análisis de Regresión, pruebas chi-cuadrado, etc.), o bien alguna de sus generalizaciones.

En este capítulo se desarrollarán en más detalle algunas metodologías multivariadas. Se han seleccionado aquellas que se utilizan con mucha frecuencia y que no requieren demasiados conocimientos previos.

Los datos multivariados se ordenan en una matriz. A efectos de unificar el lenguaje se considerará que cada fila de la matriz representará un individuo, una muestra, una especie; en definitiva, una OTU (*Operational Taxonomic Unit*). Las columnas representarán los caracteres o variables que se observan en cada OTU.

2 Tipo de datos

DATOS DOBLE ESTADO: Son los también llamados datos binarios o dicotómicos. Estos datos se presentan cuando el carácter puede tomar sólo dos estados posibles. Habitualmente se codifican como "0" ó "1".

Hay que reconocer dos tipos de situaciones donde pueden aparecer datos binarios.

a) Datos de presencia o ausencia. Sólo se registra la presencia ó ausencia del carácter.

Ejemplo: Presencia o no de una banda en

una corrida electroforética de isoenzimas o marcadores moleculares.

b) Datos doble estado excluyentes. El carácter tiene sólo dos estados posibles y la asignación del "0" ó el "1" es indistinta.

Ejemplos: Carácter: Sexo. Codificación:

Hembra = 0, Macho = 1, ó

Hembra = 1, Macho = 0

Tipo de Fruto: dehiscente ó indehiscente.

Clasificación de hojas: paripinadas ó imparipinadas.

La distinción entre uno u otro tipo de dato binario es importante al momento de seleccionar la medida de asociación.

Datos Multiestado Cualitativos: El carácter puede tomar un conjunto finito de estados.

Ejemplos: Margen de la hoja: aserrado, lobulado, entero.

Color de la flor: blanca, roja o rosada.

Disposición de folíolos en el raquis: alternos, subopuestos, opuestos.

Identificación de los nucleótidos presentes en una determinada secuencia de ADN: A, C, T, G.

Identificación de los aminoácidos esenciales presentes en una proteína: Gly, Ala, Ser, Thr, Cys, Val, Ile, Leu, Pro, Phe, Tyr, Met, Trp, Asn, Gln, His, Asp, Glu, Lys, Arg.

Clases de embriones somáticos: globular, acorazonado, torpedo, cotiledonar.

Datos Multiestado Cuantitativos Discretos: Están asociados a valores de conteo.

Ejemplos: Número de hileras por espiga, número de macollos por planta, número de inflorescencias.

Datos Multiestado Cuantitativos Continuos: Representan propiedades que se pueden expresar en una escala continua.

Ejemplos: Biomasa de plantas, peso de semillas, longitud de partes verdes, concentración de proteína del grano, frecuencia relativa de un alelo.

3 Medidas de asociación y distancia

Un objetivo frecuente suele ser la descripción del grado de parecido que hay entre las

OTUs. Para ello será necesario medir ese grado de similitud.

Se describirán a continuación algunas de las medidas que aparecen con mayor frecuencia en la literatura.

Hay dos tipos de medidas: los índices de asociación y las distancias. Los primeros miden el grado de similitud: cuanto más parecidas sean dos muestras mayor será su asociación. Las segundas miden el grado de disimilitud: cuanto más parecidas son dos muestras menor será su distancia.

Para datos binarios es usual trabajar con medidas de asociación. Entonces, para caracterizar a dos OTUs existen cuatro valores a considerar:

a = N° de caracteres donde ambas OTUs coinciden en el "1";

b = N° de caracteres donde la primera OTU tiene un "1" y la otra un "0";

c = N° de caracteres donde la primera OTU tiene un "0" y la otra un "1";

d = N° de caracteres donde ambas OTUs coinciden en el "0"

La suma de estos cuatro valores dará el total de caracteres medidos.

		OTU 1	
		1	0
OTU 2	1	a	b
	0	c	d

Si los datos son de presencia/ausencia, un criterio válido es considerar que dos OTUs son más parecidas cuantos más "unos" compartan. La coincidencia de "ceros" no aporta a la similitud porque puede estar generado por falta de información (la no amplificación de un fragmento RAPD puede ser debida a la carencia del sitio de hibridación del cebador por ausencia completa de la secuencia complementaria o como consecuencia de una mutación de punto en dicho sitio o bien, a una falla en la amplificación por ejemplo).

Dos de los índices que comparten este criterio son Jaccard y Dice.

JACCARD

$$J_{12} = \frac{a}{a + b + c}$$

Es la proporción de caracteres presentes que comparten, respecto al total de caracteres presentes en las dos OTUs.

Dice

$$D_{12} = \frac{2a}{2a + b + c} = \frac{a}{\frac{(a + b) + (a + c)}{2}}$$

Es la proporción de caracteres copresentes respecto al promedio de los caracteres presentes en cada OTU.

Se puede probar que Jaccard siempre dará un valor de asociación menor que Dice, salvo cuando toman el valor 0 ó 1, caso en que siempre coinciden. Más aun, ambos están relacionados mediante la ecuación $J = D/(2-D)$ ó $D = 2J/(1+J)$. Esta relación tiene como consecuencia, entre otras, que en un Análisis de Agrupamientos, cuando se usa ligamiento Simple o Completo, den los mismos grupos sólo que con distintos valores de asociación.

Ejemplo: Como resultado de la aplicación de la técnica RAPD sobre seis muestras se registró la información de la **Tabla 1** sobre la presencia o ausencia de ocho bandas generadas por un cebador.

Este es un proceso típico en el análisis de la información a partir de bandas. Primero se codifica la información, se construye la matriz de datos y, en este caso, se calcularon las matrices de asociación de Jaccard y Dice a efectos de observar las características mencionadas más arriba.

Entre las muestras A y C no se observaron bandas en común, por lo tanto $a = 0$ y tanto Jaccard como Dice dan 0.

Por otro lado, A y E comparten la presencia de las mismas bandas: $a = 5$, $b = 0$, $c = 0$. Tanto Jaccard como Dice dan 1.

Entre B y E: $a = 3$, $b = 1$, $c = 2$. Por lo tanto, de las 6 bandas presentes en una u otra muestra comparten 3. Así Jaccard vale 0.5. El total de bandas de B es 4 y el total de bandas detectadas en E es 5. El promedio de estos totales da 4.5 por lo que la asociación de Dice da $(3/4.5) = 2/3 = 0.667$.

Se observa también que, salvo los 0 y los 1, todos los valores de Jaccard son menores que los de Dice.

Tabla 1: Matriz de datos construida en base a 8 cebadores RAPDs.

	A	B	C	D	E	F
1	—			—	—	
2	—	—		—	—	—
3		—	—	—		—
4	—	—			—	—
5	—	—			—	—
6			—			—
7	—				—	—
8			—			—

	A	B	C	D	E	F
1	1	0	0	1	1	0
2	1	1	0	1	1	1
3	0	1	1	1	0	1
4	1	1	0	0	1	1
5	1	1	0	0	1	1
6	0	0	1	0	0	1
7	1	0	0	0	1	1
8	0	0	1	0	0	1

	1	2	3	4	5	6	7	8
A	1	1	0	1	1	0	1	0
B	0	1	1	1	1	0	0	0
C	0	0	1	0	0	1	0	1
D	1	1	1	0	0	0	0	0
E	1	1	0	1	1	0	1	0
F	0	1	1	1	1	1	1	1

	A	B	C	D	E	F
A	1	0.5	0	0.333	1	0.5
B	0.5	1	0.167	0.4	0.5	0.571
C	0	0.167	1	0.2	0	0.429
D	0.333	0.4	0.2	1	0.333	0.25
E	1	0.5	0	0.333	1	0.5
F	0.5	0.571	0.429	0.25	0.5	1

	A	B	C	D	E	F
A	1	0.667	0	0.5	1	0.667
B	0.667	1	0.286	0.571	0.667	0.727
C	0	0.286	1	0.333	0	0.6
D	0.5	0.571	0.333	1	0.5	0.4
E	1	0.667	0	0.5	1	0.667
F	0.667	0.727	0.6	0.4	0.667	1

Además, ambas matrices son simétricas: la asociación entre A y E es la misma que la que se da entre E y A. Por eso, basta mostrar la mitad de la matriz de asociación. Esta observación será válida para todas las medidas que se presenten en este capítulo.

Si los datos son binarios pero de estados equivalentes, dos muestras deberán considerarse más asociadas tanto cuando comparten "unos" como "ceros", ya que la codificación que se les asigna es indistinta.

Este es un proceso típico en el análisis de la información a partir de bandas. Primero se codifica la información, se construye la matriz de datos y, en este caso, se calcularon las matrices de asociación de Jaccard y Dice a efectos de observar las características mencionadas más arriba.

Entre las muestras A y C no se observaron bandas en común, por lo tanto $a = 0$ y tanto Jaccard como Dice dan 0.

Por otro lado, A y E comparten la presencia de las mismas bandas: $a = 5$, $b = 0$, $c = 0$. Tanto Jaccard como Dice dan 1.

Entre B y E: $a = 3$, $b = 1$, $c = 2$. Por lo tanto, de las 6 bandas presentes en una u otra

muestra comparten 3. Así Jaccard vale 0.5. El total de bandas de B es 4 y el total de bandas detectadas en E es 5. El promedio de estos totales da 4.5 por lo que la asociación de Dice da $(3/4.5) = 2/3 = 0.667$.

Se observa también que, salvo los 0 y los 1, todos los valores de Jaccard son menores que los de Dice.

Además, ambas matrices son simétricas: la asociación entre A y E es la misma que la que se da entre E y A. Por eso, basta mostrar la mitad de la matriz de asociación.

Esta observación será válida para todas las medidas que se presenten en este capítulo.

Si los datos son binarios pero de estados equivalentes, dos muestras deberán considerarse más asociadas tanto cuando comparten "unos" como "ceros", ya que la codificación que se les asigna es indistinta.

Un índice recomendable por su simplicidad es el de *Simple Matching* o de Concordancia Simple:

$$\text{SIMPLE MATCHING} \quad SM_{12} = \frac{a + d}{a + b + c + d}$$

Simplemente es la proporción de caracteres que comparten las dos muestras.

Si se piensa que la matriz de datos anterior corresponde a ocho caracteres binarios de estados equivalentes la matriz de asociación con el índice de Simple Matching dará:

	A	B	C	D	E	F
A	1	0.625	0	0.5	1	0.5
B		1	0.375	0.625	0.625	0.625
C			1	0.5	0	0.5
D				1	0.5	0.250
E					1	0.5
F						1

Se observa que A y E comparten todos los caracteres, por lo tanto tienen la máxima asociación. En cambio C y E no coinciden en ninguno, su asociación es 0. La asociación entre C y D y entre D y E es 0.5, lo que significa que coinciden en la mitad de los caracteres evaluados.

Además de las que se han definido hasta ahora existen muchas otras medidas para datos binarios. También se pueden definir medidas de distancia o asociación para distintos tipos de datos multiestado. Para no extender en demasía esta sección se presentarán algunas distancias definidas específicamente para frecuencias alélicas.

4 Distancias Genéticas

Se pueden clasificar en dos grupos: las basadas en un modelo geométrico (Cavalli-Sforza y Rogers) y las basadas en modelos biológicos (Nei).

Si se tienen dos poblaciones de las que se cuenta con la información sobre los *loci* para m alelos y las frecuencias correspondientes, éstas pueden expresarse de la siguiente manera:

Pob. 1: p_1, p_2, \dots, p_m

Pob. 2: q_1, q_2, \dots, q_m

Distancia Cuerda de CAVALLI-SFORZA y EDWARDS (1967):

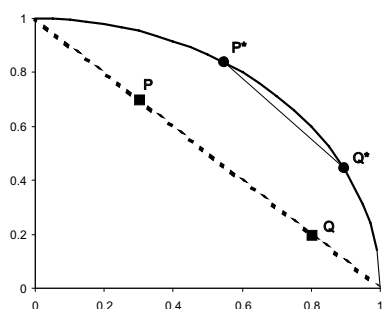
$$d_{12} = \sqrt{2 \left(1 - \sum_{i=1}^m \sqrt{p_i q_i} \right)}$$

Los puntos $P^* = (\sqrt{p_1}, \sqrt{p_2}, \dots, \sqrt{p_m})$

y $Q^* = (\sqrt{q_1}, \sqrt{q_2}, \dots, \sqrt{q_m})$ están sobre una

esfera de radio 1. La distancia Cuerda es, precisamente, la longitud de la cuerda que une esos dos puntos.

Para el caso $m = 2$, se ve en el gráfico la distancia cuerda entre los puntos $P = (0.3, 0.7)$ y $Q = (0.8, 0.2)$. Los puntos originales son llevados a la esfera (círculo) de radio 1 y luego se calcula la distancia habitual entre esos dos puntos: $d = 0.5324$.



Si se consideran simultáneamente varios *loci* la distancia Cuerda se calcula así:

$$d_{12} = \sqrt{2 \left(1 - \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{m_i} \sqrt{p_{ij} q_{ij}} \right)}$$

Distancia de ROGERS (1972):

$$R_{12} = \frac{1}{r} \sum_{i=1}^r \sqrt{\sum_{j=1}^{m_i} (p_{ij} - q_{ij})^2}$$

En el gráfico, ésta es la distancia habitual entre los puntos P y Q.

Distancia de Estándar de NEI (1972):

Esta distancia tiene una base biológica. Expresa la probabilidad de que dos alelos tomados al azar de dos poblaciones diferentes sean idénticos, con respecto a la probabilidad de que lo sean dos alelos tomados al azar de la misma población. Sean, como antes, las poblaciones 1 y 2 y las frecuencias alélicas de un *locus*:

$\sum p_i q_i$ se puede interpretar como la probabilidad que dos alelos sean iguales si uno ha sido elegido al azar de la población 1 y el otro de la población 2.

$\sum p_i^2$ es la probabilidad que dos alelos elegidos al azar de la población 1 sean iguales;

$\sum q_i^2$ es la probabilidad que dos alelos elegidos al azar de la población dos sean iguales.

Los dos últimos términos equivalen a un estado de homocigosis en la población 1 y 2, respectivamente.

Nei define primero la *Identidad normalizada* (varía entre 0 y 1):

$$I = \frac{\sum_{i=1}^m p_i q_i}{\sqrt{\sum_{i=1}^m p_i^2 \sum_{i=1}^m q_i^2}}$$

y luego la *Distancia Estándar*: $D_{12} = -\ln I$.

Si se usan varios *loci* se trabaja con el promedio aritmético de las probabilidades definidas anteriormente resultando:

$$D_{12} = -\ln \frac{\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{m_i} p_{ij} q_{ij}}{\sqrt{\sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{m_i} p_{ij}^2 \sum_{i=1}^r \sum_{j=1}^{m_i} q_{ij}^2}}$$

Ejemplo: Para la información de la Tabla 2, en el caso de las frecuencias de cinco alelos provenientes de dos *loci*, se tiene: $I = 0.857986$ y, por lo tanto, $D = 0.15317$.

loci	1			2		
	1a	1b	1c	2a	2b	
Población 1	0.4	0.3	0.3	0.2	0.8	p
Población 2	0.6	0.05	0.35	0.5	0.5	q

Tabla 2: Datos de frecuencias alélicas de dos loci para el cálculo de la Distancia Estándar de Nei.

En las poblaciones naturales una de las formas de realizar el agrupamiento jerárquico de las mismas en grupos (variedades, líneas, genotipos), es mediante el empleo de medidas de divergencia genética. Es en este campo donde las llamadas distancias genéticas tienen su mayor aplicación. Las distancias genéticas basadas en modelos biológicos son las más empleadas en estudio de genética poblacional debido a que resumen los conocimientos obtenidos de las fuerzas evolutivas que conllevan a los cambios genéticos es decir, mediante mutaciones y deriva genética.

La medida de distancia genética estándar de Nei es más confiable cuando se utilizan datos provenientes de muchos alelos. La distancia de Nei está formulada para un modelo donde se asume que las mutaciones ocurren en forma infinita, con la misma probabilidad para todos los alelos a una tasa de mutación neutral, y que la variabilidad genética inicial en la población está en equilibrio entre la variabilidad producida por mutaciones y por deriva genética, siendo el tamaño efectivo de la población, en cada una, constante. Basándose en estos supuestos, y en que todos los *loci* sean equivalentes entre sí, se espera que la Distancia de Nei se incremente linealmente con el tiempo. Si las frecuencias alélicas en cada población han sido estimadas con pocas muestras se pueden utilizar, en cambio, algunas modificaciones a la Distancia Estándar de Nei como las propuestas por Nei (1978) y Hillis (1984). La distancia de Cavalli-Sforza y Edwards, por el contrario, asume que las diferencias entre las poblaciones no provienen de mutaciones sino que son sólo consecuencia de la deriva genética. Además, no asume que el tamaño poblacional ha permanecido constante en todas las poblaciones. Considera que el tamaño de la población cambia en forma lineal pero no con el tiempo sino con $1/N$, donde N es el tamaño efectivo de la población. Así, en estos casos, los conocimientos básicos de genética poblacional brindarán las herramientas necesarias en el momento de la elección del método más apropiado para el análisis de nuestros datos.

5 Análisis de coordenadas principales

Si se tiene una matriz de distancias entre N muestras ¿será posible representar cada

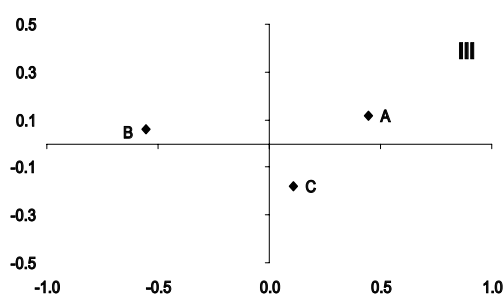
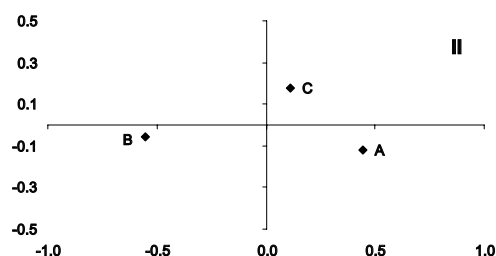
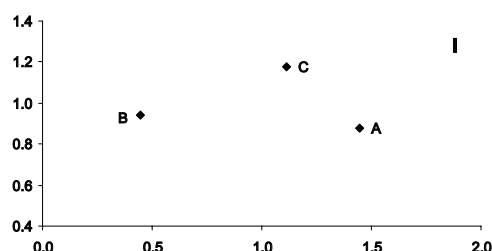
muestra mediante un punto de manera tal que las distancias resultantes reproduzcan las de la matriz?

Veamos dos ejemplos:

(i) Si se tiene la siguiente matriz D de distancias entre las muestras A, B y C:

$$D = \begin{pmatrix} 0 & 1 & .447 \\ 1 & 0 & .707 \\ .447 & .707 & 0 \end{pmatrix}$$

se podrían hacer algunos de los siguientes gráficos:



Coordenadas de A, B y C:

I: (1.444, 0.881); (0.445, 0.94); (1.111, 1.179)

II: (0.444, -0.119); (-0.555, -0.06); (0.111, 0.179)

III: (0.444, 0.119); (-0.555, 0.06); (0.111, -0.179).

Si se calcula la distancia euclídea entre los puntos en uno cualquiera de estos gráficos se ve que se han reproducido exactamente los valores de la matriz D. Por ejemplo:

$$d_E(A,B) = \sqrt{(1.444 - 0.445)^2 + (0.881 - 0.94)^2} = 1$$

en el gráfico I.

(ii) Si se tuviera la matriz de distancias entre las muestras P_1 , P_2 y P_3 :

$D' = \begin{pmatrix} 0 & 0.9 & 0.5 \\ 0.9 & 0 & 0.3 \\ 0.5 & 0.3 & 0 \end{pmatrix}$ Es fácil ver que es imposible representar en un plano puntos separados por estas distancias porque si P_1 y P_2 se ubican como extremos de un segmento de longitud 0.9, no hay manera de ubicar un punto P_3 que esté a 0.5 de P_1 y a 0.3 de P_2 .

P_1 ----- P_2

P_1 ----- $P_3?$ $P_3?$ ----- P_2

Se van a considerar, por ahora, distancias como las del ejemplo (i). Esto es, distancias para las que se puedan encontrar puntos que reproduzcan esas distancias.

Otro aspecto a considerar es el número de coordenadas necesarias para representar esos puntos. Es intuitivo que si sólo hay dos muestras a una distancia dada se pueden graficar en una recta (dimensión = 1); si hay tres muestras ya se vio que se pueden graficar en un plano (dimensión = 2); si se tuvieran cuatro muestras serían necesarias tres coordenadas (dimensión = 3); ... y si se tienen N muestras se necesitarán, en general, N-1 coordenadas. Con lo cual si se quieren graficar 40 muestras serán necesarias 39 coordenadas!!!

Es evidente que esto no es cómodo si el objetivo es obtener una representación gráfica de los puntos o muestras. Lo ideal sería obtener dos coordenadas pues se podrían graficar en un plano, o bien tres para graficar en tres dimensiones.

El problema, entonces, es encontrar las **dos mejores** coordenadas (ó las tres mejores) para obtener esta representación. Ese es el objetivo del Análisis de Coordenadas Principales (ACOP): encontrar las **k mejores** coorde-

nadas para las muestras de manera tal que si se calculan las distancias euclídeas entre ellas reproduzcan lo mejor posible una matriz de distancias dada. Habitualmente $k = 2$ ó 3 , a éstas se las llama Coordenadas Principales. Naturalmente se perderá la información de las restantes coordenadas.

Como se mostró en el ejemplo (i) hay muchas representaciones posibles. Ahí se han dado tres pero se podrían haber dado muchas más. Una manera de reducir las opciones es obtener coordenadas de manera tal que los puntos estén centrados en el origen, como en II ó III.

Se explicará el método de obtención de las Coordenadas Principales partiendo de una matriz de Asociación S . En este caso las distancias que se van a reproducir son las definidas por:

$$d^2(i, j) = S_{ii} + S_{jj} - 2 S_{ij} \quad (1)$$

donde S_{ij} es la asociación entre la muestra i y la j . Si la asociación de una muestra consigo misma es 1, es decir $S_{ii} = 1$, como ocurre con la mayoría de los índices, la ecuación se reduce a:

$$d^2(i, j) = 2(1 - S_{ij}). \quad (2)$$

Se detallarán los pasos que se deberían realizar para hacer este análisis al simple efecto de poder manejar con idoneidad los programas estadísticos de que se dispongan. Los pasos 1) a 3) son responsabilidad de esos programas. El usuario deberá, fundamentalmente, indicar-le qué asociación o distancia desea calcular y cuántas coordenadas quiere.

PASO 1) Centrar doblemente la matriz $S \rightarrow S^0$.

PASO 2) Calcular los autovalores y autovectores de S^0 .

PASO 3) Calcular las coordenadas de los puntos representativos de las muestras.

PASO 4) Graficarlos.

El PASO 1 tiene como fin hacer que los puntos resultantes estén centrados. Cada elemento de la matriz de asociación S se centra por filas y por columnas:

$$S_{ij}^0 = S_{ij} - S_{i\bullet} - S_{\bullet j} + S_{\bullet\bullet} \quad (3)$$

donde $S_{i\bullet}$ es el promedio de la fila i de S , $S_{\bullet j}$

es el promedio de la columna j y $S_{\bullet\bullet}$ es el promedio de todos los elementos de S .

En el PASO 2 se encuentran:

a) una matriz $N \times N$ donde cada columna es un vector de longitud uno. Son los *autovectores*.

b) N números ordenados en forma decreciente: los *autovalores*.

Estos elementos son característicos de cada matriz S^0 . Por eso también se los conoce como vectores y valores característicos. Cada autovector está asociado a un autovalor.

Si la matriz de distancias es "representable" (como la del ejemplo (i)) los autovalores serán positivos o ceros (el más chico es siempre cero para estas matrices "representables").

En el PASO 3, si se desean k coordenadas, se toman los k primeros autovectores y se multiplican por la raíz del autovalor respectivo. El primer autovector da la primera coordenada de todas las muestras, el segundo la segunda coordenada y así siguiendo hasta la k -ésima. Si sólo se desean dos coordenadas para graficar los puntos en un plano se toman los dos primeros autovectores ($k=2$).

En la **Tabla 3** se presenta un ejemplo sencillo.

El gráfico correspondiente es el Gráfico II que se mostró más arriba donde A es la muestra 1, B la 2 y C la muestra 3.

Las distancias (2) calculadas a partir de la matriz de asociación S dan la matriz de Distancias D . Por esa razón ambas matrices tienen la misma representación.

$$d_{12}^2 = 2(1 - S_{12}) = 2(1 - 0.5) = 1 \Rightarrow d_{12} = 1$$

$$d_{13}^2 = 2(1 - S_{13}) = 2(1 - 0.9) = 0.2 \Rightarrow d_{13} = 0.447$$

$$d_{23}^2 = 2(1 - S_{23}) = 2(1 - 0.75) = 0.5 \Rightarrow d_{23} = 0.707$$

OBSERVACIÓN 1: Como en el ejemplo sólo hay tres muestras los autovectores tienen tres componentes. Si se trabajara con una matriz de asociación entre 40 muestras, los autovec-

tores tendrían 40 componentes, una por cada muestra.

OBSERVACIÓN 2: Para la matriz S se han reconstruido totalmente las distancias porque sólo son tres muestras. Si hubiera más ($N=40$, por ejemplo) sólo se reconstruirían totalmente las distancias si se usan 39 coordenadas. Si sólo se usan las dos primeras se reconstruye, en general, sólo un porcentaje de las distancias. Hay dos tipos de porcentajes que se pueden calcular:

Porcentaje de Dispersión:

$$\alpha_1 = \frac{\lambda_1 + \lambda_2}{\lambda_1 + \dots + \lambda_N} \times 100\%$$

si sólo se usan dos coordenadas.

Este porcentaje se interpreta teniendo en cuenta que:

$$2N (\lambda_1 + \dots + \lambda_N) = \sum \sum d_{ij}^2$$

, sumando sobre todos los pares de muestras. En cambio, la suma del cuadrado de las distancias reconstruidas con las dos coordenadas es igual a $2N (\lambda_1 + \lambda_2)$. Por lo tanto, este porcentaje mide cuánto se reconstruye del cuadrado de todas las distancias.

Si se usan más de dos coordenadas se van sumando los autovalores correspondientes en el numerador.

En nuestro ejemplo: $\alpha_1 = 100\%$

Porcentaje de Distorsión:

$$\alpha_2 = \frac{\lambda_1^2 + \lambda_2^2}{\lambda_1^2 + \dots + \lambda_N^2} \times 100\%$$

Este valor mide cuánto se acercan los valores de la matriz de asociación reconstruida respecto de la matriz de asociación original S^0 . Más exactamente:

$$\alpha_2 = \left(1 - \frac{\|S^0 - S^{0*}\|^2}{\|S^0\|^2} \right) \times 100\% = \left(1 - \frac{\sum (s_{ij}^0 - s_{ij}^{0*})^2}{\sum (s_{ij}^0)^2} \right) \times 100\%$$

En este algoritmo se ve que lo que se está comparando son las asociaciones originales, s_{ij}^0 , con las reconstruidas, s_{ij}^{0*} , una a una. Para el cálculo de α_2 se usa la primera fórmula por lo que el lector no debe traumatizarse con la segunda.

$\begin{pmatrix} 1 & 0.5 & 0.9 \\ 0.5 & 1 & 0.3 \\ 0.9 & 0.3 & 1 \end{pmatrix}$	Doble \Rightarrow centrado	$S^0 = \begin{pmatrix} 0.2111 & -0.239 & 0.028 \\ -0.239 & 0.3111 & -0.072 \\ 0.028 & -0.072 & 0.0444 \end{pmatrix}$
Autovalores de S^0 :		
$\lambda_1 = 0.5167$	$\lambda_2 = 0.05$	$\lambda_3 = 0$
\downarrow	\downarrow	\downarrow
v_1	v	v_3
Autovectores de S^0 : Columnas de		
$V = \begin{pmatrix} 0.6173 & -0.5344 & 0.57735 \\ -0.7716 & -0.2674 & 0.57735 \\ 0.1543 & 0.8019 & 0.57735 \end{pmatrix}$		
Primeras 2 Coordenadas:		
$\sqrt{\lambda_1} v_1$	$\sqrt{\lambda_2} v_2$	
Muestra 1 \Rightarrow 0.4437	-0.1195	
Muestra 2 \Rightarrow -0.5546	-0.0598	
Muestra 3 \Rightarrow 0.1109	0.1793	

Tabla 3. Cálculo de autovalores y autovectores para el gráfico de coordenadas principales.

OBSERVACIÓN 3: Si se hubieran obtenido autovalores negativos la primera medida no es recomendable. Hasta podría darse el caso que α_1 fuera mayor al 100%. La segunda, en cambio, sigue teniendo sentido. Por otro lado, no se podrían calcular coordenadas asociadas a ese autovalor porque no se puede calcular $\sqrt{\lambda_i}$

La aparición de autovalores negativos no es necesariamente un problema grave para la representación siempre que los autovalores negativos sean pocos y pequeños. Por ejemplo, si se trabaja con 50 muestras, en el PASO 2 se obtendrán 50 autovalores, de los cuales uno, seguramente, es cero. Para la representación en el plano se usan sólo los dos primeros. Si los últimos 10 son negativos no se verán afectados los cálculos de las coordenadas.

Hay asociaciones y distancias que nunca dan autovalores negativos, entre ellos se encuentran Jaccard, Ochiai, Russell y Rao, Simple Matching y la distancia euclídea.

Si en lugar de tener una matriz de asociaciones se tiene una matriz de distancias el procedimiento consiste en calcular una matriz S cuyos elementos son:

$$s_{ij} = -\frac{d_{ij}^2}{2}, \quad (4)$$

y luego seguir los PASOS 1, 2, 3 y 4 anteriores.

OBSERVACIÓN 4: Cada autovector de S^0 es un vector de longitud 1 en una cierta dirección. Pero por cada dirección podemos tener dos vectores: v y $-v$. Por ejemplo:

$$v_2 = \begin{pmatrix} -0.5344 \\ -0.2674 \\ 0.8019 \end{pmatrix} \quad y \quad -v_2 = \begin{pmatrix} 0.5344 \\ 0.2674 \\ -0.8019 \end{pmatrix}$$

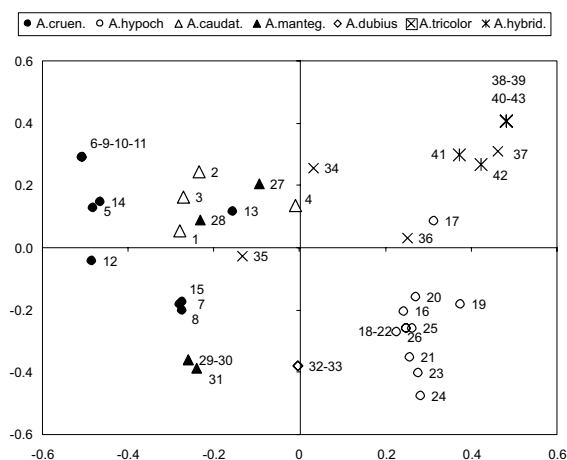
Cualquiera de estos dos vectores pueden usarse como segundo autovector y, más aun, algunos programas pueden dar como resultado el primero y otros el segundo. Como consecuencia de esta selección se obtendrá el gráfico II ó el III. Se ve que el único efecto de usar uno u otro vector es una reflexión del gráfico respecto del primer eje. Si se cambia el signo de v_1 se obtendrá una reflexión respecto del segundo eje. Ninguno de estos cambios modifica la distancia entre los puntos.

No debe causar sorpresa, entonces, que con un programa se obtenga un gráfico y con otro el mismo gráfico pero con una reflexión sobre uno u otro eje, o sobre los dos.

Por otro lado, también es lícito cambiar, por alguna razón, el signo de una coordenada. Por ejemplo, esto puede ser útil cuando se quieren comparar Análisis de Coordenadas Principales realizados con distintas asociaciones o distancias sobre el mismo conjuntos de muestras.

Ejemplo:

Presentamos la caracterización de 8 cultivos comerciales y 35 cultivares en experimentación mediante análisis izoenzimático de semillas de *Amaranthus*. Estas accesiones pertenecen a siete especies: *A. caudatus*, *A. cruentus*, *A. hypochondriacus*, *A. mantegazzianus*, *A. dubius*, *A. tricolor*, y *A. hybridus* (Di Renzo et al., 2001). Del total de 43 cultivares, 31 fueron polimórficos con 7 sistemas isoenzimáticos (**Tabla 4**). Se aplicó análisis de coordenadas principales a los datos de presencia/ausencia de las 23 bandas polimórficas. En la figura puede observarse el nivel de diversidad genética dentro de este germoplasma representado por las coordenadas 1 y 2. Este análisis agrupó la mayoría de los cultivares de acuerdo a su clasificación taxonómica y mostró que existen relaciones entre diferentes accesiones. Se concluye que el análisis isoenzimático de semillas fue efectivo para caracterizar los cultivares destinados a los programas de mejoramiento de *Amaranthus*.



Al sólo efecto de que el lector pueda reparar algunos cálculos en la **Tabla 5** se dan los primeros diez elementos de los dos primeros autovectores y las dos primeras coordenadas principales.

6 Análisis de agrupamientos (cluster)

Esta técnica tiene como objetivo formar grupos de muestras, poblaciones, individuos u OTUs que sean similares entre sí y diferentes a los elementos de los otros grupos.

El primer problema es fijar el criterio para decidir cuándo dos elementos son similares. Si se tuviera un mazo de cartas, ¿cómo formar grupos? ¿por el valor de la carta?, ¿porque comparten el palo?. Según el criterio que se aplique los grupos que se formen serán distintos.

En la sección anterior hemos visto distintas maneras de definir la similitud o disimilitud entre OTUs. Cada una de ellas, u otras que no se han presentado aquí, plantean distintos formas de medir la similitud entre los elementos a agrupar.

Existen, además, muchos métodos para formar los grupos. Uno de los más usados son los agrupamientos *jerárquicos* que pueden, a su vez, ser *divisivos* o *aglomerativos*. Los primeros comienzan con todos los elementos en un solo grupo y en sucesivas divisiones se van formando grupos cada vez más pequeños. Los aglomerativos, por el contrario, empiezan considerando tantos grupos como elementos se tienen y se van agrupando según su grado de parecido. Los sucesivos pasos de uno y otro método se pueden representar en un gráfico denominado *dendrograma*.

En esta sección se tratarán solamente los métodos jerárquicos aglomerativos.

Aquí se plantea un segundo problema: ¿Qué tipo de ligamiento se va a utilizar? Esto es, una vez realizado el primer agrupamiento, cómo se define la distancia entre ese grupo y los restantes elementos?

Supongamos que en un primer paso se han agrupado los elementos A y B porque son los que presentan la menor distancia entre sí. La distancia entre el nuevo grupo AB y otro elemento C se puede definir según distintos criterios:

LIGAMIENTO SIMPLE: $d(AB,C) = \min \{d(A, C), d(B, C)\}$,

LIGAMIENTO COMPLETO: $d(AB,C) = \max \{d(A, C), d(B, C)\}$,

LIGAMIENTO PROMEDIO: $d(\{A,B\},C) = \frac{d(A,C) + d(B,C)}{2}$

En el caso del ligamiento simple, la nueva distancia se define es la mínima distancia entre

el elemento elemento C y cada elemento del grupo formado AB. En cambio, el ligamiento completo la nueva distancia se define tomando la máxima distancia entre C y cada elemento del nuevo grupo. Si A, B y C fueran grupos formados en pasos anteriores, se usan los mis-

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
5	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
6	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
9	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
10	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
11	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
12	0	0	0	1	0	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1
13	0	0	0	1	1	0	0	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
14	0	0	0	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	0	0	0	1
15	0	0	0	1	1	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
19	0	1	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
16	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1
20	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
21	0	1	0	1	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0
28	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	1
27	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
2	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
3	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	1	1	0	0
23	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	1	0	0	0	1	0
24	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1	0
25	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
26	0	1	0	0	1	0	0	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
29	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
30	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1	0	1	0
31	0	1	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
32	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	1	0
33	0	1	0	1	1	0	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1	0
18	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
22	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	1
7	0	1	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
17	0	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
34	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	0	1
35	1	0	0	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	1
36	1	1	1	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	1	0	0	1	0	1	1	1
37	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
38	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
39	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
40	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
41	1	1	1	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1
42	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	1	1
43	1	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	1	0	0	0	1
4	1	1	0	0	0	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0
8	0	0	1	1	0	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0

Tabla 4. Matriz de datos de análisis isoenzimático de 8 cultivos de *Amaranthus*.

	V1	V2	CP1	CP2	
1	-0.127	0.031	-0.279	0.055	Autovalores: 4.81258 3.22431 $\alpha_1 = 46.85$ $\alpha_2 = 78.2$
2	-0.107	0.137	-0.235	0.246	
3	-0.123	0.091	-0.270	0.163	
4	-0.005	0.074	-0.010	0.134	
5	-0.220	0.070	-0.483	0.126	
6	-0.232	0.162	-0.509	0.291	
7	-0.125	-0.112	-0.273	-0.202	
8	-0.125	-0.097	-0.274	-0.174	
9	-0.232	0.162	-0.509	0.291	
10	-0.232	0.162	-0.509	0.291	
...	

Tabla 5. Resultados de autovectores y coordenadas principales del análisis isoenzimático de 8 cultivos de *Amaranthus*.

	AE	B	C	D	F
AE	0	1	1.41	1.15	1.1
B	1	0	1.29	1.10	0.93
C	1.41	1.29	0	1.26	1.07
D	1.15	1.10	1.26	0	1.22
F	1.1	0.93	1.07	1.22	0

	AE	BF	C	D
AE	0	1	1.41	1.15
BF	1	0	1.07	1.10
C	1.41	1.07	0	1.26
D	1.15	1.10	1.26	0

	AEBF	C	D
AEBF	0	1.07	1.10
C	1.07	0	1.26
D	1.10	1.26	0

	AEBFC	D
AEBFC	0	1.10
D	1.10	0

	AE	BF	C	D
AE	0	1.1	1.41	1.15
BF	1.1	0	1.29	1.22
C	1.41	1.29	0	1.26
D	1.15	1.22	1.26	0

	AEBF	C	D
AEBF	0	1.41	1.22
C	1.41	0	1.26
D	1.22	1.26	0

	AEBFD	C
AEBFD	0	1.41
C	1.41	0

	AE	BF	C	D
AE	0	1.05	1.41	1.15
BF	1.05	0	1.18	1.16
C	1.41	1.18	0	1.26
D	1.15	1.16	1.26	0

	AEBF	C	D
AEBF	0	1.295	1.155
C	1.295	0	1.26
D	1.155	1.26	0

	AEBFD	C
AEBFD	0	1.277
C	1.277	0

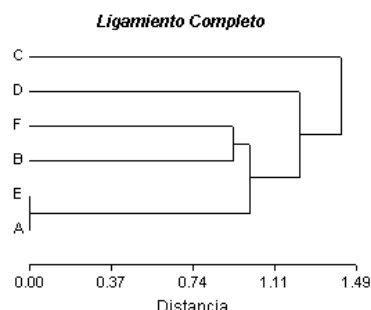
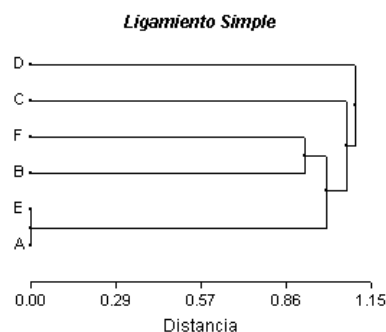


Tabla 6. Diferentes clases de agrupamiento en base a la matriz de distancias.

mos algoritmos en el caso del ligamiento simple o completo. Para el ligamiento promedio hay que promediar todas las distancias entre elementos de AB y de C: donde d_{ij} es la distan-

$$d(AB, C) = \frac{\sum_{i,j} d_{ij}}{n_{AB} n_C}$$

cia entre el elemento i del grupo AB y el j de C; n_{AB} y n_C son los números de elementos en el grupo AB y C, respectivamente.

Este ligamiento promedio se conoce también por las siglas UPGMA (Unweighted Pair Groups Method with Arithmetic Averages).

Consideremos el ejemplo de la **Tabla 6**. Primero se realizará un agrupamiento aplicando ligamiento simple.

En primer lugar se agrupan los elementos A y E porque están a menor distancia (son iguales). Formado ese primer grupo habría que calcular las nuevas distancias del grupo AE a los restantes elementos pero como $d(A, U) = d(E, U)$ para todos los restantes elementos U se mantienen esas distancias.

En el segundo paso se observa que la menor distancia es la de B a F; se forma ese grupo y se recalculan las distancias del nuevo grupo a los restantes. Y así hasta que se han agrupado todos. También se puede detener el proceso fijando algún otro criterio para ello.

Por ejemplo, cuando se ha alcanzado una distancia máxima fijada previamente.

A continuación se aplica el ligamiento completo. Los dos primeros agrupamientos coinciden en este ejemplo, por lo que sólo se muestran los tres últimos pasos. Por último se ven los pasos cuando se aplica un ligamiento promedio. Los mismos métodos se pueden aplicar sobre matrices de asociación cambiando los conceptos de "menor distancia" por el de "mayor asociación".

En general, el ligamiento simple produce agrupamientos en cadena: a los grupos formados inicialmente se van acoplando los restantes elementos. En cambio, el ligamiento completo tiende a generar muchos grupos chicos que se reunirán en los últimos pasos.

El análisis de Agrupamientos sólo debe tomarse como un **método exploratorio**. Si originalmente los datos forman grupos bien separados cualquier método de agrupamiento dará, aproximadamente, los mismos resultados. Pero si las muestras forman un continuo, cada método y cada medida de distancia pueden conducir a resultados muy dispares. En este caso las conclusiones deben realizarse con cautela.

A veces es conveniente realizar un Análisis de Coordenadas Principales para determinar si existen grupos claramente definidos o no.

7 Lecturas recomendadas

- Cavalli-Sforza, L.L.; Edwards, A.W.F. 1967. Phylogenetic analysis: models and estimation procedures. *Am J Hum. Gen* 19: 233-257.
- Di Renzo, M.; Bonamico, N.; Gesumaria, J. 2001. Characterisation of amaranth accessions by isozymic patterns. *Seed Sci Technol* 29 (1): 227-238.
- Everitt, B.S.; Dunn, G. 1991. *Applied Multivariate Data Analysis*. E. Arnold, London.
- Hair, J.F.; Anderson, R.E.; Tatham, R.L.; Black, W.C. 1995. *Multivariate Data Analysis*. 4ta. Ed. Prentice Hall - Upper Saddle River, New Jersey.
- Hillis, D. 1984. Misuse and modification of Nei's genetic distance. *Syst Zool* 33: 238-240.
- Manly, B.F. 1986. *Multivariate Statistical Methods. A Primer*. Chapman and Hall, London.
- Nei, M. 1972. Genetic distances between populations. *Am Nat* 106: 283-292.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from small number of individuals. *Genetics* 76: 379-390.
- Rencher, A.C. 1995. *Methods of Multivariate Analysis*. J. Wiley & Sons, Inc. New York.

PARTE III
***Métodos para acelerar
programas de mejoramiento
e identificación varietal***

III. CAPÍTULO 1

Obtención de Plantas

Doblehaploides

Polci, Pablo; Conti, Verónica; Miranda, Rubén;
Gear, Nicolás

1 Introducción

Comentarios generales sobre los haploides

Para referirnos al término haploide es necesario conocer previamente el origen de dicha denominación, y definir algunos conceptos básicos sobre el tema. Si consideramos *haploide* al individuo que posee un solo juego de cromosomas de la especie, no estaríamos incluyendo en esta clasificación a aquellos individuos derivados de especies poliploides, cuya constitución genética es igual a la de los gametos normales de dicha especie. Por ejemplo, un autopoliploide AAAA ($2n = 4x$) daría lugar a individuos “haploides” AA ($n = 2x$), que por tener dos juegos cromosómicos (AA) no podrían ser incluidos en la definición. Por lo tanto, una solución sería denominar como haploides a los individuos originados a partir de especies *diploides*, que posean un solo juego de cromosomas ($n = x$), llamando *polihaploides* a aquellos individuos con una composición cromosómica igual que la gamética normal de la especie, que tengan dos o más juegos cromosómicos ($n > x$). Otra posibilidad sería considerar el término haploide en un sentido más amplio, comprendiendo en éste a todos los individuos que posean una constitución cromosómica igual a la de los gametos normales de la especie ($n = 2n/2$). Llamariamos de esta manera *monoploides* y *polihaploides* a los individuos provenientes de plantas diploides ($2n = 2x$) y poliploides ($2n > 2x$) respectivamente. De aquí en adelante, a los fines prácticos y en concordancia con la segunda definición, nos referiremos al término *haploide* indistintamente del nivel de ploidía de la especie en cuestión, como a aquellos individuos que poseen la mitad del número cromosómico normal contenido en las células somáticas de la especie.

Identificación de Haploides

Varios procedimientos facilitan la búsqueda de haploides en muestras grandes en número de individuos. Algunos de ellos son:

- *Morfología*: las plantas haploides son, en general, más pequeñas que las diploides, tanto en sus partes vegetativas como florales. Esto se debe principalmente a la disminución en el tamaño de sus células. Es lógico pensar que el fenotipo más pequeño de las plantas puede ser una primera aproximación en la búsqueda de haploides. Si esta disminución de tamaño fuera notable en las semillas, sería muy fácil realizar una selección mecánica, aunque esto sucede en pocas especies.
- *Poliembrionía*: la presencia de poliembrionía facilita la detección de embriones haploides. No obstante, debe realizarse el control citológico correspondiente. El porcentaje de embriones gemelos observados varía con la especie y el genotipo.
- *Genes marcadores*: con este fin puede utilizarse cualquier par de alelos cuyos fenotipos dominante y recesivo sean fácilmente distinguibles. En la práctica, conviene utilizar marcadores que posean manifestaciones fenotípicas claras en semilla o en plántula y de esta manera hacer una selección más económica en tiempo y esfuerzo. Para identificar haploides en una variedad que se supone homocigota, se realizan cruzamientos con otra variedad que sea homocigota para el alelo alternativo. La mayor parte de la descendencia será heterocigota (diploide), con fenotipo dominante. Los individuos que aparezcan con el fenotipo recesivo serán haploides, obtenidos por partenogénesis o androgénesis, según sea el fenotipo recesivo materno o paterno, respectivamente.

Antecedentes

El valor de los haploides se conoce desde 1922, cuando se descubrió la producción espontánea de los mismos, siendo superior a cien el número de especies vegetales capaces de producirlos *in-vivo*. Sin embargo, la frecuencia con la cual se producen es muy baja, con valores que van de 0,001 a 0,01%.

Entre los casos de *haploidía espontánea* es común la poliembrionía, que, con una gran va-

riación entre los distintos genotipos, ocurre en una amplia gama de especies, géneros y familias. En estos casos es frecuente la aparición de haploides procedentes de una sinérgida del saco embrionario, puesto que se ha comprobado en muchas especies que las células antípodas degeneran antes de la fecundación.

En 1966, Guha y Maheshwari descubrieron que las anteras de *Datura innoxia* Mill. generaban plantas haploides al ser cultivadas *in-vitro*. Este proceso, confirmado posteriormente por Nitsch y Nitsch (1969) en tabaco, se ha utilizado para producir haploides en numerosas especies. En el caso de *Datura innoxia*, las frecuencias de inducción son casi del 100% y el rendimiento es de más de mil plántulas o callos por antera en condiciones óptimas (figura 1).

En estudios de androgénesis *in-vitro* se ha detectado especial facilidad para regenerar haploides a partir de anteras aisladas o de granos de polen en miembros de la familia de las solanáceas. También se han encontrado resultados sorprendentes en numerosos géneros de las crucíferas, gramíneas y ranunculáceas, aunque resulta común observar diferencias significativas, incluso dentro de un mismo género. No se ha logrado, sin embargo, el mismo éxito en especies arbóreas y arbustivas.

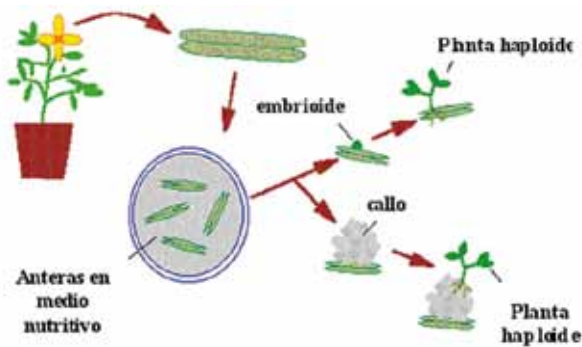


Figura 1. Obtención de plantas haploides por cultivo de anteras.

Importancia de los haploides y aplicaciones en el mejoramiento vegetal

Los métodos tradicionales para el mejoramiento vegetal han sido practicados por cientos de años. Actualmente se ha llegado a una etapa en donde estos métodos son insuficientes

para hacer frente a las demandas mundiales de producción. A pesar de que cada año se liberan al mercado numerosas variedades, estas no persisten demasiado. Los objetivos de mejoramiento a largo plazo no podrán ser alcanzados a menos que se genere mucha variabilidad genética que pueda ser utilizada con estos fines y que existan métodos que acorten el tiempo necesario para la obtención de variedades.

El advenimiento de las técnicas biotecnológicas y los avances en biología molecular han permitido el desarrollo de nuevas herramientas de gran utilidad en el mejoramiento vegetal. Entre éstas, la producción de haploides y doblehaploides son herramientas interesantes ya que permiten acortar el tiempo requerido para la obtención de nuevas variedades, siendo un buen complemento para los programas de mejora tradicionales. Al carecer de genotipos heterocigotas, las poblaciones doblehaploides (DH) necesarias para encontrar genotipos raros pueden ser mucho menos numerosas, especialmente en el caso de caracteres recesivos, ya que éstos no quedan enmascarados por los alelos dominantes. Las poblaciones DH, si se las compara con poblaciones segregantes, presentan mayor variación genética aditiva y ausencia de varianza genética debida a la dominancia. Es decir que cuando se utilizan poblaciones doblehaploides se eliminan las complejidades del estado heterocigota y se facilita enormemente el análisis genético. De esta manera pueden distinguirse las mutaciones recesivas de forma inmediata, haciendo que el proceso de selección sobre una población de haploides resulte más eficiente (figura 2).

La producción de haploides es una alternativa biotecnológica de gran importancia y ha resultado exitosa en varios cultivos, entre ellos cebada, arroz, maíz y trigo.

Un sistema de producción de DH debe cumplir con tres requisitos básicos para su utilización en programas de mejoramiento:

1. Debe producir líneas DH eficientemente a partir de todos los genotipos.
2. Los DH obtenidos deben ser normales y estables.
3. Éstos deberían representar una muestra al azar del conjunto de gametos parentales.

Entre las aplicaciones más importantes de los doblehaploides en el mejoramiento vegetal podemos citar:

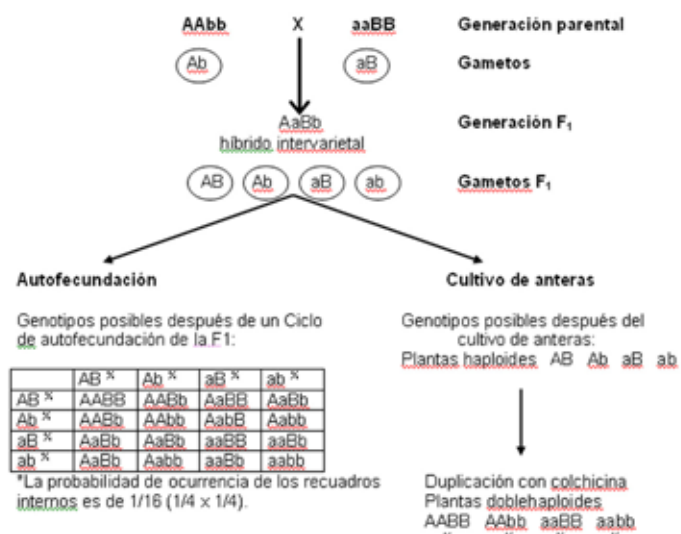


Figura 2. Ventaja del uso de haploides en el mejoramiento cuando los cultivares parentales difieren, teóricamente, en dos pares de genes. Si el genotipo buscado es, por ejemplo el doble recesivo aabb, por autofecundación convencional se tiene una probabilidad de 1/16 de encontrarlo. Si se induce haploidía, el mismo genotipo tendrá una probabilidad de ocurrencia de 1/4 porque no se producirán los genotipos heterocigotas.

1. Acortamiento de los programas de mejora: el desarrollo de nuevos cultivares por los métodos tradicionales actuales comprende tres etapas fundamentales: a) generación de variabilidad genética, ya sea por medio de hibridaciones sexuales intra e interespecífica, por inducción de mutaciones, o por transformación genética; b) recuperación de progenies homocigotas a través de generaciones repetidas de autofecundación o retrocruzamiento, seleccionando a favor de los caracteres de interés; c) evaluación del comportamiento de los nuevos materiales en ensayos comparativos a campo. Estos pasos son básicos en un programa de mejora, pudiendo existir otras etapas en función del modo reproductivo de la especie. Así por ejemplo, el tiempo requerido para la obtención de un nuevo cultivar de trigo de ciclo invernal es de aproximadamente diez años, a través del mejoramiento tradicional (figura 3). La biotecnología se presenta como una alternativa atractiva, no sólo para reducir el tiempo de obtención de los genotipos deseados, sino también para lograr una economía de mano de obra y espacio en el campo experimental.

- En las plantas *autógamas*, con los métodos convencionales de mejoramiento, la homocigosis práctica se logra recién luego de seis a ocho generaciones de autofecundación. Mientras que con una técnica de producción de haploides seguida de duplicación cromosómica, es posible llegar a homocigosis completa en solo una generación.
- En las plantas *alógamas*, la producción de homocigotas resulta de gran importancia. Al trabajar con especies de polinización cruzada se favorece naturalmente la heterocigosis, y, de ser posible la autofecundación, la obtención de homocigotas se ve dificultada por la endogamia.
- En plantas *bulbosas, árboles frutales y forestales* la homocigosis juega un rol muy importante en el aceleramiento de los programas de mejora. Debido al prolongado tiempo requerido para alcanzar la fase adulta, el proceso de mejora resulta extremadamente largo, aún siendo posible la autopolinización.

2. Generación de poblaciones de mapeo: para el mapeo genético de plantas, diversos tipos de poblaciones pueden ser utilizadas. La selección del tipo de población a usar se realiza en función de los objetivos de la investigación y del tiempo y recursos disponibles. Las poblaciones de mapeo con el mayor contenido de información son aquellas obtenidas a partir del cruzamiento entre dos individuos homocigotos contrastantes. En las plantas F₁ obtenidas, el desequilibrio de ligamiento es máximo, y las poblaciones derivadas a partir de estas plantas F₁ procuran explorar este desequilibrio. Para especies de autofecundación o que toleran la autofecundación pueden utilizarse poblaciones F₂, F_n, RILs (*Recombinant Inbred Lines*), derivadas de retrocruzas y doblehaploides. Las poblaciones de doblehaploides representan la variabilidad genética entre los progenitores luego de ocurrida una sola meiosis (F₁), y son especialmente indicadas cuando se realizan estudios con QTL (*Quantitative Trait Locus*), ya

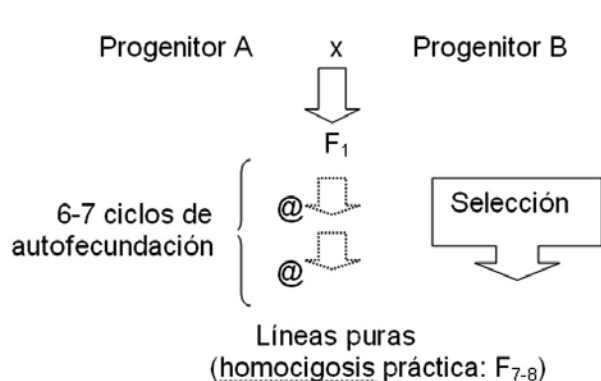


Figura 3. Representación esquemática de los pasos requeridos para la obtención de líneas puras en un programa de mejoramiento tradicional.

que al obtenerse genotipos 100% homocigotas se dispone de poblaciones estables o “inmortales” de mapeo, permitiendo analizar la misma población en diferentes años y localidades, debido a la constante disponibilidad de semilla.

3. Estudio de especies poliploides: la inducción de haploides en plantas poliploides facilita el trabajo de investigación y mejora, ya que permite manejar niveles de ploidía menores para los estudios de herencia y la combinación de caracteres de interés.

4. Fusión de protoplastos: al fusionar dos protoplastos haploides se origina uno diploide que puede duplicarse y llevar a la obtención de un híbrido interespecífico o intergenérico, siendo esto una ventaja importante cuando se trabaja en hibridación somática.

5. Variación gametoclinal: la androgénesis *in-vitro* provee un excelente sistema para analizar, a nivel esporofítico, la variación debida a recombinación y segregación meiótica. Las variantes gametoclonales expresan el carácter recesivo en la R₀, a diferencia de las somaclonales, que requieren de autofecundación y análisis de progenie. Algunos logros de esta técnica:

- Frutos de tomate con mayor contenido de sólidos.
- Plantas enanas de arroz con granos más largos y con elevados niveles de proteínas de reserva y más macolladoras.
- Plantas de *Datura innoxia* con contenidos más elevados de alcaloides en las hojas.
- Plantas de tabaco con mayor resistencia

a bajas temperaturas.

- Plantas de *Brassica napus* con mayor contenido de aceite del ácido erúico en las hojas. Este aceite se usa como lubricante en la industria.

6. Mutagenesis: si se aplica mutagenesis a un sistema de haploides, se obtienen mutantes sólidos, lográndose la homocigosis del mutado rápidamente luego de la duplicación con colchicina. Entre los agentes mutagénicos más frecuentemente utilizados se encuentra la N-metil-N-nitrosurea (20 mM), los rayos γ (0,5 krad) y el etil metil sulfonato.

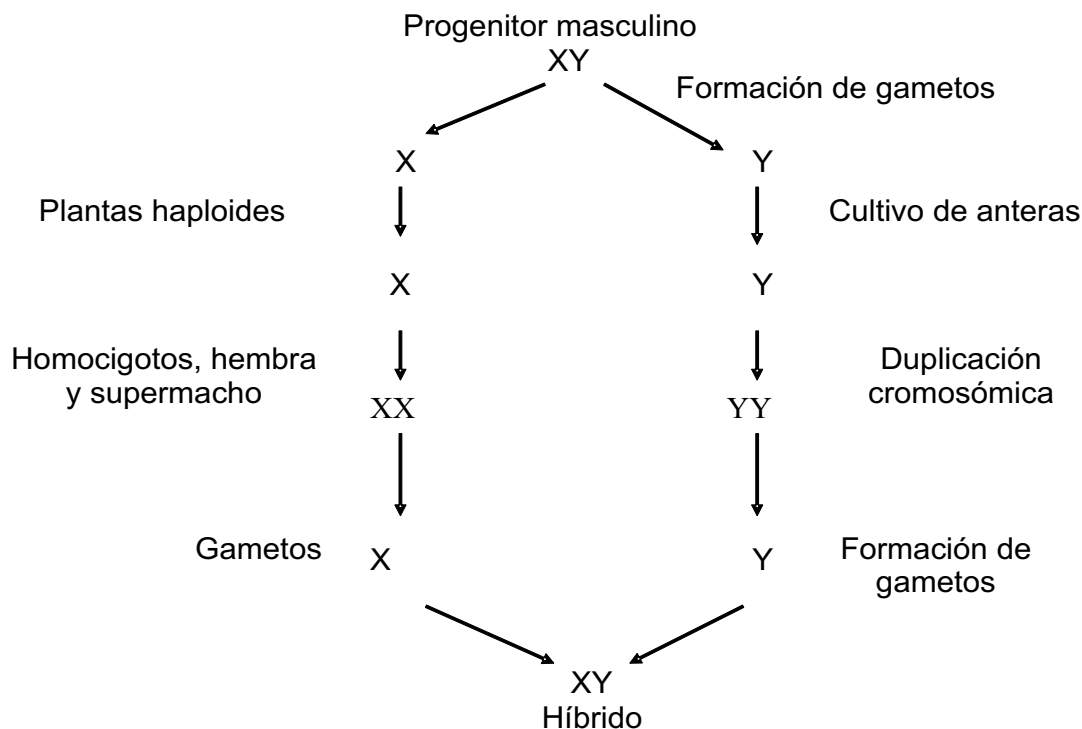
7. Transformación genética: rige el mismo principio que para mutagenesis. La transformación de haploides permite la obtención del transgén en homocigosis luego de la duplicación con colchicina. Puede realizarse con PEG (polietilenglicol), microinyección o utilizando *Agrobacterium tumefaciens*.

8. Producción de plantas homogaméticas: *Asparagus officinalis* es una especie cultivada, dioica, en la cual las plantas femeninas son XX y las masculinas son XY. De esta manera, para obtener una población de plantas deben cruzarse ambos tipos, lo que dará una progenie constituida por 50% de plantas XX y 50% de plantas XY. Sin embargo, desde el punto de vista del productor, es deseable la obtención de una población constituida solamente por plantas XY, que tienen un menor contenido de fibra y son, por lo tanto, preferidas por los consumidores. Para solucionar este problema y obtener 100% de plantas masculinas se ideó un sistema que consiste en el cultivo de anteras y diploidización de plantas YY, llamadas supermachos. La ventaja de estas plantas es que, al ser cruzadas con plantas XX darán 100% de plantas XY, como se muestra en el esquema 1.

Con este sistema, en 1990 fue liberada una variedad llamada Andrea (un híbrido obtenido como se mencionara anteriormente). Andrea es una variedad muy homogénea, de alto rendimiento y de excelente calidad.

Obtención de Haploides

Como se mencionara anteriormente, las plantas haploides aparecen en muy baja frecuencia en la naturaleza, siendo necesaria la



Esquema 1.

posterior ocurrencia de duplicación cromosómica para la obtención de semillas. Por ello, la producción artificial de haploides resulta siempre más efectiva.

- Origen de los haploides

I. Ginogénesis: desarrollo de un gameto femenino no fecundado. Se logra por:

1. Castración y aislamiento de las flores. Por este tratamiento se han obtenido haploides de *Triticum monococcum*.
2. Polinización retrasada: la castración de las flores y la posterior polinización en el límite de la madurez receptiva del estigma permiten obtener hasta un 30% de haploides en trigo.
3. Presencia de dos células espermáticas con diferente velocidad de desarrollo: el mecanismo involucrado en la generación de haploides estaría basado en la falta de fertilización de la oosfera durante la doble fertilización.
4. Polinización con polen inviable: a) utilizando polen extraño (típico de cruzamientos interespecíficos), incapaz de fe-

cundar a la especie en cuestión, puede servir de estímulo para inducir haploidía, como sucede en el cruzamiento entre *Solanum tuberosum* x *S. phureja* (papa silvestre). El polen de la papa silvestre contiene sólo un núcleo generativo, producto de una gametogénesis anormal, por lo cual la fertilización doble no logra producirse, pero se forman embriones haploides por partenogénesis; b) utilizando polen previamente irradiado.

5. Cultivo de ovarios: puede ser eficaz para obtener haploides a partir de cruzamientos interespecíficos.

II. Androgénesis: desarrollo de un gameto masculino. Se logra por:

1. Cultivo de anteras: se ha inducido haploidía en mono y dicotiledóneas, siendo más fácil en las últimas. Es una técnica simple que, dependiendo del genotipo y de las condiciones de cultivo permite obtener elevados números de plantas en tiempos relativamente cortos. Ha sido más difícil en los cereales, no obstante se obtuvieron haploides de arroz, trigo,

cebada con diferentes grados de dificultad.

2. Cultivo de microsporas: en 1974 Nitsch indujo la regeneración de plantas haploides de *Nicotiana tabacum* y *Datura innoxia* a partir de cultivos en suspensión de microsporas, previo choque térmico a baja temperatura de las flores. Este método tiene la ventaja de producir haploides masivamente (más de 7000 plantas por botón floral en tabaco), y de permitir la aplicación de diferentes tratamientos a las microsporas como transformación o mutagénesis para luego obtener plantas por embriogénesis partiendo de una única célula inicial. Para conseguir diferenciar plantas a partir de microsporas es necesario quebrar el mecanismo responsable de la asimetría en la primera mitosis del polen.
3. Técnica de gametofito indeterminado (*ig*): en 1969 J L Kermicle desarrolló una técnica en maíz basada en la ocurrencia de una mutación espontánea, encontrada en la línea W23. El gen *ig* provoca una disrupción en el desarrollo del gametofito femenino, generando, luego del proceso de polinización, que los núcleos espermáticos ocasionalmente se desarrollen androgenéticamente. El desarrollo embrionario de los núcleos espermáticos en el citoplasma materno resulta en la formación de haploides androgenéticos, o haploides paternos.

III. A partir de alguna célula haploide del saco embrionario distinta del gameto femenino (sinérgidas o antípodas).

IV. Cruzamientos interespecíficos o intergenéricos con eliminación cromosómica: se produce la fertilización de manera de que se forme un cigoto diploide, que a lo largo de las sucesivas divisiones mitóticas, va perdiendo el genoma del individuo que aportó el gameto masculino, como sucede en los cruzamientos entre *Hordeum vulgare* y *H. bulbosum*.

V. Interacción núcleo-citoplasma: utilizando líneas de sustitución y restauración nuclear se encontró que los individuos con citoplasma de *Aegilops caudata* y núcleo de *Triticum aestivum* o *Triticale* mostraban una frecuencia de

haploidía del 3,1% y del 52,9% respectivamente. Esto se debe a que ciertas interacciones entre un citoplasma y un núcleo extraño inducen haploidía.

VI. Semigamia: el núcleo del gameto masculino penetra en la ovocélula pero sin fusionarse con el núcleo femenino. Ambos núcleos comienzan a dividirse independientemente, produciendo un individuo haploide con tejidos de origen materno y paterno.

- Métodos más utilizados para la obtención de plantas haploides

Entre los métodos disponibles actualmente para la obtención de doblehaploides, los más utilizados son la hibridación interespecífica e intergenérica, la androgénesis, y recientemente la ginogénesis en maíz.

I. Cultivo de Anteras: consiste en el cultivo de anteras inmaduras en un medio de inducción donde las microsporas competentes originarán callos, que serán luego transferidos a un medio apropiado para la regeneración de plantas (figura 1). En algunas especies de dicotiledóneas el número de plantas obtenidas por cada cien anteras cultivadas es muy elevado. En cambio, en las gramíneas la técnica no ha sido tan exitosa. Sin embargo, los progresos en los métodos de cultivo *in-vitro* durante las últimas décadas han permitido obtener buenos resultados con gramíneas (figura 4), aún en aquellas consideradas recalcitrantes. La capacidad de respuesta al cultivo de anteras, denominada capacidad androgénica, puede ser evaluada a través de la producción de callos y de plantas verdes, y su eficiencia es altamente dependiente de:

1. El genotipo: es quizás el factor más importante que afecta al cultivo de anteras. En la naturaleza, la haploidía es controlada por el gen *hap*, llamado gen inhibidor de la haploidía. Existe suficiente evidencia que sugiere que la androgénesis *in-vitro* también está bajo control génico, y que este carácter puede ser transferido desde clones con alta respuesta a otros no respondedores. Se ha hallado variabilidad en la respuesta entre especies y aún dentro de ellas. En cebada y trigo los caracteres inducción de callos y regeneración de plantas son altamente hereda-

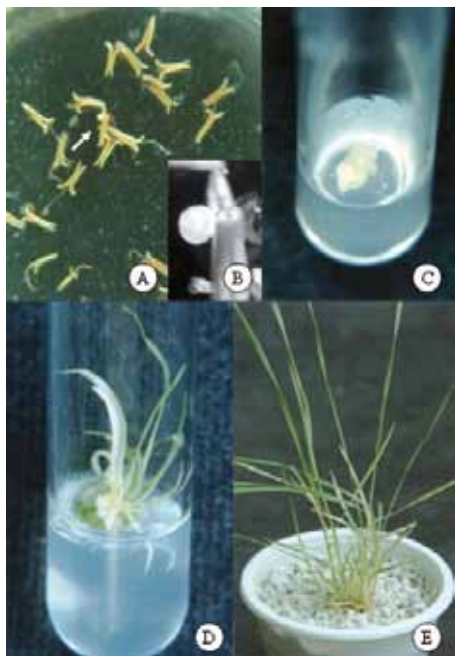


Figura 4. Producción de callos y plantas a partir del cultivo de anteras de *Triticum aestivum*. (A) Callo blanco y compacto sobre una antera (flecha). (B) Detalle del callo señalado en (A). (C) Callo transferido a medio de cultivo para regenerar planta. (D) Plántula de trigo regenerada a partir de callo, con sistema radicular en formación. (E) Planta haploide completa finalizando la etapa de rusticación, creciendo sobre sustrato inerte (Perlita).

bles, y se ha sugerido que ambos caracteres estarían controlados por muchos genes. Por lo tanto, el mejoramiento de la capacidad androgénica no parece difícil, siendo la identificación de genotipos con gran capacidad de respuesta un paso indispensable para su incorporación en los bloques de cruzamiento.

2. El % de albinismo: la ocurrencia de plantas albinas representa un serio problema para la aplicación del cultivo de anteras en programas de mejoramiento de cereales. La incidencia depende, no sólo de la especie, sino también de la variedad, citándose valores de 50, 70 y 100% para tres variedades diferentes de arroz. Bernard (1980) ha sugerido que las altas temperaturas incrementan la diferencia entre la velocidad de replicación del

material nuclear y el de las organelas, resultando en un desarrollo retardado o incompleto de los plástidos, lo cual conduciría a la producción de fenotipos albinos. De acuerdo a este autor, el desarrollo de un sistema fotosintético funcional es promovido por el tratamiento con bajas temperaturas, aunque no siempre un pretratamiento con frío reduce incidencia de albinismo.

3. Las condiciones de crecimiento de las plantas donantes: la edad y las condiciones ambientales en que crecen las plantas afectan considerablemente la capacidad androgénica de las mismas. Los factores ambientales más críticos son el fotoperíodo, la intensidad de luz, la temperatura, la nutrición y la concentración de CO_2 . Estos factores incidirían en la capacidad de producir las divisiones celulares morfogénicas que conducen al desarrollo de embrioides y la regeneración de plantas. Este último paso es crítico dentro de todo el proceso, es altamente dependiente de la calidad del callo, y está asociado fuertemente a toda la historia previa del cultivo. En general, se ha informado que la utilización de anteras de las primeras floraciones favorece la respuesta androgénica, mientras que las colectadas al final de la estación muestran una menor respuesta al cultivo, generando una menor cantidad de embrioides. En *Brassica napus*, el crecimiento de las plantas a bajas temperaturas mejora la producción de embrioides obtenidos a partir de anteras.
4. El estado de desarrollo de las microsporas: en la fase gametofítica de las plantas, que comienza luego de la meiosis, las microsporas sufren inicialmente una división mitótica asimétrica que da origen a dos células de distintos tamaños: la generativa (más pequeña y con un núcleo altamente condensado) y la vegetativa (más grande y con un núcleo difuso). En las gramíneas, el núcleo generativo se divide nuevamente originando dos núcleos espermáticos. Uno generará el endosperma triploide al fusionarse con

los dos núcleos polares del saco embrionario, mientras que el segundo fertilizará a la óosfera produciendo el cigoto diploide, que constituirá el primer paso de la nueva fase esporofítica. Los embrioides haploides se originan *in-vitro* a partir de una de las vías que se enuncian a continuación. Cuando la primera división mitótica de la microspora es asimétrica, los haploides se originan por repetidas divisiones de la célula vegetativa, de la generativa o de ambas. En cambio, cuando la primera división mitótica es simétrica, ambas células resultantes contribuyen al desarrollo del haploide. Por lo tanto, una célula gamética masculina puede revertir su desarrollo gametofítico hacia el grano de polen y dar origen directamente a un nuevo individuo. En general, las microsporas que se encuentran en la primera división mitótica son las que mejor responden. Esto varía levemente con la especie vegetal, pero esta reversión no es posible luego de iniciada la deposición de almidón. El estadio más apropiado para los cereales es el de microspora uninucleada media y tardía.

5. Los pretratamientos: distintos tipos de estrés aplicados durante el estadio adecuado pueden enmascarar el programa gametofítico e inducir la expresión de genes específicos del desarrollo esporofítico. Si bien las bajas temperaturas son consideradas como el mejor pretratamiento, también otros pueden estimular la androgénesis, como el calor, el choque osmótico, la centrifugación de las anteras o hasta una incisión en la parte superior de la inflorescencia donante. También se citan la poda, la pulverización con etrel, la irradiación, la reducción en la presión atmosférica, la anaerobiosis, el tratamiento en una atmósfera saturada de agua y la aplicación de gametocidas. Las bajas temperaturas aplicadas sobre la planta madre, sobre las yemas florales jóvenes o sobre las anteras, generalmente estimulan la embriogénesis. El frío estimula la división mitótica simétrica de las microsporas. Esto se debe-

ría a una alteración en la orientación del huso que conduciría a una primera mitosis anormal del grano de polen. Por otra parte, se ha mencionado que las bajas temperaturas retardan el envejecimiento de la pared de la antera, lo cual aumentaría la supervivencia y la viabilidad del polen. En general, las temperaturas citadas varían entre 2 y 10 °C y la duración del tratamiento de 2 a 30 días. Es importante determinar la temperatura adecuada para cada especie vegetal, aún para variedades dentro de la misma especie. En algunas especies, tales como *Capsicum annuum*, avena y algunos genotipos de trigo se ha logrado éxito con un choque con alta temperatura. Temperaturas de 30 – 35 °C durante los primeros 1 a 4 días del cultivo ayudaron a inducir la androgénesis en varias especies de género *Brassica*.

6. La composición del medio de cultivo: es otro de los factores importantes para el éxito en el cultivo de anteras. No existe una recomendación general y las variaciones dependen de la especie a cultivar.
 - a) Medios de inducción: dos tipos de estrés, osmótico y nutricional, han sido identificados como causas disparadoras de la inducción de embriogénesis en las microsporas de mono y dicotiledóneas. En tabaco, el cultivo de las anteras en un medio carente de sacarosa durante los primeros 6 días de la etapa de inducción permitió una máxima respuesta androgénica. Los carbohidratos cumplen dos roles fundamentales en los medios de inducción, ya que actúan como osmolito y como nutriente. Los agentes gelificantes representan otro aspecto importante en la evolución de los medios de inducción. Tradicionalmente se utilizó agar como gelificante de los medios de cultivo debido a su disponibilidad y bajo costo. Pero en 1973 se detectó una mejor respuesta androgénica en tabaco cuando las anteras fueron cultivadas en un medio solidificado con agar y suplementado con carbón activado. En medios líquidos la adición de Ficoll (polímero sintético de

sacarosa, inerte, no iónico y de alto peso molecular) incrementa la tensión superficial y la viscosidad del medio. De esta manera, las anteras y callos flotan sobre el medio líquido y se desarrollan en condiciones aeróbicas, permitiendo elevadas tasas de embriogénesis y de producción de plantas verdes. En cuanto a los reguladores de crecimiento, la mayoría de los cereales requiere de la presencia de auxinas y de citocininas en el medio de cultivo y las respuestas parecen depender de los niveles endógenos de tales reguladores. Por ejemplo, para lograr la inducción en trigo es indispensable el uso de 2,4-D en concentraciones de 1,5 a 2 mg/l. Existen otras sustancias que, adicionadas al medio de cultivo, ayudan en la estimulación de la androgénesis, como la glutamina y el inositol. También se citan otros compuestos inespecíficos como extracto de papa, de batata, de mandioca, de trigo germinado y de endospermas de arroz y de maíz. En ocasiones, si el medio es suplementado con leche de coco los granos de polen desarrollan directamente en embrioides.

b) Medios de regeneración: la variedad de medios de regeneración citada es menor cuando se la compara con la de los medios de inducción. Los más utilizados son modificaciones derivadas del medio MS, con concentraciones de carbohidratos similares a las utilizadas en los medios de cultivo de tejidos tradicionales (30g/l de sacarosa), utilizando agar (0,6%) como gelificante, auxinas menos poderosas, y un balance hormonal a favor de las citocininas

7. Las condiciones de incubación: las características ideales de cultivo son específicas para cada especie, y aún para cada genotipo dentro de una misma especie. Estas afectan particularmente la tasa de absorción final de nutrientes y la regeneración de plantas verdes. La duración e intensidad lumínica, la temperatura y la orientación de las anteras sobre el medio de cultivo pueden tener un efecto considerable en algunas especies.

II. Cultivo de Microsporas: comprende la obtención de individuos haploides a partir de microsporas aisladas. Las espigas son pretratadas y las microsporas liberadas son colocadas en un medio de cultivo donde desarrollarán embriones haploides que serán luego transferidos a un medio de regeneración para originar plántulas (figura 5). Este sistema es considerado el de mayor potencial para la producción de doblehaploides, debido a que induce a las miles de microsporas que contiene una flor a dividirse y producir embriones. La ausencia de la pared de la antera podría mejorar la nutrición y eliminar las restricciones físicas para la androgénesis. El cultivo de microsporas tiene la ventaja de originar embriones de similar tamaño y etapa fisiológica debido a que pueden separarse las microsporas de tamaños semejantes por centrifugación diferencial. La optimización de los diferentes pasos críticos para el éxito de esta técnica puede llevar a la obtención de una alta cantidad de plantas verdes con menores costos y esfuerzos. Entre los fac-



Figura 5. El diagrama muestra las diferentes etapas del cultivo de anteras y de microsporas aisladas. Para el cultivo de anteras, las etapas requeridas a partir de anteras hasta la obtención de las plantas haploides pueden describirse como sigue: a) yema floral previo a la antesis, 1b) anteras, 1c) anteras en cultivo, 1d) y 1e) proliferación de las anteras, 1f) callo haploide, 1g) diferenciación de callo, h) planta haploide. Para el cultivo de microsporas aisladas: a) yema floral previo a la antesis, 3b) microsporas aisladas de una antera, 3c) cultivo de microsporas, 3d) estado multinucleado, 3e) y 3f) embrión en desarrollo.

tores determinantes de la eficiencia del método podemos citar:

1. Genotipo: se han citado cultivares de cebada con una alta respuesta al cultivo de microsporas, en contraste con otros menos respondedores.
2. Albinismo: al igual que en el cultivo de anteras, el número de plantas albinas depende del genotipo, y también se ve influido por la densidad de cultivo de las microsporas.
3. Condiciones de crecimiento de la planta donadora: el mantenimiento de las plantas en condiciones controladas de fotoperíodo y temperatura es esencial y debe ser ajustado en función de la especie. Se han citado excelentes resultados en cebada cuando las plantas son cultivadas en ambientes libres de patógenos, con alta humedad relativa (60-80%), fotoperíodo de 16 hs de luz, y adecuado régimen de fertilización y riego. Cuando las plantas crecen estresadas, ya sea por riego excesivo, sequía, enfermedades, o la aplicación de algún plaguicida, la respuesta al cultivo de microsporas es menor.
4. Estadio de las microsporas: como se citara anteriormente para el cultivo de anteras, es imprescindible el chequeo del estadio correcto de las microsporas para que conserven su capacidad androgénica.
5. Pretratamientos: los más utilizados consisten en el uso de frío, estrés osmótico, presencia o ausencia de determinados nutrientes, etc. Se ha demostrado que los nutrientes disponibles para las microsporas durante el pretratamiento constituyen un factor decisivo que determina la calidad de los embriones originados.
6. Densidad de cultivo de las microsporas: la densidad de las microsporas en cultivo afecta el desarrollo de las mismas y el número de microsporas que entrarán en división. Existe una concentración mínima para el desarrollo de las microsporas, y una densidad óptima para una mayor regeneración. Las condiciones más favorables deben ser ajustadas en cada caso

y para cada genotipo en particular.

7. Medio de inducción: se han estudiado diferentes concentraciones de azúcares, distintas fuentes de nitrógeno orgánico, y la adición de diferentes de auxinas al medio. En general se sugiere la sustitución de sacarosa por maltosa como fuente de carbohidratos, la disminución de la concentración de nitrato de amonio, el agregado de glutamina, y el empleo de APA (ácido fenil acético) como auxina para favorecer la inducción.
8. Medio de regeneración: la composición del medio de regeneración puede afectar el vigor y supervivencia de las plántulas. Kasha et al. (2001), trabajando con cebada, encontraron en este método una manera eficiente de producción de DH, con una mejor respuesta y una menor dependencia del genotipo que en el caso del cultivo de anteras. A esto se le suma la ventaja de contar con una elevada cantidad de microsporas haploides en un estado fisiológico uniforme, que constituyen excelentes blancos para la mutagénesis, la selección y la transformación.

III. Hibridación Interespecífica e Intergenética: en este caso los haploides se originan a través de la eliminación del genoma del polinizador. El sistema de hibridación de trigo x *Hordeum bulbosum*, inicialmente descubierto y empleado con éxito en cebada, ha sido considerado superior al cultivo de anteras por tres razones:

1. La producción de haploides es más fácil.
2. El tiempo requerido para la regeneración de plantas es menor.
3. La eficiencia en la regeneración de plantas parece ser mayor. La gran limitante de este sistema lo constituye el hecho de que la mayoría de los cultivares de trigo no pueden cruzarse con *H. bulbosum* debido a la presencia de los genes de incompatibilidad, *Kr1* y *Kr2*, y al desconocimiento del estado de estos genes en los genotipos de trigo y de *H. bulbosum* involucrados en los cruzamientos, debido a que los genotipos se seleccionan en base a criterios agronómicos y no a un sistema de compatibilidad de cruzamien-

tos con *H. bulbosum*. Para sortear estos inconvenientes, se ha sugerido como alternativa realizar los cruzamientos de trigo utilizando maíz como polinizador (figura 6). Luego de la fertilización del óvulo de trigo por el polen de maíz, durante las primeras mitosis del cigoto, los cromosomas del maíz son eliminados. Esto se debe a una incompatibilidad entre los cinetocoros de estos cromosomas y las fibras de los husos acromáticos que hace que en las primeras anafases los cromosomas de maíz vayan quedando

rezagados en el citoplasma, donde finalmente son degradados. El resultado de este proceso es un embrión haploide de trigo. Seguidamente, los embriones inmaduros deben ser rescatados en un medio de cultivo apropiado. A través de las cruza con maíz se han obtenido haploides de trigo de cultivares tanto compatibles como incompatibles con *H. bulbosum*, lo cual sugiere que el sistema de incompatibilidad no afecta al método de trigo x maíz, por lo que sería menos dependiente del genotipo.

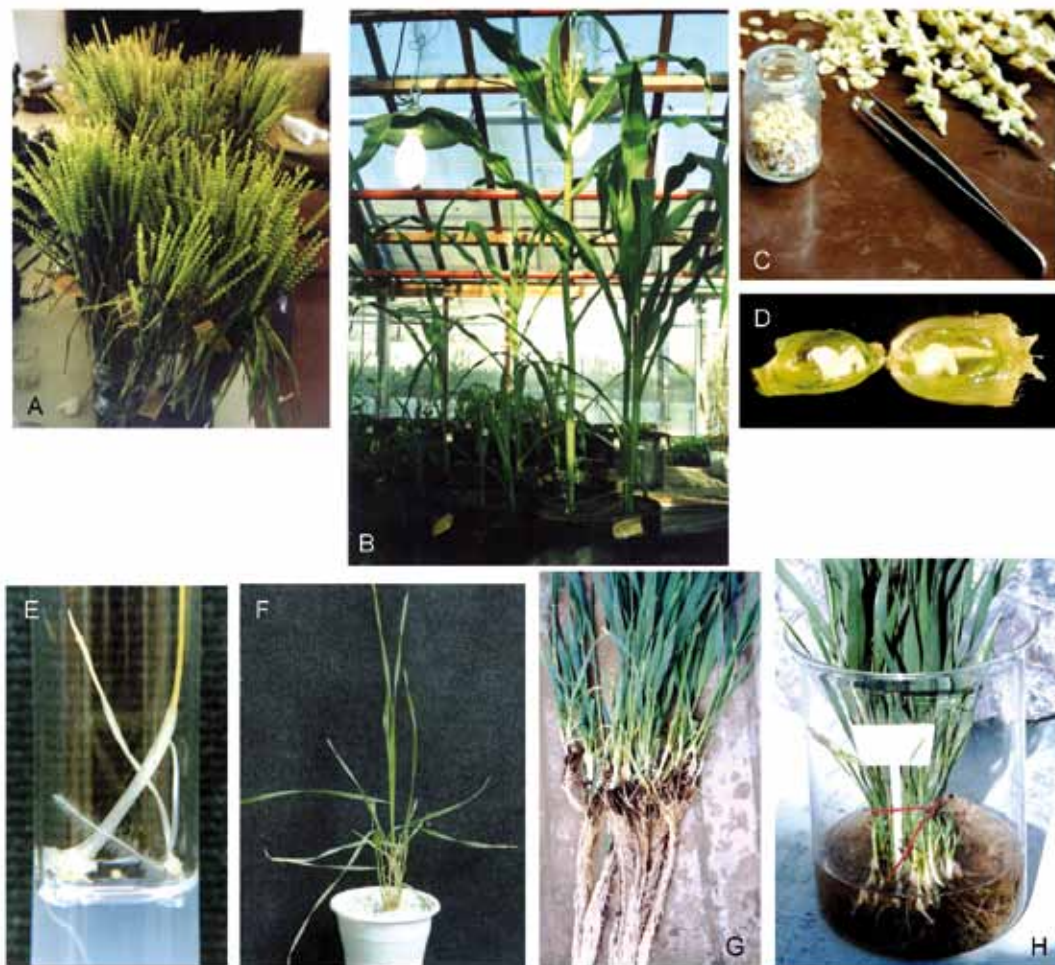


Figura 6. Producción de haploides de *Triticum aestivum* por cruzamientos de trigo x maíz (*Zea mays*). (A) Espigas de trigo cortadas en el campo y castradas en el laboratorio. (B) Plantas de maíz (donantes de polen) crecidas en invernáculo. (C) Desgrane de espigas para realizar la desinfección de los granos y posterior rescate de embriones. (D) Grano con dos embriones haploides (poliembriónía). (E) Embriones inmaduros rescatados y creciendo *in-vitro*. (F) Planta rusticada. (G) y (H) Plantas con 3-5 macollos con sus raíces sumergidas en solución de colchicina para la duplicación cromosómica. I. Plantas tratadas con colchicina y llevadas a macetas con tierra en cámara de crecimiento

IV. Ginogénesis *in vivo* en maíz: el empleo de líneas con elevada frecuencia de haploides como polinizadores motivó al desarrollo de la tecnología para la obtención de haploides maternos *in-vivo*. Este hallazgo abrió nuevas posibilidades para el empleo de polinizadores seleccionados en función de su capacidad de incrementar las frecuencias de haploides. Líneas inductoras fueron desarrolladas a partir del germoplasma de Stock 6 de “elevada haploidía”. El mecanismo involucrado en la generación de haploides estaría basado en la falta de fertilización de la oosfera durante la doble fertilización. En relación a este fenómeno se ha planteado la hipótesis en que se asume que las líneas inductoras de haploidía presentan dos células espermáticas con diferente velocidad de desarrollo (figura 7).

El método de generación de haploides maternos *in-vivo* involucra los siguientes pasos:

1. Generación del cruzamiento del cual se desean obtener líneas homocigotos (Generación parental).
2. Fecundación de la F1 con polen proveniente del inductor de haploidía.
3. Identificación de granos haploides.

4. Duplicación de los individuos haploides.
5. Autofecundación de las plantas haploides duplicadas.

La identificación de los granos haploides se realiza mediante el empleo de genes marcadores de color en embrión y endosperma, siendo el alelo rojo navajo ó *Navajo crown* (*R-nj*) el más frecuente. Aquellos cariopses con un embrión haploide (*r-nj*), resultantes de la falta de fecundación de la oósfera, pueden distinguirse claramente debido a la falta de expresión del marcador antociánico dominante *R-nj* en el embrión. Es decir que la expresión específica del gen *R-nj* en el endosperma (*Navajo crown*) y en el embrión permite de manera rápida y precisa identificar aquellos granos con la potencialidad de producir plantas haploides (figura 8).

Duplicación cromosómica

Después de la duplicación cromosómica, ya sea espontánea o inducida, se logra la homocigosis y se restaura la fertilidad. La planta haploide, sin duplicar, es estéril por lo que no podría producir semillas. Entre las técnicas que han sido utilizadas para la duplicación de haploides cabe mencionar:

1. La duplicación espontánea durante la etapa de callo o de rescate de embriones.
2. La regeneración de plantas doblehaploides a partir de callos de médula de plantas haploides de tabaco.
3. Sustancias químicas: aunque se conocen casos utilizando agentes químicos tales como acenafeno, hidrato de cloral, sulfanilamida, etc., la mayor eficacia se ha logrado con la colchicina y el óxido nitroso. La aplicación del óxido nitroso bajo presión (2-6 atmósferas) resulta de especial interés por su fácil penetración en los tejidos y la rápida desaparición de los mismos cuando cesa la presión. Puede utilizarse en flores recién polinizadas. La ventaja que presenta este tratamiento es que, al poder ser aplica-

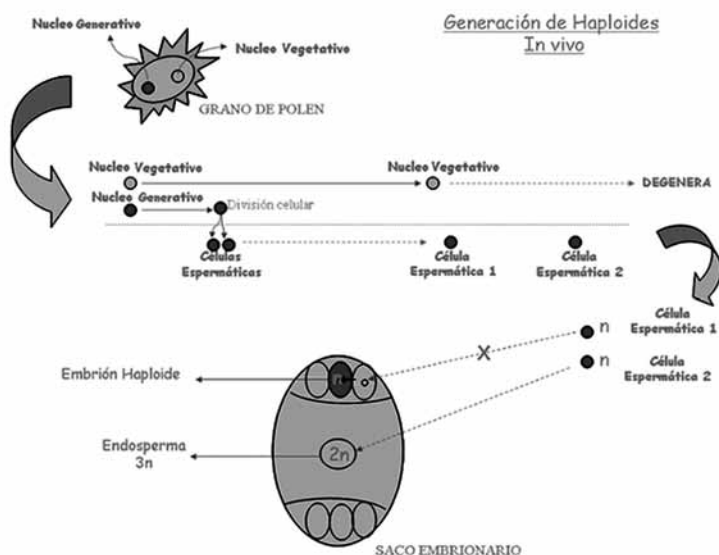


Figura 7. Generación de haploides *in-vivo* a través de fecundación incompleta. La célula espermática se une a los núcleos polares dando como resultado la formación del endosperma (3n). La otra célula no logra fecundar a la oosfera produciendo un embrión haploide (n)

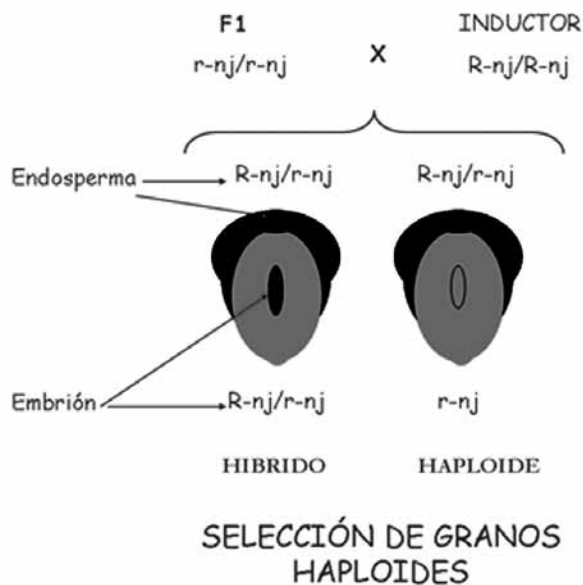


Figura 8. Marcadores de color en embrión y endosperma que permiten la selección de granos haploides

do durante la primera división mitótica del óvulo fecundado, se ve reducida la aparición de quimeras. Por otro lado, los residuos de este agente resultan menos tóxicos para la planta que otros que se aplican en forma líquida, aunque la frecuencia de aneuploides puede ser muy elevada. La acción de la colchicina fue descubierta en 1937 y desde entonces ha pasado a ser prácticamente el agente diploidizante más importante. Esta droga actúa impidiendo el autoensamblaje de la tubulina, inhibiendo así la formación de los microtúbulos del huso y, en consecuencia, la segregación anafásica de las cromátides. Afecta por lo tanto sólo a las células que se encuentran en división. Puede aplicarse a plántulas, plantas adultas, semillas, microsporas y anteras. El tratamiento puede realizarse utilizando una solución acuosa donde se sumergen las raíces, dejando fuera la parte aérea. También se puede hacer llegar la solución al interior de la planta utilizando una jeringa con la dosis deseada (microinyección), o por absorción de la solu-

ción a través de los tallitos decapitados, sobre los que se vierte. Otra forma es tratar los callos con colchicina antes de trasladarlos al medio de regeneración. Este último método permite la obtención de gran número de doblehaploides, pero presenta la desventaja de que la mayoría de las plantas así obtenidas son mosaicos cromosómicos. Otra alternativa, para microsporas y anteras, es la adición del agente duplicador directamente en el medio de inducción, antes de la primera mitosis. La diploidización en este momento requiere menos tiempo y esfuerzo y ha sido utilizada en programas de mejoramiento de trigo, maíz, *Triticordeum* y arroz. El problema de la suplementación del medio de inducción con colchicina es que reduce la embriogénesis en trigo, si bien en *Oryza sativa* y *Brassica* la puede incrementar. La duración del tratamiento y la concentración de la solución varían para cada especie.

Cualquiera sea el método con que se duplique la planta, un macollo o sólo una yema floral, lo importante es lograr que las semillas que éstas produzcan sean viables.

Consideraciones finales

La elección de los progenitores y la selección son etapas decisivas en un programa de mejoramiento que avanzará luego, generación tras generación, hacia una homocigosis que permita entrar en las etapas de evaluación. Ganar tiempo en estos casos puede significar una reducción de costos muy importante y una más temprana entrada en el mercado de la nueva variedad. En el caso de una especie autógama, como el trigo, es posible ganar generaciones haciendo dos cosechas en un año, especialmente en aquellos cultivares de corto ciclo vegetativo. Esto, sin embargo, dificulta la observación de algunas características agronómicas importantes, que no pueden ser observadas en los genotipos en esas condiciones, atentando contra una selección eficiente. Para los trigos de tipo invernal y facultativos, con ligeros requerimientos de vernalización, esta ganancia de generaciones no es posible o es compleja. La producción de individuos

doblehaploides que puedan participar anticipadamente en la etapa de evaluación agronómica se plantea como una solución promisorio a este problema, reduciendo los tiempos y presupuestos.

Muchos interrogantes quedan aún sin resolver, limitando la aplicación extensiva de esta tecnología a algunos modernos programas de mejoramiento vegetal. Algunas preguntas a las que debemos encontrar respuestas son:

En que generación segregante se aplica el método de doblehaploides?

¿Cuál es el número de individuos doblehaploides derivados de un cruzamiento, representativo de la variabilidad gamética creada en la cruce, que permita un aprovechamiento integral, comparable al logrado con el método convencional de selección a campo?

¿Cómo superar la escasa cantidad de semilla producida?

¿Es una técnica alternativa, o complementaria del mejoramiento tradicional?

¿La eficiencia en la producción de doblehaploides, justifica su alto costo dentro de un plan de mejora?

De acuerdo a Mujeb-Kazi (1998), las generaciones segregantes adecuadas para producir doblehaploides son la F2 y F3. Si eligiéramos individuos F3, que ya cuentan con un año de selección a campo durante la F2 -generación que ha mostrado la mayor varianza genética entre los dos padres- estaríamos evitando producir un gran número de plantas doblehaploides que no serán agronómicamente promisorias. No obstante, debemos considerar que serían necesarios varios cientos de individuos DH para que el proceso tenga posibilidades de éxito agronómico.

En general, la producción de doblehaploides resulta en un gasto excesivo en comparación a los métodos tradicionales de mejoramiento, por lo cual en la mayoría de los programas sólo genotipos élite son sometidos a este sistema. Si bien el costo de producción de los DH depende directamente del método elegido y la eficiencia lograda, la aplicación de esta metodología al mejoramiento vegetal se vislumbra más bien como una herramienta complementaria al mejoramiento tradicional, y que de ningún modo intentaría reemplazarlo.

Lecturas Recomendadas

- Atanassov, A.; Zagorska, P.; Boyadjiev, P.; Djilianov, D. 1995. *In vitro* production of haploid plants. World Journal of Microbiology & Biotechnology, vol. 11, 400-408.
- Bhojwani, S.S., Razdan, M.K. 1996. Haploid Production. En: Plant Tissue Culture: Theory and Practice, Capítulo 7. S.S. Bhojwani y M.K. Razdan (eds.) Elsevier, Amsterdam. pp.167-213.
- Coe E. H. Jr., Neuffer M. G., Hoisington D. A. 1988. The Genetics of Corn. En: Corn and corn Improvement 3ra Edición. (Sprague C. F., Dudley J. W. eds) pg 81-258. A.S.A., C.S.S.A., S.S.S.A, Madison Winsconsin, pp 81-258.
- Lacadena, J.R. 1988. Variaciones cromosómicas numericas. En: Genética, Capítulo 15. Lacadena, J.R. (ed.) A.G.E.S.A., Madrid. pp. 683-719.
- Snape, J., Simpson, E., Parker, B., Friedt, W., Foroughi-Wher, B. 1986. Criteria for the selection and use of doubled haploid systems in cereal breeding programmes. En: Genetic manipulation in plant breeding. Proc. Int. Symp. Eucarpia W. Horn, C. Jensen, W. Odenbach, O. Schieder (eds). W. De Gruyter, Berlin. pp. 217-229.

III. CAPÍTULO 2

Aplicaciones de los marcadores moleculares

Alicia Carrera; Gabriela Tranquilli;
Antonio Garayalde; Marcelo Helguera

Los marcadores moleculares, herramientas básicas de la biotecnología vegetal descritas en Parte I Capítulo 5 de este libro, se utilizan en la actualidad en numerosas áreas relacionadas con el mejoramiento vegetal y el análisis de la biodiversidad. A continuación se describen algunas de esas aplicaciones. Cada uno de estos campos posee una base teórica en ocasiones compleja y muchos de ellos requieren del uso de programas de estadística avanzada. De este modo, el presente capítulo debe ser considerado como una introducción a los temas presentados.

Identificación de genotipos – Pureza varietal

El control de la pureza varietal y la discriminación de variedades protegidas requieren de una adecuada identificación de los materiales. Esta identificación se ha basado tradicionalmente en el uso de caracteres morfológicos y fisiológicos. Desafortunadamente, la utilización de recursos genéticos de origen común en diferentes programas de mejoramiento ha reducido la eficiencia de discriminación por marcadores fenotípicos (descriptores), que si bien son importantes, presentan limitaciones (bajo polimorfismo, influencia ambiental, dependencia del estadio de desarrollo de planta, etc.). Como alternativa para resolver este problema, los marcadores moleculares resultan de gran utilidad por su número virtualmente ilimitado y por su habilidad para explorar variabilidad genética a nivel del ADN. ISTA (*International Seed Testing Association*) y UPOV (*Union Pour La Protection Des Obtentions Végétales*) son entidades internacionales que han distribuido información para estandarizar los análisis de laboratorio para la identificación de cultivares, y para reglamentar la utilización de diferencias moleculares en la evaluación de homogeneidad intra-varietal, la discriminación de varie-

dades y el otorgamiento de nuevas patentes. En la actualidad se dispone de patrones moleculares varietales para una extensa lista de especies. Frecuentemente, un grupo de *loci* polimórficos de un marcador molecular, tales como microsatélites o AFLPs (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) es suficiente para generar un perfil molecular de identificación, o “huella dactilar” de ADN, única para cada cultivar. Como ejemplo, podemos mencionar al trigo pan (*Triticum aestivum* L.) para el que se desarrolló una Matriz de Identificación Varietal en base a marcadores microsatélites de ADN, que permite la individualización de las distintas variedades argentinas. Por otro lado, a partir de datos moleculares es posible obtener distintos índices de similitud o distancia genética y generar dendrogramas que ponen en evidencia las relaciones entre los materiales. Esta información puede ser altamente valiosa en caso de litigios por derechos de obtención. Para más detalles sobre identificación de genotipos se recomienda la lectura de Parte III, Capítulos 4 y 5 de este libro.

La pureza varietal es uno de los principales requisitos de la semilla comercial. En la producción de semilla híbrida la heterogeneidad intralote puede originarse por falta de uniformidad en las líneas parentales, polinización cruzada espontánea o mezcla de semillas durante la siembra, cosecha o embolsado. Los individuos fuera de tipo pueden identificarse mediante el patrón molecular. Del mismo modo, pueden establecerse las relaciones de descendencia entre una serie de líneas parentales y sus híbridos. Asimismo, la caracterización molecular de líneas puras permite conocer el nivel de variabilidad genética presente en la colección, confirmar homocigocis, precisar la identificación y asistir en la planificación de los cruzamientos destinados a producir híbridos de características superiores.

Bancos de germoplasma

El proceso de selección para mejora y las prácticas de la agricultura moderna han generado una pérdida notable de diversidad en la mayoría de las especies cultivadas. El reemplazo paulatino de las variedades primitivas por los nuevos cultivares de indudables ventajas económicas ha producido una reducción en el número de genotipos que se cultivan. La ero-

sión genética puede tener graves consecuencias para el cultivo, principalmente en relación con su vulnerabilidad sanitaria. Este proceso puede ser atenuado mediante la creación de bancos de germoplasma, que constituyen un componente vital de los programas de mejora. Las colecciones pueden mantenerse como bancos de semilla, a campo, *in-vitro* o criopreservadas. Esta actividad se vuelve particularmente relevante para el Continente Americano y el Caribe, que constituyen los centros de origen de cultivos importantes como maíz, poroto, cacao, papa, maní, pimienta, tomate, zapallo, además de numerosas medicinales, aromáticas, frutales y forestales.

Los recursos genéticos de una especie cultivada comprenden: i) cultivares antiguos y de reciente obtención; ii) poblaciones locales mantenidas por los productores, "*landraces*"; iii) poblaciones silvestres de la misma especie o formas maleza; iv) especies relacionadas. Los marcadores moleculares permiten caracterizar accesiones cultivadas y silvestres, estudiar el proceso de domesticación, establecer relaciones filogenéticas, y contribuir en la toma de decisiones para la elección de estrategias de conservación. El procedimiento consiste básicamente en analizar los materiales mediante marcadores proteicos o de ADN, y calcular medidas de diversidad (nivel de polimorfismo, riqueza alélica, presencia de alelos únicos) y de similitud genética. Esta información luego se integra a datos geográficos (procedencia de las accesiones, distribución), pedigrí, taxonomía y variabilidad en caracteres morfológicos, fenológicos, fisiológicos, etc.

Una gran parte de los polimorfismos moleculares se encuentra en regiones no codificantes del genoma, carece de expresión fenotípica y es selectivamente neutra. En contraste, los genes que codifican los rasgos morfológicos y/o agronómicos poseen un fuerte efecto fenotípico y han estado sometidos a intensas presiones de selección en las distintas etapas del mejoramiento. Por lo tanto, estos caracteres representan grupos de genes sometidos a diferentes fuerzas de cambio a lo largo del proceso de domesticación. Los marcadores moleculares combinados con datos morfológicos, agronómicos y de origen, conforman una base de

datos integral que permite describir la variación genética en colecciones de germoplasma.

Veamos algunos ejemplos. En casos como el girasol (*Helianthus annuus*), originario de Estados Unidos, el análisis de diversidad ha demostrado que el proceso de domesticación ha reducido considerablemente la base genética de los materiales cultivados en relación a las poblaciones silvestres. Por el contrario, en poroto (*Phaseolus vulgaris*) y olivo (*Olea europaea*), las formas cultivadas conservan gran parte de la variabilidad presente en las poblaciones de los centros de origen en América y Europa, respectivamente. La comparación entre los materiales silvestres y cultivados de una especie permite además identificar los lugares de origen del cultivo, conocidos como centros de domesticación. Una vez que los recursos genéticos disponibles han sido caracterizados, es posible decidir cuáles serían los cruzamientos que más contribuirían a la expansión de la base genética.

Aunque frecuentemente el proceso de domesticación involucra una pérdida importante de diversidad que es revelada por marcadores moleculares dispersos en el genoma, los cambios más significativos en el paso de formas silvestres a cultivadas pueden ser explicados por unos pocos genes. Por ejemplo, Dubcovsky y Dvorak (2007) describen un fenómeno llamado síndrome de domesticación, que es mayoritariamente adjudicado a genes que controlan la arquitectura morfológica de la espiga y el mecanismo de dispersión de las semillas. Uno de ellos es el gen *Br* (*brittle raquis*) que determina un raquis quebradizo (ancestral) o firme de la espiga; otro es el gen *Tg* (*tenacious glume*) que determina glumas firmemente adheridas al grano (ancestral) o granos desnudos y el tercero es el gen *Q*, que gobierna el libre desgrane de la semilla madura y la forma cuadrada de la espiga. El alelo *q* produce una espiga piramidal de raquis elongado (espeltoide) cuyas semillas no se desgranar fácilmente al madurar. La espiga del trigo moderno es la resultante de la combinación de los alelos *br* (raquis firme), *tg* (grano desnudo) y *Q*, que generan una espiga cuadrada, que permite el libre desgrane de la semilla madura desnuda, facilitándose enormemente la cosecha del grano.

Desde el punto de vista del mejoramiento, la información generada por los marcadores resulta de inmediata aplicación en los procesos de acopio (dónde coleccionar, qué intercambios realizar), conservación (identificación de duplicados en las colecciones, monitoreo de los cambios en la composición genética que puedan ocurrir durante la multiplicación o conservación de los materiales), caracterización (diversidad genética de la colección) y distribución eficiente de los recursos genéticos hacia los usuarios.

Mapas Genéticos

Un mapa genético de una especie animal o vegetal muestra la distribución lineal de marcadores en cada uno de los cromosomas que constituyen el genoma de un organismo. Este mapa está basado en el concepto clásico de *ligamiento*: si dos o más genes o marcadores están físicamente cercanos sobre el mismo cromosoma, sus alelos se transmiten usualmente juntos a través de la meiosis. Las proporciones en que estos genes segregan en una población se apartan de las esperadas bajo la ley de segregación independiente. La mayor parte de los gametos contendrán las mismas combinaciones alélicas que los padres; sólo aquellos meiocitos que experimenten un intercambio entre cromátides no hermanas o *crossover* generarán gametos con combinaciones alélicas diferentes de las parentales (*recombinantes*).

El fundamento del mapeo genético reside en la *relación entre la frecuencia de recombinación y la distancia física entre los loci*. La frecuencia de recombinación entre dos genes se convierte en una estimación de la distancia de mapa que los separa. La unidad de medida de los mapas genéticos es el "centimorgan" (cM), que es una medida de la cantidad de eventos de recombinación entre marcadores, ocurridos en una población segregante (de mapeo). Para más detalles sobre construcción de mapas genéticos se recomienda la lectura del Capítulo 6, Parte I de este libro.

El aporte de los marcadores moleculares en la construcción de mapas genéticos es fundamental, ya que han permitido incrementar la probabilidad de identificar regiones cromosómicas que determinan rasgos agronómicamente importantes, en comparación con los mapas obtenidos mediante el uso de marcadores morfológicos o isoenzimáticos. Consecuentemente, cuanto mayor sea el número de marcadores incorporados a un mapa genético mayor será su capacidad de resolución y utilidad como marco de referencia para incorporar genes asociados a características de interés económico.

Para incorporar un carácter de interés agronómico en un mapa genético es necesario cumplir con las siguientes etapas:

1. Desarrollar una población segregante para el carácter agronómico en cuestión.
2. Caracterizar la población segregante utilizando marcadores moleculares polimórficos (con diferencias en la secuencia de ADN entre los parentales). Para construir un mapa mínimo es deseable disponer de al menos cuatro marcadores moleculares por cada cromosoma del genoma en estudio.
3. Evaluar fenotípicamente el carácter agronómico sobre los individuos de la población segregante. Este punto es crucial, ya que si la evaluación del carácter en la población de mapeo no es precisa, el mapeo del carácter será erróneo o irrealizable.
4. Identificar marcadores ligados al carácter agronómico en cuestión (co-segregación entre fenotipo del carácter y fenotipo del marcador). Para esta instancia, al igual que para la construcción del mapa genético, se pueden utilizar herramientas informáticas específicas tales como los programas Mapmaker, MapmakerQTL, Genemap, etc.

Cuanto mayor sea la distancia genética entre los parentales que darán origen a la población de mapeo, mayor será la probabilidad de detectar marcadores polimórficos, que es un punto crítico para identificar marcadores ligados al carácter en estudio.

En el contexto del mejoramiento vegetal los mapas genéticos posibilitan:

- La cobertura y análisis de genomas completos.
- La localización de regiones genómicas

que controlan caracteres de importancia agronómica o industrial.

- La cuantificación del efecto de estas regiones en la característica estudiada.
- La descomposición de caracteres genéticos complejos (QTLs) en componentes mendelianos.

En los últimos años ha comenzado a usarse una nueva estrategia de mapeo denominada *mapeo por asociación*, que utiliza el concepto de desequilibrio de ligamiento (LD), definido como la asociación no al azar de alelos de diferentes *loci*. La hipótesis de base considera que en poblaciones grandes, con apareamientos al azar (panmixis), con los *loci* segregando independientemente y en ausencia de selección, mutación, o migración, los *loci* polimórficos están en equilibrio: la frecuencia de un cierto haplotipo depende del producto de las frecuencias alélicas en cada locus. En este caso el LD será cero. La existencia de ligamiento físico aumenta los niveles de LD, aunque procesos de selección y migración generan igualmente valores de LD distinto de cero. Una ventaja importante de este método es que puede prescindir de poblaciones de mapeo clásicas, tales como F2 o RILs (*Recombinant Inbred Lines*) pudiendo utilizarse la variación en poblaciones naturales de una especie o colecciones de cultivares, producto del mejoramiento. Este enfoque aprovecha la historia de recombinación natural de la especie y los procesos ocurridos de selección, lo cual incrementa el grado de asociación entre los marcadores y el carácter de interés.

Si un marcador resulta estar asociado a un gen que controla un carácter de interés agronómico, la selección de este marcador resulta en la selección indirecta del gen de interés. La comparación de mapas genéticos entre especies genera información básica sobre la estructura y evolución de los genomas. Por otro lado un mapa genético constituye el punto de partida para proyectos de clonado de genes.

Selección asistida por marcadores

El desarrollo de múltiples técnicas moleculares ha facilitado el análisis genético de caracteres de interés agronómico y la selección

de individuos con características ventajosas. La selección asistida por marcadores (MAS) es un proceso de selección indirecta basado en la existencia de *co-segregación* entre marcadores y un gen determinado. Su eficiencia depende de la distancia entre el marcador y el gen, y de la contribución de ese gen al fenotipo. En términos amplios, el marco de aplicación que brindan los marcadores moleculares comprende la introducción y seguimiento de genes o QTLs (*Quantitative Trait Locus*) de interés, así como la agilización del proceso de recuperación de homocigosis en fondos genéticos particulares. En el primer caso, la estrategia se basa en focalizar el análisis sobre el gen de interés en una población segregante mediante el uso de marcadores previamente desarrollados sobre porciones de secuencias de dicho gen, o con marcadores localizados en las regiones adyacentes que se encuentren ligados al carácter en cuestión. El segundo caso tiene que ver con que la transferencia de genes de interés se realiza comúnmente mediante cruza amplias, que requieren luego del cruzamiento inicial, una serie de retrocruzas hacia el parental elite o recurrente. El producto final es un material que posee el fondo genético original con la nueva característica incorporada. En este caso, la estrategia se basa en un análisis más amplio de la población segregante, ya que el uso de marcadores no sólo se aplicará para la identificación del gen asociado a la característica de interés, sino que también se caracterizarán otras regiones del genomas, a fin de identificar aquéllas que provengan del parental elite. Las herramientas moleculares permiten acelerar este proceso, dado que poseen alta densidad y cubren en forma uniforme el genoma.

Con relación al seguimiento de genes de interés, un argumento frecuentemente utilizado en contra de la selección asistida por marcadores es que el mejoramiento de caracteres de herencia simple no precisa de marcadores para selección si los fenotipos son fácilmente identificables. Si bien esto es correcto, aún en estos casos, la utilización de marcadores moleculares en un programa de mejoramiento puede representar una ventaja importante, y es que la selección se independiza del fenotipo

y el ambiente. Estas características permiten identificar rápidamente genotipos únicos en poblaciones segregantes e incorporar varios genes de interés en un fondo genético, proceso también denominado "piramidización" o "apilamiento" de genes.

Por lo descrito anteriormente, puede decirse que la utilidad potencial de los marcadores moleculares en el proceso de mejoramiento genético es alta. Sin embargo, factores de orden técnico y/o económico han limitado su adopción. Dentro de los primeros, corresponde mencionar la disponibilidad de marcadores moleculares que permitan, por un lado, mejorar la cobertura del genoma en cuestión, y por otro lado, que resulten factibles de ser implementados bajo procesos automatizados, tales como extracción de ADN o reacciones de amplificación a gran escala. En este sentido, es importante destacar que cada vez es mayor la cantidad y variedad de marcadores moleculares desarrollados para cultivos de importancia económica. Por otro lado, la implementación de un marcador para la selección de un carácter agronómico en un programa de mejoramiento requiere de una serie de estudios previos relacionados con: (1) material a utilizar (variedades, poblaciones F2, retrocuzas, líneas avanzadas, etc.), (2) condiciones óptimas de la reacción de PCR –*Polymerase Chain Reaction*– (número de ciclos de PCR, temperatura y extensión de cada ciclo, concentración de los componentes que conforman la reacción de PCR, etc.), (3) detección del marcador (geles de agarosa, acrilamida, secuenciado, etc.), (4) tipo de información a obtener (marcador dominante o codominante), (5) posibilidad de eventos de recombinación entre marcador y carácter, etc., proceso que se denomina validación.

Desde el punto de vista del mejoramiento, sin dudas el mejor marcador es aquel que detecta sitios polimórficos que estando dentro del gen son los determinantes de la variación fenotípica observada. Estos marcadores, también llamados de diagnóstico o funcionales, pueden ser usados en forma confiable en poblaciones en las que no se hayan mapeado previamente, sin correr el riesgo de que la información de interés se pierda por recombinación. Como ejemplo podemos mencionar un marcador de-

sarrollado para el gen *Pinb-D1* de trigo. Este gen codifica una de las proteínas relacionadas con textura de grano y se ha demostrado que el cambio de un aminoácido (glicina a serina) da origen a una variante alélica cuyo fenotipo es un grano con textura dura. Tanquilli y col. (1999) desarrollaron un marcador que detecta dicha mutación en cualquier población segregante que sea polimórfica para el gen *Pinb-D1* y es de gran utilidad para el mejoramiento de trigos blandos (figura 1). Desafortunadamente, la disponibilidad de marcadores funcionales se ve restringida por el limitado número de genes caracterizados molecularmente que controlan caracteres agronómicos. Sin duda, la disponibilidad de marcadores funcionales aumentará progresivamente a partir del conocimiento generado de los proyectos de genómica en especies modelo (*Arabidopsis*, arroz) así como del número creciente de secuencias codificantes mapeadas y caracterizadas.

Dentro de los factores de índole económico, la principal limitante en la adopción generalizada de esta tecnología ha sido la relación entre el costo del dato molecular (*data point*) y el valor comercial de la semilla mejorada. En los programas de mejoramiento de aquellas especies donde el material de cultivo es híbrido, en general se observa mayor uso de selección asistida por marcadores moleculares. Es esperable que esta limitante se vaya superando con el tiempo por el permanente avance tecnológico. En este sentido el amplio desarrollo de marcadores basados en amplificación (SSRs –*Simple Sequence Repeats*–, SNPs –*Single Nucleotide Polymorphisms*–) ha permitido simplificar las metodologías a aplicar, en comparación con aquellos marcadores basados en hibridación (RFLPs –*Restriction Fragment Length Polymorphism*–, por ejemplo), reduciendo costos y también aumentando la eficiencia en el proceso de selección.

Para mas detalles sobre selección asistida por marcadores se recomienda la lectura de Parte III, Capítulo 3 de este libro.

Mapas comparativos

El tamaño del genoma de plantas es muy variable entre especies, y gran parte de esa diferencia está dada por secuencias de ADN

A

```

5' - AAACAACATTGAAAAC ATG AAG ACC TTA TTC CTC CTA GCT CTC CTT GCT CTT
GTA GCG AGC ACA ACC TTC GCG CAA TAC TCA GAA GTT GGC GGC TGG TAC AAT
GAA GTT GGC GGA GGA GGT GGT TCT CAA CAA TGT CCG CAG GAG CGG CCG AAG
CTA AGC TCT TGC AAG GAT TAC GTG ATG GAG CGA TGT TTC ACA ATG AAG GAT

                                Gly
TTT CCA GTC ACC TGG CCC ACA AAA TGG TGG AAG GGC GGC TGT GAG CAT GAG
                                AAG AGC GGC
                                Ser

GTT CGG GAG AAG TGC TGC AAG CAG CTG AGC CAG ATA GCA CCA CAA TGT CGC
TGT GAT TCT ATC CGG CGA GTG ATC CAA GGC AGG CTC GGT GGC TTC TTG GGC
ATT TGG CGA GGT GAG GTA TTC AAA CAA CTT CAG AGG GCC CAG AGC CTC CCC
TCA AAG TGC AAC ATG GGC GCC GAC TGC AAG TTC CCT AGT GGC TAT TAC TGG
TGA TGATATAGCCTC
TATTCGTGCCAATAAAATGTCACATATCATAGCAAGTGGCAAATAAGAGTGCTGAGTGATGATCTATGAA
TAAAATCACCCCTGTATATTGATCTGTGTTCGAGAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA 3'

```

B

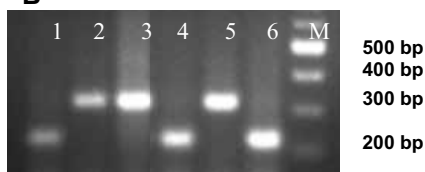


Figura 1. (A) Secuencia nucleotídica del gen *pinb-D1*, mostrando el cambio de aminoácido Glicina → Serina (Gly → Ser) resultante de la mutación de la base guanina (G) a adenosina (A) que diferencia a los alelos asociados a texturas blandas y duras, respectivamente. Con un recuadro se indican las zonas donde hibridan los *primers*, y en negritas y subrayado las bases que forman el sitio de restricción de *Bsr*BI (GAGCGG/CCGCTC) presente en el alelo asociado a textura dura en grano de trigo. (B) Fotografía de electroforesis en gel de agarosa 2% de productos de PCR amplificados con *primers* señalados en figura anterior digeridos con la enzima de restricción *Bsr*BI. En calles 1, 4 y 6 patrón del alelo de *pinb-D1* asociado a textura blanda; en calles 2, 3 y 5, patrón del alelo de *pinb-D1* asociado a textura dura.

repetitivo, que difiere entre especies (especie-específico). Contrastando con esta situación, los genes tienden a ser altamente conservados a nivel de secuencia de ADN y esta característica permite utilizar los genes como sondas para identificar secuencias de genes ortólogos (genes con funciones similares, presentes en diferentes especies, que derivan de una secuencia ancestral). A partir de esta información (presencia/ausencia de genes ortólogos) se construyen los denominados *mapas comparativos*. En general, al comparar mapas genéticos de dos especies emparentadas, se han detectado regiones cromosómicas donde los genes mantienen el orden y las relaciones de ligamiento, fenómeno conocido como *colinealidad* o *sintenia*. Esta sintenia se va perdiendo a medida que se comparan especies más alejadas filogenéticamente. Ejemplos de genomas con regiones colineares se han observado en grupos de especies pertenecientes a la familia *Solanaceae* (tomate, papa, pimiento), entre *Arabidopsis* sp. y cultivos del género *Brassica*, y también dentro de las gramíneas entre especies pertenecientes a la tribu *Triticeae* (trigo, cebada, centeno) así como entre especies pertenecientes a distintas subfamilias taxonómicas, tal el caso de arroz, maíz y sorgo.

La utilidad de los mapas comparativos puede apreciarse desde distintos puntos de vista. Por un lado, aportan información valiosa para detectar cambios producidos en la estructura cromosómica, que ocurrieron durante el proceso evolutivo, ya que cuando se comparan la posición y el número de *loci* entre los mapas de dos especies se hace evidente la ocurrencia de rearrreglos como inversiones, translocaciones y duplicaciones. En otros casos se ha podido detectar la ocurrencia de eventos de poliploidización muy antiguos. Por ejemplo, el maíz presenta un comportamiento meiótico que corresponde al de una especie diploide típica. Sin embargo, el mapa molecular muestra que numerosos *loci* RFLP de arroz están presentes dos veces en el genoma de maíz por lo que actualmente se considera que el maíz descende de un poliploide ancestral.

Por otro lado, los mapas comparativos posibilitan la transferencia de información molecular de especies modelo con genomas simples,

completamente secuenciados, tales como *Arabidopsis* y arroz (*Arabidopsis* Genome Initiative, 2000; International Rice Genome Sequencing Project, 2005), a especies con genomas más complejos tales como trigo, cebada, avena, etc. Este ha sido tal vez el objetivo principal para impulsar el desarrollo de estos mapas. Las notables similitudes observadas entre genomas fue la base sobre la que se postuló el uso de especies modelo, a partir de las cuales estudiar y avanzar en el conocimiento de genomas más complejos. Asimismo, partiendo del supuesto de que los genes que gobiernan aspectos fundamentales de la biología vegetal muy probablemente están conservados entre distintas especies, y el hecho que la variación en el tamaño de los genomas de especies relacionadas se debe fundamentalmente a variación en la cantidad de ADN no codificante y no a una variación en el número de genes, la idea de llegar a la identificación, clonado y caracterización de genes en las especies modelo se ha visto fortalecida. De este modo la información generada podría hacerse extensiva a una amplia gama de especies, incluyendo las cultivadas. En este sentido, la información molecular proveniente de los genomas de *Arabidopsis* y arroz ha sido clave para clonar genes de interés agronómico en especies de genomas complejos como el trigo, como por ejemplo, *Vrn-1*, *Vrn-2*, *Q*, *Ph1*, *Ppd-D1*, *Lr10*, etc.

Clonado posicional

El clonado posicional consiste en el aislamiento de un gen responsable de un carácter particular a partir del conocimiento de su localización en el genoma. El proceso utiliza información genética (modo de herencia del carácter y ubicación del gen/es en una región específica de un mapa), molecular (secuencia nucleotídica de aquellos genes presentes en la región cromosómica asociada con el carácter), y de función o expresión de los genes.

El primer paso para lograr esto es seleccionar parentales que sean contrastantes para el carácter vinculado al gen en cuestión, por ejemplo, una variedad de trigo susceptible y otra resistente a la roya de la hoja. Una vez seleccionados los parentales se desarrolla una población segregante, la más sencilla es una

F2, a partir de la cual se construye un *mapa genético* utilizando marcadores moleculares, y sobre este marco se identifican las regiones cromosómicas asociadas al control de dicha resistencia.

Una vez identificada dicha región, para avanzar hacia el clonado posicional, es necesario mejorar el grado de resolución del mapa en esa zona. Esto se logra saturando dicha región con nuevos marcadores moleculares e incrementando el número de individuos de la población, a fin aumentar las posibilidades de encontrar recombinantes entre marcadores estrechamente ligados. El objetivo es reducir el intervalo del genoma analizado al fragmento mínimo posible que contenga al gen de interés. Muchos de estos marcadores pueden obtenerse del mapeo comparativo en regiones cromosómicas ortólogas de especies emparentadas con genomas menos complejos. En el caso de trigo, serían arroz, cebada, sorgo, *Triticum monococcum*, *Triticum tauschii*, etc.

Una vez reducido al mínimo el intervalo de genoma portador del gen de interés, el paso siguiente es obtener la secuencia nucleotídica del mismo. Una forma de hacerlo es mediante una *caminata cromosómica*, para lo cual es necesario contar con un *mapa físico* (secuencia nucleotídica) de la región. Para el ejemplo que estamos considerando, la caminata se inicia seleccionando de una "biblioteca" del genoma de trigo (*BAC library*) aquellos clones (tomos) que hibriden con los marcadores que flanquean al intervalo portador del gen. Los clones seleccionados en la hibridación contra la biblioteca son digeridos con enzimas de restricción para identificar en cada caso fragmentos compartidos y no compartidos. Se estima que los clones seleccionados con un mismo marcador deben tener en común al menos un fragmento de digestión (el fragmento que posee la secuencia del marcador). Los fragmentos no compartidos corresponden a los extremos de estos clones parcialmente solapados entre sí. Estos extremos se utilizan como nuevos marcadores para extender la caminata cromosómica hacia el gen, reiniciando la búsqueda de clones en la biblioteca genómica. Este proceso se hace simultáneamente en ambos sentidos, hasta lograr que el mapa físico (secuencia nu-

cleotídica) que se ha iniciado desde cada marcador flanqueante forme un continuo o "*contig*" de fragmentos de ADN genómico de trigo. Este *contig* contiene la secuencia del gen en estudio. El paso siguiente consiste en la secuenciación del *contig*. A partir de esta información, y por análisis de secuencia con herramientas bioinformáticas, se determinan los genes presentes y aquellos posibles candidatos del carácter en estudio. La prueba definitiva para establecer el hallazgo del gen en cuestión es la prueba de complementación. Esto consiste en transformar una planta que carece del carácter en estudio (siguiendo con el ejemplo, una variedad de trigo susceptible) con cada uno de los genes candidatos y determinar cual de ellos le confiere el carácter (en este caso resistencia al patógeno).

A partir de la secuenciación completa del genoma de arroz es posible obtener una primera estimación de los genes presentes en nuestro *contig*, con algunas salvedades, como son la presencia de genes específicos de arroz (que no estarán en el *contig* de trigo) y trigo (que no estarán en el genoma de arroz), ruptura de la colinearidad de genes entre genomas por rearrreglos cromosómicos, etc. Como ejemplo, en el clonado posicional del gen *Vrn-1* en *Triticum monococcum* se utilizó una población de 3095 individuos F2, para llegar a delimitar un intervalo de 0,04 cM en el cromosoma 5A^m que contenía dos genes candidatos. Posteriormente, mediante estudios de expresión de estos genes se observó que sólo uno de ellos (*Ap-1*) presentaba un patrón de expresión idéntico al gen *Vrn-1*. Para llegar a esto se trabajó con marcadores provenientes de las bibliotecas de los genomas de cebada, sorgo, arroz y *Triticum monococcum* (figura 2).

Distribución de la variabilidad genética en poblaciones naturales y conservación

Las especies están constituidas por unidades o demos más o menos aislados denominados poblaciones. Una especie vegetal raramente se extiende en forma continua e ininterrumpida. En general adopta una distribución en parches. El número de individuos en cada población, el modo reproductivo (autogamia-allogamia), las distancias inter-demos, el tipo de polinización

(gravedad-anemófila-entomófila), la acción del hombre en la fragmentación del hábitat y el origen (especies nativas-especies introducidas) determinan en conjunto una distribución de la variación genética propia de cada especie.

Los programas de conservación utilizan a menudo información acerca de la distribución de la variación genética para establecer prioridades y estrategias de manejo. Las variaciones dentro y entre poblaciones colaboran en la definición de las unidades a conservar y se convierten en elementos importantes para la toma de decisiones relacionadas con la protección de la biodiversidad. Es deseable que las poblaciones seleccionadas para formar parte de las áreas protegidas, contengan la mayor diversidad genética posible de modo de asegurar el mayor potencial evolutivo.

A partir de marcadores *codominantes* como las isoenzimas y microsatélites, pueden obtenerse parámetros de diversidad: P, número de *loci* polimórficos/número total de *loci* analizados; A, número promedio de alelos por locus; Ho, heterocigocidad observada; y He, heterocigocidad esperada ($1 - \sum p_i^2$, p_i : frecuencia alélica del alelo i). Dado que los genotipos homo y heterocigotos pueden ser reconocidos, es posible probar si la población se encuentra en equilibrio de Hardy Weinberg. Con los datos de frecuencias alélicas disponibles se calculan índices tales como Nei, Rogers, o Prevosti y se construyen matrices de distancia genética (D), a partir de las cuales es posible realizar análisis de agrupamientos que permiten visualizar las semejanzas o diferencias genéticas entre poblaciones.

En el caso de marcadores *dominantes* como los RAPD (*Random Amplification of Polymorphic DNA*) o AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) el genotipo heterocigoto no puede ser reconocido y se asume para una especie diploide que cada banda corresponde a un locus con dos alelos, A y a. El homocigoto dominante (AA) y el heterocigoto (Aa) corresponden a la presencia de la banda y la ausencia corresponde al homocigoto recesivo (aa). Los parámetros de diversidad pueden ser

estimados: P de la misma manera que para marcadores codominantes; A es dos, por definición; sólo es posible calcular He a partir de las frecuencias alélicas estimadas, asumiendo equilibrio. Entonces $q = \sqrt{q^2}$ donde q es la frecuencia del alelo a y q^2 la frecuencia de individuos con ausencia de banda; luego $p = 1 - q$ siendo p la frecuencia del alelo A. Con estos datos, para calcular la He se procede de la misma manera que para marcadores codominantes.

El estudio de variabilidad con marcadores dominantes no permite determinar si una población está o no en equilibrio de Hardy Weinberg. Las diferencias genéticas entre poblaciones pueden igualmente ser estimadas con métodos que no utilizan frecuencias alélicas y que por lo tanto no asumen equilibrio. Uno de estos métodos se basa en el cálculo de distancias binarias entre pares de individuos, que consideran la proporción de bandas compartidas. El paso siguiente comprende un análisis de la varianza molecular (AMOVA) que permite particionar esta varianza en sus componentes dentro y entre poblaciones a diferentes niveles. El programa GenAlEx disponible en <http://www.anu.edu.au/BoZo/GenAlEx/>, permite realizar AMOVA y otros análisis de variabilidad, distancia genética y correlaciones a partir de datos moleculares. Posee un sólido soporte teórico, es de acceso libre y de fácil manejo dado que se agrega a la barra de herramientas Office Excel.

El siguiente es un ejemplo simplificado de uso de este programa.

Paso 1) Confección de la tabla de datos en formato para GenAlEx conteniendo registro de marcadores RAPD de dos poblaciones vegetales.

- Número de loci RAPD: 11 (A1)
- Número de individuos totales: 10 (B1)
- Número de poblaciones: 2 (C1)
- Número de individuos de la población A: 5 (D1)
- Número de individuos de la población B: 5 ((E1)

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L	M	N
1	11	10	2	5	5									
2														
3	ind	pob	P2 240	P2 260	P2 330	P2 400	P2 440	P6 520	P6 550	P6 590	P6 650	P6 660	P6 800	
4	1	A	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	
5	2	A	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	
6	3	A	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
7	4	A	1	1	1	1	1	0	1	1	1	0	1	
8	5	A	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	
9	6	B	1	0	0	1	0	0	1	1	1	1	0	
10	7	B	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
11	8	B	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	
12	9	B	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	
13	10	B	1	0	0	1	1	0	1	1	1	1	1	
14														

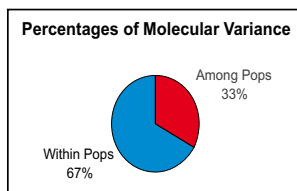
Paso 2) Cálculo de las distancias binarias entre individuos.

GenAlEx ⇒ Distance ⇒ Genetic (binary) ⇒ OK

	A	B	C	D	E	F	G	H	I	J	K	L
1	1	10	2	5	5	1	10					
2												
3	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10		
4	0										1	
5	3	0									2	
6	3	2	0								3	
7	2	1	3	0							4	
8	3	2	0	3	0						5	
9	5	4	6	5	6	0					6	
10	5	2	4	3	4	2	0				7	
11	4	1	3	2	3	3	3	0			8	
12	2	1	3	2	3	3	3	2	0		9	
13	5	2	4	3	4	2	0	3	3	0	10	
14												

Paso 3) A partir de la matriz de distancia se realiza el análisis de varianza molecular

GenAlEx ⇒ AMOVA (tri or square distance matrix; 999 permutations) ⇒ OK



Summary AMOVA Table

Source	df	SS	MS	Est. Var.	%
Among Pops	1	4,00	4,00	0,57	33%
Within Pops	8	9,20	1,15	1,15	67%
Total	9	13,20		1,72	100%

Stat	Value	P (rand >= data)
PhiPT	0,331	0,020

Del análisis se concluye que la diferenciación molecular entre las poblaciones representa un 33 % de la varianza total, y que esa diferencia es significativa ($p = 0,02$).

La diversidad genética cuantificada por marcadores moleculares puede mostrar, por ejemplo, que en una especie nativa de interés forestal todas las poblaciones presentan altos niveles de variabilidad genética y son bastante similares entre si. En este caso, la decisión de

cuáles poblaciones formarán parte del programa de conservación podría basarse en consideraciones exclusivamente prácticas ya que las poblaciones son genéticamente equivalentes. Por el contrario, una especie compuesta de poblaciones con niveles bajos de variabilidad en cada unidad pero con alto grado de diferenciación entre poblaciones, requerirá que los esfuerzos de protección sean dirigidos hacia tantas poblaciones como sea posible, ya

que cada una de ellas posee una identidad genética diferente. Poblaciones de especies endémicas, con niveles de diversidad genética extremadamente bajos y un reducido número de individuos, son normalmente ingresadas a la categoría de especies en peligro de extinción.

En este punto, es importante recordar que los marcadores moleculares representan variación genética esencialmente neutra, es decir se encuentran sometidos a la acción de fuerzas evolutivas no selectivas tales como deriva o flujo génico. Las decisiones finales de un programa de conservación deberían por lo tanto combinar los datos obtenidos a partir de marcadores moleculares junto con la evaluación de ciertos rasgos morfológicos, fisiológicos o reproductivos, que son críticos en el proceso de adaptación y supervivencia de las poblaciones en su hábitat.

Las malezas de mayor impacto en la agricultura mundial son en general especies introducidas. En el nuevo territorio, libre de presiones selectivas tales como especies competidoras o patógenos característicos del ecosistema de origen, la especie introducida es capaz de establecerse y colonizar todos los territorios que reúnan determinadas condiciones ambientales. La caracterización genética de las poblaciones de malezas puede aportar información de utilidad en los programas de control. Mediante marcadores moleculares puede establecerse si las poblaciones actuales provienen de un solo evento de introducción, con unos pocos individuos iniciales o por el contrario, ocurrieron múltiples eventos de introducción. Además, determinados marcadores informativos pueden establecer con bastante precisión cuál es el lugar de origen de las poblaciones introducidas, y en este caso rastrear “enemigos naturales” que pudieran ser útiles en el control biológico de la especie invasora.

El tipo de reproducción de una especie vegetal determina en gran parte la distribución de variabilidad genética entre poblaciones. Los mecanismos reproductivos pueden clasificarse en los tres tipos básicos: alogamia, autofecundación y apomixis. En realidad, existen combinaciones de estos tipos básicos, con porcentajes variables de cada uno de ellos según las

especies y aún dentro de las poblaciones, con formas obligadas o facultativas. El estudio de marcadores moleculares en diferentes plantas de una población y su progenie ha contribuido a determinar el tipo de reproducción de numerosas especies vegetales

Estimación del flujo génico

El flujo génico entre poblaciones vegetales ocurre mediante el movimiento de polen o de semillas. La morfología de semilla y polen, los mecanismos de dispersión, el tipo de polinización, etc., hacen que la contribución de estas dos vías al flujo total varíe de acuerdo a la especie. Los marcadores moleculares permiten cuantificar cada uno de estos procesos. Si el flujo génico se produce básicamente a través de polen, los marcadores de ADN de organelas, como por ejemplo cloroplastos, no serán transferidos de una población a otra porque este tipo de información es sólo heredada vía materna. En contraste, si el flujo génico se realiza principalmente a través de semillas, tanto los marcadores de herencia materna como los de herencia biparental o nuclear, serán transmitidos entre poblaciones. Mediante el uso de marcadores altamente polimórficos como los microsatélites es posible determinar cuál ha sido la planta donadora del polen de cada semilla de una planta madre, por ejemplo en especies arbóreas. En este caso, por un lado se obtiene información acerca de la distancia de transporte de polen y además constituye un test de “paternidad”.

La estimación del flujo génico ha cobrado especial relevancia en los estudios tendientes a evaluar el efecto sobre el ambiente de los materiales genéticamente modificados. De esta manera, es factible analizar la posibilidad de que poblaciones silvestres cercanas a las formas cultivadas, adquieran el transgén mediante fecundación cruzada, generando cambios en la dinámica poblacional, competitividad o relación con otros miembros de la comunidad biótica tales como polinizadores, patógenos, etc. Esta potencial transferencia de genes se torna preocupante cuando se trata de flujo génico hacia poblaciones silvestres catalogadas como malezas. En este escenario, los marcadores moleculares de ADN o isoenzimas

constituyen herramientas muy útiles. Los individuos de una determinada población pueden ser analizados y comparados con su progenie, producto de una polinización libre. Los alelos que no estaban presentes en la población materna son atribuidos al ingreso externo de polen del cultivo. Evaluando poblaciones a distancias crecientes desde una determinada fuente de polen, el flujo génico puede ser cuantificado, y cuando esta información se complementa con datos de compatibilidad sexual, polinizadores y clima se arriba a una serie de conclusiones que pueden aplicarse al cultivo en gran escala de variedades transgénicas.

Se trate de variedades transgénicas o no, los procesos de hibridación de formas cultivadas y silvestres, alteran los niveles de diversidad genética de las poblaciones naturales, produciendo una erosión de los recursos genéticos vegetales, con potencial aplicación en mejora. Nuevamente la estimación del flujo génico y la determinación de la variabilidad genética mediante marcadores pueden contribuir a atenuar los procesos de "homogenización" genética y dar tiempo a la evaluación de las poblaciones naturales en cuanto a rasgos como resistencia a enfermedades o parámetros de calidad.

Filogenia

La filogenia intenta reconstruir las relaciones jerárquicas de descendencia entre especies o grupos de especies y utiliza esta información como criterio de clasificación biológica. El conocimiento de la filogenia y diversidad genética de los recursos silvestres permite optimizar los procesos de hibridación con los materiales cultivados. Cultivos importantes como trigo, girasol, tomate, poroto, o arroz cuentan con numerosas especies o géneros silvestres relacionados, con potencial uso en el mejoramiento genético mediante cruzamientos.

Los marcadores moleculares han aportado nuevas formas de análisis para la resolución de incógnitas filogenéticas o taxonómicas. Los marcadores RFLP son particularmente útiles dado que están basados en reacciones de hibridización, lo que garantiza la homología de los segmentos que se comparan entre los diferentes *taxa*. RAPDs no requiere un conocimiento previo del genoma en estudio y puede

ser aplicado a diferentes especies pero la interpretación de los datos parte de asumir que los productos de amplificación de igual tamaño son homólogos.

Uno de los métodos de análisis filogenético a partir de marcadores, consiste en calcular un índice de distancia genética en base al número de bandas en común, y luego realizar un análisis de agrupamiento (UPGMA) o árbol filogenético (Neighbour Joining), que refleje las relaciones entre los *taxa*. Establecer cuál es el árbol correcto entre todos los posibles es una tarea difícil que en parte es resuelta mediante el uso de métodos estadísticos, como técnicas de re-muestreo, que generan índices de consistencia o confiabilidad para cada árbol. Las relaciones establecidas de este modo se cotejan luego en relación a las vías filogenéticas propuestas a partir de datos citogenéticos, morfológicos, ecológicos, cruzamientos, etc.

Por otro lado, la comparación de mapas moleculares entre especies ha permitido conocer el tipo de reorganización genómica que ha operado durante el proceso de especiación. Cuando se compara el orden de los marcadores moleculares del girasol, *Helianthus annuus*, y especies relacionadas como *H. petiolaris* o *H. argophyllus* se observa que estas especies poseen zonas colineares y zonas no colineares, originadas estas últimas en cambios estructurales. Cuando se incluyó en el mapeo comparativo a *H. anomalus* se pudo inferir que: i) esta especie ha surgido por hibridación entre *H. annuus* y *H. petiolaris*; ii) conserva el número cromosómico de las especies parentales (especiación homoploide); iii) cambios en la estructura cromosómica han sido un mecanismo importante en la evolución de las especies anuales de *Helianthus*.

Mediante marcadores es posible elucidar las especies parentales ancestrales de una especie alopoliploide, como el tabaco o el algodón. Basta con examinar las variantes moleculares de las especies candidatas diploides y compararlas con las de la especie poliploide derivada. El modo en que segrega un marcador codominante en una progenie interespecífica, permite inferir el comportamiento disómico o polisómico, lo que permite caracterizar una especie en cuanto a su origen alo- o autopoliploide, respectivamente.

En la evolución del género *Citrus* ha operado la hibridación natural a través de reproducción sexual pero también están presentes mecanismos apomícticos que constituyen barreras al intercambio de genes. La taxonomía de este grupo resulta particularmente compleja ya que no puede ser aplicado el concepto biológico de especie. Marcadores de ADN han permitido esclarecer las relaciones de este polimórfico grupo que incluye naranjas, limones, limas y mandarinas.

Los estudios moleculares más recientes han colocado al tomate, previamente denominado *Lycopersicon esculentum*, dentro del género *Solanum*, cambiando su denominación por *Solanum lycopersicon*. Los estudios sobre ADN de cloroplasto y la similitud de los mapas de ligamiento constituyen evidencias de que el tomate y la papa comparten un antecesor común muy reciente. Esta información resulta de gran aplicación en el mejoramiento de estos cultivos así como en la comprensión de la evolución de los genomas.

En los últimos años, ha tomado gran importancia la filogenia basada en datos de secuencias de ADN, en la que cada base de un grupo de secuencias alineadas, constituye un carácter a comparar. La velocidad de cambio del ADN a lo largo del proceso evolutivo difiere en las distintas porciones de un genoma, encontrándose algunas secuencias altamente conservadas y otras con elevadas tasas de sustitución. Si los taxones a comparar han divergido recientemente, será conveniente utilizar secuencias altamente variables, que hayan experimentado suficientes cambios en cortos períodos de evolución. Por el contrario, si las especies a comparar llevan mayores tiempos de divergencia (especies poco relacionadas) deben utilizarse secuencias más estables, con menores tasas de sustitución. Por otro lado, la existencia de genomas nucleares, mitocondriales y plastídicos que evolucionan a tasas específicas, representan herramientas adicionales para estudiar las relaciones filogenéticas entre especies con distintos grados de parentesco.

Lecturas recomendadas

- Andersen J. R., Lübberstedt T. 2003. Functional markers in plants. Trends in Plant Science, 8, 554-560.
- Angiolillo A, Mencuccini M, Baldoni L. 1999. Olive genetic diversity assessed using amplified fragment polymorphisms. Theor. Appl. Genet., 98, 411-421.
- Arabidopsis Genome Initiative 2000. Analysis of the genome sequence of the flowering plant *Arabidopsis thaliana*. Nature, 408, 796-815.
- Bagge M., Xia X., Lübberstedt T. 2007. Functional markers in wheat. Current Opinion in Plant Biology, 10, 211-216.
- Buerkle C. A, Rieseberg L.H. 2008. The rate of genome stabilization in homoploid hybrid species. Evolution, 62, 266-275.
- Carrera A, Pizarro G, Poverene M, Feingold S, Berry S, León A. 2002. Variability among inbred lines and RFLP mapping of sunflower isozymes. Genetics and Molecular Biology, 25, 65-72.
- Devos K.M. and Gale M.D, 2000. Genome relationships: The grass model in current research. The Plant Cell, 12, 637-646.
- Dubcovsky J. and Dvorak J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. Science, 316, 1862-1866.
- Godt M, Hamrick J. 1998. Allozyme diversity in the grasses. En: G.P. Cheplick (ed). Population biology of grasses. Cambridge University Press. pp 1998-399.
- Huff DR, Peakall R, Smouse PE. 1993. RAPD variation within and among natural populations of outcrossing buffalograss *Buchloe dactyloides* (Nutt) Engelm. Theoretical and Applied Genetics, 86, 927-934.
- International Rice Genome Sequencing Project 2005. The map-based sequence of the rice genome. Nature, 436, 793-800.
- Manifeto M.M., Schlatter A.R., Hopp H.E., Suárez E.Y., and Dubcovsky J. 2001. Quantitative evaluation of genetic diversity in wheat germplasm using molecular markers, Crop Science, 41, 682-690.
- Moore G. 2001. Oranges and lemons: clues to the taxonomy of *Citrus* from molecular markers. Trends in Genetics, 17, 536-540.
- Paterson A, Tanksley S, Sorrells M. 1991. DNA markers in plant improvement. Advances in Agronomy. 46, 39-90.

- Peakall R, Smouse P.E. 2006. GenAlEx 6: Genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes*, 6, 288-295.
- Rieseberg L, Seiler G, 1990. Molecular evidence and the origin and development of the domesticated sunflower (*Helianthus annuus*, Asteraceae). *Economic Botany*, 44, 79-91.
- Sherry A. Flint-Garcia, Jeffry M. Thornsberry and Edward S. Buckler IV. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 54, 357-74.
- Soltis E, Soltis P. 2000. Contribution of plant molecular systematics to studies of molecular evolution. *Plant Molecular Biology*, 42, 45-75.
- Stein, N; C. Feuillet, T. Wicker, E. Schlagenhauf, and B. Keller. 2000. Subgenome chromosome walking in wheat: A 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the Lr10 resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 97 (24), 13436-13441.
- Tohme J, Gonzalez D, Beebe S, Duque M. 1996. AFLP analysis of gene pools of a wild bean core collection. *Crop Sci.*, 36, 1375-1384.
- Yan, L., Loukoianov, A., Tranquilli, G., Helguera, M., Fahima, T. and J. Dubcovsky 2003. Positional cloning of wheat vernalization gene VRN1. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 100, 6263-6268.

III. CAPÍTULO 3

Marcadores moleculares y mejoramiento genético de cultivos

Carlos Sala; Mariano Bulos; Analia Fresco;
Emiliano Altieri

Introducción

El mejoramiento genético es un conjunto de principios científicos, métodos, técnicas y estrategias aplicadas a la obtención de genotipos o grupos de genotipos con características deseables según objetivos previamente definidos. El proceso fundamental que subyace en el mejoramiento es el de cambio adaptativo por sustitución alélica bajo selección. La mutación, la hibridación interespecífica y la transgénesis pueden aportar nuevos caracteres a la diversidad de un cultivo, no obstante el proceso fundamental, luego que tales caracteres son incorporados al germoplasma, no se modifica.

El mejoramiento genético es un proceso cíclico. En cada ciclo, se evalúan todos los individuos de una población determinada. Como resultado de esta evaluación, se seleccionan los individuos deseables y los restantes son descartados. Finalmente, los individuos seleccionados se cruzan entre sí (se recombinan) para dar origen a una nueva generación en que se reinicia un nuevo ciclo.

Un excelente medio para organizar una discusión en torno a cómo maximizar el progreso genético y distribuir eficientemente los recursos dentro de un programa de mejoramiento es la ecuación de ganancia genética por selección:

$$Gy = \frac{k \sigma_A^2}{y \sigma_P}$$

Esencialmente, esta ecuación indica que el progreso genético de cualquier programa de mejora (Gy) es directamente proporcional a la variabilidad heredable (σ_A^2) disponible y a la intensidad de selección que se aplique (k). La variabilidad genética disponible refleja el grado de diversidad de los materiales genéticos que posee el programa de mejora. En el extremo,

un programa que carece de variabilidad ($\sigma_A^2 \rightarrow 0$) no tendrá posibilidad de generar nuevos genotipos por recombinación y selección por lo que su progreso genético se verá severamente disminuido ($Gy \rightarrow 0$). Por otra parte, el progreso por selección es inversamente proporcional al número de años que se tarda en completar un ciclo de selección (y) y al desvío fenotípico (σ_P). El desvío fenotípico refleja básicamente el grado de interacción entre el genotipo y el ambiente para expresar un dado fenotipo. En otras palabras, es una medida de la correlación existente entre genotipo y fenotipo.

Consideremos un determinado carácter (por ejemplo, la resistencia a una enfermedad) el cual está gobernado por un solo gen con dos alelos, el alelo de resistencia es incompletamente dominante, el patógeno está siempre presente y las condiciones ambientales para que se produzca la infección son siempre favorables. Por lo tanto, si se observa una planta sin síntomas puede concluirse que la misma es homocigota para el alelo de resistencia. En forma similar, si se observa una planta muy afectada por la enfermedad se concluirá que la planta es homocigota para el alelo que confiere susceptibilidad, y todas las plantas que muestren fenotipos intermedios podrían considerarse heterocigotas. En este caso ideal, el fenotipo estaría indicando exactamente cuál es el genotipo de cada individuo, la correlación entre fenotipo y genotipo tendería a 1 y el desvío fenotípico tendería a cero. Bajo esas condiciones el progreso genético por elección sería máximo. Lamentablemente, en la práctica este tipo de ejemplo jamás ocurre. Los caracteres de importancia económica no siempre están gobernados por un único gen, sino por varios, y las relaciones de dominancia y de epistasis (interacción entre genes) suelen ser bastante complicadas. Asimismo, el patógeno puede o no estar presente, y el ambiente puede o no ser favorable para el desarrollo de la enfermedad. Por todas esas razones, la asociación entre fenotipo y genotipo es en general escasa, lo que hace que al evaluar individuos a través de su fenotipo no se esté seleccionando el genotipo adecuado y la recombinación incluirá muchas cruces entre individuos que no portan el/los gen/es deseados. El resultado es que el

incremento de los alelos favorables dentro de la población se hace a tasas más lentas y, por ende, el progreso genético es mucho menor.

La tecnología de marcadores moleculares se puede aplicar para optimizar o hacer más eficiente todos y cada uno de los factores determinantes de la ganancia genética o del progreso genético por selección. Así, los marcadores moleculares pueden utilizarse para:

Organizar, mantener e incrementar la diversidad genética. De este modo se verá incrementado el numerador de la ecuación y, por ende, el progreso genético.

Disminuir la interacción genotipo/ambiente. Si en lugar de seleccionar por el fenotipo se seleccionara por el genotipo de cada individuo, tendería a disminuir drásticamente el denominador de la ecuación de ganancia genética, con el consiguiente incremento del progreso por selección. Este tipo de selección se denomina “selección asistida por marcadores moleculares” o, simplemente, “selección asistida”.

Disminuir el tiempo requerido para completar los ciclos de selección. Si para incorporar un carácter dentro del germoplasma del cultivo se tarda usualmente 6 a 7 generaciones, los marcadores moleculares permiten acortar esos plazos a 3 generaciones, por lo que el progreso genético se verá incrementado. Adicionalmente, los marcadores permiten la introgresión de tales caracteres con un mínimo de incorporación de genes provenientes del individuo dador, garantizando de ese modo, que no se reduzcan las medias poblacionales para aquellos caracteres que no están relacionados con el gen introducido. Este tipo de método de incorporación de variabilidad al germoplasma se denomina “retrocruzadas asistidas por marcadores moleculares” o, simplemente, “conversiones”.

A lo largo de este capítulo se analizarán con mayor detalle los modos de implementación de los marcadores moleculares en todas estas áreas lo que, en última instancia, contribuye a maximizar el progreso genético.

Selección asistida por marcadores moleculares

La aplicación de marcadores moleculares en el mejoramiento de cultivos fue inicialmente propuesta al comienzo de la década de

1980 cuando se utilizaron algunos marcadores isoenzimáticos para acelerar la introgresión de caracteres monogénicos desde el germoplasma exótico hacia trasfondos cultivados. Pocos años después, Beckmann & Soller (1986) describieron el uso de marcadores RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphism*) en el mejoramiento de cultivos, incluyendo los aspectos teóricos relacionados con las retrocruzadas asistidas por marcadores para el mejoramiento de caracteres cualitativos. Lande & Thompson (1990) fueron los primeros en considerar los aspectos teóricos de la *selección asistida por marcadores* (MAS, por su acrónimo inglés) para los caracteres cuantitativos, y catalizaron una serie de publicaciones de estudios de simulación en la década del 90. Más recientemente, se han publicado resultados de la aplicación de MAS en programas de mejora y algunas consideraciones teóricas adicionales, incluyendo la optimización de los sistemas de *retrocruzadas asistidas por marcadores* (MABC, por su acrónimo inglés); y las estrategias para la piramidización o apilamiento de alelos favorables en esquemas de selección recurrente. Todos estos estudios han contribuido a nuestro entendimiento de muchos aspectos básicos a tener en cuenta al implementar MAS, tales como el tipo de poblaciones, el tamaño de la muestra, el tamaño genómico, y el número de marcadores. Asimismo, hay varias revisiones que comparan el uso de distintos tipos de marcadores en mejoramiento.

La figura 1 muestra los pasos para realizar selección utilizando marcadores moleculares microsatélites (si bien, cualquier otro tipo de marcador podría ser usado). Básicamente, de cada planta a evaluar se extrae su ADN, se amplifica el marcador que esté asociado al gen de interés utilizando la técnica de PCR (*Polymerase Chain Reaction*), y el producto de amplificación se somete a una corrida electroforética en geles para su observación. Se muestra un ejemplo de selección asistida para desarrollar resistencia a una enfermedad denominada “Mancha ojo de rana” producida por *Cercospora sojina* en soja. En el gel que se muestra a la derecha del esquema pueden observarse los fragmentos de ADN obtenidos para un progenitor resistente (R), un individuo susceptible (S)

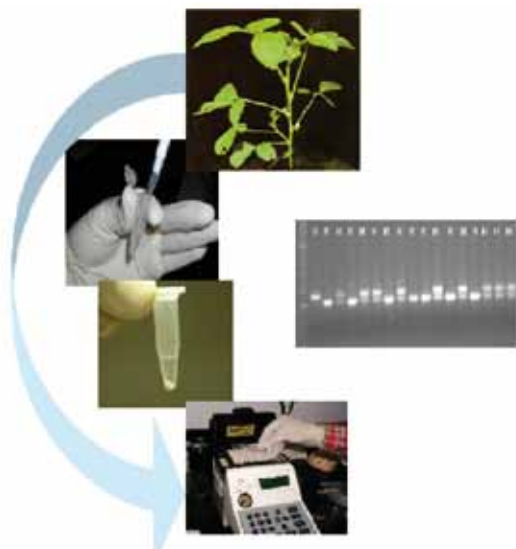


Figura 1. Etapas de la selección asistida por marcadores moleculares. Los individuos a evaluar son muestreados y el material foliar es acondicionado de acuerdo al método que se utilice para la extracción del ADN. El ADN obtenido es utilizado como molde para realizar el proceso de amplificación por PCR del marcador elegido. Los fragmentos obtenidos para cada individuo son resueltos mediante electroforesis. Los resultados son leídos e interpretados para decidir la selección de los individuos que presenten el alelo de interés. Actualmente, una o más etapas de este proceso pueden ser automatizadas.

y varios descendientes de la primera retrocruza con el padre resistente. Tales descendientes muestran el fragmento que indica la presencia del gen de resistencia, o bien, ambos fragmentos, lo que indica que son heterocigóticos para el gen de resistencia.

Existen algunos aspectos importantes que deben considerarse para la implementación de la selección asistida por un carácter en un programa de mejora. Ellos son: a) el tipo de marcador elegido; b) la distancia genética entre el marcador y el gen de interés; c) la/s fuente/s posible/s para el carácter o gen de interés. Respecto del primer punto, cuando se practica selección asistida por marcadores es necesario evaluar cientos o miles de plantas en forma eficiente y ello determina la elección de los mismos. Ciertos tipos de marcadores (como por ejemplo aquellos basados en la hibridación del ADN, como los RFLPs) no se adaptan bien

a este fin dado que son técnicamente más laboriosos. En general, los marcadores basados en PCR son los más indicados para este tipo de aplicación. Por esta razón, en muchas oportunidades se convierten marcadores RFLPs en marcadores basados en PCR. Dentro de los marcadores basados en PCR, los marcadores multipunto (como los AFLPs –*Amplified Fragment Length Polymorphism*–, RAPDs –*Random Amplification of Polymorphic DNA*– o ISSRs –*Inter Simple Sequence Repeats*–) presentan dos dificultades: son en general dominantes y no es eficiente amplificar y leer múltiples fragmentos para detectar sólo el que nos interesa. Esta última dificultad se resuelve diseñando marcadores SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) a partir del fragmento polimórfico que está asociado al gen o carácter de interés. De este modo, la amplificación del ADN con cebadores específicos produce patrones simples y de fácil lectura. Sin embargo, los SCARs son en general dominantes, lo que involucra una dificultad adicional. Si el marcador es codominante, como el que se muestra en el ejemplo de la figura 1, se puede determinar inmediatamente si cada individuo resistente es homocigótico o heterocigótico para el gen en cuestión. Si, en cambio, el marcador fuese dominante, únicamente se podrían distinguir los individuos portadores del gen de resistencia de aquellos que no lo presentan. En esos casos, posteriormente se deberá determinar si cada individuo es o no homocigótico mediante análisis de la descendencia de cada planta. Para solucionar este inconveniente lo que se hace es diseñar un marcador CAPs (*Cleaved Amplified Polymorphic Sequence*) o bien utilizar la técnica de PCR en tiempo real. El segundo punto importante se relaciona con la distancia genética existente entre el marcador molecular y el gen de interés. Idealmente, se deberían utilizar marcadores específicos de alelo. No obstante, en general no es posible disponer de tales tipos de marcadores. A medida que la distancia entre el marcador y el gen de interés se acrecienta, mayor será la probabilidad de cometer errores de evaluación (tomar a un individuo como positivo cuando en realidad no lo es). Esta dificultad puede solucionarse de dos formas básicas. En primer lugar, se debe

tratar de saturar la región de interés con un mayor número de marcadores para hallar uno que esté más cercano al gen. Si ello no fuera posible o los nuevos marcadores hallados no se encuentren suficientemente cercanos al gen de interés, se puede optar por utilizar dos marcadores -uno por “encima” y otro por “debajo” del gen en cuestión- para reducir la probabilidad de cometer errores de evaluación. Finalmente, la tercera consideración a realizar es acerca de la fuente del carácter o gen de interés. Cuando en un dado cultivo un carácter o un gen tienen un solo ancestro dador (o sea, hay una sola fuente original), existirá un solo tamaño de fragmento para el alelo de interés y uno o varios fragmentos de diferente tamaño para los otros alelos. En consecuencia, los resultados obtenidos de la población de mapeo del carácter en cuestión son inmediatamente utilizables o trasladables a otras poblaciones y líneas. No obstante, lo usual es que existan diferentes fuentes. Si esto es así, primero hay que determinar los tamaños de fragmento tanto para las diferentes fuentes de resistencia como para aquellos individuos que no portan el alelo de interés, ya que en muchas oportunidades el tamaño de fragmento puede variar entre diferentes fuentes de resistencia. Asimismo, en otras poblaciones o en otro sector del germoplasma, un marcador detectado previamente como polimórfico en la población de mapeo original puede ser monomórfico entre individuos contrastantes para el carácter, lo que puede inducir a errores de evaluación.

Justificaciones para el uso de selección asistida por marcadores en mejoramiento genético.

Las justificaciones para el desarrollo y uso de MAS en mejoramiento genético pueden agruparse en 6 categorías diferentes las cuales son relevantes para casi todos los cultivos:

Cuando la heredabilidad del carácter que se está evaluando es baja (o sea, cuando la expresión de un carácter se halla altamente influida por el ambiente) ya sea porque la genética del carácter es compleja, la penetrancia es baja o la expresividad es variable.

Cuando no hay métodos efectivos, precisos o rutinarios de selección fenotípica o convencional, o éstos son caros, su determinación es en-

gorrosa, o bien depende de ambientes específicos o estados de desarrollo que influyen la expresión del fenotipo. Asimismo, para el caso de resistencia a enfermedades, cuando el patógeno está ausente en el lugar donde se realiza la selección o su frecuencia de aparición (su incidencia) varía mucho entre años.

Cuando se necesita un elevado número de individuos para evaluar fenotípicamente el carácter en cuestión (ejemplo: calidad panadera en trigo), los marcadores permiten realizar tal evaluación sobre un solo individuo y en las primeras generaciones de endocría.

Cuando es necesario apilar o “piramidizar” varios genes o QTLs que determinan un solo carácter, como por ejemplo la resistencia a roya de la hoja o a la fusariosis de la espiga en trigo, lo que puede ser muy engorroso o virtualmente imposible si se utilizan métodos fenotípicos solamente.

Cuando se necesita individualizar eficazmente las fuentes de resistencia a patógenos existentes en el germoplasma y buscar nuevas fuentes para complementar las anteriores. Esta prospección de recursos genéticos mediante el uso de marcadores no está limitada a las resistencias a patógenos sino que puede emplearse para otros caracteres, como por ejemplo la calidad del producto.

Los marcadores moleculares, finalmente, debido a que permiten determinar la genética subyacente detrás de un dado fenotipo garantizan la generación del mismo en forma recurrente. En otras palabras, los marcadores permiten reobtener las combinaciones de genes o QTLs cuya interacción gobierna un determinado fenotipo, proceso que -si librado al azar- sería de una ocurrencia altamente improbable.

En la tabla 1 se ejemplifican algunos de los caracteres en distintos cultivos cuya selección se realiza por medio de marcadores moleculares. Como puede apreciarse, estos caracteres van desde resistencias a enfermedades hasta caracteres que están relacionados con la calidad del producto, incluyendo caracteres de herencia simple (por ejemplo, la resistencia a *Cercospora sojina* en soja) hasta caracteres de herencia compleja (por ejemplo, la calidad panadera en trigo o la resistencia a la virosis conocida como Mal de Río Cuarto en maíz).

Tabla 1. Ejemplos de caracteres para los cuales se realiza selección asistida utilizando marcadores moleculares agrupados por rasgo. Los ejemplos fueron escogidos para representar la diversidad de ámbitos donde esta metodología encuentra aplicación.

Ref.: 1) Guo et al. (2005) Theor. Appl. Genet. 111, 965-971. 2) Dedryver et al. (1996) Genome 39, 830-835. 3) Sala et al. (2005) Sol. Pat. Arg. INPI AR038302 4) Pankovic et al. (2008) Plant Breed. 126, 440-444. 5) Zhu et al. (2006) Crop Sci. 46:1094-1099. 6) Sutka (2001) Euphytica 119, 169-177. 7) Lee et al. (2004) Theor. Appl. Genet. 109, 1610-1619. 8) Magalhaes et al. (2004) Genetics 167, 1905-1914. 9) Yan et al. (2003) PNAS 100, 6263-6268. 10) Mohler et al. (2004) Euphytica 138, 33-40. 11) Salvi et al. (2002) Plant Mol. Biol. 48, 601-613. 12) Ellis et al. (2002) Theor. Appl. Genet. 105, 1038-1042. 13) Ahmad (2000) Theor. Appl. Genet. 101, 892-896. 14) Distelfeld et al. (2006) New Phytologist 169, 753-763. 15) Lillemo & Ringlund (2002) Plant Breed. 121, 210-217. 16) Kim et al. (2006) Euphytica 152, 361-366. 17) Bilyeu et al. (2006) Crop Sci. 46, 1913-1918. 18) Gunnar et al. (2006) Mol. Breed. 17, 241-256. 19) Sala et al. (2008). Crop Sci. (en prensa). 20) Yang et al. (2007) J. Agric. Food Chem. 55, 14-24. 21) Terry & Harris (2001) Eur. Food Res. Technol. 213, 425-431.

Tipo de Rasgo	Cultivo	Ejemplos	Marcador	Ref
Resistencias a enfermedades y plagas	Soja	Resistencia a Nematodo del Quiste	SSR	1
	Trigo	Resistencia a Roya de la hoja	SCAR	2
	Maíz	Resistencia a Mal de Rio IV	SSR	3
	Girasol	Resistencia a <i>Plasmopara</i>	CAPS	4
	Soja	Resistencia a insectos	SSR	5
Resistencias a estrés abiótico	Trigo	Tolerancia a heladas	RFLP-AFLP	6
	Soja	Tolerancia a salinidad	SSR	7
	Sorgo	Tolerancia a aluminio	RFLP	8
	Trigo	Requerimiento de frío para florecer	RFLP	9
Adaptación	Trigo	Requerimiento fotoperiódico para florecer	AFLP-SCAR	10
	Maíz	Días a floración	AFLP	11
	Trigo	Enanismo	SCAR	12
Calidad del producto	Trigo	Calidad panadera	SCAR	13
	Trigo	Porcentaje de proteína en el grano	SCAR	14
	Trigo	Dureza del grano	CAPS	15
	Soja	Inhibidor de tripsina (Kunitz)	SSR	16
	Soja	Bajo contenido de ácido linolénico	SNP	17
	Girasol	Alto contenido de ácido oleico	SCAR	18
Resistencia a herbicidas	Girasol	Resistencia a imidazolinonas	INDEL	19
	Maíz	Resistencia a glifosato	SCAR	20
	Soja	Resistencia a glifosato	SCAR	21

Conversiones

Se denomina *retrocruza asistida por marcadores moleculares* o *conversión* al proceso de introducir un carácter controlado por uno o pocos genes desde un genotipo dador o donante a un genotipo recurrente, de modo tal de obtener el trasfondo genético del recurrente con el carácter deseado.

Los marcadores se utilizan para realizar la selección por el carácter de interés y, aún más importante, para seleccionar las plantas de modo tal de recuperar más rápidamente el trasfondo genético del padre recurrente. Para entender mejor la importancia de este método como así también su implementación, lo mejor es comenzar por analizar el método convencional o tradicional de retrocruzas.

El método de mejoramiento por retrocruzas

El método de retrocruzas es un método muy antiguo de mejoramiento y consiste en el cruzamiento repetido de la progenie híbrida derivada de una cruce con uno de sus parentales. El objetivo principal es mejorar a una línea, cultivar o variedad ya existente por una o más características para la cual es deficiente. Por ejemplo, una variedad de soja tiene buen rendimiento y estabilidad del rendimiento, pero es susceptible a una enfermedad importante de herencia simple, mientras que otra variedad es resistente a tal enfermedad pero es deficiente en muchos otros aspectos. Un objetivo del mejoramiento podría ser obtener una nueva variedad con las características deseables de rendimiento y estabilidad de la primera y con el/los gen/es de resistencia de la segunda.

El esquema general de implementación del método de retrocruzas es el siguiente (figura 2.A). Una

línea pura (el padre *recurrente*, R) de muy buenas características agronómicas, pero deficiente para un carácter, se cruza con un individuo que exhibe el carácter en cuestión (individuo *dador*, D), y se obtienen descendientes F1. Estas plantas F1 se retrocruzan con el progenitor R. La progenie obtenida se denomina “retrocruza 1” (BC1). En esta generación BC1 se seleccionan las plantas que muestran el carácter de interés y se retrocruzan con “R”, obteniéndose la “retrocruza 2” (BC2). Se repite de nuevo este proceso de selección por el carácter y retrocruzamiento con el progenitor “R” hasta llegar a una generación (usualmente la retrocruza 6, BC6) en la cual se han recuperado todas las características del progenitor R, se seleccionan los individuos que presenten el carácter de interés y se autofecundan. En la próxima generación (BC6F2) se seleccionan aquellas plantas homocigóticas para los genes que gobiernan el carácter en cuestión y se autofecundan de nuevo. De este modo, se ha obtenido la línea R original con el carácter del dador incorporado. La figura 2.B es un esquema en el que se puede apreciar lo descrito en forma gráfica. Se simboliza con una ba-

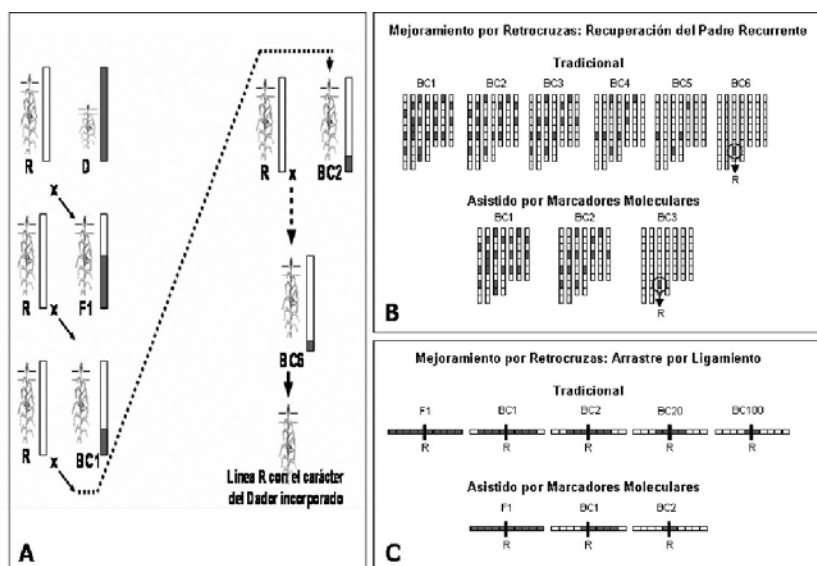


Figura 2. Método de retrocruzas. (A) Esquema del método tradicional de retrocruzas. (B) Comparación de los niveles de recuperación del trasfondo genético del padre recurrente utilizando el método tradicional de retrocruzas y el asistido por marcadores. (C) Comparación de los niveles de eliminación del arrastre por ligamiento utilizando retrocruzas convencionales y asistidas por marcadores. D progenitor donante del carácter a incorporar, R progenitor recurrente. BC1, BC2, BC6, generaciones sucesivas de retrocruzas hacia el progenitor recurrente.

rra vertical el genotipo de cada individuo, negro para el dador y blanco para el recurrente. Como puede observarse, la F1 tiene una contribución de 50% de cada progenitor. En la BC1, la contribución del dador ha disminuido a un 25%. O sea, en promedio, la generación BC1 presenta el 75% de contribución genética del recurrente (la ecuación que permite calcular la proporción del genotipo del padre recurrente recuperado –RPR– luego de un número determinado de n generaciones de retrocruzas es, en ausencia de selección y ligamiento: $RPR = (1 - 0.5^{(n+1)}) * 100$). La generación BC2 a su vez presentará, en promedio, un 87,5% de contribución del recurrente. De esta forma, en cada generación de retrocruzas la contribución genética del dador va decreciendo a la mitad de la generación previa. De esta forma, al llegar a BC6 la población de plantas tendrá, en promedio, el 99,2% de los genes del progenitor recurrente y, en la práctica, se considera que cada individuo es igual al recurrente salvo por el carácter incorporado. Este método de mejora fue originalmente propuesto por Harlan y Pope en 1922, pero hasta hace pocos años no fue extensivamente utilizado en los programas de fitomejoramiento. La razón de esta baja adopción es bastante simple: la incorporación del carácter (o sea, la recuperación del trasfondo genético del progenitor elite R con el carácter en cuestión suministrado por D) tarda más o menos 7 generaciones, lo que para cultivos anuales implica 7 años si no se pueden cultivar generaciones de contra-estación. Por lo tanto, al cabo de 7 años se obtendrá el mismo material genético, pero que expresa un carácter adicional. Como resulta lógico, durante este período el trabajo de mejoramiento en el mismo programa en el que se obtuvo a “R” habrá producido nuevos materiales que superen ampliamente a ese genotipo. Más aún, se pueden haber obtenido genotipos nuevos que expresen el carácter que se deseaba incorporar mediante cruzas simples y posterior selección. En resumidas cuentas: la aplicación del método convencional de retrocruzas habrá obtenido un genotipo “viejo” con un carácter nuevo o, en palabras de muchos mejoradores, se habrá detenido el progreso genético por 7 generaciones. Los marcadores moleculares permiten acelerar este proceso, como se explica a continuación.

Retrocruzas asistidas por marcadores

Para realizar una retrocruza asistida por marcadores se sigue un esquema de trabajo similar al presentado en la figura 3, en la cual se describen los pasos utilizados para implementar dicha conversión. Luego de obtener la BC1 entre una línea recurrente y una línea dadora del gen de interés, se extrae el ADN de cada segregante. En primer lugar, se selecciona por el carácter de interés. Esta selección puede ser fenotípica o, más comúnmente, mediante marcadores ligados al gen/es de interés (selección asistida por marcadores). Se descartan todos los individuos que no presentan el/los alelos de interés y, a partir del ADN de los restantes individuos, se procede a amplificar los marcadores para todas las regiones del genoma para las cuales difieren los parentales D y R (o sea, para todos los marcadores polimórficos entre las líneas D y R). Luego de leer los geles, se calculan las similitudes genéticas de cada individuo segregante con respecto al padre recurrente y se seleccionan aquel/aquellos individuos con los mayores porcentajes de similitud. Esos individuos son los que se retrocruzan con el padre recurrente para obtener la generación BC2.

Como se describió previamente, los porcentajes de recuperación del genotipo recurrente en cada generación de retrocruzas son valores promedio de toda la población. De hecho, existe una gran variabilidad entre individuos respecto de este porcentaje. Así, en la figura 3 se muestra, para el caso del maíz, el porcentaje de similitud de los segregantes en BC1 con respecto al padre recurrente, evaluados por medio de un gran número de marcadores moleculares dispersos a través de todo el genoma. Se puede observar, como ejemplo, que en la BC1F1 hay individuos que sólo presentan un 40% de similitud con el recurrente, mientras que hay otros que muestran más del 80%. Individualizando y cruzando sólo los individuos que presentan los mayores niveles de similitud para obtener la siguiente generación de retrocruzas, se logra disminuir el número de generaciones necesarias para recuperar el trasfondo genético del padre recurrente.

Obsérvese que si se elige el individuo con 84,3% de similitud para retrocruzar, el mínimo

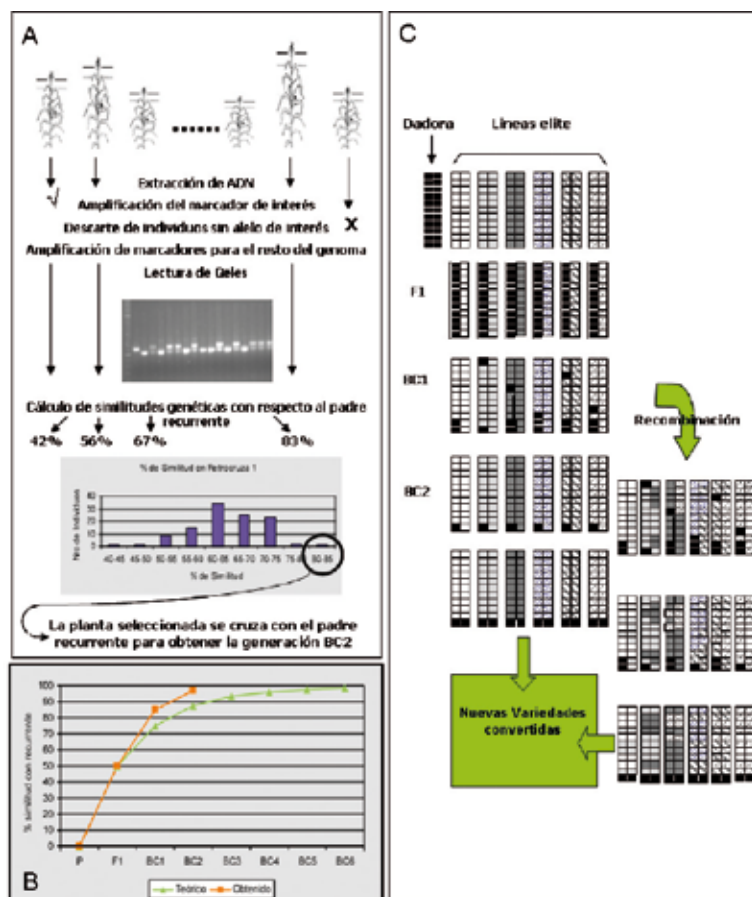


Figura 3. Conversiones asistidas por marcadores moleculares. (A) Etapas del proceso de análisis de la generación BC1 durante una conversión asistida por marcadores. (B) Porcentaje de recuperación del trasfondo genético del progenitor recurrente a través de las generaciones para el método convencional de retrocruzas (teórico) y el método asistido por marcadores (obtenido). (C) Las conversiones dentro de un programa de mejora. Se inician múltiples conversiones para un mismo carácter sobre distintos trasfondos genéticos, con el objetivo de obtener los mismos genotipos con el carácter incorporado. Como estrategia para obtener genotipos nóveles con el carácter incorporado, es posible iniciar la recombinación en etapas intermedias del proceso de conversión.

porcentaje de similitud que, en promedio, tendrán los individuos en la BC2 será del 92% (según el número de plantas que se obtengan se pueden lograr individuos con el 98-99% de similitud). Repitiendo el mismo procedimiento en la BC2, se autofecundan los individuos con los mayores porcentajes de similitud para obtener la BC2F2. En esta generación se terminan de seleccionar los segregantes que presentan el gen de interés en estado homocigótico e identidad genética con el padre recurrente para el

resto del genoma. De esta forma, se habrá obtenido la línea recurrente convertida por el carácter de interés en sólo dos generaciones de retrocruzas. La figura 3.C muestra los resultados obtenidos en el laboratorio de los autores para el caso del cultivo de maíz, luego de convertir decenas de líneas endocriadas por mutantes (por ejemplo, resistencia a herbicidas), transgenes (resistencia a insectos) o QTLs (*Quantitative Trait Locus*) para resistencia a enfermedades. Como norma, la recuperación del trasfondo genético del padre recurrente se logra en BC2, 4 generaciones antes de lo que requerido por el método tradicional. De hecho, los porcentajes de similitud promedio de las mejores plantas seleccionadas de la BC1 fueron del 89,3% y de la BC2, del 98,5%.

La descripción anterior del método de retrocruzas se ha realizado considerando que el carácter en cuestión es de herencia monogénica, que el estado favorable del carácter está controlado por el alelo dominante, y que la selección puede realizarse antes de que florezcan las plantas. En este caso, la implementación del método de retrocruzas (supongamos que se desea incorporar la re-

sistencia a una enfermedad a una variedad de trigo) es relativamente simple. En la práctica real del mejoramiento, los casos son en general un poco más complicados. Así, por ejemplo, si se desea incorporar un carácter controlado por un alelo dominante que se expresa en la semilla (ejemplo: alto contenido de ácido oleico en la semilla de girasol), no se pueden seleccionar las plantas en cada generación de retrocruzas antes de que éstas florezcan. En este caso, se deben hacer todos los cruzamientos posibles

con el padre recurrente y evaluarlos cuando se obtengan las semillas de cada planta. Recién en ese momento se podrán descartar aquellas cruza con las plantas que no presentaban el carácter de interés. La mayor dificultad en este ejemplo radica en la cantidad de cruzamientos que se deben realizar para asegurar que al menos una de las plantas que se retrocruzan lleve el carácter en cuestión. Ahora bien, si el carácter que se desea incorporar está controlado por un alelo recesivo (por ejemplo, la dureza del grano en trigo), no sólo se debe retrocruzar cada planta con el padre recurrente, sino también autofecundarla (o hacerle un cruzamiento de prueba o “*testcross*”) para determinar cuál de las plantas de cada generación de retrocruzas lleva el carácter en cuestión. En este caso, no sólo se deben hacer gran cantidad de cruza sino también perder una generación adicional entre cada generación de retrocruzas para evaluar el carácter de interés. Existe, finalmente, otro tipo de complicaciones. Todos los casos anteriores se refieren a ejemplos en los que el fenotipo de cada planta se puede analizar en forma individual. Existen muchos ejemplos (uno de ellos es la calidad panadera en trigo) donde se necesitan cientos de semillas para evaluar el fenotipo. En estos casos, para evaluar cada individuo en las generaciones de retrocruzas, se deberían obtener dos generaciones de autofecundaciones antes de decidir cuáles son los individuos con los determinantes genéticos correctos para continuar retrocruzando.

El empleo de marcadores moleculares reduce notablemente las complejidades descriptas ya que todos los ejemplos mencionados (seleccionar individuos después de la floración, hacer cruzamientos de prueba, o multiplicar la semilla para poder evaluar) se reducen al caso más simple de seleccionar el carácter de interés por marcadores antes de la floración.

El arrastre por ligamiento y su eliminación

Cuando se incorpora un carácter desde un genotipo dador a una línea recurrente, todos los genes ligados al gen incorporado pasan con éste de generación en generación. Ese *arrastre por ligamiento* puede que no tenga consecuencias fenotípicas o bien, como ocurre

generalmente, puede deprimir el rendimiento potencial o la calidad del producto, dependiendo de las características del genotipo dador (si es una especie silvestre se esperan mayores consecuencias fenotípicas que si el dador es una línea elite). Así, por ejemplo, cuando se transfirió al trigo el gen *Lr19* que confiere resistencia a roya de la hoja desde *Thinopyrum ponticum*, también se incorporó un gen ligado (Y) que determina el amarillamiento de la harina, un carácter indeseable para la industria alimenticia. Otro ejemplo es el de la transferencia a trigo de la resistencia a varias enfermedades conferidas por distintos genes en el cromosoma 1R de centeno (*Secale cereale* L.), el cual también presenta genes que disminuyen diversos parámetros de la calidad panadera.

En el método convencional de retrocruzas la eliminación del arrastre por ligamiento se va logrando por la “erosión” del segmento incorporado a través de recombinación por entrecruzamiento. Se ha estimado a través de experimentos de simulación que este proceso puede tardar hasta 100 generaciones (figura 2.C). El uso de marcadores, en cambio, permite eliminar el arrastre por ligamiento en sólo dos generaciones de retrocruzas siempre que se disponga de un mapa saturado de esa región genómica y del suficiente número de plantas en cada generación de retrocruzas. En una primera generación de retrocruzas, por ejemplo, se pueden eliminar todos los individuos que presenten alelos del genotipo dador para los marcadores situados a más de 1 cM río arriba del gen. En la segunda generación de retrocruzas se hace lo mismo pero río abajo del gen deseado. De esta manera el arrastre por ligamiento disminuye drásticamente hasta niveles aceptables en tan solo dos generaciones de retrocruzas, tal como se muestra en la figura 2.C. Una vez incorporado el gen con esta metodología, la línea obtenida se utiliza como fuente para los sucesivos proyectos de conversión, de modo tal que el arrastre por ligamiento alrededor de ese gen en particular no constituye un problema adicional en los proyectos posteriores.

Estimaciones de diversidad genética

Las estimaciones de diversidad genética de un programa de mejoramiento son fundamen-

tales para planificar los cruzamientos entre parentales. Así, la diversidad dentro del programa puede incrementarse si se planifican cruza entre individuos que exhiban escaso parecido genético. La genealogía de los individuos o su parecido fenotípico son de escaso valor para determinar si dos individuos están o no estrechamente relacionados genéticamente. Las estimas de similitudes genéticas basadas en marcadores, en cambio, proveen un indicador bastante ajustado de las similitudes o distancias genéticas reales. Se puede cuantificar la diversidad global que presentan los genotipos en estudio a partir de las huellas dactilares ("fingerprinting") de ADN de los individuos a analizar, las cuales incluyen un gran número de marcadores. Mediante los algoritmos de Índice de Contenido de Polimorfismo (PIC) ($PIC = 1 - \sum p_i^2$) se puede determinar cuáles son los marcadores más discriminantes de los individuos en estudio. Así, un PIC igual a 0 indica que el marcador en cuestión es monomórfico y un PIC alto (por ejemplo, mayor a 0,7) indica que el marcador en cuestión es altamente polimórfico y que tal polimorfismo esta distribuido uniformemente entre los individuos estudiados. El valor promedio de PIC para todos los marcadores analizados permite realizar estimaciones de Diversidad Genética (D) ($D = 1 - \sum \sum p_i^2$). Mediante la comparación de sucesivos valores de D, es posible determinar si la diversidad ha cambiado a través del tiempo, o si se ha modificado por la introducción al cultivo de nuevo germoplasma. La utilización de un gran número de marcadores adecuadamente dispersos en el genoma permite construir Matrices Básicas de Datos (MBD). Mediante programas estadísticos apropiados se calculan a partir de ellas relaciones tales como la de similitud genética entre genotipos. Esta relación puede obtenerse usando el "Simple Matching Coefficient" (SMC) ($SMC = m/(m+n)$), el cual se define como el número de alelos de marcadores que dos genotipos tienen en común (m) sobre el número total de alelos analizados (m+n). De este modo, se pueden generar matrices de similitud genética entre genotipos sobre las que, mediante programas de análisis multivariado, se construyen dendrogramas que comparan gráficamente las relaciones genéticas entre los

individuos. Ello permite agrupar a aquellos que exhiben mayor similitud genética en conjuntos coherentes.

En la figura 4.A se comparan las estimaciones de similitud genética entre individuos basadas en el uso marcadores moleculares con aquellas derivadas de información fenotípica. La gráfica muestra la relación entre la distancia morfológica (abscisas) y la distancia molecular (ordenadas) para 50 líneas de sorgo granífero (*Sorghum bicolor*). Puede apreciarse que se obtiene un diagrama típico de dispersión triangular: si dos individuos están muy relacionados a nivel de marcadores es muy probable que también lo estén a nivel morfológico. Por el contrario, una gran distancia molecular entre dos individuos no permite realizar ninguna inferencia acerca de su parecido morfológico

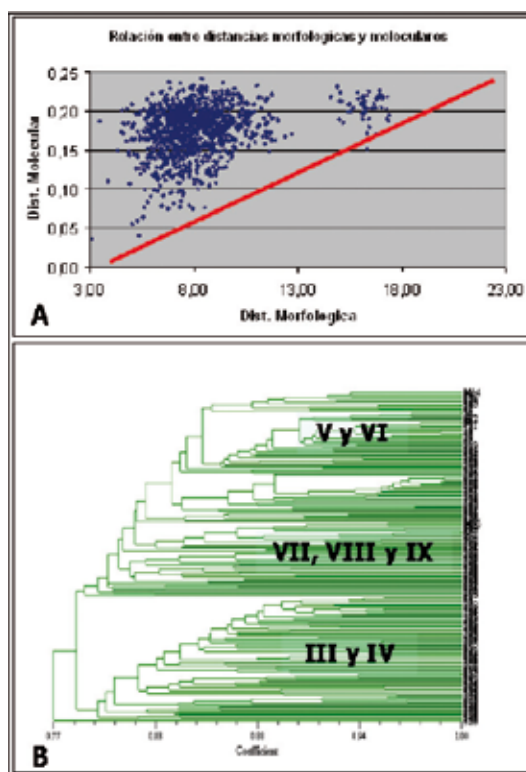


Figura 4. Estimaciones de diversidad genética mediante el uso de marcadores moleculares. (A) Relación entre las distancias evaluadas sobre la base de información morfológica y molecular para 50 líneas de sorgo granífero. (B) Análisis de agrupamiento para 214 variedades argentinas de soja utilizando marcadores microsatélites.

(éste puede ser muy alto o muy bajo). Esta relación puede explicarse por el determinismo generalmente poligénico de los caracteres que se utilizan en la estimación de las distancias morfológicas, que puede conducir a fenómenos de convergencia. Por ejemplo, si se considera que un carácter está controlado por 4 *loci* bialélicos con efectos iguales y se denotan respectivamente + y - los alelos favorables y los desfavorables, las líneas portadoras de las combinaciones de alelos ++-- y --++ presentarán el mismo fenotipo pero diferirán para los 4 *loci* considerados. En síntesis, lo anterior indica que el parecido morfológico entre materiales genéticos tiene escaso valor para realizar un manejo eficiente de la diversidad genética de un cultivo.

El análisis de agrupamiento que se muestra en la figura 4.B se realizó evaluando 214 genotipos de soja representativos del germoplasma disponible en Argentina analizados a través de 30 *loci* de microsatélites seleccionados por su capacidad discriminante. Luego de calcularse la similitud entre los genotipos, se realizó el análisis de agrupamiento cuyo dendrograma se muestra en la figura. Pueden definirse tres grandes grupos, los cuales están asociados a los grupos de madurez al que pertenecen los cultivares. De esta forma, los cultivares de los grupos de madurez V y VI están más asociadas entre sí que con los individuos de los grupos de madurez III y IV. Esto indica que los diferentes grupos de madurez tienen ancestros diferentes y refleja una práctica común en el mejoramiento de la soja consistente en cruzar cultivares del mismo grupo de madurez al desarrollar nuevas variedades. La conclusión de este tipo de análisis es que para incrementar la diversidad genética y, por ende, el progreso genético en soja, se deberían realizar cruces entre genotipos pertenecientes a distintos grupos de madurez.

Estos son sólo algunos ejemplos de los estudios de variabilidad que se pueden realizar para monitorear la diversidad genética de un cultivo y el impacto que, sobre la misma, pueden tener diferentes estrategias de mejoramiento.

Diseño de genotipos y de germoplasma

Se denomina “diseño de genotipos o de

germoplasma” a la utilización de todas las herramientas previamente descritas para la obtención de cultivares o germoplasma de alto potencial de rendimiento (creados por selección convencional en ambientes agronómicos de alta oferta potencial con respecto a agua, nutrientes, fungicidas e insecticidas) a los que se le introducen caracteres por selección asistida y conversiones que incrementan su estabilidad (resistencia a enfermedades o a estrés ambiental), calidad del producto final y/o rango de adaptación (como por ejemplo, obtención de cultivares de ciclo más corto o más largo dependiendo de la estación de crecimiento).

El diseño de germoplasma comprende el uso de genotipos dadores que presentan caracteres de interés (resistencias o mejor calidad) pero que, en general, son agronómicamente muy deficientes (representada en color negro en la figura 3.C). Estos dadores se utilizan para introgresar tales caracteres en líneas elite de alto potencial de rendimiento que no los poseen (representadas con diferentes tonos de grises en la gráfica para señalar sus diferencias genéticas). Por otra parte, las líneas elite, se eligen de modo tal que exhiban entre ellas escaso parecido genético. A medida que el proceso de conversión de cada línea avanza (o sea, se minimiza la contribución genética del dador como se aprecia en la gráfica desde F1 hacia BC2), se comienzan a cruzar entre sí a las líneas elite en proceso de conversión de modo de obtener recombinantes entre los materiales elite y que lleven el gen de interés (representadas en la gráfica como individuos que presentan combinaciones de colores de diferentes líneas y la región del genoma que lleva el gen de interés de la línea dadora). De esta forma, si bien las conversiones continúan de modo tal de obtener cultivares aptos para el mercado, se genera al mismo tiempo germoplasma de alto rendimiento con los genes aportados por la línea dadora. Ese germoplasma ingresa al programa de mejora convencional para continuar el proceso de mejoramiento del rendimiento por selección.

Por todo lo expuesto anteriormente, el mejoramiento genético en la actualidad debe ser el resultado de la estrecha colaboración y del sinergismo entre los programas de mejora

convencional y molecular. Como se ha mostrado previamente, los ciclos de evaluación, selección y recombinación del mejoramiento convencional continúan siendo el corazón del proceso, pero ahora cuentan con el aporte de la tecnología de marcadores moleculares a través de la selección asistida y del análisis de la diversidad del germoplasma (figura 5). Tales aportes contribuyen a una mejora significativa del progreso genético por selección a través del mantenimiento e incremento de la diversidad y de la reducción de la interacción genotipo x ambiente. Por otro lado, la base genética puede actualmente enriquecerse en forma continua con nuevos genotipos y con nuevos caracteres por medio de las conversiones asistidas por marcadores.

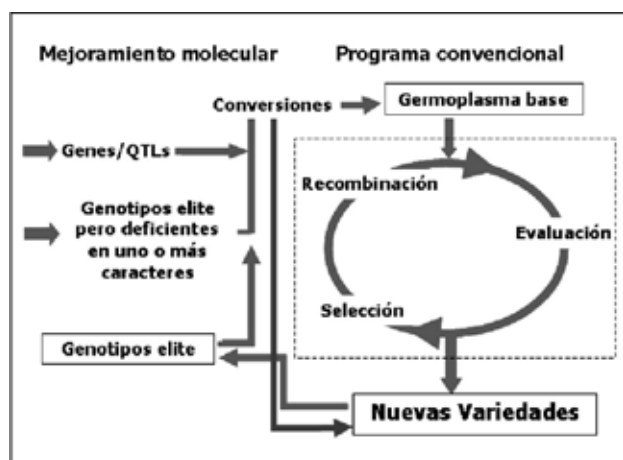


Figura 5. Interacción entre el mejoramiento convencional y el mejoramiento molecular. En el recuadro se esquematiza la naturaleza cíclica del mejoramiento convencional y, por fuera del mismo, los aportes proporcionados por el mejoramiento molecular.

Lecturas recomendadas

- Awise JC. 2004. Molecular markers, natural history, and evolution. 2nd ed. Sinauer Associates, Inc., Sunderland, MA.
- Beckmann J.S. and Soller M. 1986. Restriction fragment length polymorphisms in plant genetic improvement. *Oxford Surv. Plant Mol. Cell Biol.*, 3, 196-250.
- Bernardo R., Moreau L. and Charcosset A. 2006. Number and fitness of selected individuals in marker-assisted and phenotypic recurrent selection. *Crop Sci.*, 46, 1972-1980.
- Charcosset A. and Gallais A. 1998. Intérêt des marqueurs en sélection. In: *Les marqueurs moléculaires en génétique et biotechnologies végétales*. de Vienne D. (ed.) INRA.
- Dubcovsky J. 2004. Marker-assisted selection in public breeding programs: The wheat experience. *Crop Sci.*, 44, 1895-1898.
- Echarte M., Bulos M., Rossi R., Ferrari B., Sala G. and Sala C. 2004. Pattern of molecular genetic diversity in Argentine soybean germplasm. VII World Soybean Res. Conf., Foz do Iguassu, Brasil, pp 126.
- Fehr, W. 1987. *Principles of Cultivar Development. Theory and Technique*. McGraw-Hill.
- Frisch M. and Melchinger A.E. 2001. Marker-assisted backcrossing for simultaneous introgression of two genes. *Crop Sci.*, 41, 1716-1725.
- Frisch M. and Melchinger A.E. 2005. Selection theory for marker-assisted backcrossing. *Genetics*, 170, 909-917.
- Gimelfarb A. and Lande R. 1994. Simulation of marker-assisted selection for non-additive traits. *Genet. Res.*, 64, 127-136.
- Gimelfarb A. and Lande R. 1994. Simulation of marker-assisted selection in hybrid populations. *Genet. Res.*, 63, 39-47.
- Gimelfarb A. and Lande R. 1995. Marker-assisted selection and marker-QTL associations in hybrid populations. *Theor. Appl. Genet.*, 91, 522-528.
- Guimarães E.P., Ruane J., Scherf B.D., Sonnino A. and Dargie J.D. 2007. Marker-assisted selection, current status, and future perspectives in crops, livestock, forestry, and fish. *FAO*, Rome.
- Harlan H.V. and Pope M.N. 1922. The use and value of backcrosses in small grain breeding. *J. Hered.*, 13, 319-322.
- Hospital F. 2002. Marker-assisted backcross breeding: A case study in genotype building theory. pp 135-141. In: M.S. Kang (ed.) *Quantitative gene-*

- tics, genomics, and plant breeding. CABI Publishing.
- Hospital F. and Charcosset A. 1997. Marker-assisted introgression of quantitative trait loci. *Genetics*, 147, 1469-1485.
- Hospital F., Goldringer I. and Openshaw S. 2000. Efficient marker-based recurrent selection for multiple quantitative trait loci. *Genet. Res.*, 75, 1181-1189.
- Koebner R.M. 2004. Marker assisted selection in the cereals: The dream and the reality. pp 317-329. In: P.K. Gupta and R.K. Varshney (ed.) *Cereal genomics*. Kluwer Academic, Dordrecht, The Netherlands.
- Koorneef M. and Stam P. 2001. Changing paradigms in plant breeding. *Plant Physiol.* 125:156-159.
- Kumlay A.M., Baenziger P.S., Gill K.S., Shelton D.R., Graybosch R.A., Lukaszewski A.J. and Wesenberg D.M. 2003. Understanding the Effect of Rye Chromatin in Bread Wheat. *Crop Sci.* 43: 1643-1651.
- Lande R. and Thompson R. 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics*, 124, 743-756.
- Paterson A.H., Tanksley S. and Sorrells M. 1991. DNA markers in plant improvement. *Advances in Agronomy*, 44, 19-89.
- Prins R., Marais G.F., Pretorius Z.A., Janse B.J.H., Marais A.S. 1997. A study of modified forms of the *Lr19* translocation of common wheat. *Theor. Appl. Genet.*, 95: 424-430.
- Ribaut J.M. and Hoisington D. 1998. Marker-assisted selection: New tools and strategies. *Trends Plant Sci.*, 3, 236-239.
- Sala C., Bulos M. and Echarte M. 2005. "Agrobiotecnología. Curso de grado para estudiantes de biología y agronomía". Mentaberry A. (ed) Universidad de Naciones Unidas, Programa Biolac.
- Servin B., Martin O.C., Mézard M. and Hospital F. 2004. Toward a theory of marker-assisted gene pyramiding. *Genetics*, 168, 513-523.
- Simmonds N.W. *Principles of Crop Improvement*. 1979. Longman, UK.
- Tanksley S.D. 1983. Molecular markers in plant breeding. *Plant Mol. Biol. Rep.*, 1, 3-8.
- Tanksley, S.D. and Rick, C.M. 1980. Isozyme gene linkage map of tomato: Applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.*, 57, 161-170.
- Whittaker J.C., Halley C.S. and Thompson R. 1997. Optimal weighting of information in marker-assisted selection. *Genet. Res.*, 69, 137-144.
- Xu Y. 2002. Global view of QTL: Rice as a model. pp 109-134. In: M.S. Kang (ed.) *Quantitative genetics, genomics, and plant breeding*. CABI Publishing.
- Xu Y. 2003. Developing marker-assisted selection strategies for breeding hybrid rice. *Plant Breed. Rev.*, 23, 73-174.
- Xu Y., McCouch S.R. and Zhang Q. 2005. How can we use genomics to improve cereals with rice as a reference genome? *Plant Mol. Biol.*, 59, 7-26.
- Yazdi M.H., Sonesson A.K., Woolliams J.A. and Meuwissen T.H. 2008 Combined detection and introgression of quantitative trait loci underlying desirable traits. *J. Anim. Sci.*, 86, 1089-1095.
- Young N.D. and Tanksley S.D. 1989. Restriction fragment length polymorphism maps and the concept of graphical genotypes. *Theor. Appl. Genet.*, 77, 95-101.
- Zhang W. and Smith C. 1992. Computer simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium. *Theor. Appl. Genet.*, 83, 813-820.
- Zhang W. and Smith C. 1993. Simulation of marker-assisted selection utilizing linkage disequilibrium: The effects of several additional factors. *Theor. Appl. Genet.*, 86, 492-496.

III. CAPÍTULO 4

Identificación y registro de variedades

Ana Laura Vicario, Marcelo Labarta y
María Alicia Loray

El registro de variedades en la República Argentina

Introducción

En la República Argentina, la legislación en materia de semillas y creaciones fitogenéticas es la establecida por la Ley N° 20.247 (1973), su Decreto Reglamentario N° 2183 (1991) y la Ley N° 24376, de aprobación del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (1994). El organismo encargado de aplicar esta legislación es el Instituto Nacional de Semillas (INASE).

En lo referido a variedades vegetales, esta legislación, las define como *“el conjunto de plantas de un solo taxón botánico del rango más bajo conocido que pueda definirse por la expresión de los caracteres resultantes de un cierto genotipo o de una cierta combinación de genotipos y pueda distinguirse de cualquier otro conjunto de plantas por la expresión de uno de esos caracteres por lo menos”*. Asimismo, se define el término obtentor, como *“la persona que crea o descubre y desarrolla una variedad”*. Por otra parte, se define el término creación fitogenética como *“toda variedad o cultivar, cualquiera sea su naturaleza genética, obtenido por aplicación de conocimientos científicos al mejoramiento heredable de las plantas”* (Decreto N° 2183/1991 – Reglamentario de la Ley N° 20.247, de semillas y creaciones fitogenéticas).

Estos términos y definiciones, nos permiten reconocer claramente a dos partes integrantes de un sistema de propiedad intelectual que se conoce internacionalmente como Derecho de obtentor, siendo la variedad vegetal el objeto de ese derecho y el obtentor el sujeto del mismo. Se trata de un sistema de propiedad intelectual independiente, conocido como *“sistema sui-generis”*, ya que ha sido específicamente

diseñado para el objeto de protección al que se aplica: las variedades vegetales.

Es sabido que al tratarse de sistemas biológicos, las variedades vegetales presentan características particulares (ya sea en cuanto a fisiología, propagación, etc.) que no podrían ser equiparadas a las que presentan otros objetos de derecho. De allí la necesidad de contar con un sistema de propiedad específico y acorde a las necesidades de los obtentores y usuarios.

Este sistema no es nuevo. Deriva de la Convención de París en materia de propiedad intelectual y su Acta específica es la de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) que data del año 1961/72. La UPOV es la organización internacional intergubernamental, de donde emanan las directrices tanto técnicas como jurídicas en materia de derecho de obtentor. Los miembros de esta Unión, son los Estados y/u organizaciones intergubernamentales (como por ejemplo la Unión Europea) y cuenta con una organización específica que es la Oficina de la UPOV con sede en Ginebra, Suiza, integrada por un Secretario General, un Vice-Secretario General, su cuerpo técnico y su personal administrativo.

La República Argentina actualizó en el año 1991 su legislación en materia de derecho de obtentor mediante el Decreto Reglamentario N° 2183 (se la conoce como Acta de 1978 de la UPOV). De esta forma pudo acceder a ser miembro de la UPOV en el año 1994. Vale hacer esta aclaración ya que luego, fue adoptada y puesta en vigencia una tercera versión del Acta de UPOV que es la que se conoce como Acta de 1991, a la que Argentina aún no adhirió.

Independientemente de esto, de los 64 miembros parte de UPOV a diciembre de 2007, 24 son parte del Acta 1978 -incluido Argentina-; 1 es parte del Acta de 1961/72 y 39 miembros son parte del Acta de 1991. Todas estas Actas cuentan con principios básicos que son comunes y nuevas regulaciones que se han incorporado como consecuencia de los avances técnicos y tecnológicos en la obtención de variedades vegetales (Miembros de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales – Status al 18 de junio de 2007 – UPOV).

Desde su adhesión al Convenio de UPOV – Acta de 1978, la República Argentina participa

activamente en los diferentes órganos de decisión de la UPOV: Consejo; Comité Consultivo; Comité Administrativo y Jurídico y Comité Técnico, como así también en los diferentes cuerpos técnicos específicos y grupos de trabajo.

Registro de variedades

La Ley N° 20.247, creó dos Registros Nacionales referidos a variedades vegetales, el primero es el Registro Nacional de Cultivares (RNC) y el segundo es el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares (RNPC).

El RNC es de carácter obligatorio para todo cultivar que se identifica por vez primera y se va a exponer al público o entregar a usuarios a cualquier título con un rótulo identificatorio. Este Registro Nacional no da ningún derecho de propiedad sobre el cultivar en cuestión, pero habilita a la comercialización del mismo.

El RNPC es optativo. Es el Registro Nacional por el que se inscribe una variedad concediéndole un Título de Propiedad a su obtentor. Por si sólo no habilita a que una variedad pueda comercializarse, pero reconoce el derecho que su obtentor posee sobre la misma.

Consecuentemente, si una persona desea poder comercializar su variedad y, a la vez, tenerla protegida mediante el sistema de derecho de obtentor, en ese caso deberá realizar el trámite de inscripción en ambos Registros Nacionales. Esto no significa un trámite por duplicado, sino que la misma solicitud de inscripción, prevé la opción de inscripción en ambos Registros.

Examen técnico

Todo cultivar que se registra, es objeto de un examen, tanto de los aspectos formales (examen de forma) como de los técnicos específicamente (examen técnico o DHE).

La solicitud de inscripción de una variedad vegetal, cuenta con diferentes Anexos, entre los que podemos destacar el de la Descripción (aspectos morfológicos, fisiológicos, fenológicos, de comportamiento sanitario y de características industriales) que va a permitir, mediante la combinación de la expresión de los diferentes caracteres que la integran, la identificación de esa variedad. Otros Anexos técnicos de importancia son el del origen genético y

la historia del mejoramiento de la variedad; el del procedimiento para el mantenimiento de la pureza varietal y el que solicita la información correspondiente a la expresión OGM (organismo genéticamente modificado) de la variedad y su evento incorporado, en el caso en que corresponda (INASE – Formularios generales para inscripción de cultivares – 2006).

Vamos a referirnos específicamente al examen técnico de la solicitud, ya que tanto para la inscripción en el RNC como para RNPC, es condición que todo cultivar sea sometido a este examen.

El examen técnico es conocido internacionalmente como examen DHE (o DUS por sus siglas en inglés) y se refiere a determinar las condiciones de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad del cultivar cuya protección se pretende.

Estas condiciones provienen de los requisitos internacionales para conceder un derecho de obtentor, que exigen que la variedad cumpla con los siguientes:

Novedad: en sentido comercial.

Distinción: que permita distinguirla claramente por medio de una o más características de otra variedad cuya existencia sea materia de conocimiento general al momento de completar la solicitud.

Homogeneidad: que sujete a las variaciones previsibles originadas en los mecanismos particulares de su propagación, mantenga sus características hereditarias más relevantes en forma suficientemente uniforme.

Estabilidad: que sus características hereditarias más relevantes permanezcan conforme a su definición luego de propagaciones sucesivas o, en el caso de un ciclo particular de propagación, al final de cada uno de dichos ciclos.

Además, la variedad debe contar con una denominación genérica que permita su identificación sin inducir a error o confusión respecto de la identidad de otras variedades u obtentores, ni sobre las características que esta posee, entre otras condiciones (Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales UPOV – Actas de 1978 y 1991).

En concreto, las diferentes “Oficinas de Protección” se ocupan de determinar los aspectos referidos a la novedad, la denominación y efec-

tuar el examen DHE. Para esto último, existen diferentes posibilidades y alternativas para los Estados a fin de poder llevar adelante el examen técnico DHE.

Una opción es la que se conoce como examen oficial, en el que es la misma oficina la que se encarga de conducir el ensayo a campo (colección de variedades), agrupar a la variedad inédita con las más parecidas en virtud de los caracteres de agrupamiento que el obtentor informa, tomar las observaciones y expresiones de cada carácter siguiendo la guía técnica correspondiente, determinando su distinción y producir la descripción oficial del cultivar. Para esta opción, es necesario contar con recursos económicos y humanos, estaciones de evaluación en diferentes localidades, personal de campo, etc. La mayoría de los países europeos utilizan esta forma de examen técnico.

Otra opción es la reconocida como examen realizado por terceras partes, en el que personal acreditado por la oficina o el mismo obtentor, es el encargado de llevar adelante los ensayos de campo, tomar los datos, comparar las variedades similares, presentar una descripción completa del cultivar (morfológica, fisiológica, fenológica, de comportamiento sanitario y de cualidades industriales si corresponde), con las verificaciones efectuadas por el personal técnico de la oficina para su control. En este caso la oficina ya no necesita contar con recursos económicos tan elevados como en el caso anterior, ni con sitios de realización de ensayo ni personal de campo. Un cuerpo de técnicos especializados en los diferentes grupos de especies, puede efectuar los controles necesarios a fin de verificar el cumplimiento de las condiciones de protección. Los países latinoamericanos y centroamericanos miembros de UPOV, utilizamos esta forma de examen técnico, al igual que Canadá, Estados Unidos de América y Australia, entre otros.

Examen técnico en Argentina

En el caso nacional, el solicitante u obtentor, debe presentar debidamente completos los formularios de solicitud de inscripción y sus Anexos a la Dirección de Registro de Variedades del INASE. Esta Dirección es el Área técnica responsable de conducir el RNC y RNPC,

y está organizada mediante grupos de especies con un profesional técnico responsable de cada uno: cereales, oleaginosas, forrajeras, industriales, hortícolas, frutales, forestales, ornamentales.

1. Cada técnico evalúa la solicitud en sus aspectos de forma y de fondo, la denominación propuesta para el cultivar y, las características diferenciales del mismo en comparación con las descripciones de todos los cultivares de la misma especie, ya registrados o en trámite de registro. Esta primera comparación de caracteres se efectúa mediante un programa que permite la comparación entre las diferentes expresiones de los caracteres que forman parte de un descriptor.
2. Estos caracteres, pueden ser más o menos influenciados de acuerdo con las condiciones del medio en el que se está efectuando la descripción. Así, existen caracteres de tipo cualitativo que son los menos influenciados por condiciones externas y, consecuentemente, más deseables para poder efectuar la comparación. Los otros caracteres, denominados cuantitativos pueden variar o varían en virtud del ambiente (por ejemplo, altura de planta; largo de hoja, etc.).
3. Consecuentemente, luego de efectuada la comparación primera, el técnico examinador debe analizar el resultado y, de ser necesario, verifica a campo los caracteres y sus expresiones diferenciales o incluso, está facultado para efectuar ensayos oficiales.
4. Estos últimos, son efectuados por los técnicos de la Dirección de Registro de Variedades en los casos en que poder establecer la distinción se haya convertido en un estudio no del todo sencillo, como es el caso de la soja, para la que desde el año 1994, el INASE conduce sus propios ensayos por medio de la Dirección de Registro de Variedades, cuyos resultados luego son comparados con los declarados por el obtentor.

Estos ensayos y verificaciones a campo, también son efectuados para otras especies con el fin de poder corroborar las declaraciones

de los obtentores y realizar el seguimiento del mantenimiento de la pureza varietal a lo largo de los años.

En cuanto a los descriptores varietales, existe uno por especie y todos ellos incluyen los caracteres utilizados a nivel internacional para efectuar los exámenes DHE. Estas directrices técnicas de la UPOV, son efectuadas por los expertos de los diferentes miembros que participan de los grupos técnicos específicos. En las mismas, se explica claramente la forma de ejecución del examen, la toma de observaciones y datos y las expresiones de cada carácter en base a las observaciones efectuadas. Todos los descriptores están integrados por caracteres que son, como ya dijimos, de tipo morfológico, fisiológico, fenológico, de comportamiento a enfermedades y que, en determinadas especies, incluyen a los referidos a calidad industrial.

Cada variedad, cuenta con su descriptor, que no es ni más ni menos que la combinación de las expresiones de cada carácter que lo integra. Esa combinación de caracteres nos da la expresión de la identidad varietal. Hace que esa variedad sea esa y no otra. Nos permite identificarla mediante estos caracteres contenidos en el descriptor y la combinación de sus expresiones.

Cuando el técnico que realiza el examen DHE compara la descripción de variedad inédita contra todas las anteriormente registradas o en trámite de registro, lo que está haciendo es comparar identidades morfológicas, fisiológicas, fenológicas, etc. para poder establecer el cumplimiento de una condición previamente establecida: la diferenciación (TG/1/3 – Introducción General a las Directrices de examen – UPOV 2005/06).

En este sentido y, hasta la fecha, la UPOV ha recomendado que los exámenes DHE se efectúen mediante la utilización de caracteres de tipo morfológico, hasta tanto se pueda establecer la técnica y qué tipo de marcadores moleculares podrían ser utilizados a efectos de la diferenciación. Para ello, y en el seno de la UPOV, se encuentran trabajando el grupo de técnicas biomoleculares (BMT) y subgrupos de trabajo específico para diferentes especies, a fin de poder establecer estas premisas. La UPOV sí se ha manifestado respecto del uso de técnicas

moleculares para determinar la identidad. En este sentido se ha recomendado la posibilidad de uso de estas metodologías.

En el caso de la República Argentina, el examen DHE como vimos anteriormente, se efectúa mediante “marcadores morfológicos” es decir, caracteres morfológicos, fenológicos, fisiológicos, etc. Aún no se utilizan técnicas moleculares a efectos de establecer la diferenciación entre cultivares. Pero sí, aceptamos que como información complementaria a la descripción, el obtentor presente el patrón molecular de su inédito, indicando la metodología técnica y los marcadores utilizados. Así y ante un eventual conflicto, el obtentor ya cuenta con esta información molecular en el INASE y podría utilizarla a efectos de la identificación de su cultivar llegado el caso.

En sesiones recientes de la UPOV de los Cuerpos de decisión, se ha considerado el tema referido a la utilización de las técnicas moleculares para otros fines, además del de la identificación, como por ejemplo en la determinación de variedades esencialmente derivadas.

Por supuesto que las recomendaciones de la UPOV son guías técnicas que cada miembro puede tomar e incorporar en su país, no siendo obligatorias per-se, pero es sumamente importante que en ese ámbito se esté discutiendo en los cuerpos técnicos correspondientes, la utilidad de las técnicas moleculares con miras a que el sistema de derecho de obtentor cuente con otra herramienta que colabore en su implementación y ejercicio.

Por último, la Federación Internacional de Semillas (FIS) que nuclea a los obtentores (participan dos organizaciones argentinas), considera que hasta tanto no se puedan definir distancias mínimas para la distinción, el impacto que esas técnicas tendrán en los requisitos de uniformidad y estabilidad y, la disponibilidad de marcadores públicos, no es posible que puedan ser utilizados para el examen DHE por sí solos. Pero la FIS considera que sí pueden ser utilizados en la identificación de una variedad protegida y/o en la determinación de una variedad esencialmente derivada (Federación Internacional de Semillas – Documentos de posición sobre propiedad intelectual - 2006).

La noción de variedad esencialmente derivada, aparece en el artículo 14.5. del Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales – UPOV Acta de 1991.

En ese sentido *“Se considerará que una variedad es esencialmente derivada de otra variedad – la variedad inicial – si i) se deriva principalmente de la variedad inicial, o de una variedad que a su vez se deriva principalmente de la variedad inicial, conservando al mismo tiempo las expresiones de los caracteres esenciales que resulten del genotipo o de la combinación de genotipos de la variedad inicial; ii). se distingue claramente de la variedad inicial, y iii) salvo por lo que respecta a las diferencias resultantes de la derivación, es conforme a la variedad inicial en la expresión de los caracteres esenciales que resulten del genotipo o de la combinación de genotipos de la variedad inicial”*. Por otra parte, pero en ese mismo sentido, el Convenio agrega que: *“Las variedades esencialmente derivadas podrán obtenerse, por ejemplo, por selección de un mutante natural o inducido o de un variante somaclonal, selección de un individuo variante entre las plantas de la variedad inicial, retrocruzamientos o transformaciones por ingeniería genética”* (Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales – Acta 1991).

Esta noción pretende introducir una mejor relación de derechos entre obtentores y titulares de derecho. El Convenio, tal como está, contiene en todas sus versiones vigentes, una excepción al derecho del obtentor, reconocida como *“excepción del fitomejorador”* o *“breeder's exemption”*. Por esta excepción al derecho, un fitomejorador puede tomar como fuente de variación inicial el material de propagación de una variedad que se encuentra con titularidad vigente (inscrita en el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares en el caso de la República Argentina) y sin solicitar autorización al titular de ese derecho vigente (el obtentor) utilizar ese material de propagación de esa variedad protegida como fuente de variación a partir de la que podrá obtener una nueva variedad, siempre y cuando no deba utilizar en cada nuevo ciclo de producción de su nueva variedad, al material de propagación de la variedad protegida.

Si pensamos, por ejemplo en variedades obtenidas por recombinación de ADN, se podría suscitar una relación de desequilibrio en cuanto a los derechos de obtentores y titulares de otros derechos. Así, el obtentor de una variedad protegida, queda exceptuado de su derecho ante la utilización de su variedad como fuente de variación inicial para otra mejora. En cambio, el titular de un derecho de, por ejemplo, patente sobre un gen modificado, producto o procedimiento determinado, podrá ejercer su derecho ante la utilización de un tercero.

Sin duda, el desbalance entre derechos y titulares es notable. Por esta razón, el Acta de 1991 de la UPOV introduce la noción de variedad esencialmente derivada por el que: *“En la práctica, el nuevo sistema ha creado un marco dentro del cual, las partes interesadas pueden negociar:*

a) aquel que desea emprender una selección “mejorante” (con inclusión de un trabajo de transformación mediante ingeniería genética) sobre una variedad protegida, concertará un acuerdo con el obtentor de esta variedad antes de comenzar sus trabajos (esos acuerdos ya se han concertado entre empresas de ingeniería genética y obtentores “tradicionales”);

b) cuando un trabajo de selección resulte de forma imprevista en la creación de una variedad esencialmente derivada, los dos obtentores se entenderán sobre la explotación de esta última si constituye un verdadero mejoramiento; el precio que ha de pagar el usuario no será una regalía doble, sino una suma determinada por las leyes del mercado (por la competencia). Si no hay mejoramiento, o bien el obtentor de la variedad esencialmente derivada decidirá que no la va a explotar, o bien el obtentor de la variedad inicial ejercerá su derecho para negar al segundo obtentor el derecho a explotar la variedad; c) los obtentores de variedades resultantes de una selección “innovante” y los inventores de productos o de procedimientos que dan lugar a variedades esencialmente derivadas tienen derechos de valor sensiblemente equivalente y, por consiguiente, se ven obligados a concertar acuerdos equilibrados” (Ley tipo sobre la protección de las obtenciones vegetales – UPOV – 1996).

“La noción de variedad esencialmente derivada hace intervenir el grado de semejanza

entre una de las variedades parentales (la variedad inicial) y la variedad derivada. Para que exista derivación esencial, este grado de semejanza debe ser muy grande y el número de caracteres heredados del segundo genitor (si lo hay) debe ser muy pequeño; en última instancia, se modifica un sólo carácter” (Ley tipo sobre la protección de las obtenciones vegetales – UPOV – 1996).

Para las oficinas de protección de variedades, la situación es clara: si una variedad es nueva, diferente, homogénea, estable, cuenta con una adecuada denominación y ha cumplido con las formalidades administrativas, esa Oficina no tiene motivo para no otorgar el título de obtentor o de propiedad de variedades vegetales.

Al momento en que el obtentor de la variedad esencialmente derivada, pretenda realizar alguno de los actos a los que se extiende el derecho del obtentor de la variedad inicial sobre ésta, es en ese caso en que deberá solicitar permiso para ello al obtentor de esa variedad inicial.

“Todas las partes interesadas se han puesto de acuerdo en que las relaciones de dependencia deberán ser administradas por los propios obtentores, sin que intervengan las autoridades encargadas de administrar el sistema de protección de las obtenciones vegetales. Las grandes organizaciones nacionales e internacionales de obtentores, están elaborando ya recomendaciones sobre las condiciones prácticas en las que una variedad será considerada como esencialmente derivada” (Ley tipo sobre la protección de las obtenciones vegetales – UPOV – 1996).

Marcadores moleculares y la UPOV

Antecedentes

A la luz de los avances en biología molecular y en las técnicas de mejoramiento, la UPOV decidió que era necesario incorporar un nuevo grupo que pudiera estudiar la aplicación de los marcadores moleculares en los estudios DHE. En el año 1993 se llevó a cabo la primera reunión del Grupo de Trabajo en Técnicas Bioquímicas y Moleculares y de perfiles de ADN en particular, conocido como Grupo BMT.

El BMT es un grupo de expertos en el examen DHE, especialistas en técnicas bioquímicas y moleculares, y obtentores cuya función actual consiste en:

1. Examinar la evolución general de las técnicas bioquímicas y moleculares.
2. Informar acerca de las aplicaciones pertinentes de las técnicas bioquímicas y moleculares al fitomejoramiento.
3. Estudiar la posible aplicación de las técnicas bioquímicas y moleculares al examen DHE e informar sobre sus conclusiones al Comité Técnico.
4. Si procede, elaborar directrices para metodologías bioquímicas y moleculares y su armonización y, en particular, contribuir a la elaboración de un documento referido a “nuevos caracteres”. Estas directrices se elaborarán en colaboración con los Grupos de Trabajo Técnico (o sus siglas en inglés TWP).
5. Examinar las iniciativas de los Grupos de Trabajo Técnico sobre el establecimiento de subgrupos sobre cultivo específicos, tomando en consideración la información disponible y la necesidad de métodos bioquímicos y moleculares.
6. Elaborar directrices en relación con la gestión y la armonización de bases de datos sobre información bioquímica y molecular, en colaboración con el Grupo de Trabajo en Computación (TWC).
7. Recibir informes de los Subgrupos sobre Cultivos y del Grupo de Consulta del BMT.
8. Constituir un foro para debatir la utilización de técnicas bioquímicas y moleculares en el examen de las variedades esencialmente derivadas y la identificación de las variedades.

(UPOV TC/38/16, 2002)

En la 6ta. Reunión del BMT, llevada a cabo en Angers, Francia en marzo de 2000, el Grupo BMT consideró que existían (y existen aún) una serie de problemas de tipo legal y político referidos al uso de estas técnicas, que deberían ser discutidos en el ámbito de un grupo específico. En octubre del mismo año el CAJ aceptó la formación de dicho grupo, y en 2001

se acordó el mandato de lo que se denominó Subgrupo Especial de Expertos Técnicos y Jurídicos sobre Técnicas Bioquímicas y Moleculares o también conocido como Grupo de Consulta del BMT, y que contiene los puntos que se describen a continuación.

1. El Grupo de Consulta del BMT deberá evaluar los posibles modelos de aplicación propuestos por el Comité Técnico, sobre la base de los trabajos realizados por el BMT y los subgrupos sobre cultivos, para la utilización de las técnicas bioquímicas y moleculares en el examen de la distinción, la homogeneidad y la estabilidad en relación con:

- a). la conformidad con el Convenio de la UPOV.

- b). las posibles repercusiones en la eficacia de la protección, comparada con la obtenida mediante los métodos actuales del examen, y pronunciarse sobre la eventual disminución de la eficacia de la protección ofrecida mediante el sistema de la UPOV.

2. Al realizar su evaluación, el Grupo de Consulta del BMT podrá remitir cuestiones concretas al Comité Administrativo y Jurídico o al Comité Técnico para proveer de aclaraciones o información complementaria, según se considere apropiado.
3. El Grupo de Consulta del BMT informará al Comité Administrativo y Jurídico sobre su evaluación, tal como consta en el párrafo 1, pero esta evaluación no será vinculante para la postura del Comité Administrativo y Jurídico.

- 4.

(UPOV TC/38/14 – CAJ/45/5, 2002)

A lo largo de los 15 años de existencia del grupo BMT, se han formado diversos subgrupos de trabajo específicos por cultivo o grupos de cultivos, denominados formalmente Subgrupos de Cultivos. Los que existen actualmente son los siguientes: papa; rosa; caña de azúcar; trigo y cebada; maíz; colza; raigrás; soja; tomate y el grupo horizontal de cultivos de propagación vegetativa.

Estos grupos analizan el tema según las características específicas de cada especie o

grupo de especies, facilitando la discusión y agilizando la toma de decisiones.

Modelos para la posible introducción de técnicas moleculares en los estudios DHE

En el año 2001, durante la 7ma sesión del Grupo BMT, éste consideró de importancia que el Grupo de Consulta del BMT pudiera tomar sus decisiones legales y políticas sobre la base de diversos modelos para el uso de marcadores moleculares en los ensayos DHE, y que además éstos deberían estar definidos por los expertos de los Subgrupos de Cultivos.

Los modelos para el uso de técnicas bioquímicas y moleculares en los estudios DHE aceptados son los siguientes:

1. Las características moleculares como predictivas de características tradicionales. Utilización de caracteres moleculares que se vinculan directamente con los caracteres tradicionales (marcadores genéticos específicos): los marcadores moleculares que se vinculan directamente con los caracteres tradicionales pueden resultar útiles para examinar los caracteres tradicionales que no pueden observarse fácilmente o de manera coherente en el terreno, o requieren disposiciones especiales adicionales (por ejemplo, los caracteres de resistencia a las enfermedades). Deberá demostrarse que existe un vínculo fiable entre el marcador y la expresión del carácter. Por ejemplo el carácter de tolerancia a herbicidas, introducido por modificación genética. Este modelo tiene una serie de supuestos:

 - el ensayo para el marcador debe realizarse sobre el mismo número de plantas individuales, la misma cantidad de años y los mismos criterios que para los ensayos a campo.
 - debe verificarse que realmente el marcador está ligado al gen.
 - si se tienen distintos marcadores para la misma característica, éstos se considerarán como distintos métodos para evaluar esa característica.
 - si se tienen distintos genes que confieren la misma característica, éstos se considerarán como distintos métodos para

evaluar la misma característica.

- si existen distintos marcadores ligados a diferentes elementos regulatorios para el mismo gen, estos marcadores serán considerados como distintos métodos para evaluar la característica.

Sobre estos dos últimos puntos se deja asentado que se podrán hacer consideraciones, en tanto que pueden existir distintos mecanismos de acción de los genes (que otorguen ciertas diferencias) y que algunos elementos regulatorios son comunes a varios genes.

2. Comparación de niveles de umbral para caracteres moleculares con la distancia mínima en caracteres tradicionales para el manejo de colecciones de referencia: la clave consiste en determinar si pares de variedades, que no se consideran distintas utilizando caracteres tradicionales, pueden juzgarse distintas al utilizarse caracteres moleculares, y si dichas decisiones podrían ser aceptables para conservar el valor de la protección. Las propuestas presentadas deberán basarse en una evaluación de la distancia genética en lugar de en un enfoque carácter por carácter y podrán ser utilizadas en la gestión de las colecciones de referencia. Es decir, lo que busca esta opción es llevar menor cantidad de variedades de la colección a campo, de manera de minimizar costos. Lo importante de este sistema es que se debe establecer un nivel de distinción, que se denomina Distinción Plus, en el que la diferencia entre dos variedades sea altamente evidente. Aquellas variedades que resulten no distintas en esta primera evaluación, serán evaluadas en un examen a campo, donde se podrá determinar si realmente son distintas o no a las variedades nuevas que se requiere ensayar. La propuesta de esta opción es la obtención de un umbral de Distinción Plus basado en características moleculares. En esta propuesta, el primer paso es evaluar las características tradicionales y establecer una diferencia

fenotípica entre dos variedades. Luego, se establece la diferencia entre variedades utilizando una distancia molecular. Si la correlación entre ambas distancias es fuerte, se verá algo similar a la figura 1.

En este caso el umbral de Distinción Plus para marcadores moleculares, puede ser extrapolado a partir del umbral basado en características tradicionales. De esta forma, se tomarán las mismas decisiones sin importar cual de los métodos haya sido el utilizado. En los casos reales, las correlaciones no son tan buenas, observándose una nube de puntos mas dispersa (figura 2):

Los métodos no coinciden en el grado de distinción para los pares de variedades que

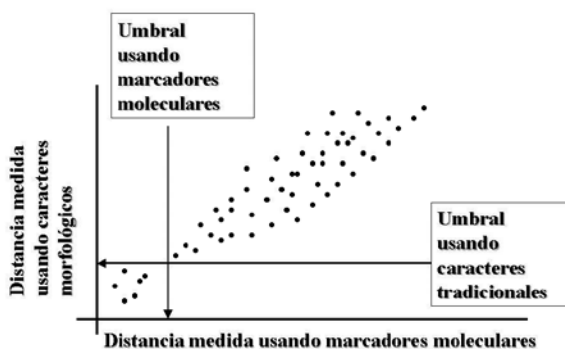


Figura 1. (Adaptado de TC/38/14 – CAJ/45/5, Anexo página 5).

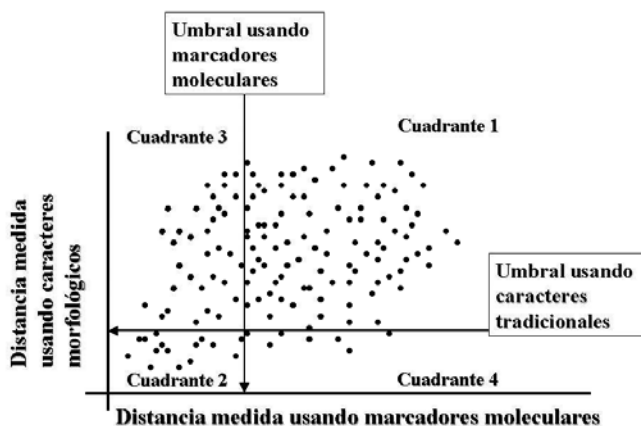


Figura 2. (Adaptado de TC/38/14 – CAJ/45/5, Anexo página 5).

caen dentro de los cuadrantes 3 y 4. Para los pares de variedades que caen dentro de los cuadrantes 1 y 2, las decisiones tomadas no tendrán impacto en la protección. Respecto del cuadrante 3, las decisiones tampoco tendrán impacto en la protección, ya que esos pares de variedades deberán pasar por la evaluación a campo. En el caso del cuadrante 4, los pares de variedades están por debajo del umbral de distinción tradicional (por lo tanto serían similares), pero resultan distintas utilizando características moleculares. Para evitar posibles inconvenientes al poner en práctica este método, ambos sistemas deben ser corridos en paralelo y se deberán determinar umbrales lo suficientemente altos (con marcadores moleculares) de manera de minimizar estos casos. Este sistema ha sido calibrado en Francia para el caso del maíz utilizando caracteres basados en proteínas. Los supuestos de esta opción son los siguientes:

- Se supone que las diferencias calculadas entre variedades utilizando marcadores moleculares, incluyen a las diferencias encontradas dentro de las variedades.
 - Esta opción será utilizada para establecer la Distinción Plus para el manejo de las colecciones de referencia.
 - La metodología utilizada es lo suficientemente robusta y repetible.
3. Creación de un nuevo sistema: esta opción se basa en la utilización de caracteres moleculares del mismo modo en que se utilizan los caracteres no moleculares existentes. Este enfoque significa que las diferencias claramente distinguibles en los caracteres moleculares se considerarían niveles de umbral para evaluar la Distinción. Para esta opción es fundamental analizar las repercusiones que podría tener el nuevo sistema, en el nivel de la protección, en comparación con el sistema actual. Esto se puede llevar a cabo mediante la revisión de las posibles diferencias en las decisiones tomadas utilizando uno u otro sistema. Este nuevo sistema se ha ensayado utilizando fundamentalmente marcadores SSR (Short Sequence Repeat o microsatélites) y más recientemente marcadores SNP (Single

Nucleotide Polymorphism o polimorfismo de nucleótido simple) en rosa y también existen algunos ejemplos en trigo y vid, ninguno de ellos actualmente aceptado por la UPOV. Como ejemplo, a continuación se describe brevemente como sería el ensayo en el caso de rosa. Para esta especie se han preseleccionado 7 marcadores SSR. La prueba se lleva a cabo sobre dos plantas individuales de cada variedad candidata. Si ésta tiene al menos 3 bandas o picos, diferentes respecto de las otras variedades, se la considera distinta, y se podrá luego realizar el ensayo a campo para evaluar la estabilidad y la homogeneidad. En el caso de que no sea distinta, se la evaluará con otros 7 marcadores SSR. Si se encuentran al menos 3 bandas o picos de diferencia, entonces se la considerará distinta y se la evaluará a campo para determinar si es homogénea y estable. Si no se logra la distinción, se considera que es una variedad ya existente o una mutante y se la evaluará a campo tanto para determinar la homogeneidad y la estabilidad como para determinar la distinción, siempre utilizando características no moleculares. El riesgo, en cuanto a mantener el nivel de protección, de esta opción es que puede ocurrir que variedades que no hayan sido consideradas distintas usando las características tradicionales, sean consideradas distintas basándose en esta opción. Si bien la probabilidad de que eso ocurra es baja, la UPOV aún no ha aceptado a este nuevo sistema (UPOV TC/38/14 – CAJ/45/5, 2002).

Otros modelos de uso de las técnicas bioquímicas y moleculares

El grupo BMT tiene dentro de su alcance la posibilidad de discutir temas de identificación de variedades y referidos a las variedades esencialmente derivadas. Además de la posibilidad de usar a los marcadores moleculares para los exámenes DHE, éstos también pueden ser utilizados para la identificación de variedades a fin de dar respuesta a dos temas de gran interés para la UPOV:

- a. Hacer valer el derecho del obtentor.
- b. Evaluar la derivación esencial.

Estos posibles usos de los marcadores de ADN tienen una definición más reciente en el ámbito de la UPOV, discutiéndose las diferentes propuestas técnicas dentro del grupo BMT.

Hacer valer el derecho del obtentor, técnicamente significa que se deberá establecer un sistema tal que se pueda realizar una identificación única de cada variedad de interés (por ejemplo todas las de la colección de referencia de un país, o una región o más ambiciosamente, a nivel mundial). Para esto es necesario contar no sólo con material original (provistos por las empresas criadero o por los organismos oficiales), sino también de marcadores técnicamente validados, en lo posible en el ámbito regional o mundial. Los marcadores a utilizar deberán ser de uso público, así como también las metodologías de análisis y se utilizarán la menor cantidad de marcadores posible tal que se pueda identificar a las variedades que ya tengan título de propiedad, a la vez que haya un margen para que se puedan incorporar nuevas variedades al sistema. Estos sistemas requerirán la construcción de bases de datos compatibles entre países para poder realizar cualquier intercambio de información.

Actualmente, en el ámbito de ISTA (International Seed Testing Association), se están llevando a cabo ensayos de validación de marcadores SSR sobre 4 especies de interés económico mundial.

En el caso de la derivación esencial, se busca determinar si una variedad deriva de otra que ya tiene título de propiedad. Esto actualmente es posible realizarlo llevando a cabo un ensayo a campo que puede durar entre 2 y 3 años. Los marcadores de ADN pueden acortar estos tiempos a unos pocos meses si se cuenta con un sistema adecuado de evaluación de la derivación.

En este caso la propuesta es evaluar gran cantidad de marcadores (no menos de 150 a 200 marcadores) de manera tal de “saturar” el genoma y así determinar el grado en que se distinguen una variedad de la otra. Para eso debe definirse un umbral de distinción, que se establece usando pares de variedades de genealogía conocida o pares de aquellas que han sido pro-

ducidas usando los métodos que pueden llevar a derivación, y calculando la similitud. Su magnitud dependerá de la especie, de la variabilidad genética y del proceso de mejoramiento.

Si al evaluar dos plantas, la similitud de las mismas está por debajo del umbral, se puede decir que las plantas son distintas. Pero si la similitud supera al umbral, estaremos en una zona de “posible derivación” y entonces se deberán llevar a cabo los ensayos a campo (figura 3).

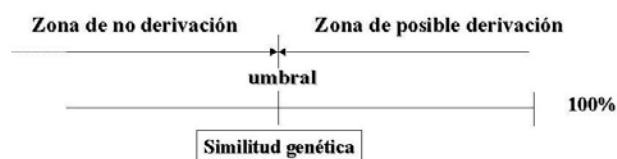


Figura 3. Esquema de umbrales de distinción para variedades esencialmente derivadas. (Adaptado de Le Buanec, 2007).

Selección de marcadores moleculares y construcción de bases de datos: directrices del BMT

Durante la 8va sesión del grupo BMT en 2003, se entendió que era necesario comenzar a armonizar metodologías para la generación de datos moleculares a fin de asegurar la calidad de los datos producidos y para que éstos además sean aceptados universalmente a fin de ser usados en la caracterización de variedades. También se consideró fundamental poder establecer normas o ejemplos de diseños de bases de datos, específicas para datos moleculares de distinto tipo. Estas consideraciones se plasmaron en los borradores de las Directrices del BMT.

Este texto, que aún sigue en discusión, contiene lo siguiente:

- definiciones generales.
- criterios básicos para la selección de metodologías adecuadas.
- criterios generales para la selección de marcadores y criterios específicos por tipo de marcador.
- consideraciones sobre el origen y tipo de material a analizar y sobre la cantidad de

plantas o semillas requeridas en cada caso (tamaño de muestra según tipo de propagación del material).

- consejos sobre el uso de materiales de referencia y la calidad de ADN requerido.
- Consejos sobre la forma de interpretación de los datos y de los resultados.

A continuación se presenta un resumen de los diversos puntos sobre selección y uso de marcadores de ADN para poder generar datos de calidad y que sean universalmente aceptados:

- a. considerar un análisis basado en estudios de especie por especie.
- b. acordar el tipo de marcador.
- c. acordar sobre el equipamiento a utilizar y la plataforma de detección.
- d. acordar sobre los laboratorios que se incluyan en un posible ensayo entre laboratorios.
- e. acordar sobre criterios de calidad.
- f. verificar la fuente del material vegetal con el que se trabaja.
- g. acordar qué marcadores se utilizarán en un primer ensayo colaborativo, cuáles laboratorios y sobre qué plataformas distintas.
- h. conducir un ensayo colaborativo.
- i. desarrollar un protocolo para evaluar los datos moleculares.
- j. acordar sobre el material vegetal y el grupo de materiales de referencia a ser analizado y el origen del mismo (por especie).
- k. analizar la colección de referencia en diferentes laboratorios, con diferentes sistemas de detección, realizando análisis por duplicado, e intercambiando muestras y extracciones de ADN si ocurre algún problema.
- l. utilizar variedades, muestras de ADN y/o alelos de referencia en los análisis.
- m. verificar cada etapa, incluyendo la entrada de datos. En lo posible automatizar.
- n. llevar adelante un ensayo “ciego” en diferentes laboratorios utilizando la base de datos.
- o. adoptar un procedimiento de manera tal de poder incluir nuevos datos.

(UPOV BMT Guidelines-proj-8, 2007)

En definitiva este texto indica que los ensayos que se realicen utilizando marcadores de ADN, deben estar validados a través de un ensayo inter-laboratorio.

En este sentido la Asociación Internacional de Análisis en Semillas (ISTA), comenzó en 2007 a conducir ensayos inter-laboratorio con fines de identificación de variedades mediante la técnica de microsatélites (SSR) para cuatro especies de interés comercial mundial: trigo, soja, maíz y arroz.

Consideraciones finales

La postura de la UPOV respecto de los marcadores moleculares es objeto de evaluación continua debido a la evolución constante de estas técnicas y a las nuevas posibilidades que ofrecen en línea con los criterios del organismo.

Conforme a la actual postura de la UPOV, es posible aplicar los planteamientos del punto 1. (las características moleculares como cualidades predictivas de características tradicionales) ya que basándose en las premisas de la propuesta, ésta está en conformidad con el Convenio de la UPOV y no mermaría la eficacia de la protección suministrada en virtud del actual sistema. También es posible aplicar lo descrito en el punto 2. (comparación de niveles de umbral para caracteres moleculares con la distancia mínima en caracteres tradicionales), ya que cuando se utilizan para la gestión de colecciones de referencia está en conformidad con las disposiciones del Convenio de la UPOV y no mermaría la eficacia de la protección suministrada en virtud del sistema actual.

Sin embargo, la UPOV considera que no se ha alcanzado un acuerdo respecto de los planteamientos del punto 3. (creación de un nuevo sistema basado en marcadores de ADN). Se ha observado que no existe consenso en relación con la aceptación de dicha opción ya que se considera que no hay conformidad con el Convenio de la UPOV. Tampoco hay acuerdo respecto de si mermaría la eficacia de la protección suministrada en virtud del actual sistema. Asimismo se ha expresado la preocupación de que si se adopta dicho enfoque, podrían utilizarse un número ilimitado de marcadores para encontrar diferencias entre variedades que estén en el plano genético que no necesariamente se reflejen en caracteres morfológicos (caracteres en los que se basa el sistema actual de la UPOV).

Finalmente se han observado una serie de cuestiones generales, como por ejemplo la ac-

cesibilidad a las técnicas protegidas por patentes, la necesidad de tener en cuenta la relación costos-beneficios de estos nuevos enfoques, la importancia de la relación que existe entre los caracteres fenotípicos y las técnicas moleculares y, finalmente, la necesidad de examinar también la Homogeneidad y la Estabilidad en los mismos caracteres que se utilizan para examinar la Distinción (UPOV TC/41/7, 2005).

Lecturas recomendadas

Decreto N° 2183/1991. Reglamentario de la Ley N° 20.247, de Semillas y Creaciones Fitogenéticas.

Federación Internacional de Semillas. 2006. Documentos de posición sobre propiedad intelectual.

INASE. 2006. Formularios generales para inscripción de cultivares.

Inase.gov.ar: www.inase.gov.ar

Le Buanec, M. 2007. Use of Molecular techniques in relation to essential derived varieties. Proceedings of the International Symposium on the application of molecular techniques for plant breeding and plant variety protection. Seoul, noviembre de 2007.

UPOV. 2005/06. TG/1/3. Introducción General a las Directrices de examen.

UPOV. 1978. Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales.

UPOV. 1991. Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales.

UPOV. 1996. Ley tipo sobre la protección de las obtenciones vegetales.

UPOV. 2002. TC/38/14 – CAJ/45/5. Ad Hoc subgroup of technical and legal experts on biochemical and molecular techniques (The BMT review group).

UPOV. 2002. TC/38/14 – CAJ/45/5. Ad Hoc subgroup of technical and legal experts on biochemical and molecular techniques (The BMT review group). Anexo página 5.

UPOV. 2002. TC/38/16. Informe del Comité Técnico.

UPOV. 2005. TC/41/7. Técnicas Moleculares.

UPOV. 2007. Miembros de la Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales. Status al 18 de Junio de 2007.

PARTE IV
***Métodos de propagación
y conservación de germoplasma***

IV. CAPÍTULO 1

Micropropagación

Sofía Olmos, Gabriela Luciani y
Ernestina Galdeano

1 Introducción

La micropropagación consiste en la propagación de plantas en un ambiente artificial controlado, empleando un medio de cultivo adecuado. El cultivo es así una herramienta muy útil en los programas de mejoramiento, ya que tiene el potencial de producir plantas de calidad uniforme a escala comercial, a partir de un genotipo selecto y con una tasa de multiplicación ilimitada. Esto es posible gracias a la propiedad de totipotencia que tienen las células vegetales; esto es la capacidad de regenerar una planta completa cuando están sujetas a los estímulos adecuados. Así, las células somáticas de cualquier tejido podrían formar tallos, raíces o embriones somáticos de acuerdo con la competencia que posea y al estímulo que reciban.

Dependiendo de las características de la planta que se pretenda propagar y del objetivo perseguido, la micropropagación puede realizarse a través de tres vías de regeneración: brotación de yemas adventicias preexistentes, producción de yemas *de novo* y embriogénesis somática.

2 Etapas de la micropropagación

La micropropagación presenta cuatro etapas principales: 1) establecimiento del cultivo, 2) desarrollo y multiplicación de vástagos o embriones, 3) enraizamiento y 4) aclimatación de las plántulas. Generalmente, las etapas de enraizamiento y aclimatación pueden combinarse en condiciones *ex vitro*. En el caso de la embriogénesis somática, el enraizamiento es reemplazado por una etapa de maduración y germinación de los embriones para la diferenciación de los ápices caulinar y radicular. En algunos casos tiene importancia considerar una etapa previa (Etapa 0) que es la etapa de preparación de los explantos para el establecimiento.

Etapa 0: Preparación del material vegetal

La correcta elección y preparación del explanto incide directamente sobre la calidad del mismo y su respuesta frente a los dos principales problemas que afectan al establecimiento del cultivo, que son la contaminación con microorganismos y la oxidación del explanto.

Los factores que influyen sobre la calidad del explanto son: el tipo de órgano que sirve como explanto, la edad ontogénica y fisiológica del mismo, la estación en la cual se colecta el material vegetal, el tamaño y el estado sanitario general de la planta donante.

La planta donante debe elegirse en base a una selección masal positiva para las características agronómicas deseables. Una vez seleccionados los individuos, es preciso definir el tipo de explanto a establecer en condiciones *in vitro*. En general, los órganos jóvenes o bien rejuvenecidos son los que tienen mejor respuesta en el establecimiento que los obtenidos a partir de materiales adultos.

El empleo de explantos que se encuentran expuestos a bajos niveles de patógenos puede resolver el problema de la contaminación por hongos y bacterias durante el establecimiento del cultivo *in vitro*.

Se recomienda colectar explantos primarios a campo durante la estación primaveral y estival, cuando existe una brotación activa de las yemas, ya que el empleo de yemas en estado de dormición ocasiona serios problemas de contaminación.

A fin de lograr explantos de óptima calidad es conveniente hacer crecer las plantas donantes por un tiempo mínimo en condiciones de invernáculo. De esta forma es posible incidir directamente sobre el estado sanitario y la calidad de los explantos mediante el control de la intensidad lumínica, temperatura y reguladores de crecimiento. Para especies ornamentales tropicales y subtropicales se recomienda mantener las plantas donantes en condiciones de alta temperatura (25°C) y baja humedad relativa (75%) a fin de reducir la proliferación de patógenos.

Los procesos morfogénicos de floración, dormición y bulbificación son controlados por el fotoperíodo y la temperatura. Controlando estos factores también es posible obtener plantas

donantes y explantos más homogéneos durante todo el año. Pueden aplicarse además pretratamientos con reguladores de crecimiento a las plantas donantes, así como también a los explantos mismos. En especies leñosas suele utilizarse como pretratamiento la inmersión de los explantos primarios en soluciones con citoquininas a fin de inducir la brotación de yemas.

Etapas 1: Establecimiento del cultivo

El objetivo de esta etapa es establecer cultivos viables y axénicos. El éxito está determinado por la calidad del explanto a utilizar. En esta etapa los principales procesos a controlar son la selección, el aislamiento y la esterilización de los explantos.

Los materiales que demuestran tener mayor capacidad regenerativa son los obtenidos de tejidos meristemáticos jóvenes, ya sean yemas axilares o adventicias, embriones o semillas en plantas herbáceas y aquellos tejidos meristemáticos que determinan el crecimiento en grosor, como el cambium en las plantas leñosas. En este sentido, es importante señalar que el empleo de yemas adventicias (también llamadas yemas formadas de *novo*) está asociado con una mayor probabilidad de ocurrencia de variantes somaclonales respecto de los sistemas de propagación basados en la regeneración a partir de yemas axilares o embriones somáticos.

La obtención de cultivos axénicos puede lograrse trabajando tanto sobre aspectos preventivos como curativos. Una acción preventiva la constituye el empleo de métodos de verificación de patógenos en los explantos. Esto puede realizarse mediante análisis específicos para las enfermedades del cultivo, tales como DAS-ELISA o PCR, análisis generales para patógenos cultivables como el empleo de medios de cultivo para el crecimiento de bacterias y hongos y métodos específicos para la detección e identificación de patógenos intracelulares como virus, viroides y bacterias. La realización de estos análisis directamente sobre las plantas donantes, previo establecimiento, presenta dos ventajas. En primer lugar, el empleo de tejidos maduros permite visualizar los síntomas más marcados de la enfermedad, en segundo lugar,

la carga de patógenos es mayor y por lo tanto la precisión del sistema de detección aumenta. Por otro lado, las plantas enfermas pueden tratarse con técnicas adecuadas para la eliminación de patógenos como la termoterapia, la quimioterapia a través de la aplicación de antibióticos, desinfectantes, antivirales y el cultivo de meristemas.

La desinfección superficial incluye varios pasos: el lavado de los explantos con agua corriente, el empleo de etanol al 70% por 1 minuto, seguido de concentraciones variables de hipoclorito de sodio (0,5 a 1,5% de cloro activo) con unas gotas de tensoactivos para favorecer su penetración y actividad. Posteriormente, los explantos deben ser enjuagados al menos tres veces con agua destilada estéril.

Algunos patógenos permanecen latentes y se expresan cuando son transferidos a un medio de cultivo nuevo. En general, estos patógenos incluyen los patógenos superficiales del material vegetal, los patógenos endógenos y los patógenos propios del manejo en laboratorio. En la Etapa 1 también pueden observarse infecciones por bacterias y hongos asociados a trips que sobreviven a los tratamientos de esterilización y por patógenos endógenos latentes dentro del sistema vascular, resultado de una esterilización inefectiva de los explantos. Estos patógenos latentes podrían manejarse mediante el empleo de bacteriostáticos o antibióticos en el medio de cultivo.

Etapas 2: Multiplicación

El objetivo de esta etapa es mantener y aumentar la cantidad de brotes para los nuevos ciclos de multiplicación sucesivos (subcultivos) y poder destinar parte de ellos a la siguiente etapa de producción (enraizamiento, bulbificación, etc.). Ambas vías de regeneración, organogénesis y embriogénesis, pueden darse en forma directa o indirecta. Esta última implica la formación de callo. En general, la organogénesis conduce a la producción de vástagos unipolares que enraízan en etapas sucesivas, mientras que por embriogénesis somática se forman embriones bipolares a través de etapas ontogénicas similares a la embriogénesis cigótica.

Es importante señalar que cualquiera sea la vía de regeneración empleada, es convenient-

te evitar la formación de callo para disminuir el riesgo de variación somaclonal. Los medios de cultivo, los reguladores de crecimiento como auxinas, citocininas y ácido giberélico y las condiciones de crecimiento juegan un papel crítico sobre la multiplicación clonal de los explantos.

La organogénesis puede darse por inducción de yemas axilares o adventicias. La inducción de yemas axilares comprende la multiplicación de yemas preformadas, usualmente sin formación de callo. La inducción de yemas adventicias comprende la inducción de tejido meristemático localizado mediante un tratamiento con reguladores de crecimiento, conduciendo a la diferenciación del primordio y desarrollo del vástago, esto último generalmente en ausencia del regulador de crecimiento que indujo la organogénesis.

La principal desventaja del primer método es que el número de yemas axilares por explanto limita la cantidad de vástagos. Esto se ve compensado, sin embargo, por un aumento en la tasa de multiplicación con los sucesivos subcultivos. La formación de yemas adventicias ofrece mayor potencial para la producción de vástagos, ya que ocurre en sitios distintos al de los meristemas.

La embriogénesis somática es una vía más conveniente porque permite saltar las etapas de formación de yemas y enraizamiento, regenerando plantas en una forma mucho más rápida y eficiente. A su vez, la disponibilidad de protocolos para la obtención de embriones somáticos es clave para la automatización de la micropropagación y la consecuente reducción de costos para su implementación a escala comercial. Los biorreactores son equipos que contienen aproximadamente 2 litros de medio de cultivo líquido estéril y donde los embriones somáticos pueden regenerar y madurar a partir de suspensiones celulares, sustentados por la circulación permanente de nutrientes y de aire (Fig.1). Hoy en día, el empleo de biorreactores para la micropropagación a gran escala está limitado por dos motivos críticos. En primer lugar, el declinamiento de las líneas celulares (clones) por efecto de la variación somaclonal y segundo, por los altos costos asociados con la conversión de estos embriones somáticos en plántulas.

Las condiciones culturales en las cuales crece el explanto son el resultado de la interacción de tres factores: el estado del explanto o material vegetal, determinado en parte por el medio de cultivo, el recipiente de cultivo y el ambiente externo o condiciones de crecimiento del cuarto de cultivo. La capacidad de respuesta de los explantos a un mismo medio de cultivo cambia con el número de subcultivos, el tipo de explanto subcultivado y el método del repique. Por esto mismo, el medio de cultivo debe optimizarse a fin de lograr la mayor tasa de multiplicación vegetativa. Comúnmente se emplea como medio basal el medio MS completo sugerido por Murashige & Skoog (1962) suplementado con 3% de sacarosa como fuente de carbono. A este medio se le adicionan además reguladores de crecimiento, tanto del tipo de auxinas como de citocininas.

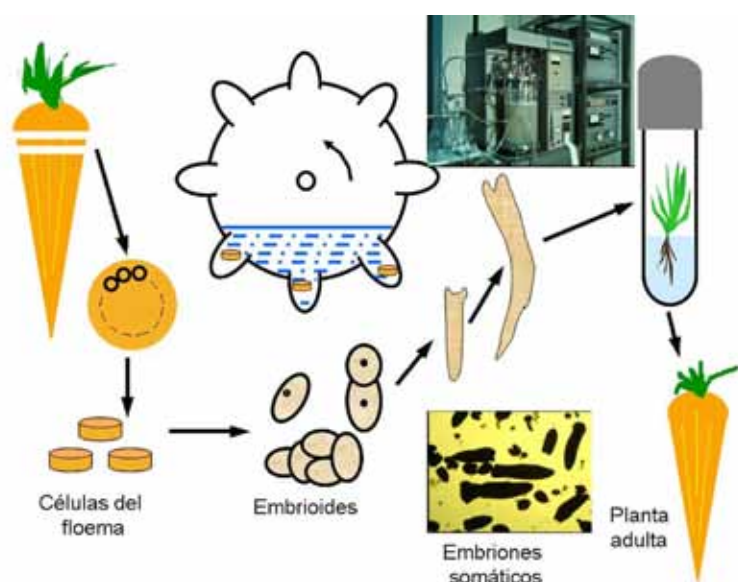


Figura 1: Embriogénesis somática en zanahoria. A partir de células del floema se obtienen los embriones somáticos que son un excelente sistema de propagación clonal. Los biorreactores permiten el cultivo a gran escala de los mismos.

La etapa de multiplicación generalmente comprende dos períodos, la fase de inducción y la fase de multiplicación propiamente dicha. La primera implica, generalmente, el empleo de concentraciones elevadas de reguladores de crecimiento (generalmente de auxinas más que citocininas) para favorecer la dediferenciación. La segunda etapa requiere del empleo de un balance hormonal adecuado para favorecer los procesos de diferenciación y multiplicación celular. En este caso el sistema es más dependiente de reguladores del tipo de las citocininas. En algunos casos, como ocurre en la formación de embriones somáticos, se requiere de una tercera y cuarta etapa, denominadas de maduración y de germinación respectivamente, cuya duración varía entre 1 a 2 semanas. Para la etapa de maduración se adiciona ABA (ácido abscísico) al medio basal en rangos de 5 a 20 μM , seguido del subcultivo a un medio basal conteniendo AG (ácido giberélico) en concentraciones de 0,1-1 μM , cuyo fin es lograr la germinación de los embriones obtenidos.

Los tipos de auxinas más empleados son IBA, 2,4-D, AIA, ANA y picloram, y las citocininas BA, CIN, ZEA, 2ip y TDZ. El rango de concentración empleado varía con el regulador del crecimiento, así es que el 2,4-D, por ejemplo se utiliza en concentraciones de 4-35 μM mientras que otra auxina como el IBA, tiene un rango de 0,1 a 2 μM .

Los tipos de reguladores, sus combinaciones y rangos de concentraciones deben ser optimizados para cada especie, genotipo y etapa de multiplicación determinada. Las condiciones de incubación de los cultivos *in vitro* dependen de las especies con que se trabaje. En el caso de las especies subtropicales, por ejemplo, los cultivos se incuban en luz a $27 \pm 2^\circ \text{C}$ con 14 horas de fotoperíodo e intensidad lumínica moderada ($100 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$).

La presencia de compuestos fenólicos oxidados se encuentra asociada con tejidos vegetales sometidos a situaciones de estrés, tales como aquel provocado por el daño mecánico producido durante el aislamiento del explanto de la planta madre o durante la transformación. Los compuestos fenólicos liberados al medio pueden inhibir el crecimiento e incluso matar

al explanto. Para minimizar el daño de estos compuestos se emplean agentes adsorbentes de fenoles en el medio de cultivo, tales como el carbón activado y la polivinilpirrolidona o antioxidantes como el ácido ascórbico, la modificación del potencial redox con agentes reductores, la inactivación de las fenoxidasas con agentes quelantes o la reducción de su actividad o afinidad por el sustrato utilizando un bajo pH, ó bien cultivando *in vitro* en condiciones de oscuridad.

Es recomendable además lograr que la tasa de intercambio gaseoso entre los ambientes del recipiente y externo sea óptima, evitándose la acumulación de CO_2 y de etileno. En este sentido el sellado del recipiente es importante, el intercambio gaseoso es más limitado con el empleo de una tapa de plástico que con un film de polietileno extensible. La utilización de una tapa perforada con tapón de gomaespuma es altamente recomendable (Fig. 2).

El principal problema que puede presentarse durante los sucesivos subcultivos *in vitro* es la vitrificación. La cual consiste en un proceso de morfogénesis anormal con cambios anatómicos, morfológicos y fisiológicos que producen



Figura 2: Plantas de tabaco creciendo *in vitro* en un recipiente de vidrio con tapa metálica perforada y tapón de gomaespuma, que evita la acumulación de CO_2 , etileno y excesiva humedad en el ambiente de cultivo.

hojas de una apariencia vidriosa. Este fenómeno está regulado por dos factores clave que son la humedad relativa y el potencial agua, y afecta a dos procesos fisiológicos fundamentales, la fotosíntesis y la transpiración. Debido a la disfunción metabólica asociada, las plantas se vuelven completamente heterótrofas y transpiran excesivamente debido a un mal funcionamiento estomático y a cambios estructurales en las paredes celulares. La principal consecuencia de la vitrificación es la baja supervivencia de las plántulas obtenida durante la aclimatización *ex vitro*. Por ello, es fundamental conocer el rol de los distintos factores que inciden negativamente sobre el desarrollo morfogénico normal (parcialmente autótrofo) *in vitro*. Estos factores son el ambiente de cultivo, los componentes orgánicos e inorgánicos del medio, los reguladores de crecimiento, la luz y la temperatura. Una baja humedad relativa, elevada irradiación, la remoción de la fuente de carbohidratos del medio de cultivo y la defoliación de las plantas para estimular la formación de hojas nuevas estimulan la fotosíntesis y otras actividades metabólicas de las hojas en forma normal. Otras estrategias para lograr un óptimo crecimiento implican el empleo de retardantes del crecimiento para estimular la formación de hojas nuevas después del transplante. O bien, el empleo de altos niveles de CO₂ (antagonista del etileno) para estabilizar la vía de lignificación y prevenir la vitrificación a través de la inhibición de la hiperhidratación, la hipolignificación y la formación de aerénquima.

Etapas 3: Enraizamiento y aclimatización

En esta etapa se produce la formación de raíces adventicias. En las especies herbáceas es relativamente fácil mientras que en muchas especies leñosas resulta más complicada por su limitada capacidad rizogénica.

El enraizamiento puede realizarse tanto en condiciones *in vitro* como *ex vitro*. En el primer caso pueden emplearse varios tipos de sustratos y reguladores de crecimiento (principalmente auxinas) para promover la rizogénesis. Los sustratos incluyen: medio solidificado con agar, perlita y/o vermiculita humedecidas con medio nutritivo o agua. En un medio solidificado con agar, los nutrientes se reducen de ½

a ¼ de la composición original, y la sacarosa se reduce a una concentración final de 1-2%. Medios con baja concentración salina, como el WPM (Lloyd & McCown, 1981) y GD (Gresshoff & Doy, 1972) incrementan el porcentaje de enraizamiento de vástagos axilares en plantas latifoliadas. El empleo de agar presenta ventajas y desventajas sobre la rizogénesis. Por un lado, el enraizamiento de especies forestales en agar se favorecería al producirse una rizogénesis más sincrónica como resultado del contacto íntimo de las estacas con el medio de cultivo. Sin embargo, las raíces producidas por este método son usualmente engrosadas y no poseen pelos radiculares. Adicionalmente, el empleo de agar está asociado con la formación de callo en la base de las estacas, que conduce al establecimiento de conexiones vasculares interrumpidas entre raíces y vástagos.

Comúnmente, a fin de proceder a su enraizamiento, los vástagos de buen tamaño provenientes de la etapa de multiplicación y provistos de al menos 4-5 yemas, se colocan durante periodos cortos en soluciones con concentraciones elevadas de auxinas. La auxina más utilizada es el IBA, que puede utilizarse a concentraciones de 1-10 µM durante pocas horas. Alternativamente se pueden emplear niveles más bajos de auxinas (0,1 a 1 µM), pero manteniendo la inducción por un periodo más prolongado (3 a 7 días). Luego los vástagos se transfieren a un medio de cultivo basal desprovisto de reguladores de crecimiento para permitir el desarrollo de las raíces. Aproximadamente 20 días después del tratamiento de inducción, es posible la obtención de una adecuada cantidad de raíces funcionales que permitan continuar hacia la etapa de aclimatización.

Es importante acentuar que el uso de auxinas a elevadas concentraciones es contraproducente porque induce la formación de callo en la base de las estacas. Por ello para cada cultivo es necesario optimizar un protocolo de rizogénesis que minimice la formación de callo y maximice la tasa de rizogénesis y supervivencia de las plantas.

El enraizamiento *ex vitro* permite que el enraizamiento y aclimatización se logren simultáneamente y que raramente se forme callo en la base de las estacas, asegurando así una

conexión vascular continua entre el vástago y la raíz. Sin embargo, el estrés asociado a la transpiración acelerada de las plantas durante las etapas iniciales del trasplante puede reducir considerablemente la tasa de supervivencia. Por ello, es conveniente contar con instalaciones de invernadero o cámaras de crecimiento adecuadas para brindar temperatura y humedad relativa moderadas que permitan lograr la rusticación de las plantas en forma progresiva. Bajo condiciones *ex vitro* se utilizan diferentes substratos, mezclas de tierra y arena y/o abonos, los cuales convienen que estén debidamente desinfectados.

3 Propagación de especies leñosas

El empleo de clones en programas de reforestación de muchas especies genera al menos un 10 % de incremento en ganancia genética en relación al empleo de plantas regeneradas por semillas de árboles selectos. Sin embargo, la máxima ganancia genética puede ser obtenida mediante el empleo conjunto de propagación sexual y agámica. La reproducción sexual es importante para la introducción de genes nuevos, prevenir los efectos de la endogamia y el mejoramiento de características controladas por efectos aditivos de genes. La reproducción asexual por otro lado permite la multiplicación de individuos o grupos de individuos seleccionados de una población elite, que exhiben una significativa ganancia genética debida a efectos no aditivos de genes.

Tradicionalmente, las especies forestales fueron propagadas vegetativamente mediante el enraizamiento de estacas, de braquiblastos en coníferas, así como por injertos. La propagación por estacas de *Cryptomeria japonica* (cedro japonés), *Populus* spp. (álamos) y *Salix* spp. (sauces) ha sido llevada a cabo durante siglos en Asia y Europa. Sin embargo, para la mayoría de los árboles propagados por estacas se observa una rápida pérdida de capacidad de rizogénesis al aumentar la edad de la planta donante de las estacas. En este sentido, una de las principales ventajas de la micropropagación es la capacidad potencial de desarrollar protocolos de multiplicación optimizados para multiplicar árboles adultos que han demostrado ser fenotípicamente superiores.

Los trabajos pioneros en el cultivo de tejidos cambiales de especies forestales condujeron, en el año 1940, a la formación de yemas adventicias en *Ulmus campestris*. Durante la década del 40 se publicaron logros adicionales en la producción separada de vástagos y raíces en especies latifoliadas. En 1950 se publicó por primera vez la obtención de organogénesis en coníferas, con la formación de vástagos a partir de callos de *Sequoia sempervirens*. En la década 1970-80 se obtuvieron las primeras plantas de álamo (*Populus tremuloides*) y *Pinus palustris*. En ambos casos la formación de plántulas se logró vía organogénesis. Luego del año 1975 la micropropagación de especies latifoliadas se realizó a través de la regeneración indirecta, pasando por una etapa de callo.

El principal método utilizado para especies latifoliadas es la brotación de yemas adventicias, empleando ápices de vástagos, yemas laterales y microestacas. En las coníferas, la elongación de las yemas axilares a partir de braquiblastos de plantas adultas no ha sido muy exitosa. En latifoliadas de clima templado los mejores explantos los constituyen las yemas y vástagos en activo crecimiento más que las yemas en estado de dormición. Los vástagos se colectan en primavera y a principios del verano a fin de obtener material con reducido nivel de contaminación. Alternativamente las yemas en dormición pueden ser colectadas y brotadas en condiciones ambientales controladas.

Para la inducción de vástagos, tanto en gimnospermas como en angiospermas, se requiere el empleo de citocininas. La más usada es la N6-benciladenina (BA) o también llamada 6-bencil amino-purina (BAP) y el tidiazurón (TDZ).

Los medios basales más usados para angiospermas son el MS (Murashige & Skoog, 1962) o el WPM (Lloyd & McCown, 1981). Para el caso de gimnospermas, el empleo de medios reducidos en sales minerales y baja cantidad de nitrógeno resulta mucho mejor que el empleo de un medio altamente salino y nitrogenado como el MS.

La inducción de yemas adventicias es el método más empleado para gimnospermas y angiospermas. En este caso, las yemas se inducen directamente sobre el explanto en ge-

neral sin previo pasaje por una etapa de callo. En general, cuanto más joven es el tejido, tanto mayor es la respuesta a los tratamientos que conducen a la organogénesis de *novo*. Los explantos más frecuentes son embriones cigóticos maduros, seguido de cotiledones y epicótilos de plántulas. Generalmente se utiliza BA a concentraciones mayores o iguales a 5 ppm como única fuente de inducción o en combinación con otras citocininas. La adición de auxinas puede ser beneficiosa, aunque en coníferas se ha encontrado que promueve la formación de callo y reduce el proceso de organogénesis.

En algunos casos, como en *Populus spp.*, la formación de yemas adventicias se logra a partir de un callo originado a partir de tejido cambial.

El método llamado multiplicación mediante nódulos meristemáticos es un método también utilizado para *Pinus radiata* y álamo. En este caso se obtiene básicamente un tejido meristemático (no un verdadero callo) usando relaciones altas de auxina/citocinina para luego inducir la producción de vástagos.

La disponibilidad de protocolos vía embriogénesis somática para especies forestales es aún limitada. En la angiospermas los primeros embriones somáticos se obtuvieron de *Santalum album*, donde sin embargo no fue posible la obtención de plantas completas. Recién 20 años después pudieron lograrse plantas completas de abeto (*Picea abies*), una gimnosperma. En las gimnospermas los mayores éxitos se lograron empleando como explantos embriones cigóticos maduros e inmaduros. En la mayoría de los casos los embriones se originan en forma indirecta a partir de callos embriogénicos o bien, directamente desde el explanto. En las coníferas puede ocurrir un proceso de poliembriónía previa formación de callo que conduce a una alta tasa de multiplicación inicial. En general, los medios de cultivo más efectivos para estos fines contienen elevados niveles de sales y suministran nitrógeno tanto como NH_4^+ y NO_3^- . Las auxinas más comúnmente empleadas en el medio de inducción son el 2,4-D y el ANA, en concentraciones mayores de 2 μM . En algunos casos es necesario además el empleo de alguna citocinina, generalmente en concen-

traciones mayores a 1 μM si se trata de BA y entre 0,1-1 μM en el caso del TDZ.

Los explantos jóvenes de especies leñosas, particularmente angiospermas, a menudo secretan al medio de cultivo polifenoles oxidados, visibles como pigmentos marrones y/o negros. Se observa también, que en los explantos de árboles adultos el problema se acentúa. Por ello se recomienda el empleo de explantos primarios juveniles.

Los tipos de explantos más utilizados para el establecimiento *in vitro* son los segmentos nodales de explantos juveniles, las yemas axilares obtenidas por rejuvenecimiento de plantas adultas, y los embriones cigóticos y plántulas obtenidas de semillas de origen sexual.

La desinfección de los mismos se logra mediante inmersión en etanol al 70 % (1 a 2 minutos) seguido de una solución de lavandina comercial conteniendo de 0,8 a 2,4 % de cloro activo durante 5-30 minutos. En la mayoría de los casos se emplean agentes tensoactivos, tales como Triton® ó Tween 20®, adicionados en la solución de lavandina. En todos los casos los explantos son lavados finalmente varias veces con agua destilada estéril.

Los medios basales más empleados son el MS, formulado por Murashige & Skoog (1962), diluido a la mitad o a un cuarto de su formulación original o el WPM, formulado por Lloyd & McCown (1981). Como medios de multiplicación se emplean además el BTM (broadleaved tree medium, Chalupa, 1983) y el medio de Périnet y Lalonde (1983). Los reguladores de crecimiento más utilizados son ANA y BA. También han sido efectivas auxinas como IBA y 2,4-D, y citocininas como 2iP, CIN, ZEA y TDZ.

En la Fig. 3 se muestran las etapas de la micropropagación de plantas de paraíso gigante, *Melia azedarach* var. *gigantea* L. (Olmos *et al.*, 2002).

3.1 Problemas asociados a la micropropagación de especies leñosas

Es mucho más difícil propagar material adulto que juvenil ya que los primeros son recalitrantes, es decir, difíciles de regenerar. Sin embargo, aún en estos casos es posible extraer explantos de mayor capacidad regenerativa mediante dos formas: 1) seleccionando los te-

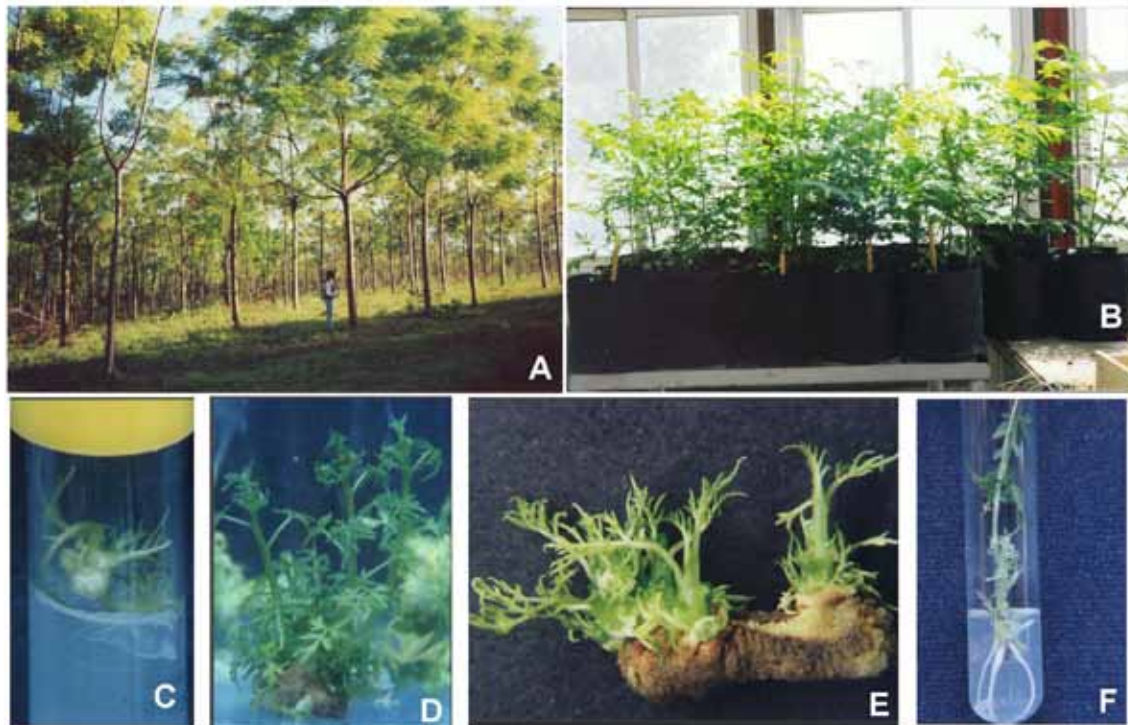


Figura 3: Etapas de la micropropagación en plantas de paraíso gigante, *Melia azedarach* var. *gigantea* L. (Olmos *et al.*, 2002): A) Huerto semillero de paraíso gigante con ejemplares de seis años de edad, provincia de Misiones, Danzer Forestación S.A. Las semillas de los genotipos seleccionados fueron empleadas para generar una población de plantas donantes de explantos. B) Etapa 0, Preparación del material vegetal: plantas de origen sexual de 6 meses de edad crecidas en condiciones de invernadero y utilizadas como donantes de meristemas. C) Etapa 1: Establecimiento del cultivo: vástagos desarrollados a partir de meristemas luego de 30 días sobre medio de establecimiento (Medio basal de Murashige y Skoog, 1962 (MS) suplementado con 2,22 μ M 6-bencil amino-purina (BAP) + 0,29 μ M ácido giberélico (GA_3) + 0,25 μ M ácido 3-indolbutírico (IBA). D) Etapa de Multiplicación: vástagos luego de 30 días sobre medio de multiplicación (medio MS suplementado con 2,22 μ M BAP, estos vástagos fueron empleados como explantos para los subcultivos siguientes o para pasar a la etapa de enraizamiento. E) Explantos provenientes de la etapa de multiplicación con problemas de vitrificación y presencia de callo. En estos casos, el medio de multiplicación para los cultivos subsiguientes fue modificado reduciendo la concentración de BAP a 0,44 μ M. F) Vástago enraizado en medio de MS con la concentración salina reducida a la mitad, suplementado con 9,89 μ M IBA durante 2 días, seguido por el subcultivo en medio basal durante 30 días hasta estar listo para pasar a la etapa de aclimatización.

jjidos más juveniles dentro de un árbol o, 2) induciendo el *rejuvenecimiento* del árbol donante antes de aislar los explantos.

Para seleccionar el material más juvenil en una planta adulta hay que considerar el fenómeno de *topósis*. Este es un proceso por el cual el tipo de crecimiento de un nuevo indivi-

duo está determinado por la posición que ocupaba en la planta adulta. Esto es ocasionado por efecto del envejecimiento fisiológico e implica que los explantos más reactivos *in vitro* se encuentran en las yemas de las áreas basales del tronco y raíces.

A su vez, el rejuvenecimiento es un proceso de reversión temporaria de las características

adultas que permite lograr material vegetal en estado de juvenilidad. En general, a fin de contrarrestar los efectos debidos a la topósis, se recomienda emplear tejidos juveniles, y un tamaño de explanto muy pequeño.

La juvenilidad puede lograrse por dos métodos. En primer lugar, mediante el empleo de órganos juveniles separados de plantas adultas, la utilización de estacas enraizadas o bien de brotes epicórmicos. En segundo lugar mediante el rejuvenecimiento de partes adultas, la iniciación de yemas adventicias y embriones (en este caso se logra un rejuvenecimiento total por el inicio de un nuevo ciclo ontogénico), del injerto de yemas adultas sobre pies juveniles, de tratamientos con reguladores de crecimiento (como citocininas como el BA), por la poda severa (recepado de árboles adultos) y, a través del cultivo *in vitro* de meristemas.

Tanto los atributos de supervivencia a campo, como la tasa de crecimiento, el plagiotropismo y la susceptibilidad a enfermedades de las plantas, tienen una correlación directa con la calidad de los vástagos durante el cultivo *in vitro*. Un problema crucial a resolver en cada sistema de propagación es la calidad diferencial de las raíces de las plantas regeneradas en relación a aquellas obtenidas por semillas. Por ejemplo, las plantas regeneradas de *Pinus elliottii* suelen tener una raíz principal no ramificada y gruesa. En cambio, las plantas obtenidas a través de semillas tienen raíces más delgadas y de mayor crecimiento lateral que permiten comparativamente un mejor anclaje y una mayor resistencia a los vientos.

4 Propagación de especies herbáceas

La micropropagación de especies herbáceas está orientada a proveer material libre de patógenos, propagar material seleccionado por su mayor rendimiento o por su mayor resistencia a enfermedades y estreses ambientales, conservar la diversidad específica en bancos de germoplasma, obtener material para estudios fisiológicos y genéticos y sentar las bases para la aplicación de técnicas de ingeniería genética.

Existe una gran variedad de protocolos, desarrollados en función de la especie y de los objetivos de la propagación. Existen protocolos generales para monocotiledóneas como en el caso ciertos cereales (trigo, maíz, cebada, ave-

na, arroz), pasturas (pasto bermuda, festuca alta, raigrás, pasto llorón) y horticolas (cebolla, ajo, puerro); protocolos generales para dicotiledóneas que incluyen especies horticolas (tomate, papa, pimientos y zanahorias) y leguminosas forrajeras (alfalfa, maní, trébol blanco) y protocolos para especies modelo como *Arabidopsis* y tabaco.

En todos los casos, las formas de propagación son las mismas. Se emplean vías de regeneración por formación de yemas axilares, yemas adventicias y embriogénesis somática. En los dos primeros casos, el sistema de propagación a través de la organogénesis directa asegura la estabilidad genética de las plantas regeneradas y se emplean cuando el objetivo es la propagación clonal a gran escala. La embriogénesis u organogénesis indirecta, con formación de callo, se emplea en cambio para generar variabilidad en programas de mejoramiento.

En el caso de ajo y cebolla, por ejemplo, las etapas de la micropropagación incluyen tanto la multiplicación de yemas axilares por el cultivo de meristemas, la formación directa de yemas adventicias en explantos obtenidos a partir de placas basales o umbelas inmaduras y la formación indirecta de yemas adventicias y/o embriones somáticos obtenidos a partir de callos que provienen de distintos tipos de explantos (meristemas, brotes, placa basal ó raíces). En el caso de alfalfa y otras leguminosas como soja y maní la micropropagación es llevada a cabo por la vía de la embriogénesis somática, donde los embriones se obtienen utilizando tejidos juveniles (embriones, cotiledones y pecíolos) como explantos. En algunos casos como pasto llorón (*Eragrostis curvula*) es posible la regeneración de plantas mediante embriogénesis, organogénesis y regeneración directa a partir de los explantos.

5 Lecturas Recomendadas

- Caso, O. H. 1992. Juvenilidad, rejuvenecimiento y propagación vegetativa de las especies leñosas. *Agriscientia* 9 (1): 5-16.
- Chalupa, V. 1983. Micropropagation of conifer and broadleaved forest trees. *Communicationes Instituti Forestalis Cechosloveniae* 13: 7-39.

- Debergh PC; PE Read, 1993. Micropropagation. En Micropropagation. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 1-13.
- Evans, D.A.; Sharp, W.R.; Bravo, J.E. 1984. Cell culture methods for crop improvement. Handbook of Plant Cell Culture 2: 47-68.
- George, E.F.; Hall, M.A.; De Klerk, G.-J. 2008. Micropropagation: Uses and methods. In: Plant propagation by tissue culture, 3rd edition. George, E.F.; Hall, M.A. and De Klerk, G.E. (eds.) Springer, The Netherlands: 29-64.
- Gresshoff, P.M.; Doy, C.H. 1972. Development and differentiation of haploid *Lycopersicon esculentum* (Tomato). Planta 107:161-170.
- Klopfenstein, N.B.; Kerl, J.G. 1995. The potential of biotechnology in temperate agroforestry practices. In: Agroforestry systems 32. Kluwer Academic Publishers. Netherlands: 29-44.
- Lloyd, G.; B. McCown. 1981. Commercially feasible micropropagation of mountain laurel, *Kolmia latifolia*, by use of shoot tip culture. Combined Proceedings International Plant Propagator Society 30: 421-427.
- Murashige, T.; Skoog, F. 1962. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15: 473-497.
- Olmos, S.E.; Lavia, G.; Di Renzo, M.; Mroginski, L., Echenique, V. 2002. Genetic analysis of variation in micropropagated plants of *Melia azedarach* L. In Vitro Cell Dev Biol Plant 38:617-622
- Périnet, P.; M. Lalonde. 1983. *In vitro* propagation and nodulation of the actinorhizal host plant *Alnus glutinosa* (L.) Gaertn. Plant Science Letters 29: 9-17.
- <http://www.redbio.org/protocolos/index.htm>
- Schenk, R.U.; Hildebrandt, A.C. 1972. Medium and techniques for induction and growth of monocotyledonous and dicotyledonous plant cell cultures. Can J Bot 50:199-204.
- Thorpe, T.A.; Harry, I.S.; Kumar, P.P. 1991. Application of micropropagation to forestry. En Micropropagation. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 311-336.
- Ziv M, 1993. Vitrification: morphological and physiological disorders of in vitro plants. En Micropropagation. Debergh PC y Zimmerman RH eds, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, The Netherlands: 45-92.

IV. CAPÍTULO 2

Semilla Sintética

Hebe Y. Rey y Luis A. Mroginski

Concepto:

Resulta difícil tratar de determinar el origen de la idea de la producción de semillas sintéticas o artificiales. Es uno de los resultados de la aplicación en la Agricultura de los embriones somáticos descritos por primera vez en 1958, por Jakob Reinert y por F.C. Steward y colaboradores. Sin embargo, un gran propulsor de su utilización para la propagación en gran escala de plantas fue Toshio Murashige quien en un Simposio realizado en 1977 en Ghent (Bélgica) presentó formalmente la idea de la producción de las semillas sintéticas, entendiendo como tal a un simple embrión somático encapsulado. Esta semilla se diferencia de la semilla verdadera en que el embrión es somático (producido por el fenómeno conocido como embriogénesis somática) y no cigótico y que si tiene endosperma y cubierta, éstos son artificiales (Fig. 1a y b). Esta semilla, puesta en condiciones adecuadas, germina (Fig. 1c) y se convierte en una planta (Fig. 1d). Muchos grupos de investigación han contribuido al desarrollo de las semillas sintéticas. Entre ellos se deben destacar el grupo liderado por Keith Walker de la Compañía Monsanto que a partir de mediados de la década del 70 trabajaron especialmente con alfalfa. También hay que mencionar la labor de Robert Lawrence de la Union Carbide quienes comenzaron los trabajos con especies forestales, lechuga y apio. Otros investigadores como Drew, Kitto y Janick realizaron sus trabajos con zanahoria. El aporte del grupo liderado por Keith Redenbaugh de la Plant Genetic Inc. fue muy importante, especialmente por su descubrimiento de que hidrogeles como el alginato de sodio podían ser utilizados para producir semillas artificiales que podían germinar en condiciones de invernadero.

Hay que aclarar que además del concepto de semilla sintética definido más arriba, también es factible que en lugar de encapsular embriones somáticos, se encapsulen yemas. Este



Fig. 1.- a) Partes de una semilla sintética .b,c y d) Obtención de plantas de *Arachis pintoi* ($2n=3x=30$) mediante semillas sintéticas (las barras verticales indican 3 mm)

tipo de “semillas sintéticas” - de una utilización muy restringida- no será tratado en este capítulo.

Tipos de semillas sintéticas

Las semillas sintéticas pueden fabricarse de diferentes maneras (Fig.2). Básicamente se pueden usar embriones hidratados (tal como resultan de la embriogénesis somática) o bien pueden ser desecados. En algunos casos estos embriones están protegidos por cubiertas protectoras. De esta manera se pueden distinguir 5 tipos básicos de semillas sintéticas.

1) Semillas sintéticas con embriones desecados (Tipo 1 de la Fig. 2) sin cubierta: Es un sistema muy simple, los embriones son desecados hasta alcanzar porcentajes de humedad de 8- 20%. En este caso los embriones no están provistos de ningún tipo de cubierta protectora. Embriones de alfalfa sometidos al desecamiento mostraron porcentajes de con-

versión en plantas de hasta el 95% (Cuadro 1), además es posible mantenerlos viables por cerca de un año en condiciones de laboratorio.

Cuadro 1: Semillas sintéticas de algunas especies basadas en la desecación de embriones sin cubierta protectora

Especie	% humedad en la semilla	% conversión en plantas
<i>Apium graveolens</i>	10-13	35-85
<i>Dactylis glomerata</i>	13	5-30
<i>Medicago sativa</i>	8-20	33-95

2) Semillas sintéticas con embriones somáticos desecados y provistos de cubierta protectora (Tipo 2 de la Fig. 2). Los embriones de zanahoria y apio fueron recubiertos con polyoxietileno y luego desecados. Los resultados han mostrado que si bien es factible lograr que los mismos sobrevivan, la conversión en plantas es realmente baja.

3) Semillas sintéticas con embriones hidratados sin cubierta (Tipo 3 de la Fig. 2). Es el sistema más simple, consiste en utilizar los embriones somáticos tal como resultan del proceso de la embriogénesis somática sin ningún tipo de cubierta protectora. Este sistema ha sido desechado en la práctica por la escasa conversión de embriones en plantas.

4) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados suspendidos en un gel viscoso ("fluid drilling") (Tipo 4 de la Fig. 2). Inicialmente fue desarrollado en zanahoria y más recientemente con batata.



Fig.2.- Tipos de semillas sintéticas

5) Semillas sintéticas con embriones somáticos hidratados y provistos de una cubierta protectora (Tipo 5 de la Fig. 2). Es el

sistema más usado. Por esta razón, de aquí en adelante cuando se mencione "semilla sintética" se referirá a este tipo. Tiene la ventaja de que los embriones no están sujetos a la desecación que constituye la princi-

pal causa de los bajos valores de conversión en plantas. Si bien se han ensayado numerosas sustancias para encapsular a los embriones somáticos (agar, gelrite, gomas), una de la técnicas más usadas consiste en lograr la formación de una cubierta protectora de alginato de calcio que es un compuesto que además de no ser tóxico para el embrión permite una rápida formación de la cubierta. El proceso es muy simple (Fig. 3) y consiste básicamente en sumergir los embriones somáticos en una solución de alginato de sodio (2%) y luego sumergirlo en un agente acomplejante [por ejemplo 100 mM de Ca (NO₃)₂]. Con esta técnica se genera una semilla sintética consistente de un embrión somático con una cubierta seminal y un endosperma artificial (Fig.1a y b). Eventualmente estas cápsulas pueden ser recubiertas por sustancias tales como el polioxietilenglicol que sirven para mantener una adecuada hidratación de las cápsulas y embriones. Este procedimiento ha posibilitado la obtención de semillas sintéticas de numerosas especies de interés económico entre los que se pueden mencionar la alfalfa, la zanahoria, el apio y especies forestales como *Picea abies*, *Pinus radiata*, *Santalum album* y *Pseudotsuga menziesii*.

Producción de semillas sintéticas

En la Fig.4 se esquematizan 6 aspectos que se deben tener en cuenta para la producción y manipulación de las semillas sintéticas.

En primera instancia es necesario contar con un eficiente sistema que asegure la inducción in vitro de la embriogénesis somática que brin-

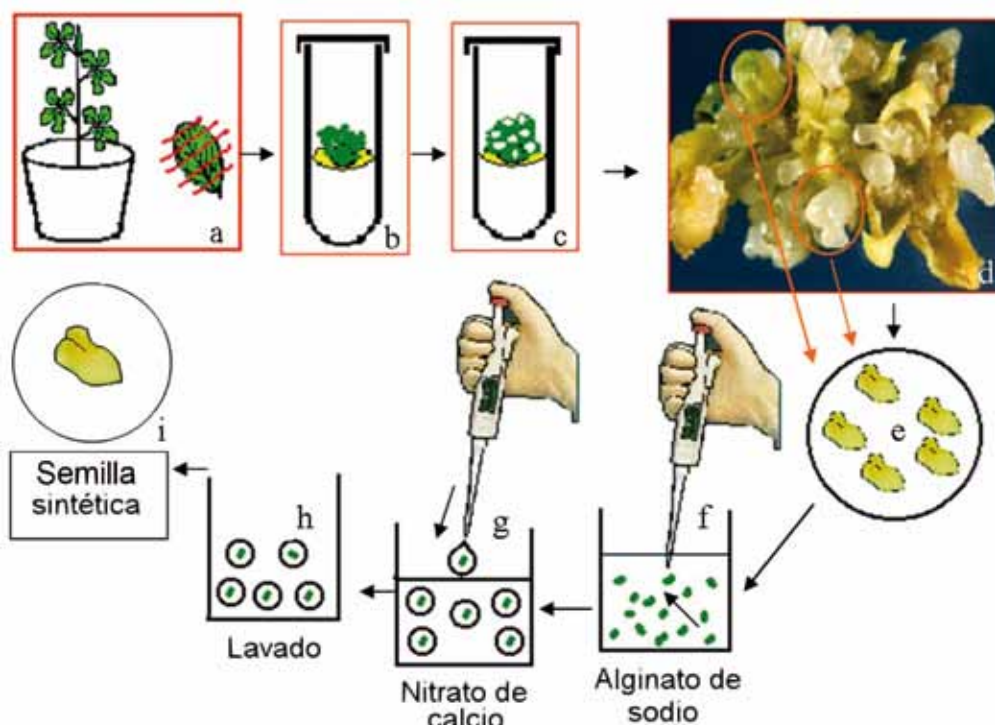


Fig.3.- Inducción de la embriogénesis somática (a-d); selección de embriones somáticos (e); inmersión de los embriones en alginato de sodio (f); acomplejamiento con nitrato de calcio (g); lavado (h); semilla sintética (i)

de la producción de embriones sin la necesidad de la fusión de gametas. Estos embriones deben ser estructuras bipolares perfectas (con un polo que genere el vástago y el otro la raíz) capaces de convertirse (“germinar”) en plantas enteras. Si bien la existencia de embriogénesis somática ha sido informada en centenares de especies de Angiospermas y Gimnospermas, en muchos casos no es de utilidad para iniciar la producción de semillas sintéticas debido a la baja tasa de producción de embriones aptos para la encapsulación.

En los últimos años se han hecho notables avances en el conocimiento de los factores que regulan la embriogénesis somática. Sin embargo aún se dista mucho de conocer las bases genéticas de este fenómeno cuya ocurrencia, *in vitro*, si bien ha sido descrita en centenares de especies de Angiospermas y casi otro tanto de Gimnospermas, en muchos casos no es de utilidad para iniciar la producción de las semi-



Fig. 4. Etapas en la producción de las semillas sintéticas

llas sintéticas, por su baja tasa de producción de embriones aptos para ser encapsulados.

El segundo paso consiste en lograr una producción sincronizada y en gran escala de los embriones. Es fundamental contar con embriones simples que no se fusionen entre sí y que en un momento determinado se encuentren en estado cotiledonar y que no generen embriones secundarios. Diferentes procedimientos (basados en filtros y equipos clasificadores automáticos) han sido desarrollados para seleccionar estos embriones. Para la producción en gran escala se han desarrollado varios diseños de bioreactores y sistemas mecanizados de encapsulamiento adaptados a las particularidades de cada especie.

Se trabaja mucho para lograr una adecuada maduración de los embriones que es un proceso esencial para la obtención de altos valores de conversión en el suelo. Investigaciones hechas con alfalfa han mostrado la utilidad del empleo de tratamientos con ácido abscísico, maltosa y del pretratamiento con temperaturas bajas (4°C).

El almacenamiento de las semillas sintéticas es otro aspecto importante a tener en cuenta. Lo ideal sería que las semillas sintéticas tuvieran un comportamiento similar al de la mayoría de las semillas verdaderas y permanecieran viables por mucho tiempo. Los resultados obtenidos con semillas sintéticas de muchas especies muestran que aún hay que trabajar arduamente para que ello ocurra. Las técnicas de la cryopreservación con nitrógeno líquido podrían resolver este punto.

Por último lo ideal es que la semilla sintética sea sembrada directamente al suelo con un alto porcentaje de conversión en plantas. Muchos factores inciden negativamente para que ello ocurra. Por ahora en la mayoría de los casos, las semillas sintéticas son sembradas primeramente en cámaras climatizadas o en invernaderos para luego ser llevadas al campo.

Calidad de la semilla sintética

Un aspecto de gran importancia tecnológica es el contar con semillas sintéticas que, además de no generar variantes somaclonales, tengan un alto porcentaje de conversión en plantas cuando las mismas son sembradas en

el suelo. Este aspecto está afectado por varios factores entre los que figuran, el tipo de embrión, la calidad del endosperma sintético, la dureza de la cápsula y la protección contra agentes patógenos.

El tipo de embrión es quizás el factor más importante que influye en la calidad de la semilla sintética. Deben poder generarse rápidamente, en grandes cantidades, no fusionarse entre sí, ni formar callos. Deben desarrollarse de manera sincronizada y convertirse rápidamente en plantas. Es altamente deseable que conserven su viabilidad por largo tiempo en condiciones de laboratorio o mantenidos en refrigeradores comerciales. Generalmente la falta de embriones de calidad es el factor limitante de la producción de semillas sintéticas.

El endosperma sintético tiene que proteger y nutrir al embrión hasta que germine y pueda crecer autotróficamente. En este punto es preciso recordar que si bien los embriones somáticos son muy similares a los embriones cigóticos, carecen de las sustancias de reserva necesarias para su conversión en plántulas. El endosperma sintético generalmente está compuesto de los mismos medios de cultivo que se usan para inducir la germinación *in vitro* de los embriones. Estos medios contienen macro y micronutrientes, vitaminas, sacarosa y sustancias reguladoras de crecimiento. La composición de este endosperma lo hace susceptible al ataque de patógenos, por lo que también se incorporan compuestos de acción fungicida y bactericida. Es común el agregado de 1-5 mg/L de benomyl y de algunos antibióticos como ceftaxima o ampicilina.

La dureza de la cápsula puede afectar, por acción mecánica o por dificultar la respiración, la conversión de los embriones en plantas. Es reconocido que la dureza debe ser del orden de 0,2 y 2 Kg/cm² de presión, la que puede obtenerse mediante una adecuada manipulación de la concentración del alginato y de los tiempos de la reacción del acomplejamiento.

Ventajas del empleo de semillas sintéticas

La mayoría de las plantas de interés económico son propagadas mediante semillas verdaderas. Éstas constituyen excelentes propágu-

los que pueden ser producidos a bajo costo, en forma rápida, y pueden ser sembrados mecánicamente. Además la mayoría de ellas pueden ser conservadas fácilmente por mucho tiempo. Sin embargo hay muchas plantas que no se propagan mediante las semillas verdaderas y lo hacen a través de partes vegetativas (Es el caso entre otras de la caña de azúcar, mandioca, ajo, frutilla, papa, batata, varios árboles y plantas ornamentales). Otras especies tienen semillas de poca calidad (Muchas coníferas). En algunos casos si bien las plantas pueden propagarse por semillas, presentan dificultades para su germinación (por ej. yerba mate) o bien debido al alto grado de heterocigosis las poblaciones derivadas de semillas son muy

heterogéneas (té, yerba mate, paraíso) y es recomendable su propagación asexual. También es el caso de muchos híbridos y de plantas que no producen semillas verdaderas o bien el caso de ciertas plantas transgénicas. En todas estas situaciones el uso de semillas sintéticas es ventajosa. Las plantas serán clonadas, es decir cada planta derivada de una semilla sintética será una copia fiel de la planta madre, utilizando sembradoras similares a las que hoy se emplean con las semillas verdaderas. Adicionalmente las semillas sintéticas podrán actuar como transportadoras de reguladores de crecimiento, microorganismos y pesticidas que se quieran incorporar durante la siembra, los costos de los transplantes se verán redu-

Cuadro 2. Necesidad de contar con semillas sintéticas en algunas plantas leñosas subtropicales de interés para Argentina y Estado actual de su desarrollo.v

Especie	Interés en contar con semillas sintéticas	Estado de desarrollo de la inducción de la Emb riogénesis Somática	Estado de desarrollo de la producción de la semilla sintética
Aguái (<i>Chrysophyllum gonocarpum</i>)	XXX	X	---
Araucarias (<i>Araucaria spp.</i>)	XXX	XX	---
Algarrobo (<i>Prosopis spp</i>)	XXX	---	---
Cítricos * (<i>Citrus spp.</i>)	XX	XXX	X
Eucaliptos* (<i>Eucalyptus spp.</i>)	XXX	X	---
Mango (<i>Mangifera indica</i>)	XX	X	---
Paraíso (<i>Melia azedarach</i>)	XXX	XX	X
Pinos* (<i>Pinus spp.</i>)	XXX	XX	X
Quebracho (<i>Schinopsis balansae</i>)	XX	---	---
Té (<i>Camellia sinensis</i>)	XXX	XXX	---
Toona (<i>Toona ciliata</i>)	XXX	---	---
Yerba mate (<i>Ilex paraguariensis</i>)	XXX	X	---

Ref.:

- * depende de la especie
- nulo
- X escaso
- XX regular
- XXX grande

cidos, las poblaciones serán genéticamente uniformes y podrán ser comercializadas ciertos híbridos de plantas resultantes de costosas manipulaciones manuales.

En el Cuadro 2 se señalan algunas especies para las cuales sería necesario contar con un sistema de semilla sintética.

La falta de una difusión más masiva de esta tecnología en la actualidad obedece por un lado a razones técnicas (En muchas especies aún no se ha logrado inducir eficientes sistemas que permitan la generación de grandes cantidades de embriones somáticos de calidad) y económicos (Cálculos hechos en alfalfa indican que su costo de producción supera en casi cien veces el costo de producción de la semilla verdadera. Sin embargo, este costo es casi similar o incluso inferior al de la producción de semillas verdaderas de algunos híbridos de alcaucil, geranio y gerbera.

CONCLUSIONES

Si bien aún el uso de la semilla sintética en la Agricultura es insignificante y sólo es utilizada en cierto grupos de árboles forestales, hay coincidencia en el mundo en que esta tecnología se va a convertir en un futuro cercano en el principal método de propagación de las plantas. Los progresos logrados en los últimos 20 años han sido notables. Sin embargo hay que incrementar las investigaciones básicas sobre embriogénesis somática para luego abordar los aspectos "industriales" de la producción en gran escala de las semillas sintéticas. En la Argentina, si bien esta tecnología podría ser usada teóricamente en todas las Angiospermas y Gimnospermas, en la actualidad la mayor demanda de su utilización proviene de productores de plantas leñosas, con los cuales un rápido diagnóstico de lo que sucede en el área subtropical (Cuadro 2) nos ubica a Argentina en un estado de desarrollo inicial, con capacidad técnica y humana para encarar la producción de las semillas sintéticas.

Lecturas recomendadas

- Cantliffe, D. J. (2001) Bioreactor technology in plant cloning, Proceedings of the Fourth International Symposium on In Vitro Culture and Horticultural Breeding. *Acta Horticulturae*.560:345-351.
- Carlson, W. C. J. E. Hartle. (1995). Manufactured seeds of woody plants. In S.M. Jain , P KGupta, R.J. Newton (eds.) *Somatic embryogenesis in woody plants*. London, Kluwe Acad. Press. 1: 253-263.
- Gray, D. J. (1991). Somatic embryogenesis and development of synthetic seed technology. *Critical Reviews in Plant Sciences* 10: 33-61.
- Guerra, M. P. T., A.C. Teixeira, (1999). Embriogénesis somática e sementes sintéticas. In: A.C.Torres, L.S.Caldas, J.A.Busó (eds.) *Cultura de Tecidos e Transformacao Genética de Plantas*. CBAB. Embrapa. Brasilia . 2: 533-568.
- Ibaraki, Y. K., (2001). Automation of somatic embryo production. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*. 65: 179-199.
- Jiménez González.A., E.Q. Mendoza (1998) In :Pérez Ponce,J.N. (ed.) *Propagación y Mejora Genética de Plantas por Biotecnología*. Instituto de Biología de Plantas.Santa Clara. Cuba. pp.225-240.
- McKersie,B.D., D.C.W.Brown (1996) Somatic embryogenesis and artificial seeds in forage legumes. *Seed Science Research* 6: 109-126.
- Mroginski, L. A. H.Rey ,S. Olmos, V. Gonzalez (1995). Semillas artificiales para la propagacion de plantas. *Paradigmas* 1: 5-9.
- Timmis,R. (1998). Bioprocessing for tree production in the forest industry: Conifer somatic embryogenesis. *Biotechnol. Progress* 14:156-166.

IV. CAPÍTULO 3

Conservación de Germoplasma *in vitro*.

Adriana Scocchi y Hebe Rey

Abreviaturas usadas en este capítulo:

DMSO (Dimetilsulfóxido); PVP (Polivinilpirrolidona); PVS2 (30% glicerol, 15% etilenglicol, 15% DMSO, 0.04M sacarosa), TTC (Cloruro 2,3,5-Trifenil-Tetrazolio), PEG (Polietilenglicol).

Introducción

Desde sus inicios, el hombre ha dependido básicamente de los vegetales como fuente de energía. Al aumentar rápidamente la población, se ha hecho necesario implantar técnicas de explotación, en particular agropecuarias, que han contribuido a la destrucción de las poblaciones pioneras vegetales que fueron producto de siglos de evolución. Por otro lado, las técnicas modernas de producción de variedades mejoradas altamente homogéneas han provocado la reducción de la variabilidad genética de las especies cultivadas, ocasionando una “erosión genética”.

En este contexto es cuando se recurre a las fuentes genéticas originales de la variabilidad, las que se deben preservar adecuadamente. Cuando se habla de preservación de germoplasma hay que subrayar que el objetivo es conservar, con la mayor integridad posible, la variabilidad genética de las poblaciones seleccionadas.

Métodos empleados para la conservación de germoplasma:

La estrategia a seguir para la conservación de germoplasma, depende de la naturaleza del material vegetal, y está definida por la duración de su ciclo de vida, el modo de reproducción y el tamaño de sus individuos. De acuerdo con estas características se han intentado diversas alternativas de conservación, que van desde el tradicional banco de semillas hasta el mantenimiento de áreas de reservas. Sin embargo, en muchos casos el mantenimiento no es posible

y en otros casos resulta sumamente costoso y los riesgos de pérdidas por manipulación o desastres naturales son muy altos. Por lo tanto, se buscó implantar nuevas estrategias para conservar los recursos genéticos en forma más eficiente.

Los métodos de conservación de germoplasma se pueden dividir en:

Métodos de Conservación *in situ*;

Métodos de Conservación *ex situ*.

Los primeros se basan en la conservación de las plantas en sus habitats naturales e incluyen la conservación en Parques Nacionales y en Reservas Ecológicas, los cuales requieren un considerable espacio físico, altos costos asociados a la necesidad de mano de obra especializada, control permanente de enfermedades y malezas, a la par que las plantas están expuestas a las inclemencias del clima y de los incendios.

Por otra parte, los métodos de conservación *ex situ* se basan en el mantenimiento del material biológico en bancos de semillas, bancos de cultivo *in vitro*, colecciones de plantas (en campo, viveros, jardines botánicos).

En general, los bancos de semillas constituyen uno de los métodos más convenientes para la conservación de germoplasma *ex situ*, porque permiten almacenar una gran variabilidad genética en forma económica y práctica. Para la conservación de semillas la International Plant Genetic Resources Institute (IPGRI) recomienda su desecación hasta un 3-7% de humedad y su almacenamiento a bajas temperaturas (-18°C). Este protocolo de conservación es en general el más recomendado para la mayoría de las especies que se propagan por semillas y cuyas semillas resisten la desecación sin que ello implique pérdida de viabilidad. A las semillas que presentan estas características se las denominan “semillas ortodoxas” como por ejemplo las semillas de arroz, trigo, avena, tabaco, tomate y lechuga. Sin embargo, en ciertos casos este método de conservación no es aplicado, porque la especie se propaga, en la práctica, vegetativamente (como la mandioca, papa, caña de azúcar, plátanos y bananos) o bien porque sus semillas pierden rápidamente la viabilidad cuando son sometidas a procesos de desecación. A estas semillas se

las denominan "semillas recalcitrantes". Las semillas de numerosas especies que viven en zonas tropicales o subtropicales se incluyen en esta categoría, como por ejemplo las de coco, cacao, frutales tropicales perennes y diversas palmeras.

Otro método de conservación de germoplasma *ex situ*, es mediante el cultivo *in vitro* de tejidos. El descubrimiento de la totipotencialidad de las células vegetales y la posibilidad de desarrollar plantas normales y completas a partir de diferentes explantes, ha permitido pensar en el establecimiento de bancos de germoplasma utilizando el cultivo de tejidos vegetales. Algunos de los primeros estudios sobre el mantenimiento *in vitro* del germoplasma fueron realizados en mandioca en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) y en papa en el Centro Internacional de la Papa (CIP). Recién en 1980 se reconoció el potencial de los métodos del cultivo *in vitro* para la conservación de especies de plantas "difíciles". Este término se refiere a las especies propagadas vegetativamente en forma obligada o que tienen semillas recalcitrantes. En estos casos, la conservación de los genotipos se realiza mediante el mantenimiento de plantas vivas o mediante el cultivo *in vitro* de ápices caulinares o de nudos.

El mantenimiento de los recursos fitogenéticos mediante los métodos del cultivo *in vitro* se logra haciendo cambios en el ambiente de cultivo para desacelerar el crecimiento de las células y de los tejidos. El objetivo es aumentar al máximo el período de transferencia del cultivo. Es esta necesidad la que estimuló algunos de los primeros estudios sobre el mantenimiento *in vitro* del germoplasma de diversas especies. Este método cubre un amplio espectro de técnicas que implican el cultivo, bajo condiciones de asepsia, de órganos o fragmentos de órganos (meristemas, semillas, embriones somáticos, embriones cigóticos, hojas, tallos, raíces, yemas, polen, anteras, callos o protoplastos), en un medio de cultivo artificial definido, bajo condiciones ambientales controladas. Esta técnica ha sido usada para mantener colecciones en crecimiento mínimo, para lo cual se requiere: reducir la temperatura, reducir las condiciones de luminosidad, modificar el medio de cultivo, adicionar al mismo inhibidores osmóticos o re-

tardantes del crecimiento, deshidratadores de tejido o modificar la fase gaseosa del recipiente de cultivo. La modificación de uno o más de estos factores es usada para la conservación de numerosas especies, como por ejemplo para la conservación de microestacas de *Manihot esculenta*; de vástagos de especies de *Fragaria*, *Ipomoea*, *Rubus*, *Musa*, *Saccharum*, *Zingiber*, *Ananas*, *Coffea*, *Dioscorea* y de microtubérculos de *Solanum*. Estas técnicas de almacenamiento se realizan a mediano plazo, es decir, se basan en reducir el metabolismo celular y con ello reducir el crecimiento y el número de subcultivos durante meses hasta un año, sin que ello afecte la viabilidad de los cultivos. En el Laboratorio de Cultivo *in vitro* del Instituto de Botánica del Nordeste (IBONE), en la Facultad de Ciencias Agrarias de la UNNE, desde hace varios años se llevan a cabo experimentos referidos a la conservación de germoplasma de paraíso (*Melia azedarach*). Utilizando como explantes meristemas de clones selectos de paraíso mantenidos durante 12 meses a tasas de crecimiento reducidas (medios de cultivo subóptimos o empobrecidos y en condiciones de oscuridad se logró mantener con éxito y regenerar plantas de paraíso que actualmente se encuentran en evaluación a campo (Fig. 1). Asimismo en el IBONE, se realizan experimentos tendientes a optimizar las técnicas de conservación *in vitro* a largo plazo que consisten en el almacenamiento a temperatura del nitrógeno líquido (-196°C) –crioconservación– con lo cual se consigue la supresión del crecimiento hasta llegar a un estado de "suspensión animada". En el Laboratorio del IBONE se ha logrado con éxito la crioconservación de meristemas de paraíso aplicando la técnica de encapsulación-desidratación (Fig. 1).

Las técnicas de conservación de germoplasma mediante el uso de la crioconservación ofrecen varias ventajas en relación con las técnicas tradicionales de conservación, pues permiten la conservación a largo plazo (años), presenta bajos costos de mantenimiento, una fácil manipulación de las muestras y no dependen del suministro eléctrico.

Desde que en 1968 se informara acerca de la crioconservación de células de lino y luego de los resultados satisfactorios que se obtuvie-

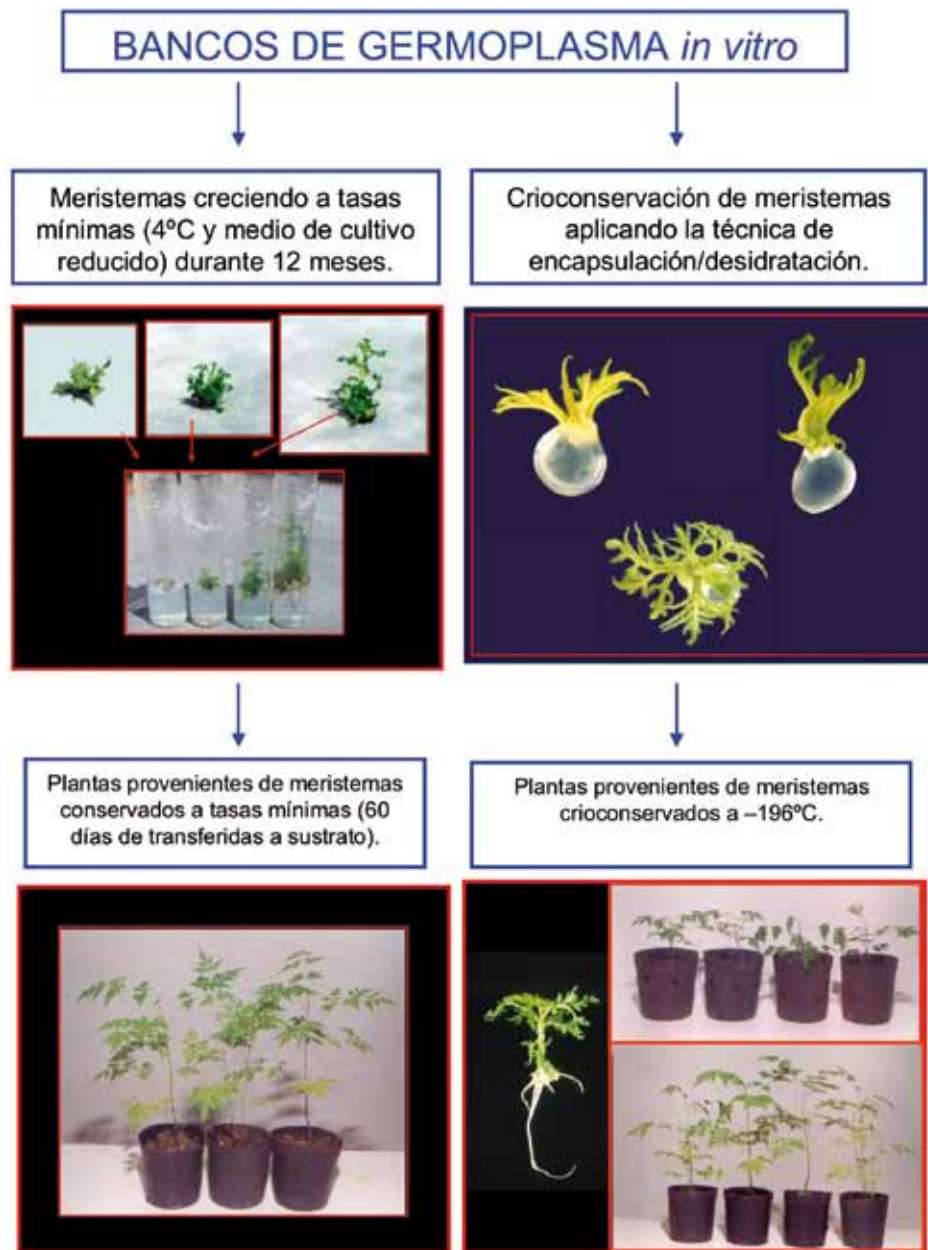


Figura 1: Estrategias para la conservación de germoplasma de paraíso (*Melia azedarach* L.), desarrolladas en el Laboratorio de Cultivo *in vitro* de Tejidos Vegetales. IBONE. Facultad de Ciencias Agrarias. UNNE

ron con la crioconservación de meristemas de frutilla en el Instituto de Biotecnología de Plantas en Sakatoon - Canadá, se iniciaron en 1985 algunas investigaciones colaborativas entre el CIAT y el IPGRI para desarrollar esta técnica con el cultivo de meristemas de mandioca. A partir de estos estudios, numerosos trabajos dan muestra de la importancia de esta técnica, de sus usos y aplicaciones.

La crioconservación consta de siete pasos:

1.- Selección del material a crioconservar:

Cuando se realiza la selección del material a crioconservar, se debe tener la absoluta seguridad de que a partir del mismo se obtienen plantas completas. El explante seleccionado depende del objetivo de conservación y está estrechamente relacionado con el tipo de pro-

pagación de la especie. Por ejemplo en el caso de la mandioca, la cual se propaga principalmente por vía asexual (mediante estacas), se conserva su germoplasma *in vitro* en el CIAT mediante el cultivo de microestacas y también de meristemas con lo cual paralelamente a la conservación se consigue el saneamiento de los cultivares. Además, se están realizando estudios para la crioconservación de meristemas.

2.- Deshidratación:

La deshidratación del explante es un paso crucial para el éxito de la crioconservación, ya que es necesario eliminar toda el agua libre presente en el tejido vegetal, minimizando así las posibles pérdidas por congelación. La deshidratación del tejido puede realizarse en una cámara a 0°C o en cámaras herméticamente cerradas utilizando sustancias higroscópicas como por ejemplo: silica gel, glicerol (5 - 20%), o sometiendo al explante a una corriente de aire en un flujo laminar de aire estéril.

3.- Aclimatación:

La aclimatación se puede realizar en forma rápida o lenta. La aclimatación rápida consiste en colocar el explante directamente en el nitrógeno líquido, con o sin la adición exógena de crioprotectores; mientras que la aclimatación lenta se realiza bajando gradualmente la temperatura (0.1-3°C/min.). Este punto debe ser manejado cuidadosamente pues una deshidratación excesiva de las células puede exponerlas a una alta concentración interna de los solutos. Por esta razón generalmente el material se congela lentamente, a una velocidad adecuada hasta alcanzar una temperatura próxima a los -40°C y luego se lleva a nitrógeno líquido (-196°C).

Para preparar (aclimatar) al explante a las bajas temperaturas se utilizan sustancias crioprotectoras como azúcares (sacarosa, glucosa); alcoholes (glicerol, etilenglicol, manitol y sorbitol), DMSO, PVP, o también pueden utilizarse soluciones de vitrificación, que son una combinación de crioprotectores tal como el PVS2. Tanto los crioprotectores como las soluciones de vitrificación actúan fundamentalmente como agentes anti-congelantes, aumentan-

do la viscosidad del tejido vegetal y reduciendo la permeabilidad de las células.

4.- Almacenamiento:

De acuerdo al material vegetal que se utilice, se presentan dos grandes sistemas:

-**Sistemas Secos:** comprende todos aquellos tejidos vegetales endógenamente resistentes y tolerantes a las bajas temperaturas y a la deshidratación.

-**Sistemas Hidratados:** son todos aquellos tejidos vegetales no tolerantes a las bajas temperaturas y a la deshidratación por lo que se requiere una protección exógena. Esta protección puede estar dada por el uso de crioprotectores o bien por la utilización de soluciones de vitrificación.

Los sistemas secos, por ser más resistentes necesitan menor preparación para su almacenamiento y comprende aquellas especies que habitan zonas frías y/o templadas. En cambio, los sistemas hidratados son más susceptibles al frío y están representados por todas aquellas especies que habitan zonas tropicales y subtropicales, las cuales no están adaptadas para soportar temperaturas inferiores a 0°C, por este motivo estos tejidos deben ser protegidos exógenamente mediante el uso de crioprotectores.

5.- Descongelamiento y Rehidratación:

Cuando se desea recuperar al explante del nitrógeno líquido, se puede realizar un descongelamiento rápido a Baño María (generalmente 1-2 min. a 30 ó 40°C) o en forma lenta sometiendo al explante a temperatura de laboratorio o a una corriente de aire en el flujo laminar de aire estéril.

6.- Test de Viabilidad:

Los tests de viabilidad nos permiten comprobar las zona/s del tejido que ha/n muerto y cual/es ha/n sobrevivido al frío. La evaluación de la viabilidad puede llevarse a cabo en forma visual, realizando el recultivo y determinando la capacidad de regeneración, utilizando TTC que colorea el tejido que ha sobrevivido a la crioconservación; o midiendo la conductividad

eléctrica, que permite estimar el daño producido en las membranas celulares.

En la última década, han surgido numerosas técnicas que combinan el uso de crioprotectores y de soluciones de vitrificación con técnicas de deshidratación y encapsulación, las cuales

básicamente pueden resumirse en técnicas de:

- Encapsulación-Deshidratación
- Vitrificación
- Encapsulación-Vitrificación
- Desección
- Precultivo

Técnica Empleada	Explant y Especie
Encapsulación-Deshidratación	Suspensiones celulares de <i>Catharanthus roseus</i> . Meristemas de 125 variedades de <i>Solanum spp.</i> Meristemas de <i>Dioscorea alata</i> , <i>Malus domestica</i> , <i>Pyrus spp.</i> y <i>Morus spp.</i> Ápices de <i>Pyrus spp.</i> , <i>Malus spp.</i> , <i>Saccharum spp.</i> y <i>Solanum tuberosum</i> Ápices caulinares de <i>Camellia japonica</i> , <i>Coffea racemosa x Coffea sessiliflora</i> , <i>Citrus spp.</i> y de <i>Saccharum spp.</i> Embriones somáticos de <i>Elaeis guineensis</i> .
Vitrificación	Células nucleares de <i>Citrus sinensis</i> . Líneas celulares embriogénicas de <i>Pinus silvestris</i> . Suspensiones celulares y callos embriogénicos de <i>Gossypium hirsutum</i> . Meristemas de <i>Pyrus communis</i> , <i>Malus spp</i> y de <i>Pyrus spp.</i> , <i>Ipomoea batata</i> , <i>Manihot esculenta</i> (15 genotipos), <i>Prunus spp.</i> , y de <i>Solanum spp.</i> Meristemas, polen y anteras de <i>Arachis hypogaea</i> . Ápices de <i>Ananas comosus</i> , <i>Colocasia esculenta</i> . Yemas adventicias de <i>Guazuma crinita</i> Mart., <i>Populus alba</i> . Semillas de <i>Bletilla striata</i> Semillas y protocormos de <i>Dendrobium candidum</i> . Suspensiones celulares embriogénicas de <i>Oryza sativa</i> . Embriones somáticos de <i>Abies cephalonica</i> Semillas, embriones cigóticos, polen, anteras y suspensiones celulares de <i>Triticum spp.</i>
Encapsulación Vitrificación	Meristemas, segmentos nodales, segmentos de raíz y yemas adventicias de <i>Guazuma crinita</i> , y de <i>Fragaria x ananassa</i> . Ápices de <i>Dyanthus cariophyllus</i> , <i>Azoreum rusticana</i> , <i>Lilium spp.</i> y de <i>Wasabia japonica</i>
Desección	Meristemas de <i>Morus spp.</i> Embriones somáticos de <i>Cucumis melo</i> , y de <i>Elaeis guineensis</i> Embriones somáticos y ejes embriogénicos de <i>Camellia japonica</i> . Ejes embriogénicos de <i>Junglans cinerea</i> . Ejes embriogénicos y semillas de <i>Gossypium hirsutum</i> . Semillas de <i>Pinus silvestris</i> , y de <i>Apium graveolens</i>
Precultivo	Meristemas de <i>Musa spp.</i> Embriones cigóticos de <i>Triticum aestivum</i> , <i>Phaseolus vulgaris</i> y <i>Oryza spp.</i> Polen y anteras de <i>Oryza spp</i> Líneas celulares y callos de <i>Oryza sativa</i> .
Precultivo Desección	Embriones somáticos de <i>Phoenix dactylifera</i> , <i>Coffea spp.</i> , <i>Pyrus spp.</i> , <i>Cucurbitaspp.</i> , <i>Cocos nucifera</i> , y de <i>Elaeis guineensis</i> (aplicada como rutina a 80 clones). Embriones cigóticos y microestacas de <i>Asparagus officinalis</i> .
Gotita Congelada	Ápices de 150 variedades de <i>Solanum tuberosum</i> .

Cuadro N° 1: Utilización de técnicas de crioconservación en diferentes explantes de algunas especies de interés agronómico.

- Precultivo-Dsecación
- Gotita Congelada.

En el Cuadro N° 1 se detallan las especies y explantes en los cuales cada una de estas técnicas ha sido empleada con resultados satisfactorios.

Encapsulación-Deshidratación:

La técnica de encapsulación-deshidratación esta basada en el desarrollo de la metodología aplicada a las semillas sintéticas, en la cual un explante es recubierto por una matriz de alginato de sodio y polimerizado en una solución de cloruro de calcio formando un gel alrededor del explante de alginato de calcio. Una vez llevada a cabo la encapsulación, se realizan pre-tratamientos generalmente con sacarosa (desde 0.3 hasta 1.5M), que actúa como crioprotector del explante. En especies tolerantes al frío, la exposición de las plantas madres a bajas temperaturas durante varias semanas previas a la criopreservación, incrementa la supervivencia.

La deshidratación puede llevarse a cabo sometiendo las cápsulas de alginato (conteniendo a los explantes) a una corriente de aire en el flujo laminar o exponiéndolas en cámaras herméticamente cerradas con silica gel. Las cápsulas así deshidratadas pueden ser llevadas directamente a inmersión en nitrógeno líquido o bien a un descenso lento de temperatura.

Vitrificación:

Esta técnica, involucra el pre-tratamiento de las muestras con soluciones de vitrificación. Ejemplos de estas soluciones muy utilizadas en el mundo son el PVS2 o bien otra compuesta por 40% etilenglicol, 15% sorbitol y 6% albúmina sérica bovina.

Luego de la exposición a las soluciones de vitrificación (generalmente a una temperatura de 0°C para disminuir los riesgos de fitotoxicidad), las muestras pueden ser sumergidas directamente en nitrógeno líquido o llevadas a un descenso lento de temperatura. Las soluciones crioprotectoras usadas en los protocolos de vitrificación, son generalmente tóxicas para las células y el tiempo de exposición a la solución

debe estar relacionado con el tamaño del explante y la misma debe ser removida rápidamente luego del descongelado.

Encapsulación-Vitrificación:

La técnica de encapsulación-vitrificación, es una combinación de las técnicas de encapsulación-deshidratación y vitrificación. Las muestras son encapsuladas en alginato de calcio y sometidas a vitrificación durante el enfriamiento. Comparada con la técnica de encapsulación-deshidratación tiene un 30% más de supervivencia. Esto puede explicarse debido a que las cápsulas de alginato de calcio reducen la toxicidad de las soluciones de vitrificación.

Dsecación:

La técnica de dsecación es un proceso muy simple que sólo requiere la deshidratación del material vegetal, la cual es crucial para el éxito de la crioconservación. Esta técnica consiste en someter al explante a una corriente de aire en un flujo laminar o en cámaras herméticamente cerradas conteniendo silica gel; luego de lo cual se realiza un enfriado rápido, sumergiendo el material directamente en nitrógeno líquido.

Precultivo:

La técnica del pre-cultivo, involucra la incorporación de crioprotectores (durante distintos tiempos que dependen del explante) antes del enfriamiento; como por ejemplo la adición de altas dosis de sacarosa para la crioconservación de meristemas de *Musa spp.*; la utilización de PEG y DMSO en embriones cigóticos de *Triticum aestivum* y *Phaseolus vulgaris*; la utilización de sacarosa y DMSO o glicerol en semillas, embriones cigóticos, polen y anteras de *Oryza spp.* y la utilización de ácido abscísico para la conservación de líneas celulares y de callos de *Oryza sativa*.

Precultivo-Dsecación:

Esta técnica es una combinación de dos técnicas descritas anteriormente. Las muestras son tratadas con crioprotectores, parcialmente dsecadas y luego sometidas a enfriamiento rápido o lento. Generalmente en el precultivo se

emplean azúcares (sacarosa, glucosa) y con un tiempo de duración variable desde horas como en el caso de la conservación de embriones maduros de *Cocos nucifera*, en el cual el pre-cultivo tuvo una duración de 11-20 hs., hasta 7 días como fue aplicado con éxito en embriones somáticos de *Elaeis guineensis*.

Gotita Congelada:

La técnica de la microgota congelada ha sido aplicada con éxito en ápices de *Solanum tuberosum*, la misma consiste en pretratar (2-3 hs) con DMSO en medio líquido y formar una microgota (2.5 µl) la cual se suspende sobre papel de aluminio y se la lleva a inmersión directa en nitrógeno líquido. Este procedimiento es una adaptación de la técnica clásica desarrollada para meristemas de mandioca.

Esta técnica ha sido satisfactoriamente aplicada en 150 variedades de *Solanum tuberosum* con un porcentaje de supervivencia del 40%.

Conclusiones:

Los recursos fitogenéticos constituyen un reservorio de información genética imprescindible para la solución de muchos de los problemas a los que se enfrenta la agricultura. Los métodos para asegurar su conservación son diversos y cada uno de ellos posee sus ventajas e inconvenientes. Por ello, se considera que el conjunto de técnicas de conservación *in situ* y *ex situ*, son métodos complementarios, no excluyentes, para lograr el objetivo común de preservar los recursos fitogenéticos, como parte esencial de una estrategia global para la conservación de la biodiversidad.

En la última década se han producido avances significativos en el desarrollo de técnicas *in vitro* de conservación. La disponibilidad de bancos de germoplasma *in vitro*, tanto en condiciones de crecimiento lento como la conservación a temperaturas ultrabajas (crioconservación), han contribuido a dicho avance. Algunos ejemplos de conservación de germoplasma en crecimiento lento son usados como rutina en Centros Internacionales, como por ejemplo, para la conservación de germoplasma de mandioca en el CIAT Cali, Colombia y para la conservación de germoplasma de papa en el CIP (Centro Internacional de la Papa) en Perú. Además, es

importante resaltar que las técnicas de crioconservación ofrecen una alternativa muy valiosa cuando se piensa en conservar los recursos fitogenéticos por tiempo ilimitado (años), si bien hasta el momento solo se aplica como rutina para la conservación de líneas celulares en laboratorios de investigación y para la conservación de algunos genotipos pertenecientes a los géneros *Rubus spp.*, *Pyrus spp.*, *Solanum spp.* y *Elaeis guineensis*.

Lecturas Recomendadas:

- Engelmann, F. 1997. Status report on the development and application of *in vitro* techniques for the conservation and use of plant genetic resources. Engelmann, F. (ed.) IPGRI :1-63.
- Engelmann, F. and H. Takagi. 2000. Cryopreservation of tropical plant germoplasm. Current research progress and application. Engelmann, F. and H. Takagi (eds.) JIRCAS-IPGRI pp 496.
- Mroginski, L.A., W.M. Roca, K.K. Kartha. 1991. Criopreservación del Germoplasma. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca W. M. y L. A. Mroginski (eds.) CIAT (32):715-730.
- Roca, W.M., D.I. Arias y R. Chávez. 1991. Métodos de conservación *in vitro* de germoplasma. En: Cultivo de tejidos en la agricultura. Fundamentos y aplicaciones. Roca, W.M. y L.A. Mroginski (eds.) CIAT (31):697-714.

PARTE V
***Ejemplos de aplicaciones
de la biotecnología vegetal***

V. CAPÍTULO 1

Aportes de la citogenética al estudio de genomas vegetales

Lidia Poggio, González Graciela,
Ferrari María Rosa, García Ana María,
Wulff Arturo, Greizerstein Eduardo,
Tómas Pablo y Schrauf Gustavo.

Dedicado a la memoria del Dr. Carlos Alberto Naranjo.

1.- Introducción

La Citogenética fue definida como la disciplina que estudia el comportamiento y la estructura de los cromosomas y su relación con la transmisión y recombinación de los genes. La citogenética clásica proporciona diferente nivel de análisis que la citogenética molecular, y ambas contribuyen a los estudios taxonómicos, evolutivos y de genómica estructural y funcional, aplicables en procesos de mejoramiento genético convencionales o biotecnológicos.

Los principales estudios de la citogenética clásica se basan en la determinación de las características del cariotipo y la identificación cromosómica mediante técnicas de tinción convencionales y bandeo cromosómico. También, se evalúa el tamaño del genoma y se analiza el comportamiento meiótico de los cromosomas en razas, especies, híbridos y poliploides.

Los estudios citogenéticos permiten analizar la presencia de cromatina introgresante en cultivos y especies naturales, contribuyendo al estudio de la transferencia de genes en programas de mejoramiento. En el área agronómica, por ejemplo, facilitaron la construcción de valiosos stocks de trigo como monosómicos, ditelosómicos, dobles ditelosómicos, nulisómicos y líneas con deleciones que fueron útiles para realizar estudios genéticos y mapas físicos.

En planes de conservación de la biodiversidad la citogenética evalúa los daños genéticos que los taxones puedan sufrir por el sistema de preservación de las semillas o por el impacto de la polución ambiental.

Las técnicas de citogenética molecular (hibridación *in situ*) combinan información citológica clásica con información molecular de las

secuencias y permiten realizar estudios de mapeo y de distribución física de secuencias, analizar relaciones evolutivas entre especies y estudiar la organización del genoma y la arquitectura nuclear. Los resultados que se obtienen mediante la aplicación de estas técnicas facilitan estudios de sistemática, filogenia, biodiversidad, evolución, mejoramiento y biotecnología.

Las técnicas de hibridación *in situ* (ISH) se refieren al FISH (Fluorescent *In Situ* Hybridization) o GISH (Genomic *In Situ* Hybridization), según que se utilicen como sonda secuencias particulares o ADN genómico total, respectivamente, y serán explicadas en el apartado 5 de éste capítulo.

Resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, que se expondrán en el presente capítulo, ejemplifican como la citogenética permite profundizar en el conocimiento del origen y evolución de cromosomas y genomas completos, localizar genes o regiones cromosómicas de interés agronómico y resolver problemas sistemático-evolutivos. Estos aportes contribuyen al desarrollo de programas de conservación de recursos genéticos y biodiversidad.

2.- Análisis del cariotipo

El complemento cromosómico de una especie, o cariotipo, se refiere a la apariencia fenotípica de los cromosomas en metafase mitótica tomando en cuenta las siguientes características:

- Número básico (x), número gamético (n) y número somático (2n).
- Tamaño absoluto y relativo de los cromosomas.
- Posición de los centrómeros.
- Número, tipo y posición de las regiones organizadoras del nucleolo.
- Cantidad y distribución de heterocromatina (detectada por bandeo cromosómico).
- Tamaño del genoma.
- Identificación cromosómica mediante la localización física de secuencias (FISH).

El número básico (x), es el número menor de cromosomas necesario para que el organismo sea viable y representa el mínimo de cromosomas de una serie poliploide. El número ga-

mético (n), es el número de cromosomas que llevan las gametas y puede coincidir o no con el número básico, de acuerdo con el nivel de ploidía de la especie que se trate. El número somático ($2n$), es el número de cromosomas que llevan las células somáticas.

Las características del cariotipo son generalmente constantes en un grupo de especies y aún de géneros, pero a menudo ocurren variaciones estructurales y/o numéricas que pueden cambiar el número, tamaño y posición centromérica de los cromosomas y concomitantemente, la simetría del cariotipo.

Los principales rearrreglos cromosómicos responsables de las diferencias cariotípicas entre grupos taxonómicos pueden modificar la forma de los cromosomas sin cambiar su número como, por ejemplo, translocaciones, inversiones pericéntricas no simétricas, duplicaciones y deficiencias. También ocurren rearrreglos que modifican tanto la forma como el número y tamaño de los cromosomas sin alterar la información genética, como las fusiones y las fisiones cromosómicas. Estos cambios se denominan dispoloides, a diferencia de los aneuploides que producen pérdida o ganancia de cromosomas enteros. Por ejemplo, en la familia Asteraceae el número básico ancestral es $x = 9$, pero hay géneros en la tribu Astereae con grupos de especies que tienen $x = 8, 6, 5$ y 4 , originadas por cambios dispoloides. Si estos rearrreglos, en condición heterocigota, poseen menor valor adaptativo que en condición homocigota, estos últimos se pueden fijar en poblaciones pequeñas con elevada endocría, dando lugar a procesos de especiación cromosómica.

El número cromosómico también puede variar por poliploidía manteniéndose constante el número básico. El trigo ($x=7$) ejemplifica una serie poliplóide compuesta por especies con $2n=14, 28$ y 42 .

En la familia Fabaceae los procesos de dispoloidía creciente y decreciente, tanto a nivel diploide como poliploide originaron números básicos secundarios y series poliploides modificadas.

Las fusiones y fisiones cromosómicas, así como hibridación entre taxones con distinto número cromosómico, tanto a nivel diploide

como poliploide serían, en muchos casos, la causa del surgimiento de nuevos números básicos. *Brassica napus* ($2n=38$) posee un número básico derivado ($x=19$) y se originó por el cruzamiento entre *B. campestris* ($x=10$) y *B. oleracea* ($x=9$) y posterior poliploidización.

Es interesante destacar que los rearrreglos estructurales mencionados, al modificar la posición de los genes, pueden cambiar también la funcionalidad de éstos aunque no se detecten cambios notorios en la morfología del cariotipo.

Distintas especies pueden estar aisladas reproductivamente si el híbrido entre ellas posee rearrreglos en condición heterocigota que ocasionen disturbios en el apareamiento meiótico, que determinen esterilidad. Estas especies pueden poseer pocas diferencias a nivel bioquímico, molecular o morfológico pero sus diferencias cromosómicas las mantendrían aisladas reproductivamente (especies crípticas).

Cuando se realizan estudios cromosómicos comparados no hay leyes o principios que permitan inferir características ancestrales o derivadas del cariotipo, ya que se pueden encontrar grandes diferencias cariotípicas entre especies relacionadas. Estas variaciones son dinámicas y no están relacionadas con complejidad genética u orgánica.

Un análisis más preciso de la variación cariotípica se obtiene empleando técnicas de bandeo cromosómico (C o DAPI, entre otros) que revelan secuencias de ADN altamente repetidas y regiones organizadoras del nucléolo, las que pueden utilizarse como marcadores cromosómicos. La heterocromatina constitutiva es un componente aditivo del genoma y presenta, en muchos grupos, variación intra e interespecífica, la cual puede revelarse por las diversas técnicas de bandeo cromosómico. Aunque las regiones heterocromáticas no contienen genes activos podrían tener importancia en eventos regulatorios y en el desarrollo y la disposición espacial de los cromosomas en el núcleo (Figura 1 A y B).

Las técnicas de bandeo cromosómico ofrecen marcadores que permiten identificar genomas y/o cromosomas, sin embargo no es posible conocer las secuencias comprendidas en dichos marcadores. Por lo tanto, las bandas C que son similares en tamaño y posición pueden

diferir en la composición de sus secuencias, las cuales pueden ser discriminadas utilizando técnicas de hibridación *in situ* (Figura 2 E y F).

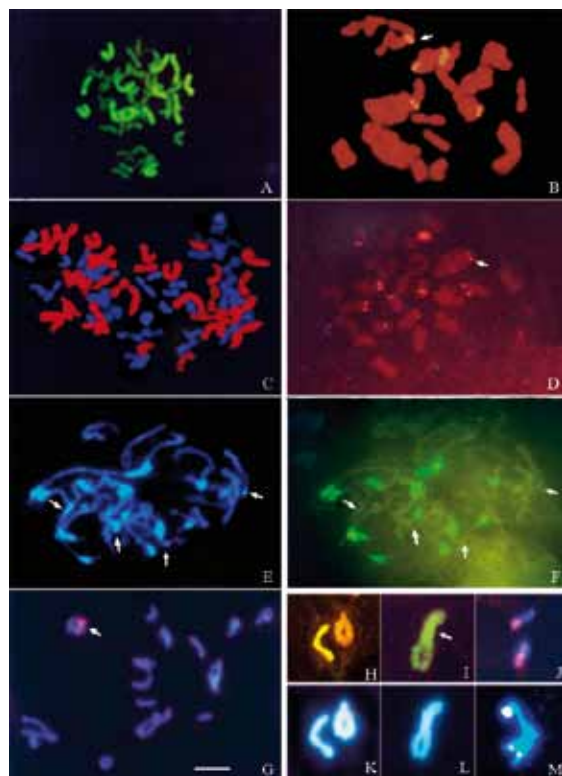


Figura 1: **A:** Bando C en Metafase mitótica de *Z. m. ssp. mexicana*. La flecha indica una banda C. **B:** Bando DAPI en centeno. La flecha muestra una banda de heterocromatina telomérica. **C:** Dos grupos de 5 bivalentes Diacinesis de maíz. **D:** Cromosoma B. N: nucleolo. **E:** Configuración meiótica en Diacinesis de maíz x *Z. perennis* (F1), se observan 5 I + 5 II + 5 III y agrupación espacial de los II. I: univalentes, II: bivalentes y III: trivalentes. **F:** Dos grupos asincrónicos de 5 II cada en Anafase I de maíz. **G:** Puentes y fragmentos en Anafase I de tricepuro. Las flechas muestran los fragmentos y las cabezas de flecha indican los puentes. **H:** Asociación secundaria de bivalentes en Metafase I de *Senecio madagascariensis*. La flecha muestra dos II agrupados. **I:** Desinapsis en Profase I de *Z. luxurians* x *Z. m. ssp. mexicana* (F1). N: nucleolo. Barra: 10 μ m en Fig. A-F y H. Barra: 3 μ m en Fig. G.

3.- Contenido de ADN. Variación intra e interespecífica en el tamaño del genoma

El contenido de ADN se evalúa en general por microdensitometría con tinción de Feulgen o por citometría de flujo. Se denomina “valor-

C” al contenido de ADN del gameto haploide y “2C” a la cantidad de ADN genómico que se encuentra en el núcleo de células somáticas no replicadas.

Dado que la poliploidia es un importante modo de especiación y muchas plantas consideradas diploides (maíz, *Arabidopsis*) han mostrado ser poliploides antiguos, los terminos “valor C” y tamaño del genoma pueden resultar ambiguos en estos casos. En un diploide ambos términos serían sinónimos. Sin embargo, en un poliploide el “valor C” representa el contenido de ADN de todos los genomas ancestrales que lleva el núcleo gamético. En estos casos es necesario conocer el contenido de ADN del genoma básico “Cx” ya que la poliploidía sólo aumenta el “valor C” pero no el “Cx”. Lo esperado en un poliploide es que el “valor C” aumente en forma directa con el nivel de ploidía y que el “Cx” permanezca constante. Sin embargo, en muchos poliploides se observó que el “Cx” tiende a disminuir a medida que aumenta el nivel de ploidía. Esto sugiere que ocurre disminución del tamaño del genoma luego de la formación del poliploide y que este fenómeno podría estar relacionado con el proceso de diploidización cromosómica y genómica.

Las principales causas de variación (intra o interespecífica) del contenido de ADN, descartando la variación en el nivel de ploidía, son: aneuploidía, polimorfismo numérico para cromosomas accesorios (cromosomas B), reestructuraciones cromosómicas con pérdida o duplicación de material genético y variación en el número de copias de secuencias no codificantes.

El tamaño del genoma es muy variable entre grupos de plantas. En Angiospermas oscila entre 0,05 pg en *Cardamine amara* y 127,4 pg en *Fritillaria assyriaca*, variación que no se encuentra necesariamente relacionada con nivel de ploidía. La variación del tamaño del genoma se encuentra, a grandes rasgos, relacionada con diferencias en la complejidad orgánica, los virus, por ejemplo, tienen genomas más pequeños que las bacterias y éstas a su vez menores que los eucariotas. Sin embargo, en organismos superiores se encontró que el aumento en el valor C no es explicable por la

existencia de mayor número de genes funcionales, ya que el contenido de ADN de un alga unicelular puede ser igual al de una angiosperma leñosa. Esta “paradoja del valor-C” fue resuelta cuando estudios moleculares mostraron que gran parte del genoma consiste en ADN repetido que tiene el potencial de cambiar rápidamente en número de copias y alterar el tamaño del genoma en respuesta a eventos bióticos y abióticos. Actualmente, está demostrado que cambios en el tamaño del genoma involucran pérdida o ganancia de secuencias repetidas (elementos transponibles, retroelementos, microsátélites, macrosátélites, etc). Estas se localizan en regiones intergénicas y pueden estar dispersas en el genoma o en arreglos en *tandem*. Aunque los elementos transponibles son transcripcionalmente inactivos pueden activarse en condiciones de variación o estrés ambiental. El estrés genómico producido por la hibridación interespecífica y la poliploidización, en la naturaleza o como consecuencia de prácticas de mejoramiento, puede, en algunos casos, producir la amplificación de elementos transponibles.

En general, la relación “ADN génico, no génico” disminuye con el aumento del tamaño del genoma y en algunas Angiospermas con elevado contenido de ADN las secuencias repetidas pueden representar hasta el 90% del ADN total. Esta relación plantea interrogantes acerca del origen y función del ADN repetido no codificante. Se han analizado las relaciones que existen entre el contenido de ADN y algunas características celulares y orgánicas, denominándose parámetros nucleotípicos a aquellos aspectos del ADN nuclear que afectan al fenotipo independientemente del ADN codificante. En varios grupos de plantas se ha observado que las variaciones en el contenido de ADN nuclear están correlacionadas positivamente con: volumen y/o longitud cromosómica, área y/o volumen celular, porcentaje de heterocromatina, longitud del complejo sinaptonémico, duración del ciclo mitótico y meiótico, latitud y altitud de crecimiento. Se han encontrado datos que permiten suponer que diferencias en el tamaño del genoma poseen significado adaptativo en la evolución, diversificación y adaptación a distintos ambientes. Algunos autores postulan que

existen mecanismos moleculares que generan ADN repetido no codificante que actúa como mutágeno y/o agente regulador.

La variación intraespecífica en el contenido de ADN es aún un tópico discutido aunque existen casos, como el del género *Zea*, donde ha sido demostrada inequívocamente. En maíz (*Zea mays* ssp. *mays*) las diferencias en el tamaño del genoma radican, principalmente, en el número de cromosomas accesorios (cromosomas B) y en el contenido de heterocromatina de los cromosomas del complemento regular, que está representada en gran parte por bloques heterocromáticos denominados “knobs”. Estudios citogenéticos clásicos realizados, por nuestro grupo de investigación en razas nativas del Noroeste argentino (NOA), revelaron la existencia de una correlación positiva entre cromosomas B y altitud de cultivo, sugiriendo un significado adaptativo para estos cromosomas accesorios. Además, el análisis de la variabilidad microsatélite en estas razas de maíz confirmó la participación de fuerzas selectivas en el mantenimiento de la correlación descripta.

La presencia de cromosomas accesorios, que son heterocromáticos, no codificantes y sin funciones vitales para el organismo, son frecuentes en razas nativas de plantas cultivadas tales como maíz y centeno. El modo particular de herencia de estos cromosomas, con mecanismos de impulso que hacen que se hereden con mayor frecuencia que la esperada por herencia mendeliana, abre un nuevo campo de investigación en lo que se refiere a su utilización como portadores de genes útiles en programas de mejora.

Es interesante señalar que no hay relación entre especiación y contenido de ADN. Por ese motivo se postuló que la especiación dependía fundamentalmente de cambios en los genes codificantes. Sin embargo la genómica comparativa ha revelado constancia en estos genes informacionales. En las gramíneas, por ejemplo, el contenido de genes y el orden de los mismos están altamente conservados, mientras que la cantidad de ADN repetido ha cambiado considerablemente. Estos hallazgos llevan a investigar el rol de las secuencias de ADN repetido en los procesos de especiación.

4.- Análisis meiótico en híbridos y poliploides

Una especie diploide con reproducción sexual es fértil si posee un comportamiento meiótico normal, o sea buen apareamiento entre cromosomas homólogos, el cual se ve reflejado en la formación de bivalentes (II) en meiosis (Profase I). Ello determina que exista buena segregación y formación de gametos balanceados y fértiles. El grado de apareamiento meiótico es una medida de la homología que existe entre los cromosomas. Por lo cual la homología genómica entre dos entidades puede evaluarse estudiando el comportamiento meiótico de sus híbridos F1. Si el híbrido analizado posee formación de II y es fértil se puede concluir que hay afinidad (homología) entre sus genomas parentales. Sin embargo, podría ocurrir que aunque las especies parentales tuvieran una elevada homología en cuanto a las secuencias de ADN, los híbridos fueran estériles, con formación de univalentes (I) en su meiosis. Esta esterilidad podría deberse a la acción de genes que interfieren con el proceso normal de apareamiento (formación del complejo sinaptonémico, ocurrencia y/o posición de sobrecruzamientos) o que alteran la disposición espacial de los genomas en el núcleo provocando, de esta manera, asinapsis o desinapsis (Figura 1F). La esterilidad podría deberse también al comportamiento meiótico irregular causado por diferencias en rearrreglos estructurales entre las especies progenitoras de un híbrido. Por lo tanto, si el híbrido entre dos taxones es estéril habrá que analizar si el aislamiento reproductivo postcigótico obedece a causas génicas o cromosómicas. Si las causas fueran cromosómicas se observaría formación de I y el poliploide derivado tendría meiosis regular con formación de II. Configuraciones meióticas anormales como I, II heteromórficos o multivalentes en Profase-Metafase I (Figuras 1D y 2G) y, en estadios posteriores (puentes, fragmentos, cromosomas con cromátidas desiguales, micronúcleos, etc.), pueden deberse a heterocigosis para distintos tipos de rearrreglos estructurales (Figura 2F). Si la esterilidad fuese de origen génico podrían observarse disturbios meióticos de distinto tipo como asinapsis, desinapsis, alteración en la formación del huso,

etc.; los cuales se observarían también en el poliploide derivado. En estos casos la meiosis irregular y la esterilidad no estarían reflejando necesariamente falta de homología entre genomas parentales. Por lo antes mencionado se deduce que el grado de irregularidades meióticas observadas en el híbrido sería una estimación de diferencias génicas y/o estructurales que poseen las entidades progenitoras.

Un fenómeno frecuente en híbridos diploides entre distintas especies es que, aunque presenten formación regular de bivalentes y desarrollo normal de los estados II de la meiosis, posean elevada esterilidad. Podemos encontrar ejemplos de este fenómeno en híbridos entre distintas especies de los géneros *Amaranthus*, *Prosopis*, *Hypochaeris* y *Bromus*, entre otros. Stebbins (1971) ha denominado a este fenómeno "hibridez estructural críptica" que puede ocurrir cuando las especies progenitoras se diferencian en pequeños rearrreglos estructurales. En estos casos si bien se forman bivalentes, se segregan combinaciones génicas inviables a los gametos. Esto indica que la formación de bivalentes no se debe necesariamente a que los genomas parentales que conforman un híbrido interespecífico sean homólogos.

El estudio meiótico de híbridos entre taxones con distinto nivel de ploidía aporta mayor información que el realizado en híbridos diploides. En la naturaleza podemos encontrar auto y alopoliploides. En los autopoliploides recientes se espera una elevada frecuencia de multivalentes mientras que en los alopoliploides ésta depende de si se trata de alopoliploides típicos (formados por hibridación entre especies con genomas muy diferentes y posterior autoduplicación) o alopoliploides segmentarios (originados por hibridación entre especies muy afines y posterior autoduplicación). Las configuraciones meióticas (frecuencia de I, II y multivalentes) permite estudiar la relación entre los genomas parentales de un alopoliplóide. Sin embargo, el apareamiento cromosómico en poliploides puede estar afectado por factores que aumentan o disminuyan la frecuencia de multivalentes, independientemente de la afinidad de los genomas, como por ejemplo, genes similares al gen *Ph* de trigo, que inhiben el apa-

reamiento homeólogo, o genes que afectan la sinapsis y la frecuencia y/o localización de sobrecruzamientos.

En el género *Zea* el análisis de las asociaciones meióticas en especies e híbridos ha revelado la naturaleza alotetraploide del maíz ($2n=20$) y de sus especies silvestres relacionadas (teosintes), con un número básico $x=5$. Las especies con $2n=20$ presentan 10 II en Profase-Metáfase I, mientras que *Zea perennis* ($2n=40$) muestra, con frecuencia elevada, 5 IV + 10 II. En híbridos con $2n=30$ cromosomas (*Z. diploperennis* ($2n=20$) x *Z. perennis*, *Z. luxurians* ($2n=20$) x *Z. perennis* ($2n=40$) y *Z. mays* ssp *mays* x *Z. perennis*), realizados artificialmente por nuestro grupo de investigación, la configuración meiótica observada mas frecuentemente fue 5 III + 5 II + 5I. Estas configuraciones meióticas indicaron la presencia de dos genomas ancestrales (A y B), de 5 cromosomas cada uno, y permitieron postular las fórmulas genómicas para los taxones de *Zea* con $2n=20$ (AxAx BxBx), para *Zea perennis* (ApApAp'Ap' Bp1Bp1 Bp2Bp2) y para los híbridos $2n=30$ (ApA'pAx BpB'p Bx). Nuestro grupo de investigación ha encontrado además, en teosintes, razas nativas de maíz e híbridos con $2n=20$, formación frecuente de dos grupos de 5 II cada uno, muchas veces asociados a husos acromáticos distintos. Este doble huso sería una evidencia de la existencia de genomas ancestrales con 10 cromosomas cada uno. Este fenómeno está asociado a una leve asincronía de los dos grupos de 5 II durante el desarrollo meiótico (Figura 1E). Este fenómeno ha sido observado con alta frecuencia en líneas aloplásmicas obtenidas por nuestro grupo de trabajo cruzando maíz como progenitor masculino y teosinte (*Z. mays* ssp. *mexicana*) como progenitor femenino. Estas líneas aloplásmicas presentaron comportamiento meiótico regular con formación de 10 II que se distribuyeron en dos grupos de cinco II cada uno. Esto sugiere que la interacción "citoplasma de teosinte-núcleo de maíz" influencia la distribución espacial de los cromosomas en el núcleo promoviendo la separación de los dos genomas ancestrales de 10 cromosomas cada uno. La presencia de dos grupos asincrónicos de 5 II cada uno permitió inferir la naturaleza

poliplóide de *Zea* (Figura 1E). En *Zea* y otros poliploides como *Senecio* se observó asociación secundaria de II, sugiriendo la existencia de homeología entre los genomas ancestrales.

En el presente apartado se ha ejemplificado cómo el análisis meiótico permite dilucidar el origen y postular los modos de especiación de algunas especies. Además de la utilidad en estudios taxonómicos y evolutivos, el conocimiento de la meiosis es de importancia fundamental en estudios aplicados, ya que en la producción de híbridos o poliploides de importancia agronómica se debe lograr un máximo de fertilidad y esto está relacionado con el comportamiento cromosómico durante la formación de sus gametos.

5.- Citogenética molecular

La Citogenética Molecular (ISH: Hibridación *In Situ*) combina información acerca de la morfología nuclear o cromosómica con la información molecular de las secuencias, y permite realizar estudios de mapeo y de distribución física de las mismas, analizar relaciones evolutivas entre especies y estudiar la organización del genoma y la arquitectura nuclear. Por lo tanto la citogenética molecular aporta importantes resultados a los estudios de sistemática, filogenia, biodiversidad, evolución, mejoramiento y biotecnología.

Las técnicas de ISH consisten en hibridar cromosomas con secuencias de ADN marcadas con fluorocromos. Estas técnicas, aplicadas desde 1969, utilizaban métodos de marcación y detección radioactivos. En plantas, se comenzaron a aplicar a fines de la década del 80 debido a la gran disponibilidad de secuencias clonadas para ser utilizadas como sonda, y a los nuevos sistemas no radioactivos de marcación y detección. Esta metodología es útil en estudios de la estructura, función, organización y evolución de los genomas y permite conocer su composición, a nivel de secuencias. Para realizar esta técnica se pueden utilizar una gran variedad de sondas: desde ADN genómico total (GISH: Hibridación *In Situ* Genómica), hasta secuencias específicas FISH (Hibridación *In Situ* Fluorescente), tales como sondas de cromosomas individuales o fragmentos cromosómicos (obtenidas por microdissección), secuencias de ADN repetido en

tandem, retrotransposones, secuencias de genes únicos o de bajo número de copias.

Una de las aplicaciones del FISH es la obtención de mapas físicos, funcionales y estructurales de los genomas, mediante la localización cromosómica de secuencias de distinto origen. El análisis de la localización de secuencias diversas permite identificar cromosomas, analizar la arquitectura nuclear del genoma y verificar hipótesis acerca de la relación entre posición y función de determinadas secuencias. Aplicando esta metodología se pueden obtener cariotipos FISH para determinadas especies y detectar los rearrreglos intergenómicos que ocurrieron en su evolución. Por otra parte, los experimentos de FISH permiten determinar la distribución y posición de material cromosómico extraespecífico, la existencia de apareamiento y recombinación intergenómico, y la segregación preferencial de determinados cromosomas o segmentos cromosómicos.

Por su parte, el GISH, en el que se utiliza ADN genómico total como sonda, revela homologías específicas del ADN, principalmente en lo que respecta a secuencias repetidas. Esta técnica facilita, por ejemplo, el reconocimiento de especies parentales y el análisis de la organización nuclear en híbridos y poliploides, y la determinación de la naturaleza de su apareamiento meiótico (auto o alosindético). Además permite detectar cromosomas o segmentos cromosómicos introgresantes en híbridos y generaciones segregantes, lo cual es de gran utilidad en planes de mejoramiento, pues es posible realizar el seguimiento de los segmentos o cromosomas introgresados a lo largo de generaciones segregantes, retrocruzadas y en líneas recombinantes. Por otra parte, es útil en el análisis de afinidades genómicas interespecíficas, en estudios evolutivos y taxonómicos. Es importante señalar que las relaciones obtenidas mediante GISH no son afectadas por genes que producen disturbios en el apareamiento meiótico (asinapsis, desinapsis, apareamiento homeólogo o heterólogo), siendo de gran utilidad para analizar homologías de híbridos o poliploides que presentan esterilidad génica. Además, el FISH y el GISH proporcionan información acerca de la localización cromosómica y genómica de loci transgénicos, número

y posición de copias insertas y su correlación con la expresión y la regulación.

Para los casos en que las secuencias a detectar son muy cortas (menores a 300pb) se han desarrollado distintas modificaciones de la técnica de FISH que consisten en sistemas de amplificación de las señales de hibridación, FISH sobre fibras de ADN, FISH sobre cromosomas paquiténicos o descondensados. Además, se han utilizado variantes como PRINS (Primed *In Situ* Hybridization) y C-PRINS (Cycling PRINS), entre otras. La técnica de PRINS se basa en el apareamiento de oligonucleótidos iniciadores a secuencias complementarias en cromosomas desnaturalizados *in situ*, seguido de la elongación debida a la incorporación, mediante una ADN polimerasa, de nucleótidos marcados. En el C-PRINS intervienen una serie de ciclos termales análogos a la reacción en cadena de la polimerasa.

En estudios realizados en nuestro laboratorio, la hibridación *in situ* permitió revelar la composición genómica del trihíbrido tricepiro, que es un cereal sintético de origen trigenérico: trigo, centeno y agropiro, y cuya composición genómica y cromosómica, luego de varios años de selección, era desconocida. El tricepiro se originó por el cruzamiento de tritcale ($2n=42$) x trigopiro ($2n=56$) cuya F1 poseía $2n=49$; luego de varias generaciones de selección este híbrido se estabilizó en $2n=42$. Los estudios de GISH realizados sobre los cromosomas de tricepiro Don René INTA empleando sondas de ADN genómico de centeno (Figura 2A) y de *Thinopyrum* mostraron 14 cromosomas pertenecientes al genoma R de centeno y pequeñas zonas de introgresión de *Thinopyrum*. Con la finalidad de identificar la totalidad de los cromosomas del tricepiro se emplearon las sondas *pSc119.2* (aislada de centeno y que hibrida con patrones característicos sobre todos los cromosomas de los genomas R y B de trigo y sobre algunos cromosomas de los genomas A y D de trigo), *pAs1* (aislada de *Aegilops squarrosa* y que hibrida sobre los cromosomas del genoma D de trigo), y *pTa71* (aislada de trigo y que revela zonas organizadoras del nucléolo porque contiene genes ribosomales). Estos experimentos mostraron la presencia de 6 zonas de ADN ribosomal, 2 en cromosomas de

centeno y 4 en cromosomas trigo (Figura 2B), mientras que la coloración con plata (Ag-NOR) indicó que sólo 4 de ellas eran activas formadoras de nucléolos. Se comprobó entonces un fenómeno de supresión intergenómica que llevó al silenciamiento de los genes ribosomales de centeno en presencia del genoma de trigo, (anfiplastia). Por lo expuesto se puede deducir que el uso conjunto de las técnicas clásicas y de ISH permitió establecer que la composición genómica y cromosómica de tricipiro Don René INTA es AABBRR, con introgresión de *Thinopyrum* en el cromosoma 6A (Figura 2A).

Por otra parte, experimentos de FISH utilizando las mismas sondas nos permitieron caracterizar distintas líneas de Triticale obtenidas en nuestro país.

En la gramínea patagónica *Bromus pictus* ($2n=70$) hemos realizado experimentos de GISH que han demostrado que *Bromus setifolius* ($2n=28$) es uno de sus progenitores (Figura 2C). Esta información evolutiva es relevante para el mejoramiento y la domesticación de esta potencial especie forrajera.

Elymus scabrifolius (agropiro criollo) es una gramínea perenne sudamericana de alto valor forrajero que posee un origen híbrido alotetraploide ($2n=28$, $x=7$). Se ha postulado una fórmula genómica SSHH cuyo genoma parental S pertenece a *Pseudoroegneria* y H a *Hordeum*. Para determinar el origen de los genomas componentes del agropiro criollo se realizaron experimentos de ISH asociados a estudios citogenéticos clásicos que permitieron confirmar que una especie de *Hordeum* es uno de sus parentales, detectar reorganizaciones intergenómicas y obtener mapeos físicos de secuencias repetidas (Figura 2D). En esta especie, la combinación del análisis clásico del cariotipo, GISH y FISH permitió identificar a cada uno de los cromosomas y su pertenencia a cada genoma parental, lo cual será de gran utilidad en los planes de mejora en ejecución.

Las distintas razas de maíz y de teosintes presentan variación en el tamaño, número y composición de sus regiones heterocromáticas, denominadas "knobs", que son citológicamente observables mediante bandeo C y DAPI. Estos pueden estar constituidos por dos familias de ADN altamente repetido en *tandem*

(180pb y/o TR-1). En nuestro laboratorio realizamos experimentos de FISH para dilucidar la composición de secuencias de las distintas bandas heterocromáticas o knobs (DAPI+). Estos nos permitieron observar que existe gran variabilidad en la composición de secuencia de los distintos "knobs" lo cual resultó de gran utilidad para caracterizar las líneas y razas de maíz y teosintes estudiadas hasta el momento (Figuras 2G y 2H).

En maíz y teosintes los métodos de GISH y FISH nos permitieron analizar las afinidades genómicas existentes entre los distintos xones de *Zea*. Un ejemplo de esto es el estudio de las afinidades, a nivel de secuencias repetidas, entre el maíz y su supuesto progenitor silvestre *Zea mays* ssp. *parviglumis*. Además, se analizaron las homologías entre los taxones de *Zea* con $2n=20$ y *Zea perennis* con $2n=40$. Mediante hibridación *in situ* utilizando secuencias marcadoras específicas hemos podido resolver la constitución cromosómica de las complejas configuraciones meióticas que se observan en los híbridos de *Zea* con $2n=30$ cromosomas (Figuras 2E y 2F). Estos resultados permitieron corroborar las fórmulas genómicas planteadas para las distintas especies de *Zea*, avalando el origen poliploide del maíz y de sus especies silvestres relacionadas.

Otro aspecto que se ha desarrollado últimamente dentro de la citogenética molecular es el de la microdissección y clonado de cromosomas o secciones cromosómicas. En plantas, es muy útil como fuente de sondas y se aplica para analizar genomas, para establecer relaciones entre cromosomas y grupos de ligamiento específicos, localizar genes de interés, y relacionar las distancias físicas y genéticas en mapas de ligamiento.

Por todo lo expuesto podemos concluir que la citogenética molecular es de gran utilidad en estudios evolutivos, sistemático-taxonómicos y aplicados, ya que en el estudio de las relaciones genómicas entre especies muestra las similitudes entre sus genomas y la distribución física de las secuencias repetidas que comparten. En el análisis de híbridos y poliploides naturales o artificiales, permite conocer del origen de híbridos interespecíficos, determinar el origen genómico de los cromosomas involu-

crados en distintas configuraciones meióticas, establecer las relaciones genómicas entre las especies parentales, analizar los dominios cromosómicos de cada genoma parental (su arquitectura nuclear), detectar cromosomas y/o introgresadas y translocaciones intra e intergenómicas.

Agradecimientos:

A la SECyT, a la Agencia de Promoción Científica y Técnica y al CONICET por financiar los proyectos PICT 14119, PIP 5927 y PICT 14170; a la Universidad de Buenos Aires por el otorgamiento de los subsidios EX178 y EX446. Asimismo, agradecemos a la Facultad de Ciencias Exactas y Naturales (UBA) donde se llevan a cabo la mayor parte de las tareas de investigación. Al Sr. Diego Fink por la confección de las láminas.

Literatura recomendada

Artículos

- Ferrari M.R., Greirzestein H.E., Pacapelo A., Naranjo C.A., Cuadrado A., Jouvé, N. and Poggio L. 2004. The genomic composition of Tricepiro, a synthetic forage crop. *Genome* **48**, 154-159.
- González G., Comas C., Confalonieri V., Naranjo C.A. and Poggio L. 2006. Genomic affinities between maize and *Zea perennis* using classical and molecular cytogenetic (GISH-FISH). *Chromosome Research* **14**, 629-635.
- González G., Confalonieri V., Comas C., Naranjo C.A. and Poggio L. 2004. GISH reveals cryptic genetic differences between maize and its putative wild progenitor *Zea mays* ssp. *parviglumis*. *Genome* **47**, 947-952.
- Poggio L., González G., Confalonieri V., Comas C. and Naranjo C.A. 2005. The genome organization and diversification of maize and its allied species revisited: evidences from classical and FISH-GISH cytogenetics analysis. Review. *Cytogenetics and Genome Research* **109**, 259-267.
- Poggio L., Rosato M., Chiavarino, A.M. and Naranjo C. A. 1998. Genome size and environmental correlations in maize (*Zea mays* ssp. *mays*). *Annals of Botany* **82**, 107-115.
- Poggio L., Rosato M. and Naranjo C. A. 1997. Meiotic behavior in alloplasmic lines of *Zea mays* ssp. *mays*. *Genome* **40**, 723-729.

Libros

- Bennett M. D. and Leitch I.J. 2005. Genome size evolution in plants. In: The evolution of the genomes. Gregory T.R (ed.). Elsevier Inc. pp 89-162.
- Bennett M. D. 1995. The development and use of genomic *in situ* hybridization (GISH) as a new tool in plant biosystematics. In: Kew Chromosome Conference IV (Brandham P.E. and Bennett M.D., eds.). Royal Botanic Gardens, Kew, pp 167-183.
- Guerra M. (ed.). 2004. FISH Conceitos e Aplicações na Citogenética. Sociedade Brasileira da Genética, pp 176.
- Lacadena J.R. 1996. Citogenética. Editorial Complutense, Madrid, pp 991.
- Liehr T. (ed.). 2009. Fluorescence *In situ* Hybridization (FISH) Application Guide. Springer, pp 451.
- Puertas M.J. and Naranjo T. (eds.). 2005. Plant Cytogenetics. Karger, pp 408.
- Ran J. Sinht (ed.). 2002. Plant Cytogenetics. 2^o Edition CRC Press, pp 463.
- Ryan Gregory T. (ed.) 2004. The evolution of the Genome. Elsevier, pp 740.
- Sharma A.K. and Sharma A. (eds.) 2001. Chromosome Painting. Principles, Strategies and Scope. Kluwer Academic Publishers (Reprinted from Methods in Cell Science **23**), pp 179.
- Soltis D.E., Soltis P.S. and Doyle J. 1998. Molecular Systematics of Plants II. DNA Sequencing. Kluwer Academic Publishers, pp 574.
- Stebbins G.L. 1971. Chromosomal Evolution in Higher Plants. Addison-Wesley Publ. Reading. Massachusetts, pp 216.
- Summer A.T. 1990. Chromosome banding. London Unwin Hyman, pp 434.
- Schwarzacher T. and Heslop-Harrison P. (eds.). 2002. Practical *in situ* Hybridization. Springer Verlag, pp 203.
- Sybenga J. 1992. Cytogenetics in plant breeding. Monographs on Theoretical and Applied Genetics. Springer-Verlag, pp 469.

V. CAPÍTULO 2

Mejoramiento de Plantas Forrajeras en la Era Genómica

German Spangenberg, Mauro Meier y
Viviana Echenique

1 Introducción

Si bien el mejoramiento genético convencional ha tenido un gran impacto en el incremento del rendimiento, la calidad y la resistencia a plagas y enfermedades en cereales y oleaginosas, en las especies forrajeras los progresos han sido significativamente menores, especialmente en lo referido al rendimiento. Esto obedece a varios factores como un proceso más reciente de domesticación, la complejidad de objetivos, problemas reproductivos, de mercado y las menores inversiones realizadas en el área. Las herramientas biotecnológicas desarrolladas en los últimos 20 años ofrecen interesantes alternativas que pueden contribuir a mejorar esta situación.

En los últimos años la biotecnología ha aportado varias metodologías para complementar los programas de mejoramiento, como el cultivo de tejidos, la hibridación somática, la variación somaclonal y la transgénesis. Esta última resulta muy promisoría, especialmente para incrementar la calidad del forraje, persistencia, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estreses abióticos y para manipular el crecimiento y desarrollo. Los marcadores moleculares brindan su utilidad para la identificación y selección de caracteres agronómicos complejos. Más recientemente, la genómica permite identificar a gran escala genes de interés para su introducción en los forrajes. Todas estas tecnologías confluyen en el mejoramiento molecular, que permitirá obtener nuevos cultivares para satisfacer las demandas actuales de producción. En este capítulo se describen las aplicaciones actuales y futuras y el impacto de la biotecnología en el mejoramiento de especies forrajeras.

2 Transgénesis

La tecnología génica y la obtención de plantas transgénicas brindan la posibilidad de ge-

nerar variación genética cuando esta es inexistente o tiene una heredabilidad muy baja. En la actualidad se dispone de metodologías eficientes para la transformación de forrajeras, ya sean gramíneas o leguminosas (Figura 1).

La utilización de la biolística o la transformación mediada por *Agrobacterium* permite la regulación de nuevos genes, o de genes preexistentes, que codifican para las enzimas que intervienen en las distintas vías metabólicas, para que estos se expresen en mayor o menor grado. En la actualidad se encuentran en etapa de evaluación a campo distintas especies forrajeras transgénicas con caracteres

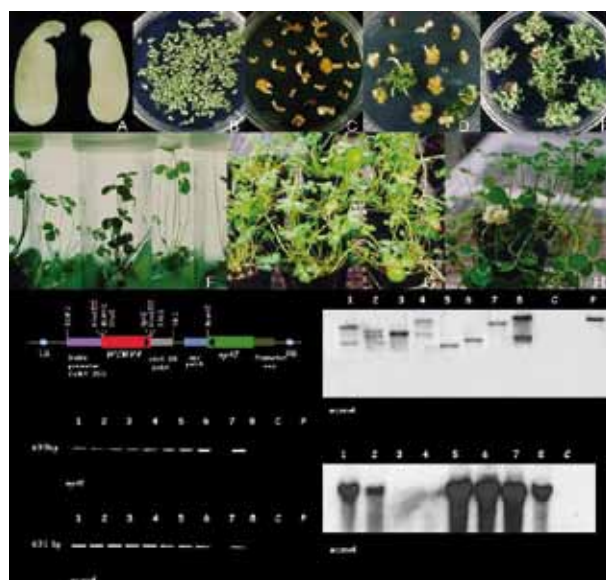


Figura 1. Transformación de trébol blanco para resistencia virus. A-H) Sistema prolífico de regeneración de plantas resistentes al virus del mosaico de la alfalfa (AMV) y al virus del mosaico del trébol blanco (WCMV) a partir de explantos cotiledonales. La transformación se llevó a cabo utilizando *Agrobacterium tumefaciens*, utilizando *npt2* como marcador de selección. **I)** T-ADN del vector binario conteniendo el gen quimérico *npt2* y el gen de la proteína de la cápside del AMV (*AMV4*). **J)** Análisis por PCR para la identificación preliminar de las plantas transformadas utilizando iniciadores para el gen *npt2*. **K)** Idem anterior pero utilizando iniciadores para el gen *AMV4*. **L)** Análisis de *Southern blot* utilizando una sonda dirigida al gen *AMV4*. **M)** Análisis de *Northern blot* de plantas transgénicas de trébol blanco expresando el gen quimérico *AMV4*.

simples modificados. Si bien algunos aspectos de la genética, fisiología y bioquímica de muchos procesos vegetales complejos no han sido aún completamente dilucidados, lo cual podría demorar algunas de las aplicaciones de la transgénesis en el mejoramiento vegetal, la tecnología génica es una poderosa herramienta para ampliar los conocimientos en genética molecular.

El número de genes disponibles para los mejoradores de plantas ha aumentado rápidamente con el advenimiento de los grandes programas de secuenciación de especies como *Lolium perenne* y el trébol blanco; o en la secuenciación completa del genoma de especies modelo como *Medicago trunculata* L., *Lotus japonicus* L. y arroz (*Oryza sativa* L.). En consecuencia, las aplicaciones de la transgénesis en el mejoramiento de especies forrajeras están orientadas hacia el desarrollo de eventos de transformación con variación genética única y a la disección genética de vías metabólicas y procesos de desarrollo relevantes para la producción de forrajes.

Los mejores candidatos en cuanto a caracteres para la aplicación de transgénesis en plantas forrajeras son: calidad del forraje, resistencia a plagas y enfermedades, tolerancia a estreses abióticos y la manipulación del crecimiento y desarrollo.

2.1 Modificación genética de la calidad del forraje

El mejoramiento molecular basado en transgénesis para mejorar la calidad del forraje está dirigido al tratamiento de los subcaracteres involucrados, a saber: digestibilidad de la materia seca, contenido de carbohidratos solubles, contenido de proteínas, metabolitos secundarios, alcaloides, etc. La modificación de la mayoría de los parámetros de calidad se asocia a ciertas vías metabólicas, o a la producción de proteínas específicas. La tecnología génica permite identificar las proteínas involucradas y las enzimas clave a ser manipuladas, el aislamiento de los genes correspondientes y la manipulación de su expresión en plantas transgénicas. A continuación desarrollaremos ejemplos de distintas aplicaciones.

2.1.1 Manipulación de la biosíntesis de lignina

El principal objetivo tendiente mejorar el valor nutritivo de las gramíneas forrajeras para la industria lechera es el incremento de la digestibilidad de la materia seca, la cual declina marcadamente (> 10%) a medida que estas crecen y maduran, reduciendo el valor nutritivo del forraje. Dado que la heredabilidad de este carácter es baja y el mismo está controlado por un gran número de genes, el potencial para un rápido mejoramiento por métodos tradicionales es reducido.

Se estima que pequeños incrementos en la digestibilidad tendrán un efecto significativo en la calidad del forraje y concomitantemente en la producción animal. Así, incrementos del 1% en la digestibilidad de la materia seca *in vitro* conducen a incrementos promedio del 3,2% en ganancia media de peso vivo.

La lignina es un componente importante de la pared celular de plantas vasculares y durante mucho tiempo ha sido reconocida por su impacto negativo sobre la calidad del forraje, en la fabricación de papel y más recientemente en la obtención de biocombustibles a partir de celulosa. Durante las últimas dos décadas, genetistas y bioquímicos han avanzado en el conocimiento de la relación entre lignificación y digestibilidad de los forrajes.

Los efectos negativos de la lignina sobre la digestibilidad dependen de su contenido, composición de monómeros y grupos funcionales y del grado de entrecruzamiento con los polisacáridos de la pared celular. La lignificación es un proceso altamente coordinado y regulado por un conjunto de eventos metabólicos que resultan en la biosíntesis de precursores de la lignina (monolignoles). Existen tres niveles de control para la manipulación genética de ligninas, a saber: la síntesis de monolignoles, el transporte de los mismos desde el sitio de síntesis al de polimerización, y el de polimerización de monolignoles para dar los productos finales. Una de las estrategias más exploradas para mejorar la digestibilidad de la lignina es la regulación negativa de las enzimas involucradas en la biosíntesis de monolignoles.

En función de los resultados de varios estudios relacionados con la manipulación de lig-

nina se ha encontrado que los genes *pal*, *c4h*, *c3h* y *4cl* no son buenos blancos para la manipulación específica de biosíntesis de monolignoles ya que producen efectos adversos sobre otras funciones biológicas (Figura 2 A). Estos genes codifican las enzimas fenilalanina amino ligasa (PAL), cinamato-4-hidroxilasa (C4H), *p*-cumarato 3-hidroxilasa (C3H) y 4-cumarato CoA ligasa (4CL).

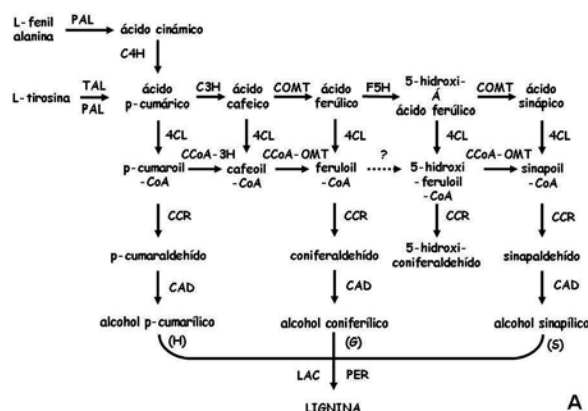


Figura 2. A) Vía biosintética de la lignina. PAL: fenilalanina amonio liasa; TAL: tirosina amonio liasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa; COMT: cafeato-O-metiltransferasa; F5H: ferulato-5-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato CoA ligasa; CCoA-3H: cumaril CoA hidroxilasa; CCoA-OMT: cafeoil-CoA-O-metiltransferasa; CCR: cinamoil-CoA-reductasa; CAD: cinamoil alcohol deshidrogenasa. Las flechas punteadas indican reacciones que no han sido verificadas experimentalmente.

Por otro lado, *comt*, *ccoaomt* y *cad* son buenos blancos para alterar el contenido y composición de ligninas, y codifican las enzimas O-metil transferasa del ácido cafeico (COMT), cafeoil CoA-3-O-metiltransferasa (CCoAOMT) y cinamil alcohol deshidrogenasa (CAD). Las investigaciones realizadas utilizando plantas modelo como tabaco y álamo demostraron que la regulación negativa de la expresión de COMT, CAD y 4CL conduce a una alteración en la composición de la lignina, o a una disminución de su contenido, con incrementos significativos en la digestibilidad de la materia seca. En algunos de estos casos la lignina resultó

más fácil de extraer químicamente, en otros esta tecnología trajo aparejadas alteraciones en el desarrollo de la planta, como reducciones en el tamaño y colapso de las células del xilema, pero, en general estos resultados indican que la introducción de genes de esta vía metabólica en construcciones de ARN sentido o antisentido permiten mejorar la digestibilidad de la materia seca, sin alterar el desarrollo normal de la planta.

Los efectos observados en plantas con regulación negativa de alguna de estas enzimas son similares a aquellos encontrados en la naturaleza en un tipo de mutantes de maíz llamados «brown midrib» (*bmr*), cuyos genes codifican para enzimas menos activas. El enfoque transgénico brinda la posibilidad de obtener plantas con ligninas diferentes, logrando una mayor variedad de fenotipos que la existente en la naturaleza, a través de la regulación negativa de varias enzimas y a la utilización de promotores específicos.

En raigrás perenne se ha logrado clonar y caracterizar tres genes clave en la vía de biosíntesis de monolignoles: *cad*, *4cl* y *ccr* (cinamoil CoA reductasa, CCR). Estos genes han sido mapeados en los cromosomas de raigras (Figura 2 B) y se encuentran en evaluación plantas transgénicas de esta especie con estos genes regulados en sentido y antisentido. La regulación negativa de OMT en *Festuca* incrementó en un 10% la digestibilidad, lo cual es un resultado muy importante de esta tecnología.

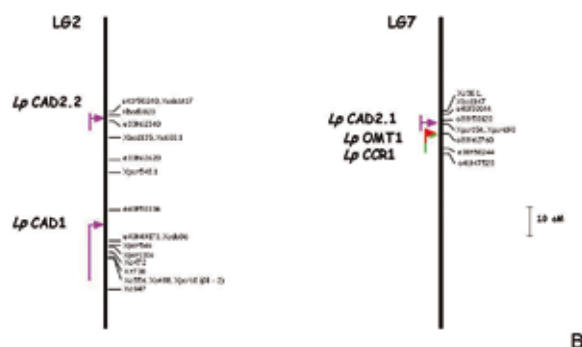


Figura 2. B) Mapeo de los genes correspondientes a la vía de biosíntesis de lignina, en los grupos de ligamento LG2 y LG7 de raigrás perenne.

En esta especie también se regularon negativamente las enzimas CAD y COMT.

Dado que los genes estructurales involucrados en la biosíntesis de lignina se encuentran regulados a nivel de transcripción, otra estrategia para la manipulación genética involucra la manipulación de factores de transcripción de tipo MYB.

El reciente interés en la producción de biocombustibles a partir de celulosa ha impulsado la ingeniería genética de ligninas, utilizando como sistemas modelo cultivos energéticos como *Populus trichocarpa* y *Brachypodium distachyon*. La gran cantidad de biomasa que proporcionan los forrajes es una alternativa atractiva para este fin. En Estados Unidos se busca utilizar el pasto varilla o *switchgrass* (*Panicum virgatum*) como una alternativa. Se trata de producir modificaciones genéticas que redunden en baja cantidad de lignina o diferente calidad de la misma. De esta manera se facilitaría la liberación de celulosa y hemicelulosa de la matriz de la pared celular y quedarían más accesibles para el tratamiento enzimático posterior.

2.1.2 Manipulación del metabolismo de fructanos

Los fructanos son moléculas de polifrutosa producidas por varias especies de gramíneas para las cuales constituyen la principal forma de almacenamiento de carbohidratos solubles. Observaciones realizadas en líneas de raigrás que almacenan concentraciones elevadas de carbohidratos solubles indicaron que éstas no sufren disminuciones en la digestibilidad durante el verano, ya que estos carbohidratos parecen contrarrestar las disminuciones en digestibilidad debidas a lignificación, favoreciendo además la asimilación del forraje y de proteínas en el rumen y, concomitantemente, generando incrementos en el peso vivo.

Un alto contenido de fructanos en los forrajes es de gran valor ya que pueden ser movilizados fácilmente para mantener el rebrote inmediatamente después de la defoliación, así como por añadir valor nutritivo para la alimentación del ganado.

La síntesis de fructosa en gramíneas involucra la acción concertada de al menos tres enzi-

mas: sacarosa:sacarosa 1-fructosiltransferasa (1-SST), fructano:fructano 1- fructosiltransferasa (1-FFT) y sacarosa:fructano 6-fructosiltransferasa (6-SFT), que sintetizan la mezcla más compleja de fructanos ligados que se encuentra en pastos y cereales. Varios de los genes involucrados en esta vía metabólica han sido aislados y caracterizados, como el 6-SFT de cebada, el 6G-FFT de cebolla y el 1-SST de alcaucil. Su introducción en plantas desprovistas de fructanos nativos conduce a la acumulación de oligofructanos y, en plantas que los producen provocan la acumulación de nuevas variedades de los mismos.

La introducción de un gen microbiano para la fructosiltransferasa (gen *SacB*) de *Bacillus subtilis* en plantas de tabaco y papa, que carecen de fructanos y acumulan almidón, condujo a la acumulación de cantidades considerables de fructanos de elevado peso molecular, que les confirieron un mejor rendimiento en situaciones de estrés. Esto demuestra que la sacarosa, el sustrato para la fructosiltransferasa, puede ser redireccionada en especies que no acumulan fructanos.

La manipulación de la biosíntesis de fructanos en plantas transgénicas para mejorar la calidad del forraje y la tolerancia a estreses abióticos, está siendo explorada en leguminosas como *Trifolium repens* y *Medicago sativa*, y en gramíneas como *Lolium perenne* y *Festuca arundinacea*.

Se ha reportado la obtención de plantas de *L. multiflorum* con alteraciones en el metabolismo de fructanos por la introducción de genes químicos de levansacarasa bacteriana. También se dispone de ADNc de genes homólogos de la fructosiltransferasa de raigrás perenne. Estos han sido aislados, caracterizados y utilizados para la disección genética de la biosíntesis de fructanos en gramíneas transgénicas. También se han aislado y caracterizado otros genes de la vía que han sido introducidos y expresados en leguminosas y gramíneas.

Por medio del análisis de secuencias, utilizando la técnica de microarreglos y *Northern blot* se determinaron los perfiles de expresión de los genes involucrados en la vía de fructanos en raigrás perenne. La organización de los genes, el número de copias y su ubicación

en el mapa genético se determinaron utilizando marcadores moleculares. También se construyeron vectores para la regulación mediante ARN sentido y antisentido de los genes mencionados. Las correspondientes plantas transgénicas se utilizan para la disección molecular del metabolismo del fructanos y para comprender su rol fisiológico en las plantas, y también para mejorar el valor nutritivo, persistencia y calidad utilizando genes de la misma especie. Estos estudios también aportarán información acerca de su rol funcional en la tolerancia al frío y la sequía. Este conocimiento es clave para el diseño de experimentos tendientes a la obtención de plantas transgénicas con mejor calidad de forraje y tolerancia a estreses abióticos.

2.1.3 Expresión transgénica de proteínas «rumen by-pass»

Los aminoácidos azufrados metionina y cisteína son limitantes en la nutrición animal. Estos influyen en el crecimiento de la lana en las ovejas y su aporte es reducido en condiciones naturales de pastoreo y por la fermentación en el rumen, ya que la microflora degrada las proteínas y en algunas circunstancias resintetiza proteínas de menor valor nutritivo. Los suplementos postruminales de metionina y cisteína resultan en incrementos del 16 al 130% en la tasa de crecimiento de la lana. Estos efectos positivos también se han observado en bovinos, donde han redundado en una mayor producción de leche y una mayor tasa de crecimiento en animales para carne. Por lo tanto la ingestión de forrajeras que contengan proteínas ricas en aminoácidos azufrados, relativamente estables en el rumen (*rumen by-pass*), incrementaría el aporte de aminoácidos esenciales para la nutrición de los rumiantes, conduciendo a una mayor producción animal, particularmente en lo que a lana se refiere.

Genes que codifican proteínas de este tipo fueron aislados, caracterizados e introducidos en plantas de festuca alta, alfalfa, trébol blanco y trébol subterráneo. Estas proteínas serían la ovoalbúmina de pollo, la albúmina de arveja y de semilla de girasol. Como ejemplo puede citarse el caso de plantas transgénicas de *Festuca arundinacea* (festuca alta) que expresan genes quiméricos constituidos por secuencias de

ADNc de la albúmina de girasol (SFA8) con la señal KDEL del retículo endoplásmico, bajo el control de diferentes promotores. Estas plantas expresan el transcripto esperado y acumulan la proteína SFA8 a niveles superiores al 0,2% del total de proteína soluble. Sin embargo, desde el punto de vista nutricional los valores obtenidos aún están lejos del óptimo, que deberá ser del 2 al 5 % del total de proteína soluble. Es crucial, por lo tanto, desarrollar estrategias que permitan alcanzar estos niveles a fin de explotar el máximo potencial de la técnica.

2.1.4 Manipulación de la biosíntesis de taninos condensados

Los taninos condensados (proantocianinas) son compuestos poliméricos derivados del metabolismo fenilpropanoide, sintetizados por la vía metabólica de los flavonoides. Desde el punto de vista agronómico son importantes en las leguminosas forrajeras, donde pueden considerarse beneficiosos o perjudiciales de acuerdo a los niveles encontrados en la planta. Niveles de taninos condensados superiores al 4 - 5% del peso seco son perjudiciales, actuando como factores antinutritivos y generando rechazo por parte del animal. En cantidades moderadas (1 - 3%) mejoran la calidad del forraje, ya que reducen el meteorismo («empaste») por disrupción de la espuma causada por las proteínas en el rumen, disminuyen la pérdida de proteínas debidas a desaminación microbiana y reducen la carga de parásitos en el animal.

Las estrategias moleculares utilizadas para la manipulación de la biosíntesis de taninos se han orientado hacia la introducción de taninos condensados en alfalfa y trébol blanco, y a su reducción en leguminosas que tienen altos contenidos. Estas estrategias se basan en la disponibilidad de genes involucrados en la biosíntesis de antocianinas, que afectan las etapas comunes en la biosíntesis de flavonoides y la suposición de que éstos funcionarán en la biosíntesis de taninos.

El estudio de mutantes de la vía metabólica de los flavonoides en *Arabidopsis* proporcionó abundante información acerca de la identidad de las enzimas involucradas en la síntesis de taninos en esta especie. Esto permitió el clonado, entre otros, de los genes *CHS*, *CHI*, *F3H*

y *DFR*, y de la identificación y clonado del gen *BAN* (*BANYULS*), que parece ser específico de la vía de biosíntesis de taninos. Por otro lado se ha intentado la regulación negativa o positiva de enzimas clave que regulan esta vía: chalcona sintetasa (*CHS*) y leucoantocianina-4 reductasa (*LAR*), o la expresión de genes reguladores que tienen un accionar pleiotrópico (con efectos a varios niveles fenotípicos). Un ejemplo de esto lo constituye la transformación de plantas de *Lotus corniculatus* con el gen regulador *Sn* de maíz, que resultó en una disminución del contenido de taninos en hojas, conjuntamente con un aumento del nivel de los mismos en raíz.

La alfalfa carece de taninos condensados en hojas y tallos, por ello puede causar meteorismo en los rumiantes que la consumen. La presencia de estos flavonoides en las semillas demuestra que esta especie contiene todos los genes necesarios para la síntesis de los mismos. La identificación y el clonado de los genes involucrados en la biosíntesis de taninos en semillas de alfalfa permitirán manipular su expresión en hojas.

2.2 Resistencia a plagas y enfermedades

Los patógenos y las plagas pueden disminuir considerablemente la producción, la persistencia, el valor nutritivo y la palatabilidad de las plantas forrajeras. En los últimos diez años se han desarrollado varias estrategias para manipular la resistencia. A continuación hablaremos de algunos ejemplos.

2.2.1 Transgénesis para incrementar la resistencia a enfermedades fúngicas

El ataque de hongos a las hojas y sistemas radicales provocan daños que afectan el establecimiento, disminuyen el rendimiento, la calidad y la persistencia de las plantas. La expresión constitutiva de genes que codifican proteínas antifúngicas (AFPs) en plantas transgénicas, bajo promotores específicos de órgano o inducibles por el patógeno, se ha logrado en leguminosas, como alfalfa y trébol blanco. Específicamente se obtuvieron plantas de alfalfa que expresan una quitinasa de arroz, que podría hacerlas resistentes al ataque de *Rhizoctonia solani* y *Sclerotium rolfsii*.

Hongos como *Phytophthora clandestina*, *Kabatella caulivora*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium* spp., que atacan a varias especies de tréboles, donde no existen fuentes de resistencia natural, provocan cuantiosas pérdidas económicas en Australia. Se han identificado cuatro proteínas antifúngicas diferentes que, en ensayos *in vitro*, demostraron ser efectivas contra estos patógenos. Los genes codificantes se utilizaron, individualmente o combinados, para obtener plantas transgénicas de trébol subterráneo. Esto brindaría una mayor protección sustancial contra un amplio espectro de hongos patógenos.

Recientemente se obtuvieron plantas de festuca alta con elevados niveles de resistencia a *R. solani* y a *P. grisea*, mediante la transformación genética simultánea con cuatro genes: *alfalfa β-1*, *3 glucanasa AGLU1*, *fago T4 lisozi- ma*, *dermaseptin rana*, y *arroz Pi9*.

2.2.2 Transgénesis para incrementar la resistencia a enfermedades virales

La mayoría de los métodos clásicos utilizados para prevenir las infecciones virales son laboriosos y económicamente inviables. Se han identificado fuentes potenciales de tolerancia o resistencia en alfalfa y en unas pocas especies de *Trifolium*, pero no existe una resistencia natural a estos virus que sea transferible, efectiva y durable, y que pueda ser incorporada a cultivos de leguminosas forrajeras. La tecnología genética es una opción atractiva para lograr este objetivo, ya que permite sortear barreras interespecíficas, desarrollar resistencias multigénicas, y manipular niveles y sitios de expresión. La transgénesis se ha utilizado para desarrollar resistencia efectiva y durable en un amplio rango de especies vegetales.

Virus como el del mosaico de la alfalfa (alfamovirus, AMV), el del mosaico del trébol blanco (potexvirus, WCMV) y el del amarillamiento de las nervaduras (potyvirus, CYVV) afectan negativamente el crecimiento y desarrollo de las leguminosas. Se estima que combinados causan pérdidas a la industria rural australiana por más de 800 millones de dólares por año. Cada uno de ellos infecta individualmente a un gran número de especies distribuidas por todo el mundo. Una interesante aplicación del mejoramiento molecular fue el desarrollo de trébol blanco inmune al virus AMV.

Los virus que se encuentran con frecuencia en gramíneas forrajeras son el de enanismo, de amarillamiento de la cebada (BIDV) y el mosaico del raigrás (RMV). La infección de BIDV provoca disminuciones en el rendimiento de hasta un 24%, mientras que el rango de RMV va del 5 al 50%. La infección con RMV también reduce la competitividad del raigrás perenne como resultado de un mal establecimiento y una reducida persistencia.

2.2.3 Transgénesis para incrementar la resistencia a plagas

Las plagas pueden dañar a las plantas directamente al alimentarse del follaje o las raíces, o indirectamente por transmisión de patógenos mientras accionan sobre la planta. En pasturas infectadas por densas poblaciones de insectos plaga se producen disminuciones en la producción de materia seca que van del 20 al 40%.

Varios insectos como *Wiseana* spp, *Costelytra zealandica*, *Teleogryllus commodus*, *Sminthurus viridis*, *Sitona* spp, *Coleophora* spp, *Inopus rubriceps* y *Acyrtosiphon* spp pueden causar daños significativos a leguminosas y gramíneas. A fin de incrementar la resistencia a los mismos se han utilizado distintos enfoques transgénicos. Uno de ellos es la utilización de la proteína cristalina e inhibidores de proteasas de *Bacillus thuringiensis* (*Bt*). Por ejemplo se obtuvieron plantas de trébol blanco que expresan un gen quimérico *Bt cry 1Ba* modificado y acumulan en las hojas la delta endotoxina soluble. La alimentación de larvas de *Wiseana* con hojas de estas plantas promovió la inhibición en la ingesta, redujo el crecimiento de las larvas y ocasionó mayor mortalidad al compararlas con larvas alimentadas con plantas control.

En alfalfa (*Medicago sativa* L.) también se ha logrado obtener planta transgénicas que expresan en gen *cryIA* con el fin de reducir el ataque de la isoca de la alfalfa (*Colias lesbis* F.).

Otro ejemplo lo constituye la utilización de inhibidores de proteasas, como el inhibidor de tripsina pancreática bovina o aprotinina en trébol blanco, donde la expresión en hoja a niveles de 0,07% de proteína soluble reduce el ataque por las larvas de *Wiseana*.

Otra estrategia para proteger contra insectos plaga sería la transformación indirecta en gramíneas, utilizando un endófito (microorga-

nismo que vive y se desarrolla dentro de los tejidos de la planta) modificado, como podría ser *Neotyphodium*. Las cepas modificadas resultarían seguras para los rumiantes que las consuman, pero serían capaces de expresar y secretar proteínas insecticidas tales como toxinas *Bt* o inhibidores de proteasas, que protejan a las gramíneas forrajeras de las plagas.

2.3 Crecimiento y desarrollo

2.3.1 Manipulación de alergenitos del polen

La fiebre del heno y el asma alérgico estacional, debido al polen de las gramíneas, son enfermedades ambientales que afectan al 25% de la población en climas templado-fríos. El polen de raigrás es uno de los más abundantes en estas regiones, siendo el principal alérgeno para más del 50% de los pacientes alérgicos. Este polen contiene por lo menos 4 clases principales de proteínas alérgicas, cada una de las cuales está constituida por múltiples isoformas inmunológicamente indistinguibles que involucran 17 alergenitos de tamaño variable. Al menos una proteína de cada una de estas clases ha sido aislada y caracterizada en detalle. Se han aislado clones de ADNc para el principal alérgeno del raigrás *Lolp1*, *Lolp2* y *Lolp5*. En 1997 se obtuvieron las primeras plantas transgénicas de raigrás, transformadas con versiones antisentido de los genes *Lolp1* y *Lolp2* bajo el control de un promotor específico del polen, a fin de obtener una regulación negativamente los alergenitos del mismo. Estudios realizados con las plantas transgénicas *Lolp1* y *Lolp2* revelaron una disminución en los niveles de expresión de los alergenitos en el polen. Las plantas de raigrás transformadas con *Lolp1* evidenciaron un desarrollo reproductivo normal y polen viable. Estos estudios permitirán comprender aún mas el rol funcional de estos alergenitos en la planta y explorar el potencial para la obtención de cultivares de raigrás hipolérgico.

2.3.2 Manipulación de cambio de fase y floración

La disminución del valor nutritivo en algunas forrajeras perennes se encuentra asociada con el comienzo del crecimiento de las cañas florales, la floración y la senescencia. Por lo tanto la calidad del forraje podría mejorarse inhibiendo

la producción de cañas florales, que son poco digeribles, o retardando la senescencia.

Se han informado modificaciones en el tiempo de floración en plantas transgénicas a través de la regulación de la expresión de genes involucrados en la iniciación del meristema floral. La expresión constitutiva de genes de *Arabidopsis thaliana* como *LEAFY* o *APETALA1* conducen a un desarrollo precoz como se ha observado en plantas transgénicas de álamo. En *A. thaliana*, mutaciones en uno o más de los genes involucrados en la determinación de identidad del meristema floral conducen a un desarrollo floral incompleto o nulo. Esto ha llevado a pensar en la posibilidad de controlar o inhibir la floración en forrajeras transgénicas regulando negativamente la expresión de los ortólogos (genes que tienen la misma estructura y función, y un origen común) de *LEAFY* o *APETALA1*.

Un ejemplo en forrajeras fue la identificación de el gen terminal de la floración 1 en *L. perenne* (*LpTFL1*), de expresión específica de ciertos tejidos en *Arabidopsis*. Otro blanco para la manipulación del desarrollo reproductivo en forrajeras es el gen *indeterminate 1* (*ID1*). Este gen desempeña un rol importante en el control de la iniciación floral y en el mantenimiento de un estado floral determinado en maíz. Su mutación es la única conocida en monocotiledóneas que bloquea específica y severamente la transición hacia un crecimiento reproductivo. Recientemente se aisló y caracterizó un ADNc de plantas de raigrás perenne homólogo de este gen. Sería esperable que la inhibición de la transición del estado vegetativo a la formación de cañas florales e inflorescencias en gramíneas incremente la calidad del forraje y, en consecuencia también disminuya la cantidad de alérgenos del polen.

La inhibición o el control de la floración en forrajeras transgénicas a través de supresión antisentido de ortólogos de *ID1* o *LEAFY* y *APETALA1* podría incrementar la calidad y mejorar los patrones de crecimiento estacional. Por otro lado, representarían una vía para la contención de transgenes. Para la producción de semilla, este bloqueo de la floración debería ser revertido. Una posibilidad para lograr este fin sería la utilización de un promotor inducible para controlar la supresión.

Se han utilizado diferentes enfoques para la manipulación del desarrollo reproductivo que podrían conducir a un bloqueo de la floración, al desarrollo de la apomixis (tipo de reproducción agámica común en ciertas especies de gramíneas) y androesterilidad (esterilidad de la parte masculina de la planta), que además posibilitarían el mantenimiento de los transgenes. Esto es de particular importancia para forrajeras transgénicas de polinización abierta, mediada por el viento, ya que la dispersión del polen es un factor importante en la evaluación de riesgo de las gramíneas genéticamente modificadas.

2.3.3 Manipulación de la senescencia

Se ha observado en plantas transgénicas que la producción autorregulada de citocininas inhibe la senescencia foliar (envejecimiento de la hoja que culmina en la muerte de la misma). Este sistema se basa en la utilización de un promotor específico de senescencia de *A. thaliana*, el SAG12, que controla la expresión transgénica de un gen para la isopentenil transferasa (*ipt*) de *Agrobacterium tumefaciens*. El producto de este gen cataliza un paso en la biosíntesis de citocininas. Las plantas que expresan este gen presentan un retraso en la senescencia foliar y no exhiben anomalías de ningún tipo. En trébol blanco, genes análogos de *ipt* quiméricos bajo el control de promotores regulados por desarrollos asociados a senescencia, retardan significativamente la senescencia. Las plantas transformadas presentaron un aumento relativo en número de hojas, en la longitud de los estolones y en el área foliar total, en comparación con plantas control. Otro caso es la transformación de plantas de *Festuca arundinacea* con el mismo gen *ipt*. Estas plantas mostraron un aumento considerable en el número de macollos, en los niveles de clorofila a y b y en la tolerancia al frío, lo cual se tradujo en plantas más vigorosas y que a bajas temperaturas permanecen verdes por más tiempo.

2.4 Agricultura molecular

Las plantas transgénicas pueden ser utilizadas para expresar proteínas recombinantes heterólogas y biomoléculas, siendo ésta una

alternativa interesante en reemplazo de los sistemas microbianos. La perennidad, la producción potencial de biomasa, la capacidad de fijar el nitrógeno biológico y la habilidad para crecer en áreas marginales que poseen las forrajeras, en particular las leguminosas, las hace atractivas para este fin. La disponibilidad de tecnologías que permitan alcanzar niveles de expresión elevados y contener los transgenes, permitiría utilizar a las forrajeras como biorreactores para la obtención de enzimas industriales, productos farmacéuticos, vacunas, anticuerpos y plásticos biodegradables entre otros. La alfalfa tiene ciertas características que la convierten en un interesante bioreactor. Entre ellas se destacan la perennidad y la capacidad de producir dos ó tres cosechas en el año, existiendo además la tecnología adecuada para extraer las proteínas de interés dejando un residuo utilizable para la alimentación del ganado. Se han desarrollado y evaluado plantas de alfalfa transgénicas productoras de enzimas microbianas involucradas en la degradación industrial de lignina y celulosa, entre otros. Este cultivo también ha sido utilizado para la producción de polímeros biodegradables como el polihidroxibutirato (PHB) mediante la introducción de tres genes de *Ralstonia eutropha*.

2.5 Evaluación a campo de plantas forrajeras transgénicas

A fin de determinar la estabilidad en la expresión de los transgenes, evaluar los nuevos fenotipos e identificar los eventos de transformación adecuados para el desarrollo de germoplasma y cultivares transgénicos es necesario realizar ensayos de campo planificados, en principio en pequeña escala.

Solo después de haber realizado estas evaluaciones se pueden integrar estos materiales en programas de mejoramiento molecular para el desarrollo de cultivares transgénicos. Un ejemplo ilustrativo de un diseño para ensayos de campo en escala reducida es el de plantas transgénicas de trébol blanco inmunes al virus del mosaico de la alfalfa. En este ensayo se tuvieron en cuenta importantes características de bioseguridad, como por ejemplo la presencia de una zona de dos hectáreas sembradas con leguminosas forrajeras que

se sabe que no se cruzan con el trébol blanco. El uso de leguminosas forrajeras como el trébol rojo, trébol de Persia y alfalfa en esta zona «*buffer*», sembradas en bandas alternadas, asegura que haya un elevado número de leguminosas no transgénicas floreciendo en el ensayo en el período crítico en que están floreciendo las plantas transgénicas motivo del experimento. Las dimensiones de esta zona «*buffer*» fueron diseñadas teniendo en cuenta consideraciones tales como la conducta de las abejas como polinizadoras del trébol blanco, la dispersión del polen, y determinaciones de flujo génico utilizando un gen marcador de fácil trazabilidad (denominado *Feathermark*). A fin de determinar el flujo génico, dos hileras de trébol blanco no transgénico se incluyeron en el diseño rodeando el perímetro del ensayo y las parcelas centrales con las plantas transgénicas. Las semillas cosechadas de las plantas de trébol blanco no transgénico de estas dos hileras se analizaron utilizando una combinación de resistencia a antibiótico (resistencia a G418 mediada por un gen *npt2* ubicado en el T-ADN integrado en el genoma de las plantas transgénicas) y PCR para detectar la presencia del gen marcador de selección. Los resultados de este análisis confirmaron que este diseño de campo es adecuado para la evaluación de plantas transgénicas (Figura 3).

2.6 Integración de plantas forrajeras transgénicas en programas de mejoramiento y desarrollo de cultivares transgénicos

Los ejemplos citados más arriba acerca del desarrollo de una serie de eventos de transformación en leguminosas y gramíneas forrajeras constituyen una prueba fehaciente de la funcionalidad de esta tecnología. El desafío actual es utilizar esta tecnología y las herramientas moleculares actuales para transferir genes valiosos de manera múltiple o individual. Se trata de generar variabilidad genética y obtener germoplasma transgénico *elite* e incorporar estos factores en programas de mejoramiento para obtener cultivares. Hoy existen estrategias eficientes para la introgresión de transgenes *elite* para la obtención de cultivares sintéticos (Figura 3B). En la Figura 3B se muestra la estrategia

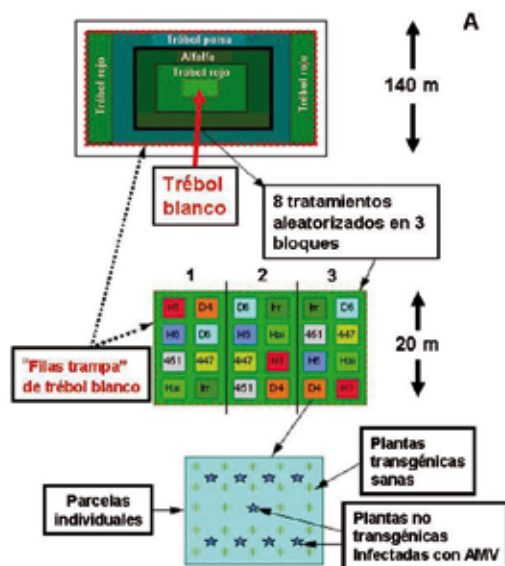


Figura 3. A) Esquema de la liberación a campo, a pequeña escala, de plantas transgénicas de trébol blanco inmunes a AMV.

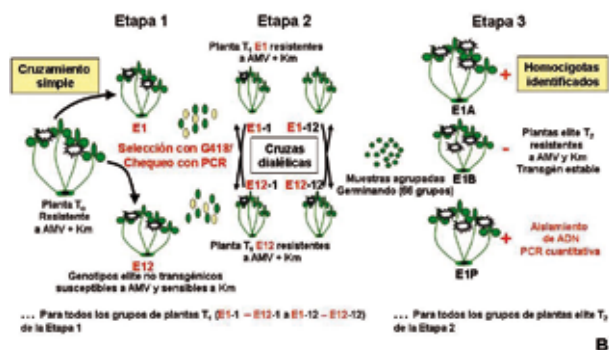


Figura. B) Estrategia para el desarrollo de germoplasma elite transgénico de trébol blanco inmune a AMV, basada en la utilización de PCR cuantitativa para detectar las plantas homocigotas para los transgenes (*npt2* y *AMV4*).

utilizada para la obtención de plantas de trébol blanco *elites* inmunes a AMV, homocigotas para los transgenes. Involucra cruza inicial de los eventos de transformación elegidos luego de su evaluación a campo con plantas *elite* no transgénicas (Etapa 1); selección por resistencia a antibiótico de la progenie que lleva el transgén y está ligado al gen marcador *npt2*, o análisis por PCR, seguido por cruza dialélicas

entre la progenie T1 (Etapa 2); identificación por PCR cuantitativa o cruce de prueba de las plantas T2 que son homocigotas para los transgenes (Etapa 3). Por último, las plantas *elite* homocigóticas para los transgenes son sembradas para su selección en un criadero junto con líneas parentales *elite* no transgénicas. De esta manera se identificarán los nuevos parentales de los cultivares sintéticos transgénicos experimentales, que posteriormente serán evaluados en distintos ambientes.

3 Genómica

El mejoramiento de las plantas forrajeras ha entrado en la era genómica, lo cual significa que se cuenta con gran cantidad de nuevas herramientas y tecnologías para el descubrimiento de genes y para el análisis global de los genomas. Todo esto aportará información acerca de todos los aspectos del crecimiento vegetal, desarrollo, diferenciación y respuestas a estreses bióticos y abióticos, revolucionando el mejoramiento vegetal y la producción. Miles de etiquetas de secuencias expresadas (ESTs, *Expressed Sequence Tag*) han sido el punto de partida para dilucidar la función de miles de genes vegetales, permitiendo la creación de bases de datos de los principales cultivos; posibilitando la identificación, caracterización funcional y uso de genes valiosos para los sistemas de producción de forraje.

3.1 Descubrimiento de genes y microarreglos para el análisis de la expresión de genes en plantas forrajeras

Las especies modelo para las cuales se han encarado proyectos de genómica basados en ESTs son *Lotus japonicus* y *Medicago truncatula*. Se han generado más 220.000 ESTs de *M. truncatula* por consorcios internacionales financiados por el múltiples entedidas de diversos países. Otro programa entre *Agriculture Victoria-DNRE* (Australia) y *AgResearch Limited* (Nueva Zelanda) generó más de 100.000 ESTs de cultivos forrajeros clave para la agricultura de clima templado, como son el raigrás perenne (*L. perenne*) y el trébol blanco (*T. repens*). Para ello se secuenciaron a gran escala clones seleccionados al azar de genotecas de ADNc que representaban un amplio rango de

órganos, estados de desarrollo y tratamientos experimentales. Más de 50.000 secuencias de ADN de raigrás perenne fueron categorizadas funcionalmente.

Dentro de este programa se realizaron microarreglos de ADNc de alta densidad (con 4.000-5.000 gotas/arreglo) para su utilización en la identificación de secuencias de tréboles y raigrases (Figura 4).

Una de las aplicaciones de estos microarreglos basados en ESTs de plantas forrajeras es la fenotipificación molecular. Esto comprende el análisis de patrones de expresión global o patrones de expresión específicos utilizando hibridación con sondas complejas de genotipos contrastantes o poblaciones y ambientes contrastantes. Todo esto puede utilizarse para integrar los datos de microarreglos con aquellos de selección fenotípica convencional.

El análisis comparativo de secuencias y datos de microarreglos de raigrás y tréboles con aquellos de *Arabidopsis* y arroz, conjuntamente con los programas de descubrimiento

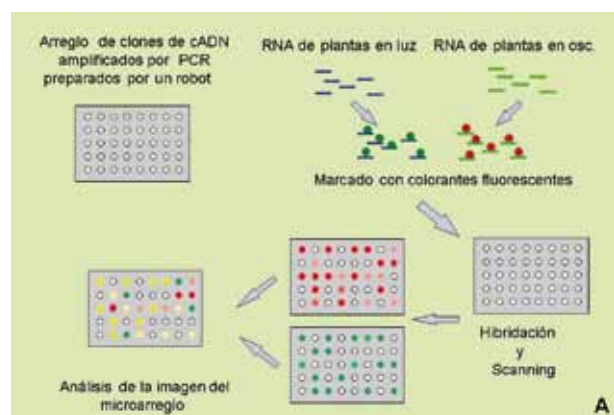


Figura 4. A) Perfiles de expresión a través de microarreglos de ADNc utilizando dos colorantes fluorescentes (Cy5 y Cy3) para marcar dos muestras de RNA total provenientes de distintas situaciones de crecimiento o desarrollo, por ejemplo plantas creciendo en luz (Cy3) y plantas creciendo en oscuridad (Cy5). Luego de la hibridación, los puntos marcados en verde indican los genes que se encuentran regulados positivamente cuando las plantas se encuentran en condiciones de luz, aquellos marcados en rojo corresponden a los regulados positivamente cuando se hallan en oscuridad y los que están en amarillo corresponderían a aquellos genes que están regulados positivamente en ambas situaciones.

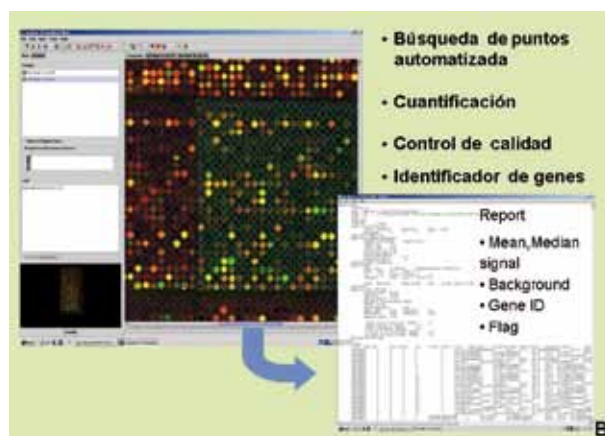


Figura 4. B) Análisis de la imagen de los microarreglos de etiquetas expresadas de ADN (ESTs) (ImageGene Software).

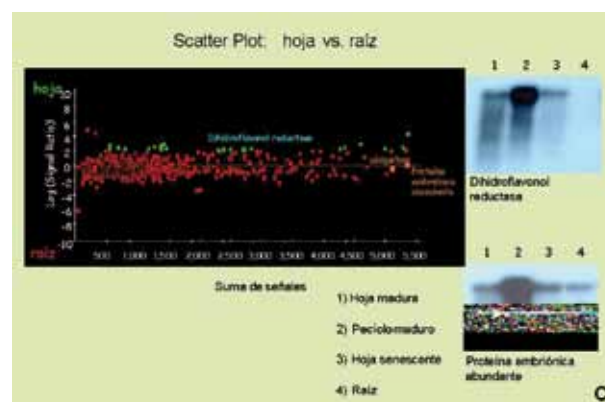
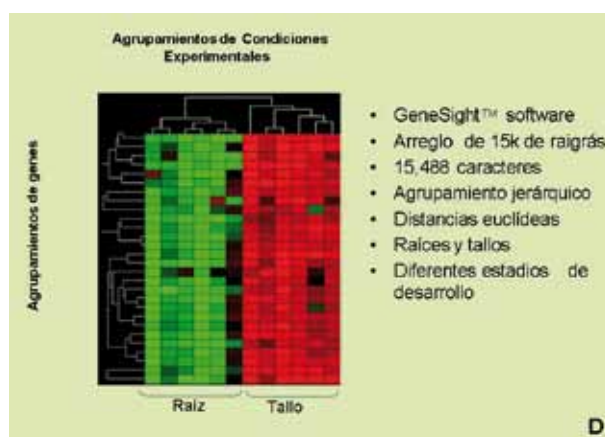


Figura 4. C) Microarreglos de ADNc de trébol blanco utilizando RNA de hojas y raíz. Confirmación por Northern de la expresión de los genes para la dihidroflavonol reductasa y una proteína embrionaria.



de ESTs en *M. Truncatula*, han aportado información acerca de los aspectos conservados y divergentes en la organización y función del genoma de gramíneas y leguminosas.

3.2 Simbio y patogenómica

Las leguminosas y gramíneas ofrecen la posibilidad de estudiar, a nivel genómico, interacciones de distintos tipos como por ejemplo: planta/patógeno, simbiosis leguminosa/bacteria fijadora de nitrógeno, asociaciones leguminosa/micorriza y endosimbiosis gramínea/endófito. La información obtenida en estos estudios será de gran valor para desarrollar resistencia a patógenos y mejorar las asociaciones beneficiosas en las forrajeras.

El trabajo de descubrimiento de genes en *M. truncatula* está orientado a estudiar la respuesta de la planta ante los patógenos y a caracterizar diferentes sistemas patogénicos que incluyen hongos como *Colletotrichum trifolii* y *Phytophthora medicaginis*, y bacterias como *Xylella fastidiosa* y *Xanthomonas alfalfae*.

Para mediados del 2000 el US *M. truncatula* Functional Genomics Project generó 27.000 secuencias de ADN que incluían 2.828 ESTs de hojas infectadas con *Colletotrichum*, 2.462 ESTs de hojas infectadas con *Phytophthora*, 3.259 ESTs de micorrizas de raíz y aproximadamente 9.500 secuencias de raíz de diferentes estadios luego de la inoculación con *Sinorhizobium meliloti*, y de nódulos maduros y senescentes.

Por otro lado existe un proyecto de genómica funcional integrado tendiente a dilucidar los eventos conducentes a la nodulación en las leguminosas utilizando *L. japonicus* como modelo. Este proceso de nodulación involucra la interacción compleja entre genes bacterianos y sus productos, con procesos de desarrollo en la planta que involucran percepción y transmisión de señales y morfogénesis. El objetivo es comprender la contribución genética de la planta a esta simbiosis a fin de mejorar las asociaciones naturales beneficiosas para la agricultura y el ambiente. Este y otros recursos genéticos de *M. truncatula* y *L. japonicus* contribuirán significativamente a conocer y comprender las respuestas a patógenos y estrés y las interacciones de la rizósfera con las leguminosas forrajeras.

Agriculture Victoria-DNRE también ha encarado un programa de genómica de endófitos de gramíneas, focalizado en el descubrimiento de genes gramínea-endófito en la asociación *Festuca arundinacea/Neotyphodium coenophialum*. A través de este programa se han generado aproximadamente 8.000 secuencias del hongo que se analizaron a través de *software* de búsquedas por homología, y se caracterizaron funcionalmente. El principal interés está dirigido al descubrimiento de genes involucrados en la colonización del huésped, en el aporte de nutrientes para el hongo endofítico y en la biosíntesis de metabolitos secundarios activos y su regulación. Este proyecto también aportará información acerca de la interacción endófito-huésped, así como de los mecanismos fisiológicos conducentes a un incremento en el vigor de la planta y a una mayor tolerancia a estreses. Estas herramientas genómicas y el conocimiento generado posibilitarán el desarrollo de tecnologías para manipular la asociación gramínea-endófito y así incrementar el rendimiento de la planta, mejorar la tolerancia a estreses bióticos y abióticos y alterar la especificidad endófito huésped a fin de beneficiar a la industria del césped y del forraje.

En otro proyecto similar se han tratado de aislar y caracterizar genes involucrados en la biosíntesis de indol-diterpenos y ergopeptinas, en la asociación *Lolium perenne-N. lolii*. Estos compuestos son tóxicos para los mamíferos. Actualmente se conoce la base genética de la variación fenotípica de cinco cepas de *N. lolii* con diferentes perfiles de expresión de la toxina. La protección de los meristemas de *Lolium* de un exceso de herbivoría es vital para el éxito reproductivo y la distribución de esta y otras especies de gramíneas. El desarrollo de asociaciones simbióticas entre gramíneas y endófitos del grupo *Epichloë/Neotyphodium* representa una forma única de protección donde el huésped y el simbionte han co-evolucionado para beneficio mutuo. El hongo le aporta protección al huésped a través de la producción de metabolitos bioprotectores en retribución por los nutrientes para su crecimiento.

El clonado de los genes de estas vías metabólicas es un objetivo importante ya que se conoce poco acerca de la enzimología, de la

Tabla 1. Descubrimiento de genes en la flora indígena de Australia y en plantas nativas de la Antártida

Organismo	ESTs	Unigenes ^a	Genes nuevos ^b
<i>Deschampsia Antarctica</i>	12403	7736	3350
<i>Lachnagrostis robusta</i>	5379	2723	716
<i>Lachnagrostis adamsonii</i>	4446	1730	438
<i>Microlaena stipoides</i>	4210	2736	441
<i>Viminaria juncea</i>	6123	4453	1726
<i>Glycyrrhiza acanthocarpa</i>	6570	4872	2202

^a ESTs de más de 100 nt e identidad superior a 95%, agrupadas en secuencias consensos.

^b La identificación de nuevos genes se realizó consultando la base de datos de GenBank mediante BLASTn, usando como valor máximo de probabilidad 1×10^{-5} .

biosíntesis de toxinas y de las condiciones para la síntesis endofítica de estos metabolitos *ex planta*.

3.3 Xeno-genómica

La genómica comparativa basada en el análisis de ESTs de varias plantas tolerantes a estreses abióticos permitirá la identificación de redes de genes asociados con estreses ambientales tales como alta salinidad, sequía y bajas temperaturas, así como la determinación de vías bioquímicas conservadas involucradas en las respuestas.

La investigación genómica utilizando especies vegetales exóticas, conocida como xeno-genómica, incluye el descubrimiento de genes a través del secuenciado de ESTs a gran escala y el análisis de la expresión global de genes con microarreglos basados en las mismas. Esto posibilitará la obtención de genes clave y variantes de genes de plantas exóticas, muchos de ellos nuevos y la determinación de sus patrones de expresión en respuesta a estreses abióticos específicos.

Un programa de xeno-genómica llevado a cabo por *Agriculture Victoria-DNRE* se encuentra abocado a seleccionar gramíneas y leguminosas australianas nativas y exóticas, adaptadas a estreses ambientales extremos.

En este marco se han aislado y caracterizado genes que permiten a estas especies tolerar estreses abióticos como sequía, salinidad y suelos de baja fertilidad.

Entre las especies estudiadas se incluyen gramíneas australianas nativas, tales como las halotolerantes *Agrostis adamsonii* y *A. robusta* y la especie tolerante a aluminio *Microlaena stipoides* (Tabla 1). También incluye especies exóticas como *Deschampsia antarctica*, una de las dos únicas plantas vasculares nativas de la Antártida. Estos descubrimientos facilitarán el desarrollo de estrategias efectivas de mejoramiento molecular que permitirán incrementar la tolerancia a estreses abióticos en forrajeras y otros cultivos.

4 Resumen y conclusiones

En los últimos años se ha realizado un considerable progreso en el establecimiento de las metodologías requeridas para el mejoramiento molecular de plantas forrajeras. Numerosas estrategias biotecnológicas están siendo consideradas en relación al mejoramiento de la calidad nutritiva a través de la alteración en la biosíntesis de lignina, carbohidratos solubles y protoantocianinas, y de la expresión regulada de proteínas ricas en

aminoácidos esenciales, resistentes al rumen. También se pretende incrementar la resistencia a patógenos y plagas, manipular el crecimiento y desarrollo a fin de incrementar la persistencia y demorar senescencia, impedir la floración, regular negativamente los alérgenos del polen. Más recientemente el creciente interés en la producción de biocombustibles a partir de celulosa ha impulsado a la ingeniería genética de ligninas para facilitar la liberación de celulosa y hemicelulosa. Las primeras plantas forrajeras transgénicas están siendo evaluadas a campo y se han seleccionado eventos de transformación para el desarrollo de nuevos cultivares.

Las herramientas genómicas permiten comprender mejor la genética, fisiología y bioquímica de varios procesos vegetales complejos y acelerar la aplicación de estrategias de tecnología génica para el mejoramiento de plantas forrajeras.

La aplicación de herramientas y metodologías moleculares para el mejoramiento de estas especies complementa, en gran medida, a la selección empírica basada en el fenotipo. Estas estrategias son promisorias solamente cuando se las considera dentro de un programa de mejoramiento. Los programas más exitosos son aquellos que incluyen equipos multidisciplinario, cuyo esfuerzo resultará crítico para el desarrollo de cultivares destinados al mercado y para de plantas forrajeras destinadas a otros usos.

La investigación genómica en las plantas forrajeras permite el desarrollo de tecnologías que van más allá de los sistemas de producción de forrajes, incrementando significativamente el valor de las semillas y de los productos agrícolas. La infinidad de genes vegetales que se descubren continuamente representan un recurso invaluable.

5 Lecturas Recomendadas

- Austin-Phillips S. and Ziegelhoffer, T.** 2000. The production of value-added proteins in transgenic alfalfa. In: Spangenberg G. (ed.) Molecular breeding of forage crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000. Capítulo 18.
- Casler MD. y Kaeppler HF.** 2000. Molecular breeding for herbage quality in forage crops. In: Spangenberg G. (ed.) Molecular breeding of forage crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000. Capítulo 10.
- Forster JW.; Jones ES.; Koelliker R.; Drayton MC.; Dumsday JL.; Dupal MP.; Guthridge KM.; Mohoney NL.; Van Zijll de Jong E. and Smith K.** 2000. Development and implementation of molecular markers for forage crop improvement. In: Spangenberg G. (ed.) Molecular breeding of forage crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000. Capítulo 6.
- Gresshoff PM.; Men AE.; Maguire T.; Grimmond S.; Lohar D.; Ayanru S.; Meksem K.; Lightfoot D. and Stiller J.** 2000. An integrated functional genomics and genetics approach for the plant's function in symbiotic nodulation. In: Spangenberg G. (ed.) Molecular breeding of forage crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000. Capítulo 17.
- Humphreys M. O.** 2005. Molecular breeding for the genetic improvement of forage crops and turf. Wageningen Academic Publishers, Netherlands.
- Humphreys MW., Yadav R S., Cairns AJ., Turner LB., Humphreys J. y Skot L.** 2005. Review: A changing climate for grassland research. *New Phytologist*, 169, 9–26.
- Kalla R.; Chu P. y Spangenberg G.** 2000. Molecular breeding of forage legumes for virus resistance. In: Spangenberg G. (ed.) Molecular breeding of forage crops. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 2000. Capítulo 13.
- Li X., Weng J., and Chapple C.** 2008. Improvement of biomass through lignin modification. *The Plant Journal*, 54, 569–581.

V. CAPÍTULO 3

Caracterización molecular de la apomixis y su aplicación en la agricultura

Silvina C. Pessino y Juan Pablo A. Ortiz

Qué es la apomixis

Algunas plantas con flores presentan un modo asexual de reproducción llamado *apomixis*. Consiste en la formación de semillas que contienen embriones genéticamente idénticos a la planta madre, sin que intervengan los procesos de meiosis y fecundación. La apomixis fue descrita por primera vez en 1841 en la planta australiana *Alchornea ilicifolia* por J. Smith. Cuando un ejemplar femenino de esta especie dioica fue llevado a los Kew Gardens de Londres desde Asia, la planta aislada floreció y produjo semillas en abundancia en ausencia de un progenitor masculino, poniendo al carácter en evidencia. Paradójicamente, los primeros experimentos con plantas apomícticas fueron realizados en forma involuntaria por Gregor Mendel, quien utilizó cruza interespecíficas de *Hieracium* para intentar confirmar los resultados obtenidos en sus famosos estudios sobre la herencia en las arvejas de jardín. Mendel atribuyó erróneamente a una supuesta “frecuente autopolinización” la falta de segregación observada en varios cruzamientos. Hoy sabemos que muchas especies del género *Hieracium* son apomícticas.

Se considera que la apomixis ha evolucionado como un sistema de reproducción alternativo a la sexualidad a través de la reformulación de sus programas de desarrollo. Por eso, para comprender mejor su funcionamiento, es necesario compararla con la reproducción sexual. La sexualidad en las angiospermas comprende la alternancia cíclica entre los estados de esporófito (la planta misma, $2n$) y gametófito (el grano de polen y el saco embrionario, n). La meiosis que ocurre en las flores posibilita la recombinación y reducción del contenido genético y da lugar a la formación de las esporas femeninas (megásporas) en el óvulo y masculinas (micrósporas) en las anteras. En la megas-

porogénesis se generan cuatro células haploides a partir de una “célula madre de la megáspora” que se diferencia en la nucela del óvulo. En la mayor parte de las angiospermas, tres de estas células haploides degeneran, mientras que la restante constituye la megáspora funcional. Por el proceso de megagametogénesis, (una serie acotada de mitosis ordenadas), esta célula desarrolla un megagametófito conocido como “saco embrionario”. El saco embrionario más común es el de tipo *Polygonum*, formado por 8 núcleos haploides (n) contenidos en siete células, a saber: la ovocélula, dos sinérgidas, una célula central binucleada, y tres antípodas. Por otra parte, en las anteras las micrósporas desarrollan los granos de polen mediante un proceso de microgametogénesis. El polen maduro está típicamente integrado por tres células haploides (n), dos de las cuales constituyen los gametos masculinos. La otra tiene una función relacionada con el crecimiento del tubo polínico.

La formación de la semilla requiere del proceso de doble fecundación: un gameto masculino (n) se fusiona con la ovocélula (n) para originar al cigoto ($2n$). A partir de este cigoto se desarrolla el embrión. La célula central del saco embrionario con sus dos núcleos ($n + n$) se fusiona con el otro gameto masculino para originar el endospermo. Así, la fusión de dos gametos haploides únicos derivados de la distribución al azar del material genético durante las meiosis masculina y femenina resulta en la generación de progenies genéticamente diversas. En resumen, en la reproducción sexual la meiosis produce la recombinación genética de los caracteres de ambos progenitores y gametos haploides. La fecundación fusiona de manera aleatoria un gameto masculino con uno femenino para originar un nuevo individuo con una constitución genética única.

La apomixis elude la ruta sexual evitando la reducción meiótica y la fecundación. El óvulo desarrolla una semilla cuyo embrión contiene exactamente el mismo genotipo que la planta que lo origina. Por lo tanto este carácter (también llamado *agamosperma*) ha sido definido como *reproducción asexual a través de semillas*. La apomixis fue descrita en más de 400 especies de plantas pertenecientes a 35 fami-

lias diferentes, entre las que se destacan las Gramíneas, las Compuestas, las Rosáceas y las Rutáceas. Presenta formas diversas y parece haber surgido varias veces independientemente durante la evolución. Brevemente, los embriones apomícticos pueden formarse a través de una ruta *esporofítica* o *gametofítica*.

En la apomixis *esporofítica*, también llamada *embrionía adventicia*, los embriones surgen directamente de una célula somática de la nucela o de los tegumentos del óvulo. Comúnmente se forman embriones múltiples a partir de células nucelares (esporofíticas) que comparten el óvulo junto con el embrión de origen sexual y utilizan su endospermo para desarrollarse. Esta forma de apomixis aparece comúnmente en los cítricos, los cuales se convirtieron en un sistema modelo para estudiar el proceso. En la *apomixis gametofítica* se forman siempre sacos embrionarios que difieren en algunos aspectos del gametófito femenino haploide (n) generado a partir de la megáspora funcional. Su principal diferencia es precisamente el hecho de ser diploides ($2n$) ya que los núcleos que los conforman no han pasado por el proceso meiótico y por lo tanto no han reducido su contenido de ADN. Por eso se dice que estos sacos embrionarios o megagametófitos surgen por un proceso de *apomeiosis* (apo: prefijo griego de significación negativa). De acuerdo con el origen de la célula que genera al saco embrionario y al embrión, la apomixis gametofítica puede ser clasificada como: *diplosporía*, cuando el saco embrionario se origina a partir de la célula madre de la megáspora misma ya sea por mitosis o luego de una falla en la meiosis o *aposporía*, cuando el saco embrionario se origina directamente por mitosis a partir de una célula somática cercana, usualmente una célula de la nucela. Los sacos embrionarios, sean éstos apospóricos o diplospóricos, contienen un gameto femenino $2n$, la ovocélula, a partir de la cual se desarrolla directamente el embrión por partenogénesis sin que exista fecundación. Así, mientras en el proceso sexual la reducción meiótica se complementa con la fecundación que restaura el nivel de ploidía $2n$, en la apomixis gametofítica la ausencia de reducción se complementa con la partenogénesis. La apomixis gametofítica fue estudiada

más profundamente que la apomixis esporofítica, principalmente por ser el tipo presente en las gramíneas, donde muchas especies con valor agronómico presentan este modo de reproducción. En la Figura 1 se muestra un esquema comparativo simplificado de las vías de reproducción sexual y apomíctica en angiospermas. Los diferentes mecanismos de apomixis observados en distintos géneros en comparación con el proceso sexual de megagametogénesis, fueron esquematizados en la Figura 2.

Recordemos que en las angiospermas existe una doble fecundación. En la apomixis gametofítica la partenogénesis excluye invariablemente una de las etapas de esta doble fecundación: la unión de los gametos masculinos con los femeninos. Sin embargo, no necesariamente se anula la fecundación de los núcleos polares. Aunque en algunos casos el endospermo puede desarrollarse en forma autónoma (sin la unión de un gameto masculino con los núcleos polares del saco embrionario apospórico o diplospórico) en muchas especies apomícticas, como en la mayoría de las gramíneas tropicales, es necesario que un gameto masculino se fusione con el o los núcleos polares de la célula central del saco embrionario para formar el endospermo. A este proceso se lo llama *pseudogamia*.

Casi todos los sacos embrionarios diplospóricos (con excepción de los de *Eragrostis*) conservan la típica estructura de los sacos embrionarios de origen meiótico, generalmente con siete células y ocho núcleos. Sin embargo, en la aposporía los sacos muestran por lo general una constitución muy variable, tanto en taxones diferentes como dentro de un mismo taxón (Figura 2). Por ejemplo, en gramíneas tropicales o subtropicales, el saco apospórico se forma por dos mitosis consecutivas, con permanencia de los cuatro núcleos en un solo polo celular. Así se organiza un megagametófito con una ovocélula flanqueada por dos sinérgidas y una célula central uninucleada y extensamente vacuolizada. Esta estructura de saco apospórico fue descrita por primera vez para *Panicum maximum* y por esa razón a los megagametófitos con esta morfología se los conoce como sacos apospóricos de tipo *Panicum*.

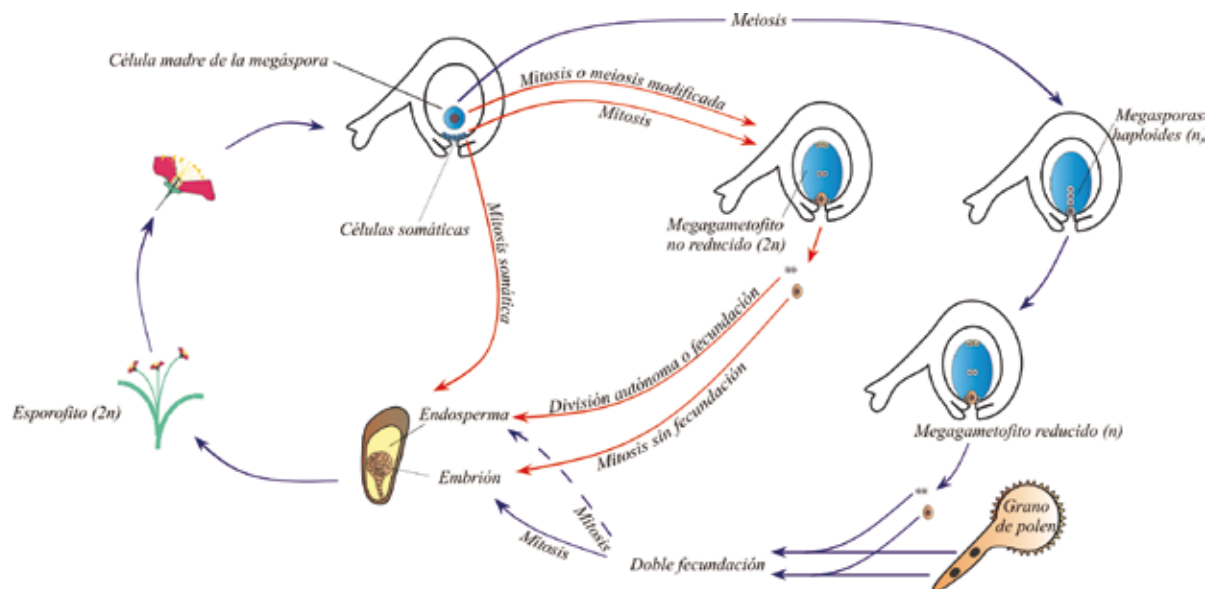


Figura 1: Rutas biológicas de reproducción sexual y apomítica. Durante la sexualidad una célula de la nucela del óvulo se diferencia como célula madre de la megáspora y luego de sufrir un proceso de meiosis da origen a cuatro megásporas haploides. Tres de estas megásporas degeneran y la cuarta da origen a la formación de un saco embrionario luego de una serie de mitosis, donde todos los núcleos celulares están reducidos (n). La ovocélula y los núcleos polares del saco son fecundados por los núcleos generativos del polen para generar el cigoto y el núcleo primario del endosperma, respectivamente. El cigoto da origen al embrión a través de sucesivas mitosis. La apomixis consiste en la formación de un embrión a partir de una célula no reducida (que no ha sufrido meiosis). En la apomixis gametofítica se observa la formación de un megagametofito con células no reducidas, cuya ovocélula ($2n$) genera un embrión por partenogénesis. En la embriónía adventicia el embrión es generado directamente a partir de una célula de la nucela en un proceso similar a la embriogénesis somática.

Sin embargo, en las especies apospóricas de *Paspalum*, un género también perteneciente a la tribu Paníceas igual que *Panicum*, existe una característica en la constitución de los sacos apospóricos que los diferencia netamente del tipo *Panicum*: en *Paspalum* los sacos generalmente tienen una célula central con dos núcleos polares y a veces tres (Figura 3). Esta característica es importante porque debido a la pseudogamia, la relación genómica materna/paterna del endospermo es distinta en las plantas sexuales y en las apospóricas. En las sexuales, hay una relación 2/1 materno/paterno (madre $n + n$; padre n), mientras que en las apospóricas esa relación es generalmente 4/1 (madre $2n + 2n$; padre n). En *Panicum* la relación es 2/1 tanto en las sexuales como en las apospóricas ($n + n/n$ en las sexuales y $2n/n$ en las apospóricas).

Otros aspectos sustanciales del carácter apomixis

Hay varias características particulares de este modo de reproducción que merecen ser remarcadas. Por una parte la apomixis usualmente no altera la formación del microgametofito y la meiosis ocurre en las anteras generando polen reducido, aunque a veces se observan tasas inferiores de viabilidad. Además, apomixis y sexualidad no son procesos mutuamente excluyentes ya que pueden aparecer simultáneamente sacos reducidos (meióticos) y no reducidos (provenientes de apomixis) en una misma planta, en una misma inflorescencia y aún en un mismo óvulo. Una planta apomítica que es capaz de generar al menos una parte de su progenie por medios sexuales se conoce como "facultativa". Por lo tanto, en los genotipos apomíticos facultativos las proge-

		Tipo	Meiosis			Mitosis			Saco
Sexualidad	Embrionía adventicia	<i>Polygonum</i>							
		<i>Taraxacum</i>							
Apomixis	Diplosporía	<i>Ixeris</i>							
		<i>Blumea</i>							
		<i>Elymus</i>							
		<i>Antennaria</i>							
		<i>Eragrostis</i>							
	Aposporía	<i>Hieracium</i>							
		<i>Panicum</i>							
		<i>Paspalum</i>							

Figura 2: Distintos tipos de sacos embrionarios formados durante el proceso de apomixis. En la mayoría de las plantas angiospermas sexuales, la célula madre de la megáspora realiza un proceso de meiosis y genera cuatro megásporas haploides, tres de las cuales degeneran. La cuarta megáspora lleva a cabo una serie de tres divisiones mitóticas para formar un saco embrionario reducido y octanucleado. En el proceso de embrionía adventicia la formación del saco sexual es normal, pero las células nucelares adyacentes desarrollan embriones somáticos que coexisten con el embrión de origen sexual. En la apomixis diplospórica la célula madre de la megáspora realiza una serie de mitosis para generar un saco embrionario no reducido o inicia un proceso de meiosis que falla y se genera un saco embrionario no reducido. En la apomixis apospórica células de la nucela cercanas a la célula madre de la megáspora realizan varias mitosis consecutivas para generar un saco embrionario no reducido cuya característica más notable es la ausencia de antípodas.

nies segregan como clases maternas ($2n + 0$) y no-maternas o aberrantes. Hay tres tipos diferentes de individuos aberrantes que pueden encontrarse en la progenie de una planta apomíctica: 1) híbridos BIII ($2n + n$) que resultan de la fecundación de una ovocélula no reducida, 2) híbridos BII ($n + n$) que resultan de la fe-

cundación de una ovocélula reducida y 3) haploides ($n + 0$) generados por partenogénesis a partir de una ovocélula reducida.

Por otra parte, la apomixis gametofítica se relaciona fuertemente con la poliploidía. En general las especies apomícticas presentan razas de bajos niveles de ploidía (usualmente

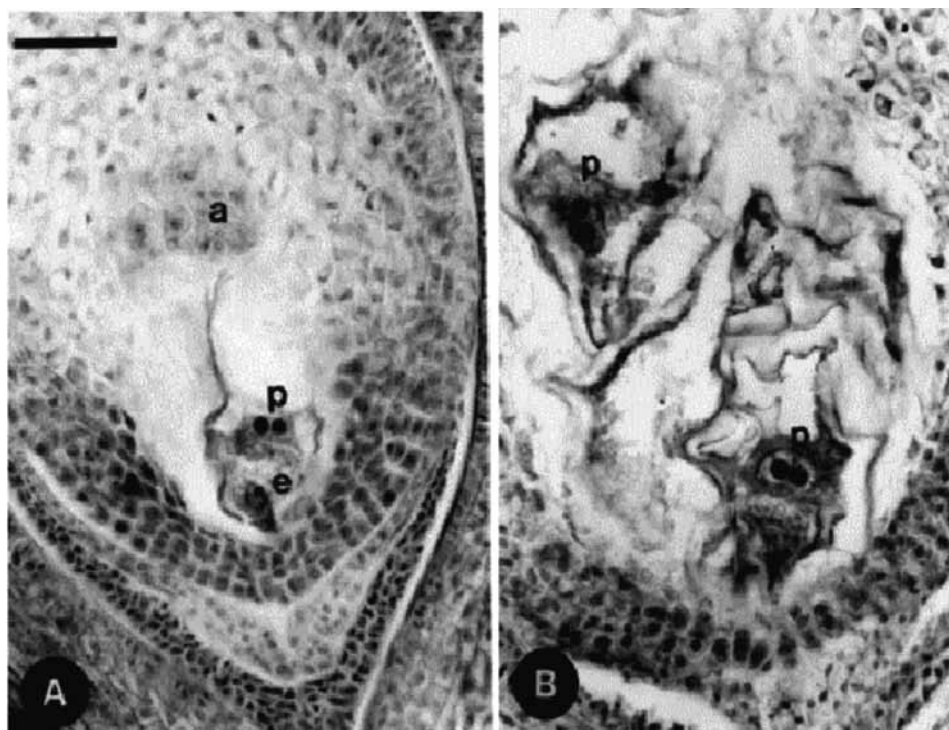


Figura 3: Microfotografías de secciones de óvulos de razas tetraploides de *Paspalum notatum*. A: óvulo conteniendo un saco embrionario meiótico (las dos sinérgidas y algunas de las antípodas no se observan porque están en una sección adyacente al corte del óvulo). B: óvulo conteniendo dos sacos embrionarios apospóricos con dos núcleos polares. Referencias: a, antípodas; e, ovocélula, p, núcleos polares; barra = 30 micras

diploides) que se reproducen por sexualidad y otras de mayor nivel de ploidía (por ejemplo tri, tetra o pentaploides) que se reproducen por apomixis. Estos complejos integrados por individuos sexuales y apomícticos de distinto nivel de ploidía se conocen como “complejos agámicos” y se consideran estructuras reproductivas complejas y evolucionadas donde la sexualidad permite la generación de nuevos genotipos y la apomixis la propagación clonal muy eficiente de las combinaciones genéticas superiores. Al menos para algunas especies (por ejemplo *P. notatum* y *P. rufum*) existen evidencias que sugieren que la diversidad generada a niveles menores de ploidía puede ser impulsada hacia los niveles poliploides por medio de eventos sucesivos de hibridación $2n + n$. La relación de la apomixis con la poliploidía es estrecha ya que existen muy pocos casos reportados de diploides que muestran repro-

ducción apomíctica. Existen varias teorías que explican la baja frecuencia de apomixis a nivel diploide. Una fue propuesta por Nogler y sostiene que un alelo dominante A, responsable de la aposporia, no puede ser transmitido a través de gametas haploides, con lo cual la apomixis no puede ser encontrada en diploides naturales. Otra fue planteada por Mogie y sostiene la existencia de un fenómeno de dosaje génico para un alelo mutante a^- , en presencia del alelo salvaje a^+ , para que el carácter se exprese. De acuerdo a esta teoría la ausencia de apomixis en los diploides naturales se debe más bien a una falta de expresión, en lugar de la no-transmisión propuesta por Nogler. Mogie sugiere que se necesitan dos copias del alelo a^- (frecuencia mayor a 0,5) para la expresión de la apomixis. En contraste con esta teoría, Noirot propone que el alelo a^+ no debería estar presente en una frecuencia mayor de 0,25.

La demostración del carácter dominante del alelo determinante de la apomixis en muchas especies apospóricas contradice estas últimas hipótesis. Sin embargo, en el género *Paspalum* se demostró que debe existir cierto efecto de dosaje relacionado con la poliploidía, ya que la sola duplicación cromosómica con colchicina de diploides sexuales indujo, al menos en algunos casos, la obtención de tetraploides apomícticos. En base a esas observaciones, Quarín y colaboradores postularon que el determinante genético responsable de la apomixis existiría a nivel diploide, pero que su expresión estaría condicionada por uno o varios genes adicionales sujetos a efectos de dosaje. Una hipótesis alternativa podría ser que una condición epigenética asociada con la poliploidía posibilitara la expresión del alelo determinante del carácter. Así, a nivel diploide el alelo determinante de la apomixis estaría eventualmente presente, pero sólo sería capaz de expresarse en forma apreciable en entornos poliploides que provean un paisaje epigenético propicio.

Mejoramiento genético de especies naturalmente apomícticas

Algunas especies apomícticas tienen un valor agronómico muy importante, como es el caso de varias gramíneas forrajeras, los cítricos, el mango y las fresas. Hasta el presente, sólo se dispone de programas de mejoramiento avanzados en algunas gramíneas forrajeras entre las que se encuentran especies de los géneros *Brachiaria*, *Cenchrus*, *Eragrostis*, *Panicum*, *Paspalum*, *Pennisetum* y *Poa*. En principio, las plantas apomícticas facultativas pueden ser mejoradas por metodologías de cruzamiento convencionales, ya que producen al menos algunos sacos embrionarios meióticos que posibilitan la hibridación y selección. En cambio en los apomícticos obligados (que se reproducen completamente o casi completamente en forma clonal), la hibridación y el análisis de segregación son impracticables. Las progenies de tales plantas exhiben siempre el fenotipo materno o pueden ocasionalmente aparecer variantes que probablemente surjan de mutaciones más que de segregación sexual. Por ello, la disponibilidad de individuos sexuales o con algún grado de sexualidad

(apomícticos facultativos), del mismo nivel de ploidía en el cual se expresa la apomixis es un requisito fundamental para el mejoramiento de estas especies. Estos individuos presentan un cierto grado de variabilidad como para aumentar las posibilidades de supervivencia frente a cambios ambientales y aportan asimismo germoplasma útil para el mejoramiento.

Uno de los principales requisitos para llevar adelante un programa de mejoramiento de una especie apomíctica es la colección de germoplasma diverso desde las fuentes de origen. Una buena colección posibilita ampliar la base genética disponible y eventualmente identificar introducciones sexuales o altamente sexuales (apomícticas facultativas con alta expresión de sexualidad). La evaluación de especies relacionadas es también una alternativa importante cuando no se dispone de plantas sexuales de la especie de interés. Ejemplos de cruzamientos interespecíficos e incluso intergenéricos empleados como punto de partida en programas de mejoramiento se encuentran en *Brachiaria*, *Zea x Tripsacum* y *Pennisetum*, entre otros.

El adecuado conocimiento de la biología floral, citogenética y modo de reproducción de los materiales disponibles es un requisito fundamental para cualquier estrategia de mejoramiento. Como se verá más adelante, los estudios realizados para determinar la base genética de la apomixis en varias especies de gramíneas indican que el carácter presenta un tipo de herencia relativamente simple, haciendo posible entonces su utilización en programas de mejoramiento una vez que son detectados individuos sexuales o apomícticos facultativos. En estos casos los genotipos apomícticos obligados con características deseables pueden ser usados como dadores de polen. Debido a que los gametos masculinos son reducidos y que la mayoría de las especies apomícticas son altamente heterocigotas, los cruzamientos entre individuos sexuales (utilizados como progenitores femeninos) y apomícticos (empleados como dadores de polen) pueden conducir a la generación de progenies F_1 variables donde es posible seleccionar. Hay que tener en cuenta que si bien son necesarios individuos sexuales o con adecuada expresión de sexualidad

para realizar las cruzas, en el momento de la selección habrá que usar el criterio contrario, es decir, seleccionar los mejores fenotipos que contengan un alto grado de expresión de la apomixis. Esto conducirá a la obtención de nuevas variedades genéticamente estables. El objetivo final de un programa de mejoramiento de una especie apomíctica en el cual ha sido posible obtener recombinación genética es la identificación en la población segregante de los genotipos superiores, con reproducción completamente (o casi completamente) apomíctica que puedan ser transformados en cultivares mediante su multiplicación por semillas. El camino no es sencillo porque en cada generación es necesario distinguir en la progenie, cuáles son los individuos generados por sexualidad y cuáles por apomixis. Dentro de los generados por sexualidad, habrá que seleccionar los que al mismo tiempo posean las mejores características agronómicas y presenten un alto grado de expresión de la apomixis. Otro aspecto a tener en cuenta es el nivel de ploidía de los progenitores que serán empleados en los cruzamientos. Los primeros estudios de hibridación indicaron la necesidad de realizar cruzas entre especies sexuales y apomícticas con el mismo nivel de ploidía ya que varios intentos realizados entre diploides sexuales y poliploides (en general tetraploides) apomícticos condujeron a la generación de progenies estériles.

En las gramíneas tropicales y subtropicales se ha hecho un buen uso del carácter en el mejoramiento, especialmente en la domesticación de algunas especies. Tres líneas de trabajo han sido llevadas adelante en estos programas: 1) *la selección de los mejores genotipos naturales partiendo de una amplia colección de germoplasma* y estudiando características como la productividad de biomasa, calidad de forraje, adaptabilidad al cultivo y a distintas condiciones ambientales, capacidad de producción de semilla, persistencia al pastoreo, y otras. Hay numerosos ejemplos de cultivares de pastos forrajeros apomícticos que se mejoraron usando este tipo de selección. Así se obtuvieron variedades apomícticas de *Paspalum*, *Bracharia*, *Panicum*, *Themeda*, *Eragrostis* y *Melinis*. Tomando como ejemplo al género *Paspalum*, en primer lugar se seleccionaron algunas es-

pecies como *P. notatum* (apomíctico, 4X), *P. dilatatum* (apomíctico, 5X), *P. plicatulum*, *P. atratum*, y luego se eligieron algunos ecotipos por sus cualidades agronómicas y su adaptabilidad al cultivo. En el sur de los Estados Unidos se han popularizado algunas variedades tetraploides apomícticas de *P. notatum* (Argentina, Paraguay, Paraguay 22, Wilmington, Tifton 7 y otras). También se cultivan algunas variedades apomícticas de Dallisgrass (*P. dilatatum*) seleccionadas de la misma manera. En nuestro país se cultivaron durante mucho tiempo dos variedades apomícticas de *P. guenoarum*: el Pasto Rojas y el Pasto Ramírez, seleccionadas por este método en Paraguay. Recientemente se han inscripto otras dos variedades que han sido seleccionadas en la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional del Nordeste: el Pasto Cambá (*P. atratum*) y el Pasto Chané (*P. guenoarum*). Otro ejemplo es el de *Eragrostis curvula* (pasto llorón), cuyos cultivares provienen de selecciones practicadas sobre materiales nativos de Tanzania y Sudáfrica. El pasto llorón fue introducido en Argentina aproximadamente en 1930 en una estancia de la provincia de San Luis. De ahí, en 1947, semillas del cultivar *Tanganyika* (primer cultivar adaptado) fueron remitidas a la Estación Experimental INTA Anguil, donde fueron multiplicadas constituyendo la base de la intensificación del cultivo en nuestro país; 2) la segunda posibilidad de mejoramiento, en la que aún se ha avanzado poco, consiste en *realizar cruzamientos con genotipos sexuales poliploides naturales*, que son muy raros. Un buen ejemplo de esto son las variedades Nueces y Llano de Buffelgrass (*Pennisetum ciliaris*) desarrolladas en EEUU en la década del 70 a partir de cruzamientos entre una rara planta 4x sexual (natural) por plantas apomícticas 4x (que son las comunes en esta especie). También se pueden conseguir plantas 4X sexuales por duplicación cromosómica de una planta diploide sexual. Mediante este tipo de tratamientos se han obtenido plantas tetraploides sexuales en *B. ruziziensis*, *E. curvula*, *P. simplex*, *P. notatum* y *P. hexastachium*. La disponibilidad de estas plantas, además de facilitar los planes de cruzamientos, permitió la realización de estudios detallados de la herencia del carácter apomixis en algunas de estas

especies. Actualmente, poblaciones segregantes de *P. notatum* obtenidas a partir del cruzamiento entre individuos tetraploides sexuales (generados experimentalmente) y apomícticos naturales están siendo evaluadas en pruebas a campo en Florida, EEUU. 3) Una tercer estrategia de mejoramiento consiste en *la obtención de variantes somaclonales a partir del cultivo in vitro de tejidos*. Esta metodología se basa en la aparición de variaciones heredables en las plantas regeneradas *in vitro* (conocidas como variantes somaclonales) que pueden utilizarse en el mejoramiento. Por ejemplo, en el laboratorio de Genética del Departamento de Agronomía de la Universidad Nacional del Sur, Bahía Blanca, Argentina, se obtuvieron varios somaclones de pasto llorón (*Eragrostis curvula*), entre ellos una línea tetraploide apomíctica registrada como cultivar Don Luis (RC9191, 2006-2026) en honor al Ing. Luis A. Mroginski, uno de los pioneros en el desarrollo del cultivo *in vitro* de tejidos vegetales en nuestro país. Don Luis se distingue de los otros materiales de *Eragrostis curvula* por su número cromosómico ($2n = 64$), el ancho de sus hojas, el color azul de las mismas y su resistencia a bajas temperaturas. En estado reproductivo se diferencia por el mayor tamaño de las panojas en relación a otros cultivares.

Usos potenciales de la apomixis en el mejoramiento de plantas naturalmente sexuales

La ausencia de recombinación durante la megagametogénesis y de fecundación de la ovocélula por un gameto masculino posibilita la generación de embriones que presentan una constitución genética idéntica a la de la planta madre. La apomixis es un carácter utilizable en el mejoramiento de plantas y la producción de alimentos, ya que puede constituir una herramienta ventajosa para la estabilización de genotipos superiores y la fijación de combinaciones híbridas. La perspectiva más atractiva que representa la apomixis para la agricultura es la posibilidad de obtener y propagar, por semillas, nuevos híbridos interespecíficos e intergenéricos, permitiendo el desarrollo de genotipos mejor adaptados a los distintos ambientes y con altos rendimientos. En teoría cualquier

combinación genética que lleve los factores determinantes de la apomixis podría ser mantenida y multiplicada como una réplica exacta por innumerables generaciones vía semillas. Esto posibilitaría el uso del carácter para propagar especies que actualmente se clonan vegetativamente o *in vitro*. La perspectiva de reproducir híbridos superiores vía semillas podría representar una ayuda importante para los productores agropecuarios de los países en desarrollo, permitiéndoles sostener altos rendimientos año tras año usando parte de la cosecha sin pérdidas en la producción debidas a la segregación o endogamia. Entre otras ventajas, la expresión de la apomixis reduciría al mínimo el aislamiento físico requerido para preservar líneas genéticas homocigotas. Asimismo facilitaría el uso de transformantes considerando que una planta transgénica apomíctica fijaría inmediatamente el nuevo carácter y se convertiría en un cultivar luego de su multiplicación. En un planeta con una demanda creciente de alimentos, que deberá duplicar su producción en los próximos 50 años utilizando una superficie de siembra igual o menor a la actual, esa opción resulta de crucial importancia. Se calcula que solamente para la producción de arroz híbrido y con una tasa moderada de aceptación por parte de los agricultores, esta tecnología brindaría beneficios globales por unos 2 a 4 billones de dólares anuales. Las ventajas enumeradas y muchas otras no mencionadas aquí hacen que este carácter represente un beneficio potencial enorme para la agricultura y que se hayan comparado los incrementos potenciales en la producción a través del uso de esta tecnología con aquellos derivados de la revolución verde a partir de los años 60.

El control genético de la apomixis

La apomixis es un carácter heredable, pero su control genético no fue aún completamente esclarecido. Tradicionalmente se consideró que sus determinantes básicos podrían haberse originado por mutación y que la mayoría de los otros genes involucrados en su expresión son similares a los de la sexualidad. A pesar de su amplia distribución en las angiospermas, el carácter no es muy común en los cultivos mayores o en sistemas modelos. Esta condición

forzó a que los estudios en este campo deban ser realizados en especies silvestres que son poliploides, altamente heterocigotas y con una pobre caracterización genética. La disección de las bases genéticas del carácter es por lo tanto dificultosa y compleja. Los estudios de herencia sólo son posibles si pueden cruzarse progenitores completamente sexuales y apomícticos y la progenie F_1 segregante puede ser examinada por métodos citoembriológicos o por análisis de progenies en busca de variaciones con respecto al fenotipo materno. El análisis de progenies usando marcadores moleculares puede ser usado como un indicador de la proporción de progenies apomícticas de un determinado individuo. En las cruza de este tipo (que pueden ser intra o interespecíficas) se utiliza un poliploide sexual natural o generado artificialmente como planta madre, mientras que un genotipo apomíctico contribuye como dador de polen.

El modo de clasificación de las progenies en apomícticas y sexuales fue motivo de controversia durante varias décadas entre los investigadores dedicados al estudio de la apomixis. Mientras algunos proponían tener en cuenta su grado de expresividad, considerándolo como un carácter cuantitativo, otros consideraban que era más conveniente tratarlo como un carácter cualitativo, y proponían clasificar a una planta como apomíctica siempre y cuando llevase al menos un saco embrionario no reducido. El primer modo de clasificación resultaría adecuado si la diferente expresividad de la apomixis se originase en la necesidad de la acción conjunta de varios genes mayores que determinaran el carácter o estuviese influida por la presencia de modificadores, mientras que la segunda aproximación sería más apropiada si el carácter estuviese controlado por un gen simple cuya expresividad dependiese de factores epigenéticos asociados. Se sabe que el ambiente puede afectar el grado de apomixis en algunas especies, lo que sugiere que efectivamente puede haber tanto genes modificadores como factores epigenéticos jugando un rol en la expresividad del carácter. Por otra parte, se demostró que en híbridos de *Penisetum*, plantas pertenecientes a diferentes progenies todas ellas portadoras de la misma

región que controla la apomixis, presentan diferente expresividad, lo que refuerza la idea de que deben existir modificadores o alteraciones epigenéticas afectando al carácter. En ningún caso el efecto de esos modificadores o la naturaleza del posible control epigenético han sido estudiados en detalle. Como veremos, en los últimos años se impuso mayoritariamente el modelo cualitativo de clasificación, ya que casi todos los estudios de mapeo han considerado una planta como apomíctica si se observa en ella al menos un saco embrionario no reducido, independientemente del grado de expresividad del carácter. El hecho de que en casi todas las especies apomícticas los marcadores ligados a la apomeiosis mapean en una única región genómica hace pensar que aplicar el modelo cualitativo es esencialmente correcto, aunque permanece pendiente el estudio de cuáles son los factores que afectan la expresividad del carácter.

La apomixis esporofítica se hereda en forma simple como un carácter dominante. En el único estudio de mapeo reportado hasta ahora en *Citrus* el carácter presentó una segregación simple con una relación de segregación de 3:1. Sin embargo la aplicación del mapeo de QTLs resultó en la identificación de 6 loci mayores con efectos positivos o negativos, un patrón más complejo que el anticipado. Actualmente se están llevando a cabo estudios genéticos y moleculares adicionales en *Citrus* y géneros relacionados así como también en otras especies que se reproducen por embrionía adventicia.

La aposporia parece estar controlada por un único locus en donde un gen mayor dominante o un grupo de genes ligados y coadaptados (que funcionan como una sola unidad genética a causa de una fuerte supresión de la recombinación) son los responsables de la expresión del carácter. En la mayoría de las gramíneas forrajeras estudiadas el "apo locus" aparece como una región genómica compleja, que contiene numerosos genes que son transmitidos a la progenie como un bloque. Es importante notar que la palabra "locus" es utilizada aquí para denotar una región del genoma que puede incluir uno o varios genes. Este único "locus" en algunas especies segrega en forma Mendelia-

na y en otras, muestra una fuerte distorsión de la segregación. El modelo del locus único se aplica a casi todas las especies apospóricas estudiadas (*Pennisetum squamulatum*, *Pennisetum ciliare*, *Panicum maximum*, *Brachiaria sp.*, *Paspalum notatum*, *Ranunculus sp.* y *Hieracium sp.*). Supone que la constitución genética de las plantas sexuales sería del tipo nuliplexo (aaaa) mientras que los individuos apomícticos serían uniplexos (Aaaa), siendo A el alelo dominante determinante de la aposporia. Los cruzamientos de individuos de este tipo generarían progenies F_1 que segregan en sexuales y apomícticos con relaciones de segregación aproximadas al 1:1, aunque en algunos casos se observan fuertes desviaciones en esta relación. Las distorsiones en la segregación en *P. notatum* han sido atribuidas a un efecto pleiotrópico letal del gen/es determinantes de la apomixis, o a un ligamiento parcial con un gen letal. Por otro lado en *Poa pratensis* está claramente documentado que existe recombinación entre la aposporia y la partenogénesis, lo cual indica un control independiente para cada uno de estos componentes. Además no se observa supresión de la recombinación en la región. En esta especie la partenogénesis puede evaluarse fácilmente en ausencia de fertilización por el desarrollo de embriones luego del tratamiento con auxina. Cuando este carácter se analizó en forma cualitativa se demostró que involucra a un único gen. Posteriormente se postuló para *Poa* un modelo genético más complejo que incluye genes simples, no ligados para la iniciación de la aposporia, la prevención de la aposporia, la iniciación de la partenogénesis, la prevención de la partenogénesis y el desarrollo de la megáspora. Este último modelo es sostenido por la observación de clases discretas con diferente expresividad del carácter apomixis, que podrían ser explicadas mejor con un modelo de 5 genes.

El modelo del gen único, aplicado a numerosas especies apospóricas, deja sin solucionar varias cuestiones, además de la ya mencionada respecto a la diferente expresividad. Por ejemplo en el caso de *Panicum maximum* (que es una especie apomíctica facultativa, o sea forma algunos de sus descendientes por sexualidad) si bien se postula que las plantas

apomícticas son uniplexas (Aaaa) hasta ahora no se han encontrado en la naturaleza plantas completamente sexuales (aaaa). Esta situación se repite en otras especies apomícticas. Tampoco se puede explicar el hecho de que siempre que se utilizó como polinizador a una planta apomíctica, ésta resultó ser un genotipo Aaaa. ¿Cómo es posible que el genotipo uniplexo sea el único existente en las poblaciones apomícticas facultativas? Estas cuestiones plantean la posibilidad de que la herencia de la apomixis no pueda ser explicada únicamente en base a la constitución genética, sino que también deba tenerse en cuenta el entorno epigenético asociado y la estrecha relación de ambas condiciones con la poliploidía. La demostración reciente de que ocurren modificaciones genéticas y epigenéticas específicas, recurrentes y reproducibles durante los eventos de alo y auto poliploidización plantea posibilidades novedosas respecto al origen de la región que contiene a locus apo y su funcionamiento en relación con la poliploidía.

La diplosporia, a diferencia de la aposporia, parece estar controlada por dos o más genes que segregan en forma independiente, responsables de la apomeiosis, la partenogénesis y la formación autónoma del endospermo, cuando esta última existe. El ligamiento entre el desarrollo del saco embrionario diplospórico y la partenogénesis puede ser eliminado en al menos dos taxones de *Asteraceae*: *Erigeron* y *Taraxacum*. En cruza de diploides sexuales y triploides apomícticos de *Taraxacum* muchos híbridos 3x y 4x forman semillas en ausencia de polinización, mientras que el endospermo se desarrolla autónomamente, tal como se esperaría en *Taraxacum* apomícticos. Sin embargo, varios híbridos 3x no forman semillas si no se los poliniza, aunque uno de ellos produjo embriones $2n+n$ (derivados de la fecundación de sacos embrionarios no reducidos) cuando fue polinizado con un diploide. Este genotipo realiza apomeiosis (ausencia de reducción de la gameta) pero es incapaz de hacer partenogénesis. La independencia entre la diplosporia y la partenogénesis fue luego confirmada en otras cruza. El desarrollo autónomo del endospermo también segregó en forma separada de la partenogénesis. Curiosamente, la región

que determina la diplosporía en *Taraxacum* no presenta reducción de la recombinación, constituyéndose (junto al caso de la apospórica *Poa pratensis*) en uno de los pocos ejemplos de recombinación en la región genómica que determina la formación apomeiótica de un saco embrionario. Similarmente, las progenies originadas a partir de cruza entre diploides sexuales y poliploides apomícticos de *Erigeron annuus* mostraron que varias plantas diplospóricas no formaban embriones, sugiriendo que se había eliminado el componente de la partenogénesis. Se demostró claramente que las dos características segregaban en forma independiente. La región que lleva el locus DIP (que determina la diplosporía) también presenta restricción de la recombinación (como en el caso de la región APO en la mayoría de las especies apospóricas estudiadas), pero no así la región responsable de la partenogénesis. Otra especie diplospórica extensamente estudiada es *Tripsacum dactyloides*, debido a que es un pariente lejano del maíz y presenta potencial para la transferencia del carácter a esta especie por mejoramiento convencional. En esta especie la diplosporía se hereda de manera simple. Varios marcadores del cromosoma 6 de maíz cosegregan estrictamente con el carácter. Aunque la región presenta una fuerte supresión de la recombinación en las razas apomícticas, en las cruza de diploides sexuales se detecta una recombinación considerable entre los mismos marcadores. La localización de la apomixis en una translocación cromosomal en híbridos de maíz –*Tripsacum* también reforzó la conclusión de que un único cromosoma de *Tripsacum* transmite la apomixis.

Transferencia del carácter apomixis a especies de interés agronómico

Aunque desde el punto de vista del mejoramiento genético la apomixis puede considerarse como un sistema que restringe la variabilidad genética, esta forma de reproducción constituye una herramienta única para desarrollar cultivares superiores y preservar combinaciones híbridas indefinidamente. Por ello la transferencia del carácter a las especies cultivadas ha sido perseguida desde hace tiempo. Básicamente se consideran tres grupos

generales de procedimientos para transferir la apomixis a especies sexuales: i) hibridación clásica entre una planta sexual y un pariente apomíctico natural; ii) iniciación de la expresión de la apomixis por experimentos de bloqueo de genes (mutantes T, etiquetado transposicional, mutagénesis) y iii) transformación de cultivares sexuales con genes que controlan la expresión del carácter. Las dos primeras aproximaciones ya fueron intentadas, aunque hasta el momento los proyectos no han sido del todo exitosos. La tercera opción todavía continúa siendo hipotética.

Los primeros experimentos dirigidos a introducir la apomixis a través de cruzamientos fueron realizados hace unos 40 años por D. F. Petrov, quien realizó hibridaciones entre maíz y razas tetraploides de *Tripsacum dactyloides* (una especie diplospórica también perteneciente a la tribu de la Andropogóneas igual que el maíz). Posteriormente otros grupos de investigación produjeron híbridos interespecíficos de maíz-*Tripsacum* que se reproducen por apomixis. Sin embargo, como los genotipos obtenidos luego de una serie de retrocruzas con maíz son completamente macho-estériles, el progreso en la recuperación del genoma de esta especie está fuertemente asociado con la capacidad de generar híbridos con algún grado de reproducción sexual (apomícticos facultativos). La imposibilidad de generar este tipo de individuos es la principal dificultad que enfrenta este sistema. Una dificultad adicional es el fuerte requerimiento de una relación 2:1 en el número de genomas haploides maternos y paternos que contribuyen a la formación del endospermo en maíz. Estos problemas han demorado el progreso en la introducción de la apomixis en maíz en los últimos años. La transferencia de la apomixis al mijo perla (*Pennisetum glaucum*) desde *P. squamulatum* por un programa de mejoramiento iniciado al final de los 70 es considerado el más avanzado de su tipo. En este esquema las retrocruzas con *Pennisetum glaucum* han avanzado hasta la generación BC₇, mediante la selección de grandes progenies para identificar individuos apomícticos parcialmente macho fértiles. Estas plantas son morfológicamente muy parecidas al mijo perla, aunque producen un bajo número de

semillas viables. Este hecho estaría vinculado a la formación del endospermo y es un inconveniente que aún resta resolver. En resumen, la factibilidad de la transferencia está aún por demostrarse. Los principales obstáculos son: equilibrar el balance endospermico y lograr la expresión de la apomixis a nivel diploide. Aquí se debería lograr, seguramente a través de un esfuerzo multidisciplinario internacional, un conocimiento profundo de la relación entre la expresión de la apomixis y la poliploidía, especialmente de la autopoloidía. En gramíneas de la subfamilia Panicoideas (*Paspalum*, *Panicum*, *Tripsacum*, *Brachiaria*, *Melinis* y otras) es posible que el sistema apomítico difiera del que existe en Pooideas (*Poa*, *Elymus* y otras). Son necesarios conocimientos básicos más profundos de la embriología de especies silvestres con sistemas apomíticos, para determinar qué género o qué especie son los más adecuados para obtener los genes que podrían utilizarse en futuras transformaciones genéticas que permitan usar la apomixis en los cereales.

Los intentos para generar mutantes apomíticas inactivando genes de la sexualidad por etiquetado transposicional o mutagénesis no han tenido éxito aún en recrear el carácter pero permitieron la identificación de varios genes involucrados en el control de etapas particulares de su desarrollo, como la proliferación del endospermo en ausencia de fertilización o la generación de sacos no reducidos que por fecundación produjeron híbridos BIII. La transformación genética de cultivares sexuales con genes que controlan el inicio del carácter es aún hipotética.

Caracterización molecular de la región genómica que gobierna la apomixis

En los últimos años la tecnología de marcadores moleculares y los procedimientos de biología molecular han generado una cantidad considerable de conocimientos nuevos sobre las bases moleculares de la apomixis. Los géneros de gramíneas para los cuales se dispone de más datos acerca de la estructura molecular de la región genómica asociada a la apomixis son hasta el momento *Pennisetum* y *Paspalum*. En *Pennisetum ciliare* y *Pennisetum squamulatum* la región que determina la apomixis

es un sector no recombinante de tamaño calculado en unos 50 Mpb. Se aislaron 99 clones de BAC conteniendo marcadores moleculares que mapean en esta región. Algunos de estos clones fueron utilizados para realizar estudios de FISH (hibridización fluorescente *in situ*; del inglés *fluorescent in situ hybridization*) sobre cromosomas de estas especies. En *P. squamulatum* los experimentos de FISH confirmaron que la región asociada a la aposporia (ASGR) es físicamente muy grande (más de 50 Mpb) y que está localizada cerca del telómero sobre el brazo corto del cromosoma portador. También demostró que la ASGR es hemicigota y de naturaleza heterocromática. Se encontró una señal proveniente de una repetición centromérica en el extremo distal de la ASGR, lo que sugiere que el cromosoma portador sufrió una inversión. En *Pennisetum ciliare* el cromosoma portador es 20 Mpb más largo que sus presuntos homeólogos, y la ASGR se localiza cerca del centrómero, en una región hemicigota y heterocromática. En ambas especies (*P. squamulatum* y *P. ciliare*) la ASGR contiene una región de alrededor de 13 Mpb de bajo número de copias. La región de baja copia es flanqueada a ambos lados por regiones de alto número de copias o repetitivas. En *P. squamulatum* la señal de alta copia se localiza únicamente en la ASGR, mientras que en *P. ciliare* puede ser identificada en todos los demás cromosomas también. Se encontró que un retrotransposón *Opie-2-like* puede mimetizar la señal de alta copia generada por los clones de BAC. Una comparación del orden de los genes en los BACs correspondientes a la región de baja copia entre las dos especies de *Pennisetum* demostró que aunque la región está invertida, mantiene el orden relativo en la posición de genes en un fragmento relativamente grande del cromosoma (es macrosinténica) en ambas especies. La macrosintenia aparentemente no se mantiene fuera de la ASGR. En una escala menor, segmentos con un orden de genes similar existen entre las dos especies apomíticas, y estos segmentos pueden ser hallados múltiples veces dentro de la ASGR en ambas especies. Inicialmente se identificaron regiones sinténicas con el cromosoma 11 de arroz, pero luego se demostró que dentro de la región

existen múltiples sectores más pequeños que comparten *sintenia* con distintos cromosomas de arroz (cromosomas 1, 2, 4, 6, 7, 8, 10 y 11). Un sector que representa 2.5 Mpb (~2 % de la región) fue secuenciado, y los genes incluidos se conocen. Entre ellos están 4 copias de genes homólogos a *baby-boom*, que fueron estudiados detalladamente como posibles candidatos a controlar alguna etapa de la apomixis en la especie. *Baby-boom* había sido identificado inicialmente en *Brassica napus*, inducido en cultivos de micrósporas que realizaban embriogénesis somática. La sola sobreexpresión de *baby-boom* en *Arabidopsis thaliana* induce la formación de embriones somáticos ectópicos en hojas y es suficiente para provocar embriogénesis somática espontánea. También se determinó la presencia de retrotransposones *Opie-2-like*, *CACTA* y helitrones en la región ASGR de *Pennisetum*.

La caracterización por mapeo genético del locus apo en especies de *Paspalum* determinó una alta conservación de la región entre *P. notatum*, *P. simplex* y *P. malacophyllum*. En *P. notatum* se observa homología (*sintenia*) con segmentos de los cromosomas 12 y 2 de arroz, mientras que en *Paspalum simplex* y *Paspalum malacophyllum* sólo con el cromosoma 12 de arroz. Dado que también en *Brachiaria brizantha*, varias sondas que mapean en el cromosoma 2 de arroz fueron asociadas al locus apo, es posible entrever una cierta conservación del mecanismo de control de la aposporia para algunas especies de gramíneas. Por otro lado, a partir de una genoteca en BAC de *P. simplex* se aisló un clon (346H10) que contiene secuencias 100% ligadas a la aposporia en *P. simplex* y *P. notatum*. Experimentos de FISH con el clon 346H10 determinaron que el locus apo se encuentra en regiones no pericentroméricas del genoma de *P. simplex*. La secuenciación de 346H10 reveló 2 regiones que mostraron homología con los genes *EXS* (un receptor del tipo proteína quinasa rico en leucinas) y *PKD* (dominio de proteína quinasa). Estos genes resultaron similares a *SERK* (receptor tipo proteína quinasa de la embriogénesis somática) el cual fue asociado con la inducción de la formación de embriones somáticos en zanahoria y con la formación de los sacos

embrionarios apospóricos en *Poa*.

En *P. notatum* (como en *Pennisetum squamulatum*) también se postuló la existencia de una inversión genética en la región del APO locus, en base a observaciones citogenéticas y a evidencias provenientes del mapeo. Los datos derivados de mapeo genético indican que la región asociada a la apomixis en *P. notatum* es un sector extenso de 36 Mpb, que presenta una fuerte supresión de la recombinación y apareamiento preferencial de cromosomas (ver Figura 4). Experimentos de MSAP (polimorfismo de amplificación sensible a metilación; del inglés *Methylation Sensitive Amplification Polymorphisms*) y RFLP (polimorfismo de longitud de fragmentos de restricción, del inglés *Restriction Fragment Length Polymorphisms*) con enzimas sensibles a metilación y la secuenciación de clones provenientes de la ASGR permitieron determinar que se trata de una región metilada extensivamente y que contiene abundantes transposones y retrotransposones. En resumen, los estudios realizados en *Paspalum* indican que, en forma similar al caso de *Pennisetum squamulatum*, la ASGR es una región extensa, que podría haber sufrido una inversión y que presenta todas las características de la heterocromatina: supresión de la recombinación, metilación extensiva, abundancia de elementos transponibles y apareamiento preferencial de cromosomas. Además se detectó que varios genes de esta región están silenciados en las razas apomícticas respecto a las sexuales (ver siguiente sección).

Expresión de genes durante el desarrollo apomíctico

Una serie de trabajos recientes enfocados en estudiar la expresión de genes en plantas apomícticas y sexuales, han informado el aislamiento de transcritos de ARNm específicos del desarrollo apomíctico. En el año 1996 se publicó un trabajo pionero en la realización de estos perfilados del transcriptoma, allí los autores informaron que un gen (*Pcs-2*) se expresa sólo en ovarios sexuales mientras otros dos (*Pca-2* y *Pca-3*) lo hacen exclusivamente en ovarios apomícticos de buffelgrass (*Pennisetum ciliare*). Estos transcritos no presentaron homología con genes incluidos en los

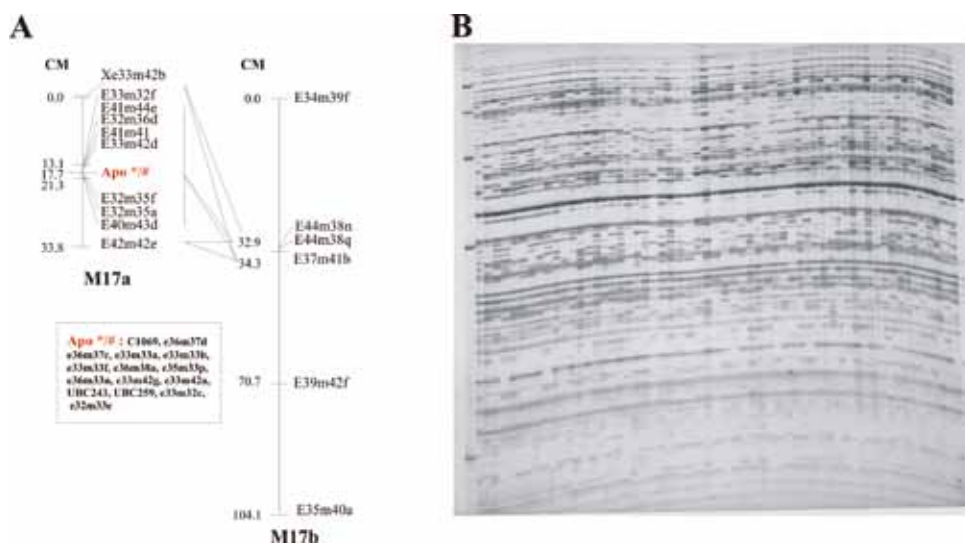


Figura 4: Localización de la región que controla la aposporia en *Paspalum notatum* por medio de marcadores moleculares. Panel A: grupo de ligamiento M17a del mapa genético de *Paspalum notatum*, que contiene a la región apo. El cuadro de abajo muestra un grupo de marcadores que están ligados 100% a la apomixis. Nótese la supresión de la recombinación en el locus. El grupo M17a está ligado en repulsión al grupo M17b. Panel B: gel de AFLP obtenido durante la construcción de un mapa genético de *Paspalum notatum*.

bancos de datos. Más adelante otros autores informaron la expresión de *asg1* (gen específico de la apomixis 1) en primordios florales de una accesión apomíctica de guineagrass (*Panicum maximum*) asociada temporalmente con la aparición de las células iniciales de la aposporia. La secuencia de *asg1* es similar a varios genes específicos de la semilla o el embrión de diferentes especies vegetales, entre ellos *rd22* (un gen expresado en semillas e inducido por sequía en *A. thaliana*), *grp* (un gen que codifica una proteína rica en glicina de la pared celular de ovarios de *Phaseolus vulgaris*), *usp* (un gen que codifica a una proteína de semilla de *Vicia fava*), *plyg1* (un gen que codifica a un precursor de la cadena beta de poligalacturonasa de *Lycopersicum esculentum*) y *adr6p* (un gen regulado negativamente por auxina de *Glycine max*). La homología de secuencia con todos estos genes es altamente significativa por lo que los autores interpretaron que *asg1* podría cumplir una función nueva dentro del complejo de formación del embrión y la semilla, relacionada con la aparición de las iniciales de la

aposporia. También se comparó la expresión de genes en flores de genotipos sexuales y apomícticos de *P. notatum* y se identificó al gen *arp1*, que es homólogo a la cinesina katD de *A. thaliana*. Se identificaron 6 genes de expresión diferencial en ovarios de plantas apomícticas y sexuales de *Brachiaria brizantha*, entre ellos un gen homólogo a una proteína quinasa (familia MAP quinasas, del inglés *mitogen-activated protein*).

Recientemente una caracterización más extensa del transcriptoma fue completada para las especies apospóricas *Poa pratensis* y *Paspalum notatum*. La misma permitió el aislamiento de centenares de genes de expresión diferencial en flores de genotipos sexuales y apospóricos (Figura 5). Varios genes comunes fueron identificados en ambas especies, y muchos de los restantes pertenecen a las mismas vías funcionales. Los genes identificados se inscriben dentro de unas pocas clases ontológicas: transducción de señales, proteólisis, control del ciclo celular, control de la transcripción, estructura de la cromatina y actividad de

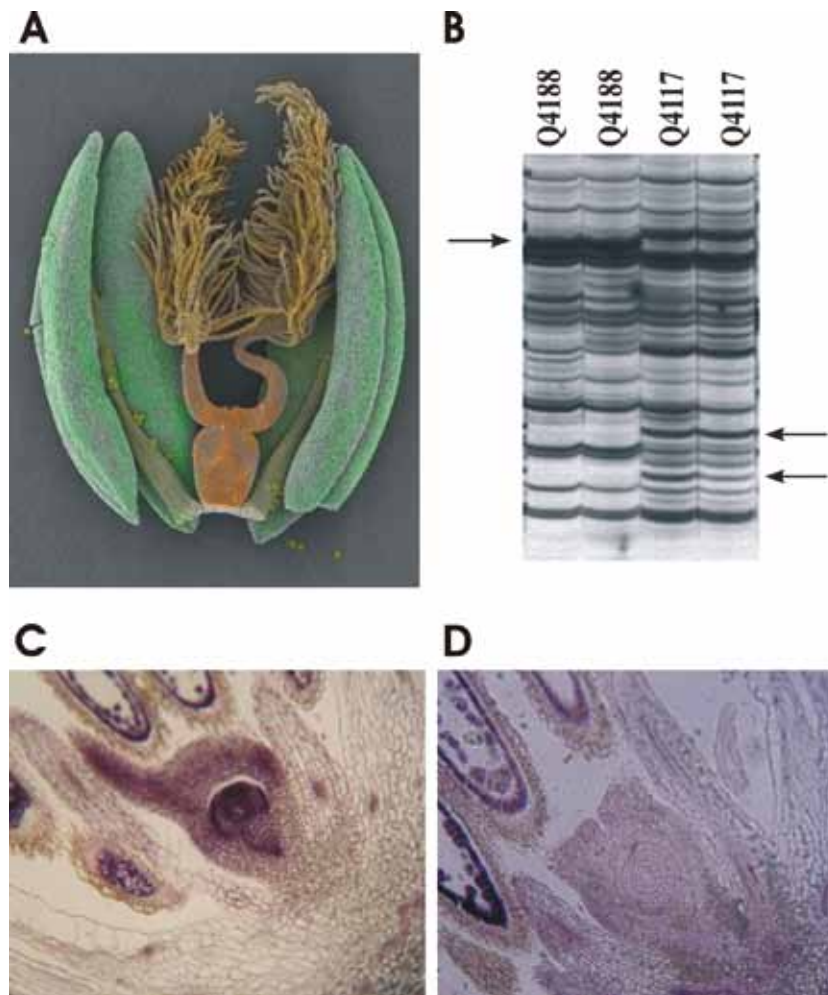


Figura 5: Análisis de expresión diferencial de genes en inflorescencias de plantas apomícticas y sexuales. Panel A. Imagen de los órganos reproductivos de *Paspalum notatum* captada por microscopía electrónica de barrido y coloreada artificialmente. En el centro se observa el ovario rodeado por las anteras que han liberado algunos granos de polen (gentileza de la Dra. Ana María González, IBONE, CONICET). Panel B. Geles de *display diferencial* mostrando la expresión de transcritos en los órganos reproductivos de una planta apomíctica (Q4117) y otra sexual (Q4188) de *Paspalum notatum*. Las flechas indican los transcritos que presentan expresión diferencial. Paneles C y D: a partir de los geles se aislaron fragmentos de genes que fueron utilizados como sondas en experimentos de hibridación *in situ* de tejidos reproductivos de *Paspalum notatum*. En el panel C se muestra la hibridación del transcritto N22 con los órganos reproductivos de la planta sexual Q4188. En el panel D se muestra la hibridación del mismo transcritto N22 con los órganos reproductivos de la planta apomíctica Q4117. En el óvulo se observa la clara expresión diferencial del gen blanco (gentileza del Dr. Guillermo Seijo, IBONE, CONICET).

transposones. Muchos de los genes aislados son idénticos a otros cuya expresión es afectada en inflorescencias por un cambio en el nivel de ploidía, lo que evidencia a nivel molecular el alto grado de relación entre la apomixis y la po-

liploidización. Asimismo, los genes afectados durante los cambios de ploidía pertenecen claramente a las mismas clases funcionales que los controlados durante la apomixis.

Entre los genes activados o silenciados du-

rante el desarrollo apospórico se encuentran numerosos representantes de una cascada de transducción de señales de tipo ERK (quinasa regulada por señales extracelulares, del inglés *extracellular receptor kinase*). Por ejemplo receptores LRR (regiones ricas en repeticiones de leucinas), Ras, proteínas de unión a activadores de Ras, proteínas ancladas a GPI (glicosilfosfatidil inositol), MAP quinasas, fosfolipasa C, fosfatidilinositol quinasas, serin-treonin fosfatasas, serin-treonin quinasas, proteínas de interacción con PRIP y otros genes asociados. Asimismo numerosos genes relacionados con el recambio de proteínas (proteínas ribosomales, serin proteinasas, ubiquitina, factores de elongación). También se detectó la expresión diferencial de elementos transponibles entre plantas apomícticas y sexuales, pero restaría comprobar si ésta se mantiene en otros genotipos y si realmente podría estar cumpliendo un rol relacionado con el carácter.

En el caso de *P. notatum*, se observa un fenómeno interesante. Muchos de los genes silenciados en las plantas apomícticas respecto a las sexuales cuentan con secuencias homólogas en la porción distal del cromosoma 2 de arroz, una región que fue asociada con el locus apo en esta especie. Más aún, cuando algunos de estos genes silenciados fueron localizados en la propia especie, resultaron asociados al locus apo. Este grupo de genes comprende: la proteína LunaPark B, un homólogo de la proteína *checkpoint* CHK1, una proteína anclada a GPI, una proteína similar a extensina, una MAP3K, poliubiquitina, un receptor LRR, una proteína hipotética y un retrotransposón. La ubicación de estos genes en cercanías del apo locus, junto con su expresión diferencial en plantas apomícticas y sexuales, los convierten en candidatos interesantes para el control de la apomixis. Los genes incluidos en la región apo parecen estar silenciados en plantas apomícticas respecto a las sexuales. Se ha postulado que en *P. notatum* podría haber ocurrido una inversión de un sector sinténico con los cromosomas 2 y 12 de arroz, seguida de una invasión de heterocromatina en la región, la proliferación de retrotransposones y la modificación local de la expresión génica. ¿Podría esta modificación de la expresión ser la causa de la

apomixis? ¿Cuál o cuáles genes de la región serían responsables de disparar el carácter? La diferente expresividad de la apomixis que observamos en numerosas especies, ¿es consecuencia directa del grado de modulación epigenética que afecta a la región? Aunque se ha avanzado mucho en la caracterización de las bases moleculares del carácter, estas y otras preguntas permanecen sin respuesta.

También se realizaron estudios de expresión de transcritos en inflorescencias inmaduras en genotipos apomícticos y sexuales de diferentes ploidías de la especie diplospórica *Eragrostis curvula*. Los estudios realizados demostraron que para un grupo numeroso de genes los perfiles de expresión de un genotipo tetraploide apomíctico (4x apo) y un diploide sexual (2x sex) resultaron casi idénticos entre sí y a la vez diferentes en comparación con un genotipo tetraploide sexual (4x sex). La casi totalidad de los genes implicados se hallan silenciados en los genotipos 2x sex y 4x apo. Estos resultados son inesperados, ya que estos individuos (2x sex y 4x apo) presentan diferencias tanto en su ploidía como en su modo de reproducción. Para explicar estos resultados los autores formularon la hipótesis de que una falla parcial en el reacomodamiento de la expresión de algunos genes durante la poliploidización en esta especie culminaría en el disparo molecular de la diplosporía. O sea, ante un cambio de ploidía un grupo numeroso de genes debería activar su expresión para lograr mantener la sexualidad. Una falla en esta activación daría como resultado un fenotipo apomíctico. Este modelo coincide con la evidencia experimental de *Paspalum* en el hecho de que la apomixis podría estar causada por un silenciamiento de la expresión génica. Genéticamente la aposporia y la diplosporía no parecen tener el mismo origen, ya que los disparadores de ambos procesos han sido asociados a regiones sinténicas de arroz con diferente localización. Sin embargo, varios de los genes expresados durante el desarrollo diplospórico son los mismos o tienen relación con los de la aposporia (de hecho las mismas clases funcionales parecen afectadas) por lo que parece haber una relación molecular evidente entre ambos tipos de apomixis. La expresión diferencial de genes fue estudiada

también en especies diplospóricas de *Boechera* (Brassicaceae). En *Boechera microphylla* y *B. lignifera* (apomícticas) y *B. formosa* (sexual) se detectaron 4500 genes diferencialmente expresados utilizando microarreglos. Entre los genes identificados se encuentran algunos relacionados con la organización de la estructura del genoma como genes del grupo polycomb (PcG) y factores de transcripción de tipo MADS box. Los autores postularon que los genes del grupo PcG, sobreexpresados en plantas apomícticas, podrían estar produciendo la alteración en la expresión de los genes de tipo MADS box, concluyendo en el desarrollo de apomixis, aunque se ignora si éste es el factor causal del disparo del carácter a nivel de control genético en estas especies.

Otros estudios de mucha importancia para la elucidación de las bases moleculares de la apomixis informaron la caracterización de mutantes en las especies modelo, que sin ser apomícticas, presentaron fenotipos similares a algunas etapas particulares de su desarrollo. Entre ellas debemos citar: 1) las mutantes partenogenéticas *fie*, *fis*, *fis2*, *medea* y *medicis* de *Arabidopsis thaliana*; 2) la mutante apomeiótica *dyad* de *Arabidopsis thaliana*; 3) una mutante LRR de arroz que da origen a células análogas a las iniciales de aposporia y 4) la mutante embriogénica somática *SERK* de zanahoria (*SERK* es un receptor de tipo LRR). Particularmente en el caso de la interesante mutante apomeiótica *dyad* de *A. thaliana*, se ha confirmado que la inactivación de un gen responsable de la cohesión de las cromátides hermanas y organización del centrómero durante la meiosis de células germinales (*DYAD*/*SWITCH1*) es capaz de generar un fenómeno similar a la apomeiosis en dichas células, llevando luego de la fertilización por polen y a la producción de híbridos BIII. La baja tasa de producción de sacos no reducidos y la ausencia de partenogénesis en esta mutante es un indicador más de que aunque la región genómica que controla el carácter es única, hay más de un gen o quizás una condición epigenética compleja involucradas en la regulación de la apomixis.

Perspectivas

A pesar de que aún es necesario responder numerosas cuestiones sobre la acción de ge-

nes, la función y la regulación de la apomixis, se vislumbra para el futuro un escenario promisorio. Nuestro entendimiento de las bases moleculares de la apomixis se ha incrementado notablemente a causa del desarrollo de técnicas poderosas de biología molecular y al creciente interés en el tema despertado en las instituciones científicas e investigadores. Por otra parte, con el advenimiento del análisis genómico a gran escala se dispone de nuevas herramientas para el descubrimiento de genes y los análisis de expresión. Es de esperar que en los próximos años este aumento del conocimiento de las bases genéticas y moleculares del carácter permita controlar su expresión con fines de mejoramiento. Solamente a través de una comprensión profunda del mecanismo biológico responsable de la apomixis y de las implicancias evolutivas derivadas de su utilización podrá concretarse su transferencia exitosa a las especies de gran cultivo. Para esto se requerirá un fuerte apoyo financiero a los estudios básicos sobre el tema. Por otra parte, dado que la problemática del carácter es muy compleja será indispensable fortalecer la cooperación internacional ya existente para mantener un espacio de discusión y de intercambio de materiales e información.

Lecturas recomendadas

- Albertini E, Marconi G, Barcaccia G, Raggi L, Falcinelli M . 2004. Isolation of candidate genes for apomixis in *Poa pratensis*. Plant Mol Biol, 56, 879-894.
- Asker SE and Jerling L . 1992. Apomixis in plants. CRC Press, London.
- Bicknell R and Koltunow A . 2004. Understanding Apomixis: Recent Advances and Remaining Conundrums. The Plant Cell, 16, S228-S245.
- Calderini O, Chang SB, De Jong H, Busti A, Paolucci F, Arcioni S, de Vries S, Abma- Henkens MHC, Klein Lankhorst RM, Donnison IS, Pupilli F .2006. Molecular cytogenetics and DNA sequence analysis of an apomixis-linked BAC in *Paspalum simplex* reveal a non pericentromere location and partial microcolinearity with rice. Theor Appl Genet, 112, 1179-1191.
- Cervigni GDL, Paniego N, Pessino S, Selva JP, Díaz M, Spangenberg G and Echenique V . 2008. Gene expression in diplosporous and sexual *Eragrostis curvula* genotypes with differing ploidy

- levels. *Plant Mol Biol*, 67, 11–23.
- Crane CF. 2001. Classification of apomictic mechanisms. In: *Flowering of Apomixis: From Mechanisms to Genetic Engineering*, Y. Savidan, J.G. Carman, and T. Dresselhaus, eds (Mexico: CIMMYT, IRD, European Commission DG VI), pp. 24–34.
- Do Valle CB and Miles JW . 2001. Breeding of apomictic species. In: SavidanY, Carman JG and Dresselhaus T (eds.) 2001. *The flowering of apomixis: from mechanisms to genetic engineering*. Mexico DF. CIMMYT, IRD, European Commission DG VI (FAIR). pp. 137-152.
- Grimanelli D, Leblanc O, Perotti E, Grossniklaus U .2001. Developmental genetics of gametophytic apomixis. *Trends in Genetics*, 17, 597-604.
- Koltunow AM, Bicknell RA, Chaudhury AM . 1995. Apomixis: molecular strategies for the generation of genetically identical seeds without fertilisation. *Plant Physiol*, 108, 1345-1352.
- Laspina NV, Vega T, Seijo JG, González AM, Martelotto LG, Stein J, Podio M, Ortiz JPA, Echenique VC, Quarín CL, Pessino SC. . 2008. Gene expression analysis at the onset of aposporous apomixis in *Paspalum notatum*. *Plant Mol Biol*, 67, 615-628.
- Nogler GA . 1984. Gametophytic Apomixis. In: Johri BM (ed) *Embryology of Angiosperms*. Springer-Verlag, Berlin.
- Ozias-Akins P . 2006. Apomixis: Developmental Characteristics and Genetics. *Critical Reviews in Plant Science*, 25, 199-214.
- Pessino SC, Ortiz JPA, Hayward MD, Quarín CL . 1999. The molecular genetics of gametophytic apomixis. *Hereditas*, 130, 1-11.
- Pupilli F, Martínez EJ, Busti A, Calderini O, Quarín CL, Arcioni S . 2004. Comparative mapping reveals partial conservation of synteny at the apomixis locus in *Paspalum* spp. *Mol. Gen. Genomics*, 270, 539-548.
- Ravi M, Marimuthu MP, Siddiqi I . 2008. Gamete formation without meiosis in *Arabidopsis*. *Nature*, 451, 28.
- Savidan Y . 2000. Apomixis: Genetics and Breeding. In: *Plant Breeding Reviews*, volume 18. J. Janick (Ed.). John Wiley & Sons, Inc. London.
- Smith J. 1841. Notice of a plant which produces seeds without any apparent action of pollen. *Transactions of the Linnaean Society of London* (meeting of June 18 1839), 18.
- Stein J, Pessino SC, Martínez EJ, Rodríguez MP, Siena L, Quarín CL, Ortiz JPA . 2007. A genetic map of tetraploid *Paspalum notatum* Flugge (bahiagrass) based on single-dose molecular markers. *Molecular Breeding*, 20, 153-166.
- Vielle-Calzada J-P, Crane CF, Stelly DM . 1996. Apomixis: The Asexual Revolution. *Science*, 274, 1322-1323.

V. CAPÍTULO 4

Avances de la biotecnología en cultivos ornamentales

Alejandro S. Escandón, Pablo A. Marinangeli y Mariana Pérez de la Torre

1. Introducción

En la segunda mitad del siglo XX la floricultura comenzó a transformarse en una verdadera industria que debía abastecer a un mercado muy exigente, altamente competitivo y ávido de novedades. En el desarrollo de este proceso la incidencia de la biotecnología resultó de una relevancia insoslayable.

Como toda industria, la actividad florícola gira alrededor de un producto y de los factores que lo afectan. Entre ellos, los referidos a la producción propiamente dicha (volumen, calidad, homogeneidad, sanidad y plazo de entrega), y aquellos que hacen a su mejoramiento (en el caso de la floricultura, factores que modifican la arquitectura de las plantas y las flores, colores, fragancias, tiempo de postcosecha, etc.).

De las herramientas biotecnológicas disponibles, el cultivo de tejidos ha sido de las que más impacto tuvo en la floricultura aunque, en forma reciente, la genómica y la transgénesis han adquirido gran relevancia, sobre todo en cultivos como la rosa, el clavel y el crisantemo. En este capítulo comentaremos los avances producidos a partir de estas tecnologías en los cultivos mencionados y en plantas en maceta.

2. Cultivo de tejidos

En los últimos años se ha verificado un incremento relevante en la producción de plantas ornamentales, este hecho posiblemente haya sido una consecuencia del aumento registrado en su valor comercial durante los últimos 20 años. Hoy en día alrededor de 150 especies diferentes de plantas ornamentales son propagadas a escala comercial a través del cultivo de tejidos en laboratorios privados, que proveen a los mayores consumidores del mercado florícola: Holanda, Japón y EEUU entre otros.

El cultivo *in vitro* de tejidos resulta una herramienta clave para la propagación de plan-

tas a gran escala, debido que permite no solo la producción masiva, sino la conservación de material selecto y la multiplicación de clones de sanidad controlada.

En la actualidad se utilizan principalmente tres estrategias para la multiplicación *in vitro*: 1) organogénesis, 2) embriogénesis somática, y 3) tecnología de cultivo de células en capa fina (TLC, *thin cell layer*) para la multiplicación de plantas entre otras aplicaciones.

Organogénesis

La micropropagación por organogénesis es una alternativa de gran aplicación para la producción masiva de plantas en un corto lapso. Se trata de una herramienta muy utilizada para la multiplicación tanto de ornamentales como de otros cultivos hortícolas, frutales, industriales y forestales.

Un requisito indispensable es el ajuste preciso de las condiciones de cultivo tanto físicas como químicas. Se deben establecer las condiciones óptimas de fotoperíodo, intensidad de luz, balance de nutrientes (orgánicos e inorgánicos), y reguladores del crecimiento (RC) adecuados. Cada especie, y cada cultivar en particular, presentan requerimientos nutricionales y hormonales sumamente específicos. Así por ejemplo, en el cultivo de segmentos nodales de *Bougainvillea* en medio libre de RC se induce el desarrollo de un callo que progresa en la medida que se lo mantenga unido al explanto original, inhibiendo el desarrollo de la yema axilar. Mientras que el agregado de BAP (6-bencilaminopurina) promueve la formación y el desarrollo de yemas.

Otro caso interesante es el de algunas especies del género *Begonia* que requieren del agregado de carbón activado al medio de cultivo para inducir el desarrollo de brotes. Se sabe que el carbón activado adsorbe a los RC reduciendo su disponibilidad para los tejidos, de modo que se ha propuesto que el híbrido de begonia en cuestión produce una alta concentración de auxinas y citocininas, y que el agregado de carbón activado adecua el nivel de RC permitiendo un desarrollo mejorado y controlado. Siguiendo en la misma línea del ejemplo, otro requerimiento especial para la multiplicación en masa del híbrido *Begonia x elatior* es la utilización de las citocininas cinetina y zeatina, que a diferencia

de BAP, no afectan las características básicas de la planta como el color de las flores, un detalle no menor al diseñar una estrategia para la producción de un cultivo ornamental.

Con respecto a la influencia de la luz, el cultivo de *Ficus benjamina* permitió estudiar el efecto de la calidad de la luz sobre la inducción de yemas *de novo*. Se observó que al utilizar ápices como explanto, la tasa de yemas formadas *de novo* resultaba mayor bajo luz roja. En el mismo estudio se advirtió que la calidad de luz no afectaba el enraizamiento de esta especie.

Los requerimientos de la etapa de enraizamiento también suelen ser muy específicos. Por ejemplo, en *Ficus carica* el agregado de PVP (polivinil pirrolidona) que adsorbe los polifenoles oxidantes facilita el enraizamiento. En gerbera, por ejemplo, para reducir el estrés provocado por el pasaje del cultivo *in vitro* a invernáculos, se trabajó con atmósfera enriquecida en CO₂ y el uso de soluciones de alta conductividad eléctrica, provocando el cierre de estomas para evitar la transpiración extrema del material y su desecación. En la Tabla se presentan algunos de los resultados obtenidos a través de estas técnicas y de las que se desarrollaran en los párrafos siguientes.

Embriogénesis somática

La embriogénesis somática tiene un gran potencial para la propagación clonal de individuos selectos y, desde el punto de vista comercial, para la producción en biorreactores y la producción de semilla artificial. Pese a esto, presenta limitaciones importantes como la dependencia del genotipo, que afecta la producción de embriones somáticos tanto como el poder germinativo de los mismos.

La puesta a punto de un sistema de producción comercial a partir de embriogénesis somática requiere de una serie de ajustes finos, sobre todo en la etapa de formación de los embriones, o fase 0. Lograr una respuesta embriogénica homogénea, en la forma, calidad y tiempo de maduración de los embriones, es esencial para alcanzar la producción industrial.

Varias especies ornamentales como crisantemo, ciclamen, rosa, begonia, violeta africana y estrella federal han sido propagadas con éxito por medio de esta estrategia (ver Tabla). Por

otro lado, los experimentos realizados con rosa y ciclamen, han contribuido en gran medida a incrementar nuestro conocimiento sobre las bases de la herencia de la capacidad de embriogénesis somática de un genotipo dado. Parece ser que este rasgo estaría controlado por más de un gen, cuya naturaleza, recesiva o dominante, sería especie dependiente.

Células en capa fina

La tecnología de células en capa fina (TCL) es una estrategia de cultivo de tejidos desarrollada en la década del 70. Consiste en utilizar como explanto una fina capa de células (entre 0,5 y 1,0 mm de espesor), el corte puede ser longitudinal (ITCL) o transversal (tTCL). El corte longitudinal generalmente involucra células epidérmicas, subepidérmicas, corticales, cambiales o medulares; que pueden realizarse a partir de tallos, hojas, pedicelos, bulbillos, nervaduras, etc. Para los cortes transversales se parte de tallos, raíces, rizomas, pedúnculos, pétalos u otros órganos florales, etc.

En la actualidad algunos investigadores la han redescubierto como una poderosa herramienta para el cultivo de tejidos, de órganos y para la transformación genética.

Se trata de un sistema simple que sólo requiere una pequeña cantidad de células como explanto inicial y una mínima cantidad de medio de cultivo. Puede ser utilizada como herramienta para la propagación comercial, en algunos casos se observó que aumenta la eficiencia respecto del uso de explantos "convencionales", e incluso acorta de manera significativa los tiempos de cultivo.

Además de regenerar plantas, a través del ajuste fino de las condiciones de cultivo, existiría la posibilidad de regenerar y cultivar órganos aislados.

En la Tabla 1 se presentan algunos ejemplos de los resultados obtenidos a través de TCL, de los cuáles describiremos algunos en detalle. Por ejemplo, a partir de trozos de 1 x 10 mm² de capas epidérmicas y subepidérmicas (ITCL) de los entrenudos de una rama floral de *Petunia hybrida*, se regeneraron yemas y flores dentro de los primeros 15 días de iniciado el cultivo. En otro experimento, partiendo de láminas transversales de pecíolos de violeta

Especie	Nombre común	Explanto	Respuesta
Organogénesis			
<i>Alocasia micoholitziana</i>	Alocasia	pecíolos	dy; r
<i>Dracaena</i> spp	Palo de agua	meristema	mb; r; pt
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Estrella federal	hipocótilos	mb; pt; ya; r
<i>Ficus</i> spp	Ficus	meristema apical y segmentos nodales	dy; mb; pt; r
<i>Petunia hybrida</i>	Petunia	segmentos nodales	mb; pt; r
<i>Calibrachoa</i> spp	Calibrachoa	segmentos nodales	mb; pt; r
<i>Mecardonia tenella</i>	Macardonia	segmentos nodales	mb; pt; r
<i>Bacopa monerii</i>	Bacopa	segmentos nodales	mb; pt; r
<i>Rosa hybrida</i>	Rosa	meristemas apicales y segmentos nodales	mb; ya; dy; pt; r
<i>Spathiphyllum</i> spp	Espatifilum	meristemas apicales	meristema apical; pt; r
Embriogénesis somática			
<i>Begonia gracilis</i>	Begonia	pecíolo y lámina foliar	ce; ge; dp
<i>Dendranthema</i> spp	Crisantemo	nervadura central foliar	ce; ge; dp
<i>Cyclamen persicum</i>	Ciclamen	mesófilo foliar	ce/sce; ge; dp
<i>Euphorbia pulcherrima</i>	Estrella federal	Hipocótilo	ce; ge; dp
<i>Rosa hybrida</i> *	Rosa	Pecíolo foliar, pétalo	ce; ge; dp
<i>Saintpaulia ionantha</i>	Violeta africana	pecíolo	ce; ge; dp
Células en capa fina			
<i>P. hybrida</i>	Petunia	ITLC (rama floral)	dy; pt
<i>Pelargonium</i>	Geranio	tTLC (hipocótilo)	es; pt
<i>Saintpaulia ionantha</i>	Violeta africana	tTLC (pecíolo)	dy; pt
<i>Orchydea</i>	Orquídeas	tTLC (yemas apicales)	dy; pt
<i>Lilium longiflorum</i>	Azucena	t y l TLC de diferentes explantos	bu; pt; r; es; dy
<i>Gentiana</i> spp	Gentiana	tTLC (yema floral)	dy; pt
<i>Gladiolus</i> spp	Gladiolo	tTLC (cormo)	dy; pt
<i>Dendranthema</i> spp	Crisantemo	ITLC (epicótilo)	es; dy; pt
<i>Heliconia</i> spp	Heliconia	tTLC (yema apical)	dy; pt
<i>Iris</i> spp	Iris	tTLC (yema apical)	dy; pt
<i>Helianthus</i> spp	Girasol	tTLC (hipocótilo)	es; pt

Tabla 1. Micropropagación de cultivos ornamentales aplicando diferentes estrategias de cultivo *in vitro* y las respuestas obtenidas. ya: yemas adventicias; mb: multibrotación; pt: plántulas; r: raíces; dy: desarrollo de yemas preexistentes; ce: callo embriogénico; sce: suspensión celular embriogénica; ge: germinación de embriones; dp: desarrollo de plántula, bu: bulbilllo; pr: protocormos. *: Sólo se regeneraron plantas completas en algunos cultivares.

africana (*Saintpaulia ionantha*) se recuperaron 70.000 plantas al cabo de 3-4 meses de cultivo.

La técnica también se utilizó para la obtención de embriones somáticos de geranio (*Pelargonium x hortorum*), donde se verificó que con el uso de segmentos transversales de hipocótilo se lograba una eficiencia 8 veces mayor en la producción de embriones, respecto de los producidos cuando se utilizaba el hipocótilo entero como explanto.

La orquídea es uno de los cultivos ornamentales más apreciados, tanto para flor de corte como para planta en maceta. Son especies

cuyos productos finales tienen una alta cotización en el mercado. A pesar de que muchas empresas propagan *in vitro* diferentes especies de esta monocotiledónea, son escasos los reportes publicados sobre protocolos de multiplicación a gran escala. Con el método de micropropagación convencional de yemas apicales, es posible producir cerca de 11.000 plantas anuales. Sin embargo, se ha reportado que el uso de tTCL de yemas apicales se podría alcanzar una producción de alrededor de 80.000 plantines por año.

En la Figura 1 se describen las alternativas de TCL según los tratamiento *in vitro* a los que se someten distintos explantos de crisantemo (*Dendranthema grandiflora*). Así, variando las condiciones de cultivo podemos seguir diferentes vías para la multiplicación, es ésta flexibilidad la que lo convierte la tecnología en una poderosa herramienta para el estudio de la diferenciación vegetal.

Otro cultivo ornamental al que se ha aplicado esta tecnología es la gentiana (*Gentiana* spp.), valorada tanto como flor de corte y planta en maceta. Gentiana puede ser propagada por medio de secciones transversales del receptáculo floral que regenera yemas por organogénesis directa luego de 2 a 4 semanas de cultivo.

Gladiolus spp, *Heliconia* spp, *Iris* spp y *Helianthus* spp, son otros de los géneros ornamentales que han sido exitosamente propagados por esta tecnología.

Automatización de la propagación *in vitro*

El proceso de escalado para la optimización de la productividad de un proceso de micropropagación, independientemente de la estrategia que se utilice, requiere de la

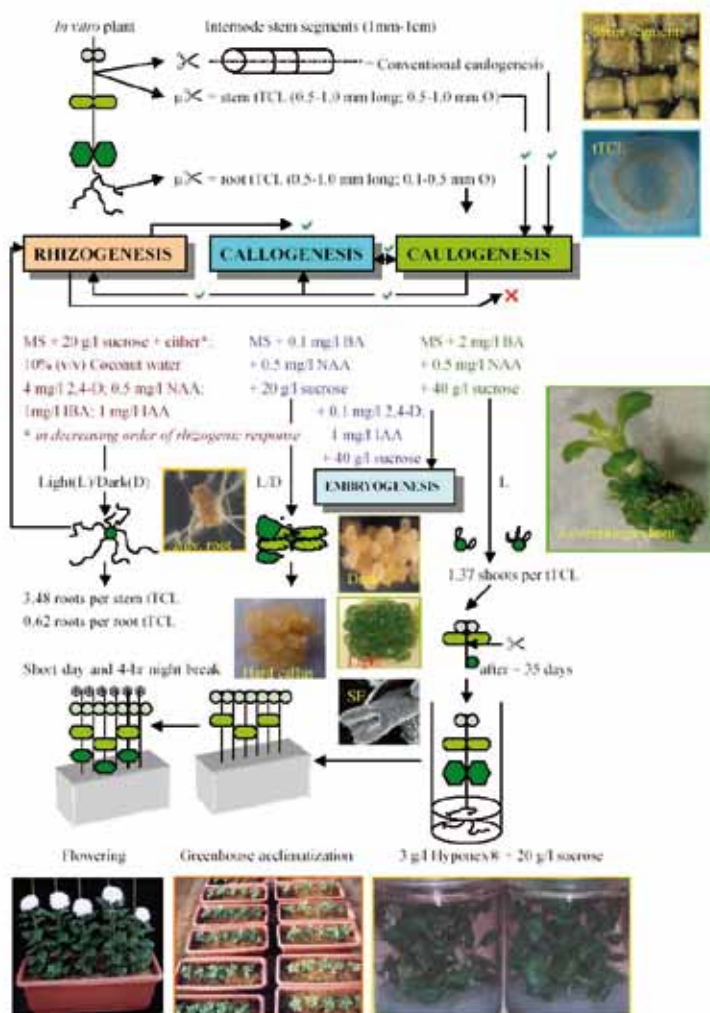


Figura 1. El diagrama indica el origen de las tTCLs y las diferentes condiciones de cultivo aplicadas para la obtención de plantines de crisantemo. (Gentileza de Jaime Teixeira da Silva, traducido)

implementación de los cultivos en medio líquido y el uso de biorreactores. En efecto, en un contexto comercial, esta tecnología tiene una serie de ventajas sobre las técnicas convencionales (entre ellas la posibilidad de automatizar la producción, disminuyendo costos y simplificando tareas).

En términos generales un biorreactor es un recipiente o sistema que mantiene un ambiente biológicamente activo y de condiciones propicias (*pH*, *temperatura*, concentración de *oxígeno*, nutrientes, etc.) para el elemento que se cultiva. En plantas, tradicionalmente se los ha utilizado para el cultivo de raíces y en la producción de metabolitos secundarios. Como sistema de propagación, no son muchas las especies en los que se los ha utilizado exitosamente. Algunos de estos casos son: *hippeastrum* (*Hippeastrum spp.*), *ciclamen* (*Cyclamen persicum*), *clavel* (*Dianthus caryophyllus*), *gladiolo* (*Gladiolus grandiflorum*) y *jacinto* (*Hyacinthus orientalis*). Comercialmente, se han multiplicado con éxito: helechos, espatifilum, filodendro, estrella federal y liliaceas.

En el año 1994, la firma francesa *IN VITRO PIC*, presentó un sistema de inmersión temporaria al que denominó RITA (del francés: *Réceptient d'Inmersion Temporaire Automatique*) (ver Figuras 2 y 3). El sistema permite sumergir los explantos en el medio de cultivo en forma sucesiva, y por tiempo e intervalos determinados para cada situación.



Figura 2. Sistema original RITA, de origen francés desarrollado por Vitropic S.A.

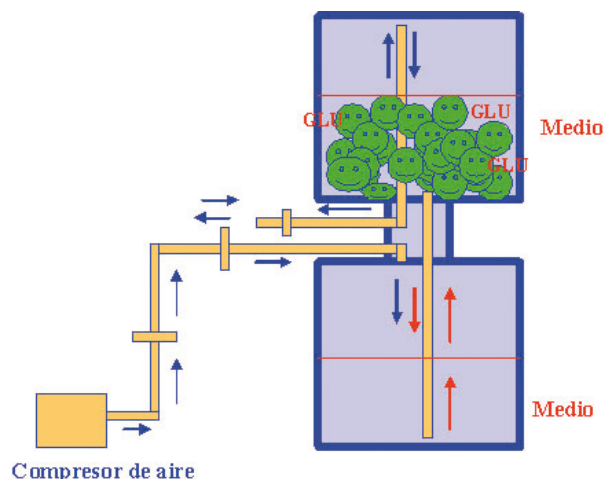


Figura 3. El principio de funcionamiento de los sistemas de inmersión temporaria se basa en que, por medio del trabajo de un compresor que insufla aire estéril al recipiente inferior, se produce el desplazamiento del medio líquido, que se encuentra depositado en su interior, al recipiente superior (las flechas azules indican el circuito del aire insuflado), donde se encuentra el material en cultivo que es cubierto totalmente por el líquido (las flechas rojas describen el recorrido del medio). Mientras la válvula se mantiene abierta, se insufla aire al interior del recipiente inferior y, en consecuencia, el medio se mantiene en contacto con los explantos. Una vez cerrada la válvula, por simple gravedad el medio vuelve al recipiente inferior.

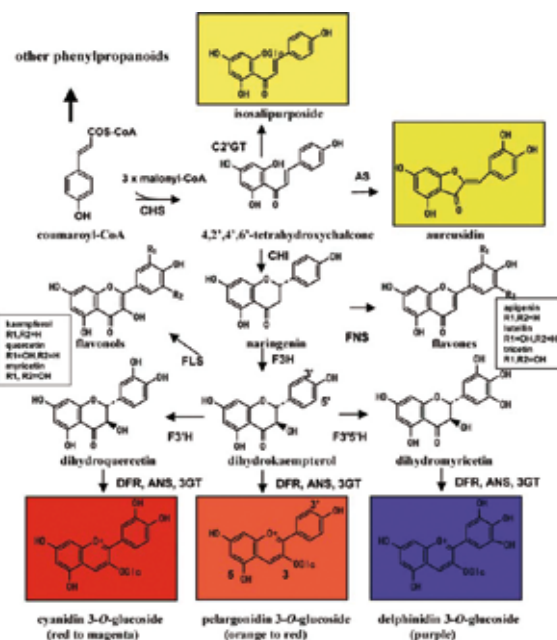


Figura 3. Vías metabólicas de las antocianinas.

Este sistema de inmersión temporaria presenta ciertas ventajas no sólo sobre el sistema de multiplicación tradicional, sino también sobre los reactores de inmersión completa. Entre ellas se destacan:

Con respecto al cultivo en fase sólida: la disminución del costo de mano de obra debido a la facilidad de manipulación de los explantos y del cambio de medio; la economía de espacio, y la optimización de la nutrición de los explantos debido a que absorben los nutrientes del medio a través de toda su superficie, favoreciendo el crecimiento en general.

Con respecto a los sistemas de inmersión permanente: debido a la naturaleza del sistema temporario se favorece la renovación completa del aire dentro del recipiente, evitando la concentración de gases perjudiciales al desarrollo de los explantos, y reduciendo los problemas de asfixia o vitrificación de los tejidos. Por otro lado, cada recipiente se encuentra protegido por filtros contra contaminación; y además se elimina el riesgo de contaminación cruzada.

Pese a esto, presentan ciertas desventajas: es difícil controlar la sanidad dentro del recipiente, requiere de equipamiento especial, y no sirve para el establecimiento del cultivo (sólo para las fases de multiplicación, crecimiento y enraizamiento).

Entre las especies florales que se han multiplicado por medio de esta tecnología encontramos la piña ornamental (*Ananas lucidus*), aunque comercialmente sólo se puede mencionar al bananero ornamental (*Musa basjoo* cv. 'Variegata') y varias especies de orquídeas (*Orchidea* sp).

Estos sistemas son especialmente interesantes para la propagación de plantas sin necesidad de luz, pues permiten un aumento de la eficiencia por disminución de costos al independizarse de la iluminación. Por ejemplo, en el caso de *Lilium* spp. se diseñó un protocolo de micropropagación independiente de la luz basado en ciclos de bulbificación directa seguida de una fase de crecimiento *in vitro* de los bulbillos. Como resultado se obtienen microbulbos aptos para el cultivo a campo.

3. Transformación genética

Modificando colores

En la edición anterior de este texto se comentó sobre el desarrollo de claveles azules y la extensión de la vida postcosecha de la empresa Florigene R&D (Australia). Posteriormente, Florigene R&D se asoció con Suntory Research (Japón) para concretar la obtención por ingeniería genética de una rosa de color azul.

Las antocianinas son la clase de pigmentos mayoritarios en las flores, son moléculas relativamente simples, solubles en agua, que se encuentran en grandes vacuolas de las células epidérmicas de los pétalos. Un punto clave de la ruta de biosíntesis de estos compuestos es el intermediario DHK (dihidrokaempferol). Las enzimas FLS (flavonol sintasa), F3'H (flavonoide 3'-hidroxilasa), F3'5'H (flavonoide-3',5'-hidroxilasa) y DFR (dihidroflavonol reductasa) utilizan este sustrato, sugiriendo que este punto es crítico en la biosíntesis de antocianinas y en la determinación del color floral (Figura 3).

Para la obtención de rosas azules, se incorporaron los genes de la vía de la delmidina, pigmento responsable del color azul. Además, fue necesario a través de la tecnología de ARN de interferencia bloquear la ruta de síntesis de cianidina, para disminuir la concentración de este pigmento y de esta forma evitar la contaminación del color bordó en los pétalos. Los cultivos de las nuevas variedades azules habrían alcanzado la etapa de ensayos a campo y podrían ser lanzadas al mercado en 2009.

En otros géneros como *Torenia*, con el objetivo de incrementar la variabilidad en los colores, se han desarrollado materiales transgénicos por medio de la técnica de cosupresión de los genes que codifican la DFR (dihidroflavonol reductasa) y la CHS (chalcona sintetasa). En lobelia (*Lobelia erinus*), se obtuvieron plantas con flores azules incorporando el gen de la F3'5'H de lisiántus.

En crisantemo, utilizando la tecnología de ARN antisentido, se ha logrado la obtener flores de diferentes tonalidades. Recientemente un grupo de origen japonés, ha dado un paso importante en la elucidación de la vía metabólica para la obtención de crisantemos de color blanco, al identificar la enzima CmCCD4 (del inglés *carotenoid cleavage dioxygenase*), como la responsable de

la degradación de los carotenoides que ocasiona la pérdida de la coloración amarilla.

Incrementando fragancias

Uno de los parámetros de gran valor agregado en el mercado de ornamentales es la capacidad de los cultivos de producir perfume, las fragancias sirven para atraer tanto a polinizadores como a potenciales clientes.

Se conocen cerca de 700 productos volátiles involucrados con el aroma de las plantas y flores, desde el punto de vista químico son ácidos grasos derivados del benceno, fenilpropanoles y terpenoides. Si bien se han clonado una interesante cantidad de genes involucrados en estas vías de síntesis, los avances en la bioquímica y la biología molecular de estos compuestos son aún muy limitados y, a la fecha, son muy pocos los reportes de avances en esta especialidad.

Por el momento se obtuvieron resultados promisorios en petunia, conejito y clavel. En el caso de éste último se reportó el incremento en la fragancia al regular negativamente la expresión del gen de la enzima F3'H (como se mencionó antes, involucrada en la biosíntesis de antocianinas). De modo que las flores resultaron más pálidas por una disminución de la concentración de antocianinas, pero con mayor fragancia debido a un incremento en la síntesis de metil benzoato.

Resistencia a hongos, insectos y virus

Dado que otros capítulos profundizan sobre las estrategias utilizadas para desarrollar resistencia a patógenos en plantas, nos limitaremos en este apartado a comentar algunos casos ilustrativos en el área de plantas ornamentales.

Los mecanismos de defensa de plantas son bastante complejos, por lo general el ataque de un patógeno activa cascadas de señales que desencadenan múltiples respuestas. En los cultivos florícolas, la mayoría de las estrategias para obtener resistencia a hongos se basan en la utilización de enzimas hidrolíticas. Por ejemplo, el hongo *Fusarium* es responsable de un 20% de las pérdidas anuales producidas en el cultivo de clavel. Se desarrollaron plantas transgénicas que expresan un gen de quitinasa aislado de *Serratia marcescens*. Ante el desafío

con el patógeno, las plantas transformantes presentaron un retraso significativo en el desarrollo de sintomatología, y de la etapa aguda de la enfermedad.

Otro caso es el ataque del hongo *Botrytis*, un problema importante para el cultivo del crisantemo. Hasta el momento no se ha logrado detectar resistencia en el germoplasma del género *Chrysanthemum*. Al día de hoy el control del patógeno se realiza por métodos químicos y de manejo del cultivo, sin embargo estas medidas son sólo paliativas. Se han obtenido plantas transgénicas de crisantemo portadoras del gen para la quitinasa de arroz (*rcc2*) que mostraron en los ensayos de desafío una resistencia leve a *Botrytis*.

Cuando se trata de obtener resistencia a insecto, la estrategia común es la utilización de toxinas. Así, en crisantemos se logró obtener resistencia a *Helicoverpa armigera* utilizando la toxina modificada del gen *Bt*, CryIAB; y resistencia a *Spodoptera exigua*, con CryIC. Además, se realizaron importantes progresos en la obtención de plantas con resistencia a trips (*Frankliniella occidentalis*, vector de tospovirus). En este caso se obtuvieron plantas transgénicas de crisantemo que expresan un conjunto de inhibidores de proteasas. Los ensayos con larvas *F. occidentalis* alimentadas con plantas transgénicas mostraron un 80% de reducción en la viabilidad, comparadas con aquellas larvas alimentadas con las plantas control (no transgénicas).

Los géneros virales *Tospovirus* y *Potyvirus* afectan a cultivos florícolas y hortícolas, y se encuentran ampliamente distribuidos en todo el mundo. Entre las estrategias planteadas para generar resistencia en plantas, se llevó a cabo la transformación de crisantemo con el gen de la nucleocápside viral de *Tomato spotted wilt tospovirus* (TSWT). Se utilizaron construcciones que presentaban la secuencia en sentido y antisentido, que lograron conferir resistencia a las plantas transgénicas (ante el desafío viral se mostraron asintomáticas y con bajos niveles de acumulación de viral). Con una estrategia similar se lograron plantas resistentes al virus de la clorosis del tomate (TCSV), al virus del anillado de tomate y pimiento (GRSV) y el de la necrosis del tallo del crisantemo (CSNV).

Una estrategia alternativa se basó en la utilización del gen *PAC1*, del hongo *Schizosaccharomyces pombe*, que codifica una ribonucleasa que reconoce y degrada ARN de doble cadena. En este caso se observó que los niveles de resistencia alcanzados por las transformantes dependían del grado de expresión del transgén, aproximadamente el 20% de estas plantas presentaban niveles altos de expresión que correlacionaban con la ausencia de desarrollo de los síntomas de infección.

Prolongando la vida en postcosecha

El período de vida postcosecha de las flores depende del grado de nutrición, la carga microbiana y, fundamentalmente de la producción de etileno (hormona asociada al proceso de senescencia). Existen sustancias como las sales de plata que retardan el proceso (actúan bloqueando el receptor de etileno, ETR1), sin embargo son muy tóxicas y su uso debería dejarse de lado. La ingeniería genética ofrece una serie de alternativas para lograr retrasar este proceso.

Por ejemplo, se transformaron claveles con el gen *etr1* bajo regulación del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor (CaMV). Las plantas transformantes mostraron una vida postcosecha de tiempo comparable al de las plantas control (no transgénicas) tratadas químicamente. En una estrategia mejorada, se transformaron plantas de *Campanula carpatica* (una ornamental de maceta) con una construcción del mismo gen (*etr1*) bajo el promotor *FBP1* de petunia, específico de flores. Las flores mostraron una marcada disminución de su sensibilidad al etileno, y fueron capaces de mantenerse abiertas durante 14 días, cuando el período habitual es de 3 días. Se puede observar que la utilización de promotores específicos de órgano genera el mismo nivel de protección frente a etileno, y presenta ventajas significativas frente a la expresión constitutiva (no modifica la sensibilidad al etileno en el resto de la planta, por lo que otras acciones del etileno como la activación de respuestas defensivas, no resultarían afectadas).

Plantas con nuevas formas

Desde el punto de vista de estético, la modificación de la arquitectura de la plantas es uno

de los parámetros más codiciados en el mejoramiento de plantas ornamentales, tanto para flores de corte como plantas de maceta. La modificación de la forma de las plantas adquiere relevancia a la hora de obtener un cultivo homogéneo en altura, o bien de incrementar la cantidad de brotes laterales. Por otro lado, una planta con forma diferente significa un gran impacto en el mercado.

A pesar de que se conoce un número importante de genes involucrados en la determinación de la arquitectura de las plantas, sólo unos pocos han sido utilizados en cultivos florícolas.

En petunia se sobreexpresó el factor LIF (del inglés *lateral shoot inducing factor*) bajo el promotor 35S de CaMV. Se observó que al alteraba el metabolismo de las citocininas provocando la aparición de fenotipos con mayor cantidad de ramas con ramificaciones secundarias, poco usuales en esta especie.

La misma planta, petunia, se transformó con el gen *ipt* (isopentenil transferasa de *A. tumefaciens*), bajo el control de un promotor de *Arabidopsis* de la senescencia de las hojas. Las plantas transformantes presentaron mayor cantidad de flores y retraso de la senescencia, con una marcada disminución de sensibilidad al etileno.

Asimismo, se han obtenido resultados interesantes modificando las vías de biosíntesis o respuesta a giberelinas. Esto se debe a que para solucionar la falta de uniformidad en la morfología de las plantas de crisantemo (plantas en maceta) se aplican productos como paclobutrazol, fosphonD, Amo1618, etc. Se trata de inhibidores de giberelinas, compuestos costosos, difíciles de manejar y, en algunos casos, de uso restringido. Dado que las giberelinas incrementan la división y elongación celular, la inhibición de esta vía resultaba una alternativa válida. Un equipo de investigadores transformó crisantemo con el gen *gai* de *A. thaliana* bajo el promotor constitutivo 35S. Obtuvieron un amplio rango de fenotipos de enanismo que atribuyeron no sólo al diferente número de copias insertadas, sino también al sitio de inserción en el genoma de la planta. Al medir los niveles de expresión del gen se observó que correlacionaban con el grado de intensidad del fenotipo observado, esto es, a mayor nivel de expresión

mayor grado de enanismo detectado (Figura 4). Usando esta estrategia lograron obtener una reducción en la altura comparable a la alcanzada por la utilización de los inhibidores de giberelinas, evitando los efectos colaterales que estos productos provocan.

Una interesante alternativa para incrementar la variabilidad genética es el uso de *A. rhizogenes*. Se trata de una bacteria del suelo que posee un megaplásmido denominado Ri (Figura 5), donde se encuentran los genes *rol A*, *rol B*, *rol C*, y *rol D*, responsables de provocar alteraciones fenotípicas denominadas raíces en cabellera (*hairy roots*). En la infección, la bacteria transfiere a la planta estos genes que codifican proteínas que intervienen en la síntesis de auxinas y opinas. Además de acrecentar el desarrollo de las raíces en el sitio de infección, otros de los síntomas asociados son: enanismo, mayor compacidad, menor dominancia apical, variabilidad en hojas y flores. Estas alteraciones varían de evento a evento, y la intensidad de los síntomas es especie dependiente. Pese a esto constituyen una herramienta interesante para programas de mejoramiento de plantas ornamentales.

En el año 2005, la empresa Sakata presentó una variedad de conejito (*A. majus*) con características diferentes a las variedades comerciales conocidas hasta ese entonces. La planta se caracterizó por ser significativamente más compacta, tener entrenudos cortos, una marcada disminución de la dominancia apical, muy ramificada, hojas y flores más pequeñas, y gran capacidad de enraizamiento. Esta variedad se obtuvo aplicando la tecnología de *A. rhizogenes*. Una estrategia similar se utilizó a principios de los '90 con *Nierembergia scoparia*, donde se trabajó con las cepas hipervirulentas de *A. rhizogenes* (Figura 6). En la misma época se presentaron resultados similares obtenidos con geranio (*Pelargonium* sp.) donde las plantas mostraron fenotipo enano, incremento en el número de entrenudos y de ramas laterales, mayor número de hojas, de color más oscuro, mayor capacidad de enraizamiento y un incremento en la concentración de aceites esenciales, pero una marcada inhibición en la floración. Utilizando la misma tecnología se informaron resultados similares en lisiantus



Figura 4. Efecto del gen *gai* en plantas de crisantemo. A la izquierda el control sin transformar, el resto son plantas transgénicas expresando diferentes niveles del transgen que se correlacionaron con los síntomas de enanismo observado. Cortesía del Dr. Setephen D. Jackson.

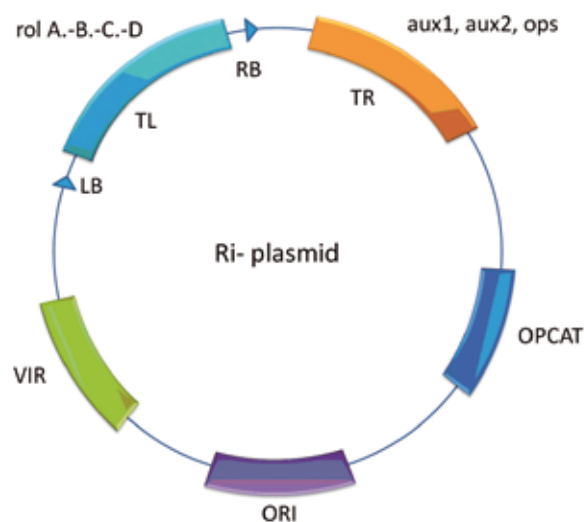


Figura 5. Plásmido Ri del tipo agropina, que se caracteriza por poseer el ADN-T dividido en dos TI y Tr. En la porción TI se encuentran las secuencias que codifican para los genes *rol* y en Tr los oncogenes *aux1* y *aux2* y de la síntesis de opinas. Ambas porciones de ADN T son transferidas en el proceso de transformación.

(*Eustoma grandiflorum*), rudbekia (*Rudbeckia hirta*), datura (*Datura arborea* y *D. sanguinea*), angelonia (*Angelonia salicariifolia*) y catarantus (*Catharanthus roseus*).

Los genes *rol* también fueron utilizados en forma independiente del sistema de *A. rhizogenes* para la transformación genética de platas.



Figura 6. A la izquierda los controles sin transformar de *Nierembergia scoparia*, a la derecha las plantas transgénicas expresando la sintomatología de la enfermedad de las raíces en cabellera. Gentileza del Dr. Masahiro Mii de la Universidad de Chi- ba, Japón.

Utilizando el *rol C* bajo el control del promotor 35S de CaMV se obtuvieron petunias con menor dominancia apical y tanto la planta, como sus hojas y flores, mostraron un tamaño significativamente más reducido que la planta control (no transgénica). En crisantemo y clavel, con una construcción similar, se obtuvieron plantas de fenotipo enano, entrenudos cortos, muy ramificadas, hojas de diferentes formas y tonos de verde, mayor cantidad de flores por tallo, aunque más pequeñas y compactas.

En begonia (*B. tuberhybrida*) se utilizó para la transformación una construcción que portaba los tres genes *rolA*, *rolB* y *rolC*. Las plantas transformantes resultaron enanas, con mayor cantidad de hojas arrugadas y de intenso color verde, pero con problemas en la floración (desde retrasos a inhibición en comparación con el genotipo salvaje).

La estrategia de transformación con tres genes también se aplicó, con distintos grados de éxito, en liliun, limonium y rosa.

4. Genómica en ornamentales

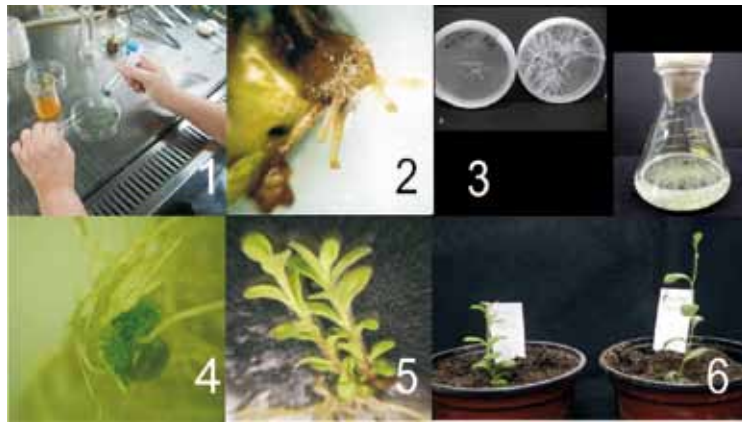
Existen cada vez más proyectos de investigación abocados al desarrollo de proyectos de bioinformática y genómica, que se estructuran como consorcios mundiales con el fin de aunar esfuerzos y recursos: En ornamentales están activos los consorcios de *Rosáceas* GDR (*Genome Database for Rosaceae*) y *Begonia*; y el de *Petunia hybrida* y *A. majus* incluidas en la SGN (*Sol Genomic Network*).

La caracterización de genes por medio de marcadores moleculares clásicos como las etiquetas de secuencias expresadas (EST, *Expressed Sequence Tags*) o los polimorfismos de un sólo nucleótidos (SNP, *Single Nucleotide Polymorphism*), conjuntamente con la estimación de la diversidad genética, pueden ser utilizados para establecer los marcadores que se corresponden con rasgos fenotípicos de interés. Y una vez obtenidos éstos utilizarlos para la selección asistida, la construcción de mapas genéticos y locus de carácter cuantitativo (QTLs, *Quantitative Trait Loci*).

En rosa, por ejemplo, se ha creado un mapa genético de alta densidad para ser usado como herramienta de análisis de la variación genética y la detección genes de interés. Los mapas de ligamiento fueron construidos con marcadores moleculares (incluyendo AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*, ISSR, *Inter-Simple Sequence Repeat*; RFLP, *Restriction Fragment Length Polymorphism*; RAPD, *Random Amplified Polymorphic DNA*, entre otros) y marcadores morfológicos. El resultado fue un mapa de gran cobertura y con marcadores robustos, con lo cual se abrió una muy promisorio perspectiva para la confección de mapas de QTLs y para el mejoramiento asistido por marcadores. Con el desarrollo del mapa de ligamiento se pudieron identificar, funcionalmente, diversas regiones del genoma, por ejemplo, se ha identificado un gen que controla el tipo de flor, dos QTLs para resistencia a *powdery mildew*, otros dos que controlan el tiempo de floración y otros asociados a el tamaño de la flor, el número de entrenudos, al grosor del tallo, la longitud de la raíz, el contenido de clorofila y el área foliar, entre otros caracteres.

El avance de la genómica también ha hecho posible generar librerías de ADNc de pétalos de rosa para desarrollar ESTs y microarreglos, que combinados con los resultados de proteómica, han permitido identificar varios genes y estimar sus posibles funciones, entre ellos algunos incluidos en la producción de fragancia.

Algunos grupos de investigación trabajan activamente en el estudio del desarrollo floral de *Lilium* para elucidar el proceso a nivel genético y transcripcional. Estudios genómicos como éstos pueden ser de suma utilidad al combi-



a) Etapas del ensayo de transformación, inoculación (1). Raíces emergentes en una etapa temprana del cultivo (2). Crecimiento en placa y medio líquido, a la izquierda se observa el grado de desarrollo de un control en medio sólido (3). Primeras etapas de la organogénesis (4). Plántulas *in vitro* (5). Eventos recuperados luego de la etapa de aclimatación (6).



b) Las flechas indican los eventos 7 y 8 (izquierda y derecha, respectivamente) y su comparación respecto de la planta silvestre. Se puede apreciar diferencias, entre otras, en el tamaño de las flores y la forma y tamaño de las hojas.

Figura 7. Desarrollo de los productos obtenidos en los ensayos de transformación de *Calibrachoa excellens* con *Agrobacterium rhizogenes*.

narse con técnicas de transformación genética que permitan introducir variaciones en el patrón de floración y explotarlos comercialmente.

El conocimiento de la diversidad genética es de gran ayuda para un correcto manejo del germoplasma por parte de los mejoradores. Con este fin se crearon BEGOBIO y BEGOMOL, dos bancos de germoplasma *ex situ* e *in situ* de *Begonia*. El proyecto cuenta con un programa de preservación de la biodiversidad por medio de criopreservación y de almacenamiento de ADN en chips y en librerías de ADNc.

Distintos trabajos con marcadores moleculares clásicos que han permitido analizar tanto

las relaciones genéticas como la diversidad entre distintas especies. Por ejemplo, en calatea (*Calathea* Mey.), el uso de AFLPs permitió diferenciar distintas especies, generando perfiles y *clusters* que podrán ser utilizados para la comparación con otras especies.

Por otro lado, estudios basados en RAPDs, ISSRs y microsatélites de cloroplasto (ADNcp) han permitido estudiar la diversidad genética de dos especies de primula, *Primula sikkimensis* y *P. farinosa*. En el último caso, el relevamiento de plantas de distintas altitudes permitió establecer la diferenciación de las poblaciones a través del gradiente de altitudes. En came-

lia amarilla (*Camellia nitidissima*) se utilizaron RAPDs y AFLPs para estudiar la variabilidad y la estructura de distintas poblaciones, estos datos son de vital importancia en la conservación de la diversidad genética de esta especie. En la variedad "Blue Parrot" de tulipán (*Tulipa* spp) se logró establecer una correlación entre la detección de cambios fenotípicos relevantes en plantas micropropagadas y la modificación de los perfiles moleculares de RAPDs e ISSR. En junquillo (*Narcissus tazetta* var. *chinensis*) se utilizaron RAPDs y AFLPs para caracterizar mutantes generadas por radiación gamma. La alta frecuencia de mutantes detectadas permitió determinar la efectividad del tratamiento.

En violeta de los Alpes (*Cyclamen persicum*) se inició un proyecto de ESTs para entender el proceso de embriogénesis somática. Aproximadamente un tercio de los genes involucrados en este proceso se cubrió con los ESTs analizados. En la colección generada de *Cyclamen* se halló una alta proporción de genes homólogos con los involucrados en el proceso de embriogénesis somática en el sistema modelo de *Daucus carota* (zanahoria).

En *Gerbera hybrida* se logró obtener una colección de ADNc a partir de 8 tejidos diferentes. A partir de la secuenciación y el ensamblado con las bases de datos existentes, se generó una base de ESTs que dio origen a un microarreglo denominado '9K cDNA'. Este microarreglo permitió la identificación de genes específicos de flores, varios de los cuales tendrían posibles funciones en el desarrollo órgano-floral. Luego, el mismo microarreglo se utilizó para analizar los cambios transcripcionales producidos durante la organogénesis en 6 estadios diferentes del desarrollo floral de gerbera. Se logró identificar una serie de genes que participarían en el desarrollo y la apertura de los pétalos, abriendo un camino interesante al manejo de la regulación de la floración.

En *Petunia* las librerías de ADNc de flores permitieron desarrollar ESTs y microarreglos, a partir de los cuales se describieron proteínas involucradas en las vías dependientes del calcio y en el metabolismo de la pared celular; y genes relacionados a la apertura de las flores, la biosíntesis de antocianinas y la degradación de proteínas.

En conejito (*A. majus*) se aislaron secuencias repetidas en *tandem* de las regiones centroméricas de los cromosomas. Por medio de la técnica de hibridación fluorescente *in situ* (FISH) se estableció un cariotipo estándar utilizando estas secuencias repetitivas. Para integrar los mapas genéticos y cromosómicos, se seleccionaron marcadores moleculares de cada grupo de ligamiento de una colección de cromosomas artificiales de *Antirrhinum* para la transformación de plantas. Los clones se hibridaron por FISH en los cromosomas de conejito, el resultado permitió establecer la relación entre los cromosomas y los grupos de ligamiento.

6. Perspectivas

Si bien se han obtenido resultados interesantes, por el momento las técnicas de ingeniería genética han tenido poco impacto en el ámbito de los cultivos ornamentales.

Teniendo en cuenta que la fuerza impulsora que mueve esta clase de industria es la permanente renovación y la aparición de novedades, las perspectivas son propicias para el desarrollo de nuevas variedades ornamentales utilizando técnicas biotecnológicas. En este marco es importante destacar que a la hora de seleccionar los cultivos sobre los cuales trabajar, deberían contemplarse no sólo cuestiones técnicas sino también comerciales y legales.

Por otro lado, los avances en las técnicas biotecnológicas y el desarrollo de nuevos y mejorados programas de computación, han dado a la genómica el impulso necesario para ser una herramienta fundamental en los programas de mejoramiento. A pesar de que se han producido avances en el número de especies estudiadas y la comprensión de sus respectivos genomas (cada día hay nueva información de mapas de ligamiento y, éstos a la vez, más saturados), aún hay mucho por hacer, sobre todo frente a las perspectivas del cambio climático y los problemas asociados a la contaminación ambiental.

Lecturas recomendadas

- Casanova E., Trillas M.I, Moysset LL. and Vainstein A. 2005. Influence of rol genes in floriculture. *Biotech Advances*, 23, 3-39.
- Choi P.S., Kim Y.D., Choi K.M., Chung H.J., Choi D.W., and Liu J.R. 2004. Plant regeneration from hairy root cultures transformed by infection with *Agrobacterium rhizogenes* in *Catharanthus roseus*. *Plant Cell Rep*, 22, 828-831.
- da Silva Souza A. and GoesJunhans T. (Editores) 2006. Introdução a Micropropagação de Plantas. EMBRAPA Mandioca e Fruticultura Tropical. Cruz das Almas-BA. Brasil.
- Dugo M. L., Satovic Z., Millán T., Cubero J. I., Rubiales D., Cabrera A. and. Torres A.M. 2005. Genetic mapping of QTLs controlling horticultural traits in diploid roses. *Theor Appl Genet*, 111, 511–520.
- Escandón A. S., Ferrari P., Facciuto G., Soto S., Hagiwara J.C. and Acevedo A. 2003. Combinación de técnicas *in vitro* y *ex vitro* para la micropropagación de Santa Rita (Híbr). Una arbustiva de relevancia ornamental. *Revista de Investigación Agropecuaria*, 32,111-122.
- Marinangeli P. 2003. Biotecnología del Liliun. En: *Floricultura en la Argentina*. Mascarini, L, F Vilella y E. Wright Eds. Editorial Facultad de Agronomía UBA. Buenos Aires. Págs. 63 a 82.
- Mishiba K, Nishihara M., Abe Y., Nakatsuka T., Kawamura H., Kodama K., Takesawa T., Abe J. and Yamamura S. 2006. Production of dwarf potted gentian using wild-type *Agrobacterium rhizogenes*. *Plant Biotechnology*, 23, 33-38.
- Nakagawa H, Jiang Ch, Sakakibara H., Kojima M., Honda I., Ajisaka H., Nishijima T., Koshioka M., Homma T., Lewis M. and Takatsuji H. 2005. Overexpression of a petunia zinc-finger gene alter cytokinin metabolism and plant forms. *The Plant Journal*, 41, 512-523.
- Nakatsuka T., Pitaksutheepong C., Yamamura S. and Nishihara M. 2007. Induction of differential flower pigmentation patterns by RNAi using promoters with distinct tissue-specific activity. *Plant Biotechnol Rep*, 1, 251–257.
- Pelkonen V.P., Niittyvuopio A., A. M. Pirttilä A., Laine K. and Hohtola A. .2007. Phylogenetic Background of Orange Lily (*Lilium bulbiferum* s.l.) Cultivars from a Genetically Isolated Environment. *Plant Biol*. 9: 534–540.
- Penga Y., Linb W., Weia H., Krebsc S. and Arora R. .2008. Phylogenetic analysis and seasonal cold acclimation associated expression of early light-induced protein genes of *Rhododendron catawbiense*. *Physiologia Plantarum* 132: 44–52.
- Petty L.M. Harberd N.P. Carre I.A. Thomas B. Jackson S. .2003 Expression of the Arabidopsis gai gene under its owner promoter causes a reduction in plant height in chrysanthemum by attenuation of the gibberellin response. *Plant Sci*. 164: 175-182.
- Pichersky E. and Dudareva N. .2007 Scent engineering: toward the goal of controlling how flowers smell. *Trends in Biotechnology*, vol: 25 (3): 105-110.
- Ponce J.P. Propagación masiva de plantas: posibilidades y perspectivas. In: *Resumos do II Encontro Brasileiro de Biotecnologia Vegetal*, REDBIO, 24 a 28 noviembre. 1997, Gramado. p.17.
- Rout GR, Mohapatra A. y Mohan Jain S. .2006. Tissue culture of ornamental pot plant: A critical review on present scenario and future prospect. *Biotech. Advances*: 24: 531-560.
- Sriskandarajah S., Mibus H. y Serek M. .2007. Transgenic *Campanula carpatica* plants with reduced ethylene sensitivity. *Plant Cell Rep.*: 26:805–813.
- Tanaka Y. Katsumoto Y. Brugliera F. y Mason J. .2005 Genetic engineering in floriculture. *PCTOC* 80: 1-24.
- Teixeira da Silva JA .2003 Thin layer Technology in ornamental plant micropropagation and biotechnology. *African J. Biotech.* 2, 683-691.
- Visser PB, De Maagd RA y Jongsma MA. .2007. Chrysanthemum. En: *Biotech. in Agriculture and Forestry*. Vol.: 61 *Transgenic Crops VI* (ed. Pua, EC y Davoey,MR) Chapter: III.3. Springer Verlag. Berlin, Heidelberg. Págs.: 253-272.
- Wang Y y Li J. .2006 Genes controlling plant architecture. *Current opinion in Biotech.* 17: 123-129.
- Wang F. Ge X., Gong X. Hu C. and Hao G. .2008. Strong Genetic Differentiation of *Primula sikkimensis* in the East Himalaya–Hengduan Mountains. *Biochem Genet* 46: 75–87.
- Wang Y y Li J. .2006. Genes controlling plant architecture. *Current opinion in Biotech*, 17, 123-129.
- Yan Z., Visser P. B., Hendriks T., Prins T. W., Stam P. y Dolstra O. .2007. QTL analysis of variation for vigour in rose. *Euphytica*, 154, 53–62.
- Ziv M .2000. Bioreactor technology for plant micropropagation. *Horticultural Reviews*, 24, 1-28.

Sitios WEB sugeridos

BEGOBIO:
<http://www.begobio.cz/pages/more/projectsc.htm>
www.arabidopsis.org
www.bioinfo.wsu.edu/gdr/
<http://www.vitropic.fr/>
<http://www.florigene.com/research/research.php>
<http://gsbjournals.client.jp/FOPB.html>
http://www.actahort.org/books/764/764_9.htm
<http://www.isb.vt.edu/news/2004/Nov04.pdf>

V. CAPÍTULO 5

Aplicación de la biotecnología en la mejora y conservación de especies forestales

Susana Marcucci Poltri, Leonardo Gallo,
Noga Zelener, Susana Torales, Sandra Sharry

En el presente texto se abordan dos grandes aspectos de investigación en biotecnología forestal, uno de los cuales involucra la exploración de la variabilidad natural y su aprovechamiento para distintos fines, incluyendo avances mundiales y principales proyectos en el campo de la genómica, aplicaciones en Argentina en la genética ecológica de los bosques y en el mejoramiento y domesticación de especies de interés. El otro aspecto se refiere a los organismos genéticamente modificados, objetivos y ejemplos de investigación en América Latina.

1) Avances de las estrategias y herramientas genómicas en el mejoramiento molecular forestal

Introducción

El desarrollo biotecnológico y sus aplicaciones al sector forestal se están expandiendo rápidamente (**Figura A**). Las técnicas de marcadores moleculares para la localización de genes simples y QTLs (*loci* involucrados en características cuantitativas o Quantitative Trait loci) han permitido identificar intervalos genómicos “relativamente amplios” típicamente involucrando decenas de centiMorgans (cM), y por lo tanto decenas o centenas de genes, y no los genes efectivamente involucrados en el control de la característica. Estos marcadores se aplican dentro de tácticas de selección familiar, y sólo una estrategia de mapeo de polimorfismos de secuencia que estén suficientemente próximos a una mutación funcional revelará asociaciones entre marcadores moleculares y caracteres de interés más precisas (Neale y Savolainen, 2004; *Gonzalez-Martinez *et al.* 2006).

La información de los mapas, conjuntamente con la generada por los diversos proyectos

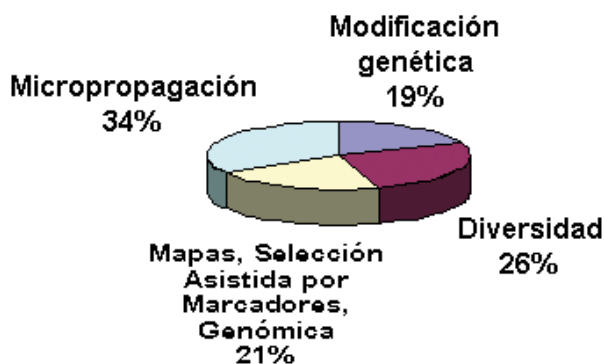


Figura A: Proporción de las actividades en biotecnología forestal agrupadas en grandes categorías, según el dominio público (Chaix and Monteuiis, Apendice 2.1) FAO, 2004.

genómicos que comenzaron en el año 2000 con la secuenciación de *Arabidopsis thaliana*, siguiendo en el año 2004 con la de *Populus trichocarpa* (<http://genome.jgi-psf.org/Poptr1/Poptr1.home>; Tuskan *et al.*, 2006), y que continúa con la de secuenciación completa del genoma de *Eucalyptus grandis* (esperada para el año 2010), permitieron el desarrollo de nuevas estrategias para la identificación de genes involucrados en características de interés.

Existen varios proyectos genómicos forestales públicos y privados. Con la información genómica disponible, se ha utilizado la estrategia del “análisis del gen candidato” (candidate gene approach) para la identificación de genes subyacentes en QTLs, por ejemplo, en pino, para genes involucrados en la síntesis de lignina y estructura de la pared celular (*Brown *et al.* 2003). Mediante la estrategia de “genética genómica” (genetical genomics), que es una combinación del análisis de QTLs y análisis del transcriptoma en las poblaciones segregantes, se vio que QTLs para crecimiento co-localizaron con eQTLs (expressed QTLs) para genes relacionados a contenido de lignina, sugiriendo que crecimiento y lignina estarían controlados por los mismos *loci* en el pedigrí de eucalipto ensayado (Kirst *et al.* 2004). En álamo, se estudiaron combinadamente QTLs, microarreglos y genes candidatos para identificar genes involucrados en tolerancia a sequía (Street *et al.*, 2006). Por último, y para determinar *loci* y alelos responsables de las diferencias fenotípicas, se

emplea el “mapeo de asociación” (association mapping) a partir de la búsqueda de variantes de genes candidatos. En contraste con el mapeo de QTLs, los marcadores que muestran asociación con un carácter fenotípico, están muy cerca o directamente en el gen que influye en el carácter (**Figura B**). Esta táctica, toma ventaja de la gran variabilidad y bajo valor de desequilibrio de ligamiento que generalmente presentan las poblaciones naturales y puede aplicarse cuando existe gran variabilidad alélica (SNPs o single nucleotide polymorphisms). En el caso de *Eucalyptus*, una primera asociación entre polimorfismo en genes candidatos y el ángulo de la microfibrilla fue publicado por Thumma *et al.*, 2005. En coníferas los estudios de asociación fueron pioneros y se realizaron en pino taeda (*Gonzalez-Martinez *et al.*, 2006; 2007), pino radiata, pino Oregón (abeto blanco) y falso abeto (abeto rojo).

Hasta aquí, se ha hablado del estudio de la variabilidad de los fenotipos naturales para la búsqueda de las variantes genéticas que los causan, cuyo esquema general simplificado se muestra en la **Figura C**. La otra alternativa es la modificación de un fenotipo, a través de los análisis de anulación o supresión (knock out) o sobreexpresión de un gen mediante plantas transgénicas.

Independientemente de las estrategias utilizadas, una vez identificados los fenotipos beneficiosos, pueden seguirse dos caminos: 1) identificar genotipos que contengan estos alelos de interés e introducirlos en los programas de mejoramiento/conservación y 2) modificar genéticamente clones elite con estas variantes, que si bien en especies forestales es dificultosa, en los casos posibles, han sido exitosas, como se explicará posteriormente (*Boerjan 2005).

Situación en Argentina

La biotecnología en estudios de Genética Ecológica Forestal

El bosque constituye el ecosistema terrestre de mayor complejidad donde ocurren infinidad de interacciones entre los elementos estructurales del sistema (los árboles) y los numerosos organismos que viven dentro de él. En las últimas décadas, el acelerado avance de la frontera agrícola y ganadera ha reducido sensible-

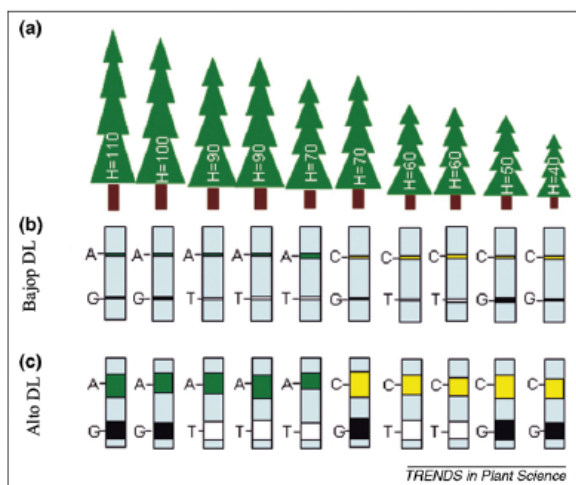


Figura B: Ilustración simplificada de un ensayo de asociación genética para la identificación de la variación alélica que influye un carácter fenotípico “altura”, en un escenario de bajo o alto desequilibrio de ligamiento. A) El carácter de interés se mide en árboles no relacionados tomados de una población. Como ejemplo se midió la altura de cada árbol a una edad definida B) se determinan SNP en cada genotipo, generalmente tomando una muestra pequeña y luego extendiendo al total de la población estudiada para los SNPs seleccionados. Los SNPs se han elegido para dos loci en un mismo cromosoma bajo el escenario de “bajo desequilibrio de ligamiento”. Para el SNP superior (“A” vs. “C”), los árboles que poseen SNP “A”, tienen una altura promedio de 92, mientras que los que tienen “C”, su altura promedio es sólo 56, consistente con una asociación significativa entre el genotipo SNP y el fenotipo altura. Para el segundo SNP (“G” vs “T”), los árboles que poseen “G” tienen un promedio de altura de 74, y los árboles que tienen “T”, también tienen un promedio de altura de 74, indicando que este SNP no tiene asociación con el fenotipo altura. El bajo desequilibrio de ligamiento resutaría típicamente en una pequeña región cromosómica (pocos cientos de bases, señalado por cajas coloreadas). C: los mismos genotipos de SNP pero en escenario de alto desequilibrio de ligamiento. En este caso, la región cromosómica que rodea al SNP es grande, algunos cientos de kilobases, y es común entre los individuos, también señalada como caja coloreada. El resultado es que un SNP con significativa asociación a un carácter, es probable que esté muy cerca o directamente sobre el gen, y esto permite el conocimiento de la función, regulación etc., siendo los SNPs predictivos no sólo en el pedigree y pueden usarse en poblaciones naturales.

Tomado de Will genomics guide a greener forest biotech? Andrew T. Groover Current Opinion in Biotechnology 2005, 16:159–166.

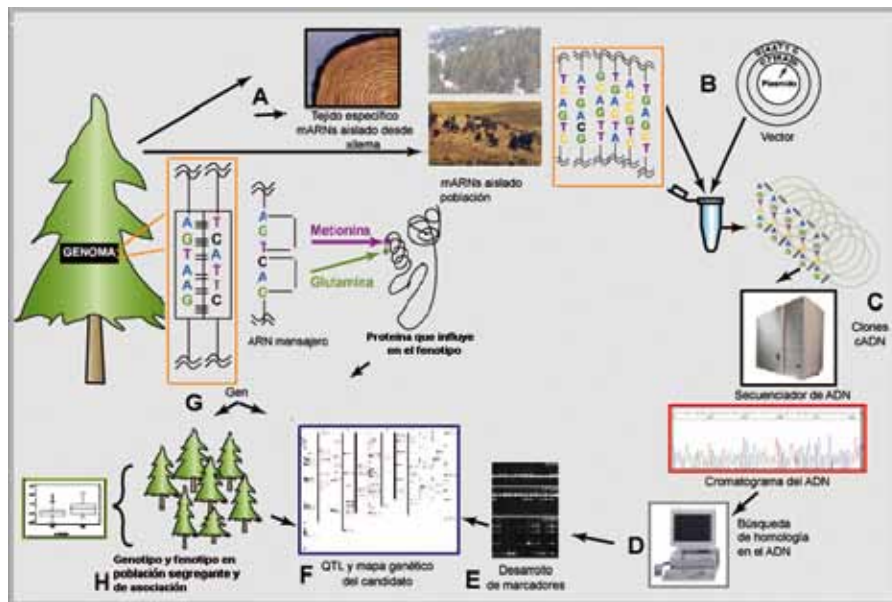


Figura C: Esquema de trabajo simplificado para detección y análisis de ESTs mediante genética directa. A partir del tejido donde se expresa el carácter o del tejido del árbol sometido a distintos estímulos (A) (ej, madera o tejidos sometidos a diversos factores de estrés), se extraen diferencialmente los ARNm que se transcriben frente a esa respuesta. Luego de un paso de síntesis de cADN “in vitro”, estos fragmentos o ESTs son clonados (B) en librerías de expresión y secuenciados (C). Esta información se compara con las secuencias depositadas en las bases de datos públicas existentes (D) y se observa el grado de similitud entre ellas. A partir de aquellas que presentan alta identidad de secuencia con los genes publicados (ahora genes candidatos), se diseñan marcadores específicos de fragmentos (E), o bien se buscan variantes de SNPs entre los individuos muestreados. Estas diferencias de secuencias permitirán posicionar al gen en el cromosoma y detectar su co-localización con QTLs en una población segregante de cruzamientos contrastantes para el carácter en cuestión (G). La otra estrategia, (H) es utilizar poblaciones de individuos de gran variabilidad fenotípica y genotípica, en donde estos SNPs tratan de asociarse con los fenotipos, realizando mapeo de asociación (ver también **Figura B**). Se observarán diferencias significativas del carácter entre los grupos que poseen uno u otro haplotipo, si éste está directamente influyendo el carácter. En este esquema general, el cambio de la base “A” del gen de por una “C”, genera una modificación del aminoácido en la proteína, que influye directamente en la expresión del carácter, y puede visualizarse en los fenotipos de los individuos segregantes de la población de mapeo y en la población de asociación.

mente la superficie boscosa a una tasa anual de deforestación mundial de unos 13 millones de has, a la cual nuestro país, contribuye con un promedio de 300.000 has de bosque nativo por año (FAO 2007) urge por lo tanto actuar rápidamente en la conservación del bien común genético forestal ya que de él depende la conservación de la diversidad genética y el uso adecuado de la misma en procesos productivos de importancia socio-económica.

Numerosos son los marcadores que se utilizan en estudios de genética ecológica con fines de conservación y domesticación de especies

forestales. La mayoría ya han sido presentados y descritos en este volumen y pueden ser encontrados en diferentes publicaciones (eg. *Ziegenhagen and Fladung 2008).

Una de las formas de agrupar a los diferentes tipos de marcadores genéticos utilizados en estudios de genética ecológica forestal es en función de su utilidad para reflejar el verdadero nivel de variación genética a diferentes escalas espacio-temporales.

En base a ello podemos definir tres grupos de marcadores genéticos que se han utilizado y se utilizan actualmente:

1.- los que permiten monitorear procesos evolutivos de larga data y en grandes escalas espaciales

2.- los que permiten monitorear procesos evolutivos recientes y procesos genéticos de importancia actual en escala de paisaje

3.- los que permiten la identificación de genomas y el monitoreo del impacto actual de diferentes tipos de disturbios sobre la diversidad genética en escala local

Los límites entre los grupos no son excluyentes por lo que podemos contar en algunos casos con un mismo marcador que sirva para más de un propósito.

- Entre los del primer grupo, se destacan los marcadores genéticos de ADN de organelas, de mitocondrias y particularmente de cloroplastos. La organización molecular del genoma de cloroplasto es extremadamente conservada por lo que diferentes taxones vegetales mantienen un mismo arreglo lineal de sus genes. Su evolución es lenta con una tasa mutacional del orden de $1-3 \times 10^{-9}$ motivo por el cual mutaciones ocurridas en tiempos geológicos son mantenidas hasta la actualidad. Con el monitoreo de la distribución espacial de su variación y en grandes escalas, como las de distribución natural de una especie pueden ser utilizadas, junto con estudios palinológicos y registros de microfósiles, para ayudar a reconstruir la historia glaciaria y post-glaciaria de los bosques. De esta forma se ubican sitios de probables refugios glaciarios y rutas migratorias a partir de ellos durante la retracción de los hielos. La correcta interpretación de la distribución espacial de líneas genealógicas dadas por las secuencias génicas o sitios de restricción permiten realizar estudios filogeográficos dentro de géneros y especies (Avice 2000).

Las angiospermas poseen herencia materna en el ADN de cloroplasto por lo que el monitoreo espacio-temporal de su variación permite definir el movimiento histórico de la semilla y por lo tanto el flujo génico materno. Mediante estudios realizados con marcadores de ADN

de cloroplasto en Rauli (*Nothofagus nervosa*) y confirmado luego en Roble Pellin (*N. obliqua*), especie emparentada, se propuso una clara diferenciación entre el norte y el sur del área de distribución natural de estas especies en base a los haplotipos encontrados (*Marchelli & Gallo 2006, *Azpilicueta *et al.* 2009) y la existencia de varios refugios glaciarios sobre la vertiente oriental de los Andes e incluso en el ecotono con la estepa patagónica. La diferencia del efecto sobre los bosques patagónicos de dos patrones diferentes de distribución e intensidad de la última glaciación se puso de manifiesto también con estos marcadores en un estudio preliminar realizado con *Nothofagus antarctica* (*Pastorino *et al.* 2009). Estos resultados permiten comprender mejor la historia evolutiva que dio origen a la distribución espacial actual de la variación genética en las especies arbóreas de nuestros bosques. En el caso de una gimnosperma emblemática como la *Araucaria araucana* se determinaron los sitios de mayor diversidad y se verificó nuevamente el patrón general de diferenciación norte-sur hallado en otras especies, mediante la distribución de los haplotipos analizados (*Marchelli *et al.* 2009).

- Para los objetivos del segundo grupo de marcadores, que comprende esencialmente estudios de variación genética entre y dentro de poblaciones (diferenciación y diversidad genéticas), se utiliza principalmente la información del ADN nuclear, sujeta a una mayor tasa de mutación, a herencia biparental y a recombinación de la información genética.

Estudios realizados con marcadores génicos isoenzimáticos en Ciprés de la Cordillera (*Austrocedrus chilensis*) permitieron encontrar que las poblaciones orientales esteparias de esta especie patagónica, fuera de los parques nacionales, son las que contienen la mayor diversidad genética (Pastorino y Gallo 2002). Información obtenida con marcadores SSRs (Arana *et al.* 2008) confirmó el carácter relicto y de alta diversidad genética en este tipo de poblaciones (*Arana *et al.* 2010, en prensa). Con ambos marcadores se determinó además la estructuración espacial del sistema de apareamiento en poblaciones de esta especie y un proceso de deriva genética.

La estructuración genética y sus patrones de distribución espacial han sido sugeridos en estudios de regeneración natural post-incendio a escala de rodal en una especie del género *Nothofagus* utilizando marcadores genéticos isoenzimáticos (Premoli y Kitzberger 2005)

En Roble Pellín (*Nothofagus obliqua*), pudo ser detectado otro proceso genético pocas veces evidenciado en especies forestales: un efecto de *cuello de botella* en una población esteparia y aislada a unos 30 km al este de las poblaciones continuas de la especie (Gallo *et al.* 2008, Azpilicueta y Gallo, 2010). Además, marcadores génicos isoenzimáticos permitieron confirmar la hibridación natural entre especies del género *Nothofagus* por medio de alelos específicos de especie en dos loci de segregación independiente o por diferenciación de frecuencias alélicas en el género *Prosopis* (Verga 1995). Estos resultados contribuyeron en el primero de los casos a formular un modelo de dinámica de hibridación natural y proponer pautas de manejo silvícola para la conservación de ambas especies (Gallo 2004). Las etapas avanzadas del proceso de hibridación e introgresión (retrocruzas) pudieron ser confirmadas con marcadores microsatélites en un estudio comparativo de su calidad de madera. Un estudio morfológico detallado junto con información sobre variación genética isoenzimática permitió detectar la hibridación natural interespecífica poco común entre una especie decidua (*Nothofagus antarctica*) y una siempreverde (*N. dombeyi*) (Steconni *et al.* 2004). Un estudio que derivó en una medida concreta de protección fue realizado a través del análisis combinado con marcadores de ADN de cloroplasto e isoenzimáticos. Con ellos fue detectado el centro de mayor diversidad genética de poblaciones argentinas de *Nothofagus nervosa* (*Marchelli & Gallo 2006; *Gallo *et al.* 2009), (**Figura D**), resultando en una decisión política sobre la conservación y manejo de masas boscosas

- El tercer grupo de marcadores es utilizado en estudios de procesos de importancia evolutiva y de genética espacial a escala local, los cuales requieren esencialmente marcadores hipervariables, co-dominantes o dominantes (nSSR o

SSR nucleares, cpSSR o SSR de cloroplastos, RAPD, AFLP). Entre estos procesos figuran estimaciones de flujo polínico actual, estructuración genética en diferentes estratos generacionales, impacto del uso silvícola en la diversidad genética, impacto de la fragmentación del habitat, análisis de paternidad, identificación de regeneración natural vegetativa, entre otros.

Aplicando SSRs junto con marcadores génicos isoenzimáticos y PCR-RFLP en ADN de cloroplasto se analizó el flujo génico entre dos poblaciones de *Nothofagus nervosa*, separadas por una colada de lava de una erupción geológicamente reciente del volcán Lanín. Se comprobó que no existe conexión por flujo se-

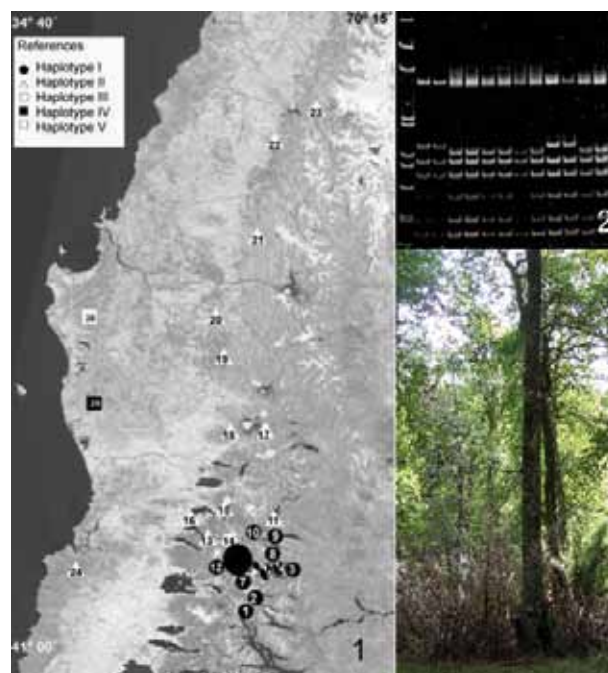


Figura D: Ejemplo del patrón electroforético de ADN de cloroplasto de poblaciones argentinas de *Nothofagus nervosa* (Raulí), que conjuntamente con isoenzimas fue utilizado para detectar el centro de mayor diversidad genética al oeste de la cuenca Lago Lacar (señalado en el mapa por el círculo lleno), derivando luego en una medida política que permitió modificar el estatus de protección de ese bosque. 1: Mapa con haplotipos (de Marchelli y Gallo 2006), 2: Migración de fragmentos de restricción de ADN de cloroplasto en geles de agarosa (de Marchelli *et al.* 1998), 3: Bosque Hua-Hum incluido en la nueva área protegida).

minal pero que ambas poblaciones se mantienen conectadas genéticamente por flujo de polen (*Milleron *et al.* 2008). Con el uso de microsatélites se obtuvieron resultados preliminares sobre el flujo polínico en *Araucaria araucana* destacándose la importancia de los árboles aislados como “puentes genéticos” entre fragmentos. Por otro lado se comprobó que el vecindario genético de un bosque de *Nothofagus* tiene un radio de solo 15 m con un número efectivo de 8 árboles polinizadores (Marchelli *et al.* 2007) lo cual ya ha servido para fijar pautas aplicables de cosecha de semilla y de manejo silvícola.

Como se ve a través de todos estos ejemplos de estudios realizados en Argentina, las técnicas biotecnológicas de genética molecular realizan un contundente aporte en el monitoreo de procesos ecológicos de importancia evolutiva. Esto permite en tiempos relativamente cortos obtener resultados que posibilitan la toma de decisiones relacionadas a la conservación y al manejo de la diversidad genética de nuestros bosques nativos.

Aplicación de marcadores moleculares neutros en Poblaciones de mejora y producción de especies forestales de rápido crecimiento

La caracterización, evaluación y manejo de la variabilidad genética en poblaciones de mejora y producción integran áreas de aplicación donde los marcadores de ADN neutros ofrecen mayor utilidad.

Tanto en los programas de mejora genética como en los programas de propagación masiva, la correcta identificación de clones elite, así como la identificación de los progenitores involucrados en cruzamientos controlados, constituyen factores críticos en la producción de especies comerciales, ya que errores de identificación genética pueden afectar severamente los niveles de ganancia esperados en sistemas a gran escala. Dichos aspectos, así como la estimación del nivel de contaminación con polen procedente de fuentes externas en huertos semilleros, pueden ser asistidos mediante “fingerprint” o huella dactilar del ADN mediante el empleo de los SSRs, gracias a su naturaleza multialélica y herencia codomi-

nante. En el ámbito local estos marcadores se utilizaron como descriptores complementarios para la inscripción en el Registro Nacional de la Propiedad de Cultivares de los primeros 10 clones de *Eucalyptus grandis*, mediante la utilización de 6 SSRs desarrollados por EMBRAPA, Brasil (*Torales *et al.* 2005).

La cuantificación de la diversidad genética dentro del stand, es uno de los criterios claves que definen la calidad de la semilla forestal. La producción de semilla genéticamente mejorada, a través de Huertos Semilleros, integra las actividades priorizadas en los programas de mejoramiento del INTA, donde idealmente el material de propagación debe presentar alto valor genético y mantener alta diversidad.

El huerto semillero constituye una plantación de clones (HSC) o progenies (HSP) seleccionados intensivamente sobre la base de características de importancia económica, el cual ha sido sometido a los aclareos genéticos necesarios para conservar únicamente aquellos clones o individuos que han demostrado su superioridad. Esto puede originar el decrecimiento del nivel de variabilidad genética presente en las semillas producidas en el huerto y, por extensión, en las plántulas utilizadas en las explotaciones comerciales, con posibles pérdidas de productividad. A modo de ejemplo se citan las especies del género *Eucalyptus*, las cuales si bien presentan un sistema de fecundación predominantemente alógamo y mediado por polinización entomófila, pueden estar sujetas a efectos de depresión por endogamia. Estos efectos se manifiestan en la reducción de los niveles de producción de semillas, reducción de altura de fuste, área basal y volumen, y deformación de hojas y tallos en algunas especies. En consecuencia, el diseño de los huertos debe considerar restricciones de distancias mínimas entre individuos emparentados. En plantaciones clonales la asistencia por marcadores moleculares permite evitar la implantación de clones genéticamente relacionados en bloques contiguos, disminuyendo además, el riesgo frente al ataque de plagas y patógenos en toda la plantación.

En el ámbito local, se aplicaron AFLP y SSR en poblaciones de mejora de *Eucalyptus dunii*, seleccionadas por caracteres morfomé-

tricos de interés, con la finalidad de diseñar HSCs que maximicen el progreso en la mejora genética y minimicen los riesgos de depresión por endogamia. Su aplicación permitió el análisis genómico de 46 clones selectos por forma de fuste y tasa de crecimiento y la identificación de nueve pares de clones más divergentes, manteniendo el 95.2% del número total de alelos detectados (*Marcucci Poltri et al. 2003). Así mismo, estos marcadores han sido utilizados para la estimación de la amplitud de la base genética retenida en huertos semilleros diseñados a partir de poblaciones de mejoramiento, en *E. grandis*, *E. globulus* y *E. dunnii* (*Marcucci Poltri et al. 2005). Actualmente se aplican en *Pinus taeda*, con el objeto de establecer las relaciones de parentesco entre individuos pertenecientes a HSCs, instalados en la provincia de Misiones (Villalba-Acosta et al, 2009) y en el NOA (*Fornes, 2003), pudiendo ser sujetos al raleo de individuos.

La incorporación de técnicas moleculares en los programas de mejora, procura optimizar la estructura de las poblaciones de mejora/producción, incrementar la información necesaria para decidir sobre la infusión de nuevos materiales y mejorar las estrategias de selección. Con la finalidad de establecer una estrategia alternativa de selección para el diseño de un HSP local de *E. dunnii*, basado en el análisis conjunto de un índice de selección morfométrico y criterios de diversidad genética molecular, se realizó el estudio genómico de 37 familias de medio hermanos, selectas por forma de fuste, DAP y densidad de la madera, provenientes de 5 orígenes australianos y una procedencia local. La diversidad genética y su distribución así como las relaciones genéticas entre los individuos, evidenciaron con claridad baja diferenciación genética entre procedencias y alta diferenciación entre familias, donde el 80% de la variación total fue explicada dentro de ellas, sugiriendo por lo tanto que el diseño del HSP debía basarse en la selección individual y familiar (*Zelener et. al. 2005).

La determinación de los posibles orígenes de las razas locales de *E. globulus* provenientes de Argentina, Portugal, España y Chile, fue también abordada mediante el análisis de SSRs y AFLPs. Los estudios de diversidad ge-

nética y estructura poblacional, diagnosticaron una marcada asociación entre las razas locales entre sí, así como una clara afinidad entre éstas y las razas australianas del Sur y Sudeste de Tasmania, sugiriendo que dichas regiones fueron las primeras fuentes proveedoras de semillas de la especie (Acuña et.al. 2004).

Evaluación de variabilidad funcional en programas de mejoramiento y domesticación

La exploración de la variabilidad alélica de genes candidatos mediante diversas técnicas de detección de SNPs, constituye un desafío para el estudio de la diversidad funcional en especies forestales.

En los programas de mejoramiento y domesticación de Argentina se han comenzado a incorporar y desarrollar nuevas estrategias, dirigidas a optimizar la calidad de madera (contenido de lignina y densidad) en especies del género *Eucalyptus*, como así también a analizar características adaptativas en especies nativas. En ambos estudios, la finalidad es detectar variantes alélicas responsables de la expresión del carácter y a continuación se detallan los dos ejemplos.

1) El contenido y composición de lignina es de gran importancia en la producción de pulpa para la industria del papel, fundamentalmente por las consecuencias que su eliminación tiene en la conservación del medio ambiente. Por otro lado, el bajo contenido de este polímero es una característica importante para la utilización de los residuos forestales en la generación de biocombustibles (bioetanol) ya que reduce los componentes inhibitorios y enriquece la concentración relativa de los hidratos de carbono fermentables. En una primera etapa se caracterizó un Huerto Semillero Clonal de primera generación (27 árboles) de *E. grandis*, tanto en la variabilidad de los genes candidatos involucrados en la vía metabólica como en el contenido y composición de lignina (Torales et al, 2006),. Se encontraron escasas diferencias fenotípicas entre individuos y algunas variantes alélicas diferenciales. En cuanto a la búsqueda de QTLs asociados a densidad de madera, se trabajó en poblaciones segregantes locales de *E. grandis* (García et al, 2007) y en el desa-

rollo de marcadores funcionales de tipo EST-SSR a partir de secuencias publicadas de *E. globulus* (Acuña et al, 2007), información útil en el mapeo genético y estudios de variabilidad funcional.

2) La segunda aplicación del programa se refiere al estudio de variabilidad a nivel de nucleótidos de genes involucrados en tolerancia a estrés abiótico tales como sequía y salinidad. Los genes seleccionados se estudiaron en las poblaciones de *Austrocedrus chilensis* y *Prosopis spp*, en sus gradientes naturales de distribución geográfica, abarcando las zonas marginales, sometidas a estrés hídrico y salino. Ambas especies constituyen sistemas modelo para este tipo de análisis, siendo especies forestales nativas de importancia económica, de relativo rápido crecimiento y con un alto potencial adaptativo. Tienen posibilidades de adecuarse a cambios climáticos futuros, que les permitirían ocupar nichos que no se superponen con la producción forestal de especies exóticas de alto rendimiento, permitiendo la restauración de ecosistemas degradados por la explotación forestal extractiva. Constituyen una alternativa productiva y en algunos casos puede ser combinada con la actividad agrícola o ganadera. A partir de ESTs de *Pinus pinaster*, *P. taeda*, *Prosopis juliflora* y genes de *Arabidopsis* y *Criptomeria japonica*, se diseñaron cebadores, se amplificaron y analizaron fragmentos con alto porcentaje de similitud a los depositados en la base de datos. En *Austrocedrus chilensis* se analizaron porciones de los genes Pal 3, LP3-1 y Aquaporina en genotipos contrastantes sin detectar aún asociación. En *Prosopis* se evaluaron 5 genes en genotipos de las especies *Prosopis flexuosa*, *P. chilensis* y *P. alba* con comportamientos contrastantes frente al estrés hídrico. En los genes HAK3P, ERD 15, PHD Finger y Rab7 se detectaron SNPs diferenciales entre especies que habitan las distintas regiones (Torales et al, 2009).

Conclusiones y perspectivas

La utilización de marcadores moleculares neutros y genéticos para manejo asistido de poblaciones de mejora y en genética ecológica, principalmente con fines de conservación, han sido aplicados en Argentina. Los avan-

ces logrados mundialmente a nivel genómico en especies modelo podrán ser utilizados con mayor intensidad en otras especies, habiendo iniciado el camino en alguna de ellas, con el fin de explotar la variación genética de poblaciones de mejora o nativas. No obstante, para el descubrimiento de nuevos genes, será también necesario generar e incorporar en bases de datos públicas, secuencias de ESTs, logradas a través de diversos experimentos y ensayos biológicos en géneros y especies en las que la disponibilidad actual de proyectos de secuenciación no esté prevista o sea difícil por la complejidad del genoma, como el caso de las coníferas. A partir de estas bases de datos y de las metodologías de alto desempeño, como métodos de pirosecuenciación o microarreglos de oligonucleótidos en cuentas (beadarrays), basadas en la extensión de iniciadores alelo específica como tecnología de Golden Gate (Fan et al. 2006), se podrán detectar gran cantidad de SNPs en forma paralela, a un costo razonable y finalmente podrán utilizarse en estudios de asociación genética. Por lo tanto, la genética de asociación promete ser la estrategia elegida en todos los géneros y en donde el objetivo es correlacionar la distribución de los genotipos de los genes candidatos como secuencias de ADN, y los fenotipos relevantes (tal como se aplica en humanos y otros organismos de fecundación cruzada).

Por esta razón, seguirán siendo clave la selección de los genes candidatos, la capacidad de caracterizar apropiadamente los fenotipos y la habilidad de utilizarlos para manipular vía mejoramiento molecular o transgénesis.

Todas estas metodologías, además de mejorar el conocimiento del control genético de características de interés (alelos de importancia económica y ecológica), reducirían los costos y tiempos de mejoramiento y ayudarán en la conservación.

2)Modificación genética de especies forestales

Introducción

La transformación genética de árboles es todavía un instrumento relativamente nuevo en el sector forestal y se realiza a menudo usando

sistemas de transformación basados en *Agrobacterium tumefaciens* (ver Capítulo XX) en angiospermas y por bombardeo con micropartículas en gimnospermas (ver Cap XX)). Los éxitos en especies forestales son hasta el momento limitados debido a los problemas asociados a la regeneración de las plantas, especialmente si se considera que muchas especies son aún consideradas recalcitrantes al cultivo *in vitro* y que la transformación de una nueva especie depende de su capacidad de regeneración de plantas.

Una de las aplicaciones de la tecnología de modificación genética que a menudo se pasa por alto, pero que es tal vez la más importante, es la que se refiere a la investigación de la biología de los árboles, es decir, estudios sobre el funcionamiento de los genes y sobre los caracteres que éstos controlan.

Por otro lado, la utilización comercial de árboles transgénicos se limita a las plantaciones comerciales, para lo cual es esencial disponer de marcos reglamentarios para el ensayo, seguimiento y gestión de los árboles OGM, utilizando materiales con reproducción controlada (estériles, de propagación vegetativa o con producción reducida de polen). La modificación genética a través del ensayo clonal es la estrategia más lógica para integrarla a los programas tradicionales de mejoramiento de árboles. Por esta razón, es preferible utilizar ingeniería genética en especies forestales que cuentan con programas avanzados de mejoramiento y en las que pueda considerarse de modo realista la utilización de técnicas de clonación.

Objetivos de la transformación genética de árboles

Uno de los objetivos más importantes, constituye el estudio de la funcionalidad de los genes que se van descubriendo y que mediante esta herramienta, ya sea por sobreexpresión o supresión, es posible atribuir. Los dos objetivos más estudiados en la investigación en ingeniería genética forestal son el aumento en la producción de biomasa y los cambios en la estructura de la madera, con un papel fundamental en los estudios de los mecanismos reguladores de formación de la misma. El aumento de la tasa de crecimiento, el incremento

del volumen del tronco, y el acortamiento de los turnos de corta, son objetivos importantes de muchos programas de mejoramiento de árboles, así como la rectitud del fuste, el período de reposo y los hábitos de crecimiento (ramificación). Para ello se ha modificado la expresión de una serie de genes que participan en la síntesis de hormonas vegetales. Por ejemplo, el gen *ipt* de *Agrobacterium tumefaciens*, que codifica una enzima para la producción de citoquininas, la sobreexpresión de los genes *rol* de *Agrobacterium rhizogenes* que producen modificaciones en la anatomía y composición química de la pared celular en árboles transgénicos, la expresión en dirección sentido y antisentido de la enzima *GA 20-oxidasa* que participa en la síntesis de giberelinas y por ende en el crecimiento, el gen de la glutamina sintasa (*GS*) de pino, que interviene en el metabolismo del nitrógeno y una xiloglucanasa de *Aspergillus* que promueve la expansión celular.

Respecto a la estructura de la madera, la investigación se concentra en modificar el contenido y la composición de lignina. Muchos de los genes involucrados en la síntesis de la lignina han sido sobreexpresados o inhibidos en árboles como álamo, pino y eucaliptos. Utilizando la estrategia de antisentido para reducir la expresión del gen *4CL* (Hu et al. 1999; *Sederoff et al, 1999) o aumentando la expresión de *F5H* se obtuvo una reducción del 45% del contenido de lignina y un aumento del 15% de celulosa en álamos.

Otros objetivos han sido la introducción de resistencia a insectos y hongos, tolerancia a herbicidas y las mejoras relacionadas con la capacidad de crecer en suelos marginales, exhibiendo resistencia o tolerancia a los estreses bióticos y abióticos (como sequías, heladas, inundaciones, alta salinidad, etc.). El primer árbol transgénico fue un álamo con resistencia a insectos (*Filatti et al, 1987), utilizando los genes *Cry* de *Bacillus thuringiensis*, que se emplean para cultivos agrícolas, útiles para varias plagas forestales. Se han introducido en álamos, pinos, abeto, nogal, alerce y otras especies forestales. La resistencia a hongos fue obtenida en álamos que expresan genes de quitinasas como *e Ac-AMP 1.2* y *ESF 12* (Liang et al. 2002). La resistencia a herbicidas (glifo-

sato) se obtuvo en álamo, *Picea* y *Pinus*. En el caso de la resistencia o tolerancia a estrés abiótico, se han logrado transformar árboles tolerantes a salinidad (gen *codA* de la enzima colina oxidasa de *Arthrobacter globiformis* en *Eucalyptus camaldulensis*), tolerantes a suelos ácidos y sequía (gen *DREB1A* de *Arabidopsis thaliana* en híbridos de *Eucalyptus grandis* x *E. urophylla*).

La modificación de la floración ha sido también blanco de la modificación genética. Al contrario de las especies herbáceas y anuales, los árboles no han sido totalmente domesticados y, por consiguiente, tienen parientes silvestres con los que pueden ser interfértiles; además, son especies longevas, producen cantidades copiosas de polen y semillas que se diseminan a menudo por el viento a distancias considerables. Por lo tanto, para liberar en forma segura árboles transgénicos, es necesario evitar el riesgo de dispersión del transgén en el ambiente. Se ha logrado la esterilidad reproductiva en forma genética, utilizando el gen *PTD*, aislado de *Populus trichocarpa*, que genera ablación citotóxica de estructuras florales únicamente (Shepard 1997).

En cuanto a la utilización de plantaciones forestales fitorremediar, se han ensayado diferentes estrategias para aumentar la capacidad de absorción de las raíces. Se han transformado híbridos de *Populus* usando un gen de mamíferos del citocromo P450, para detoxificar tricloroetileno (TCE) y otros compuestos halogenados, se han transformado callos embriogénicos de *Liriodendron tulipifera* con un gen modificado de la enzima bacteriana mercúrico reductasa (gen *merA*) (Che *et al.*, 2003) y se han modificado híbridos de álamo (*Populus alba* x *P. glandulosa*) sobreexpresando un gen de fitoquelatinas (péptidos que unen metales en hongos y plantas), para la eliminación de cadmio.

Árboles transgénicos en América latina

En algunos países de América Latina se están desarrollando proyectos de transformación genética de árboles para su comercialización. En Chile, a través de un proyecto conjunto del sector privado en acuerdo con la Universidad, se está tratando de obtener pinos resistentes

a la mariposa del brote. Investigadores brasileños han participado en el desarrollo de álamos y eucaliptos transgénicos en conjunto con Francia y USA. Por otro lado, en ese país, empresas del sector privado de la industria del papel están desarrollando eucaliptos con la cantidad de lignina modificada. En México se están ensayando nuevos genes involucrados en la modificación de la madera para incrementar el crecimiento en *Pawlonia* sp. En Argentina, tanto el INTA como la UNLP han iniciado proyectos de modificación genética de clones de álamos para modificar la lignina, para tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos.

Conclusiones

La modificación genética en el sector forestal es mucho más que una cuestión técnica; se han de tener en cuenta los valores socioculturales y los múltiples usos de los bosques y es necesaria la aceptación de la opinión pública. Se necesitan protocolos fiables, experimentados y convenidos para evaluar los riesgos relacionados con los árboles forestales modificados genéticamente, pero la evaluación del riesgo en cultivos de tan larga duración plantea algunos problemas. En consecuencia, el desarrollo, ensayo y aprobación de los árboles forestales modificados genéticamente para una utilización más generalizada puede sufrir un costo elevado y exigir plazos muy largos.

En conjunto, la manipulación genética en el sector forestal se realiza en al menos 35 países, aunque según la *FAO (2004) en la mayoría de los casos se trata de experimentos de laboratorio, con tan solo algunas pruebas sobre el terreno y se limitan esencialmente a las especies *Populus*, *Pinus*, *Liquidambar* y *Eucalyptus*. El último informe de China ante la Comisión Internacional del Álamo reportó el establecimiento de plantaciones de árboles genéticamente modificados, habiendo sido autorizada la comercialización de *Populus nigra* y de 741 líneas híbridas transformadas con los genes de resistencia a insectos. Es importante tener en cuenta que si se decide liberar comercialmente árboles forestales modificados genéticamente, es condición el empleo de materiales con reproducción controlada (estériles, de propagación vegetativa o con producción

reducida de polen). La madera es vital para la economía mundial pero la presión del desarrollo humano y el crecimiento de la demanda están contribuyendo a la degradación de los ecosistemas forestales naturales, creando un dilema sobre el futuro de estos recursos. La modificación genética y otras biotecnologías, pueden tener una función de importancia en las plantaciones forestales.

Referencias

- Arana MV, Gallo LA, Vendramin GG, Pastorino MJ, Sebastiani F, Marchelli P, 2010. High genetic variation in marginal fragmented populations at extreme climatic conditions of the Patagonian Cypress *Austrocedrus chilensis*. *Molecular Phylogenetics and Evolution*, en prensa.
- Azpilicueta, MM, Marchelli, P, Gallo, LA. 2009. The Effects Of Quaternary Glaciations In Patagonia As Evidenced By Chloroplast DNA Phylogeography Of Southern Beech *Nothofagus Obliqua*. *Tree Genetics and Genomes*, DOI: 10.1007/s11295-009-0209-x.
- Boerjan W. 2005. Biotechnology and the domestication of forest trees. *Current Opinion in Biotechnology*, 16:159–166.
- Brown G. R., Bassoni D. L., Gill G.P., Fontana J. R., Wheeler N. C., Megraw R. A., Davis M. F., Sewell M. M., Tuskan G. A. , Neale D. B: 2003. Identification of quantitative trait loci influencing wood property traits in loblolly pine (*Pinus taeda* L.). III. QTL verification and candidate gene mapping. *Genetics*, 164:1537-1546.
- FAO. Preliminary review of biotechnology in forestry, including genetic modification. 2004. Forest Resources Development Service Working Paper FGR/59E , FAO, Rome, Italy.
- Fillatti, J.J., Selmer, J., McCown, B., Hassig, B. and Comai, L. 1987 *Agrobacterium* mediated transformation and regeneration of *Populus*. *Molecular and General Genetics*, 206:192-199.
- Fornes, 2003, Tesis doctoral. Disposición estratégica de clones de *Pinus taeda* L con pedigree desconocido en un huerto semillero. Universidad Politécnica de Madrid.
- Gallo, LA, Marchelli, P, González Peñalba M, Chauchard, L. 2009. Knowing and Doing: Research Leading to Action in the Conservation of Forest Genetic Diversity of Patagonian Temperate Forests. *Conservation Biology*, 23:895-898.
- Gonzalez-Martinez S. C., Ersoz E. , Brown G. R, Wheeler N. C. and Neale D. B. 2006. DNA Sequence Variation and Selection of Tag Single-Nucleotide Polymorphisms at Candidate Genes for Drought-Stress Response in *Pinus taeda* L. *Genetics* 172: 1915–1926.
- Gonzalez-Martinez S.C., Wheeler N. C, Ersoz E., Nelson C. D. and Neale D. B. 2007. Association Genetics in *Pinus taeda* L.I. Wood Property Traits. *Genetics* 175: 399–409.
- Marchelli, P and Gallo, LA. (2006) Multiple ice-age refugia in a southern beech from southern South America as revealed by chloroplast DNA markers. *Conservation Genetics*, 7:591-603.
- Marchelli P, Baier C, Mengel C, Ziegenhagen B, Gallo L 2009. Biogeographic history of the threatened species *Araucaria araucana* (Molina) K. Koch and implications for conservation: a case study with organelle DNA markers. *Conservation Genetics*, DOI 10.1007/s10592-009-9938-5.
- Marcucci Poltri S.N., Zelener N., Rodriguez Traverso J., Gelid P., Hopp H.E. 2003. Selection of a seed orchard of Eucalyptus dunnii based on genetic diversity criteria calculated using molecular markers. *Tree Physiology* 23: 625-632.
- Marcucci Poltri S.N., Acuña C., Torales S., Zelener N., Pathaver P., López G., Harrand L., Marcó M., Hopp E. 2005. Evaluación de la Variabilidad Genética. IDIA XXI. Revista de información sobre investigación y desarrollo agropecuario. Año V. N8 .pp: 186-190
- Milleron, M; Gallo, L & Marchelli, P.2008. The effect of volcanism on postglacial migration and seed dispersal. A case study in southern South America. *Tree Genetics and Genomes*, 4:435-443
- Pastorino, M.J., Marchelli, P, Milleron, M, Soliani, C and Gallo, L.A. 2009. The effect of different glaciation patterns over the current genetic variation distribution of the southern beech *Nothofagus antarctica* (G.Forster) Oersted. *Genetica*, 136:79-88
- Torales, S., Marcucci Poltri S.N., Harrand L., Marcó M. 2005. Identificación Genética de Clones Utilizando Microsatélites. IDIA XXI. Revista de información sobre investigación y desarrollo agropecuario. Año V. N8 .pp: 197-200.
- Torales S., Pomponio F, Rodríguez M, Gallo L, Verga A, Marchelli P, Pastorino M, Ewens M , Catalano S. y Marcucci Poltri S. 2009..Estudios preliminares para la identificación de genes involucrados en la respuesta a estrés abiótico en especies forestales nativas VII Simposio Nacional de Biotecnología REDBIO-Argentina. Libro de Resúmenes pag.49.
- Zelener N., Marcucci Poltri S.N., Bartoloni N., López C.R. And Hopp H.E. 2005. Selection strategy for a seedling seed orchard design based on both, trait selection index and genomic analysis by

molecular markers: a case study for *Eucalyptus dunnii*. *Tree Physiology* 25: 1457-1467

Ziegenhagen B. And Fladung M. 2008. DNA Markers for Identification and Evaluation of Genetic Resources in Forest Trees: Case Studies in *Abies*, *Picea* and *Populus*. In: Nagata T.; Lörz H. and Widholm J. M. (eds). 2008. Biotechnology in Agriculture and Forestry. Lörz H. and Wenzel G. (eds) *Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement*, pp 413-429.

V. CAPÍTULO 6

Técnicas de Ingeniería Genética para conferir resistencia a virus en plantas

M del Vas; AJ Distéfano;
C Rovere Vázquez; HE Hopp

Las enfermedades de las plantas causan la pérdida de aproximadamente el 15% de la producción agrícola mundial. En particular, las infecciones virales producen perjuicios económicos significativos de manera directa, a través de una disminución del rendimiento por efecto de la enfermedad e indirecta, y a través de un incremento en los costos debido a la utilización de semilla libre de virus (por ejemplo en plantas de propagación clonal como papa, ajo y batata). Por otro lado, la exportación de ciertos productos se ve restringida debido a las limitaciones internacionales impuestas a la exportación de materiales fuera de las tolerancias fitosanitarias y de calidad permitidas.

Clásicamente las enfermedades virales en plantas se controlan mediante distintas estrategias como el mejoramiento genético, el uso de semillas libres de virus, la rotación de cultivos y la técnica de protección cruzada (que se describe brevemente más adelante).

Desde 1983, con las primeras obtenciones de plantas de tabaco y petunia transgénicas, se publicaron un gran número de trabajos detallando la transferencia de genes foráneos a una cantidad creciente de especies de plantas. La ingeniería genética permite incorporar en las plantas nuevos caracteres de interés agrícola en forma horizontal, evitando así el traspaso de caracteres indeseables. De esta forma, la variedad transgénica adquiere un carácter nuevo al tiempo que mantiene intactos el fondo genético y el potencial productivo original, lo que permite encarar el mejoramiento rápido de cultivares ya utilizados por el agricultor. Los transgenes introducidos pueden provenir de otras variedades de la misma especie vegetal, de plantas de otras especies sexualmente incompatibles e incluso de organismos pertenecientes a otros reinos incluyendo animales y microorganismos.

En sentido amplio existen dos formas de modificar plantas por ingeniería genética de manera de conferirles resistencia a virus: desencadenar resistencia mediante la expresión de secuencias genómicas derivadas del propio virus al que se desea combatir (llamada resistencia derivada del patógeno o PDR) o, desencadenar resistencia mediante la expresión de genes no-virales que poseen actividad antiviral. Ambas estrategias se describirán a continuación. (Recientemente se ha publicado una interesante recopilación sobre el tema, ver Prins, et al. 2008 en Lecturas Recomendadas).

Resistencia a virus conferida por secuencias virales

La prevención del desarrollo de enfermedades virales utilizando genes derivados del patógeno fue propuesta por primera vez a comienzos del siglo XX, cuando se demostró que las plantas de tabaco podían ser protegidas frente a la infección con una cepa severa del virus del mosaico del tabaco (TMV, *Tobacco mosaic virus*) si, previamente, se las había inoculado con una cepa menos virulenta del mismo virus. Este tipo de estrategia, comúnmente denominada “protección cruzada”, ha sido empleada para varios cultivos de importancia económica, incluyendo tomate, papaya, cítricos, etc. En 1985, dos investigadores propusieron que la expresión de ciertos genes del patógeno en un hospedante alteraría el balance normal de los componentes virales y predijeron que esto conduciría al impedimento de la replicación o del movimiento del virus dentro de la planta más allá de la primera célula infectada.

Protección debida a la expresión de la proteína de cápside viral (CP)

Las primeras plantas transgénicas con resistencia a virus se obtuvieron en 1986 mediante la expresión del gen que codifica la cápside de TMV. Utilizando esta estrategia se lograron obtener plantas resistentes a virus pertenecientes a casi todos los géneros de virus de plantas, principalmente en tobamo-, potex- y alfamovirus (Tabla 1).

En general, las plantas protegidas muestran un retardo temporal del desarrollo de síntomas, una atenuación en la sintomatología caracte-

Tabla 1: Ejemplos de resistencia a virus mediante la expresión de la proteína de cápside (CP) o nucleocápside (Gen N) viral en plantas transgénicas.

Géneros de virus	transgén	Virus	Especies vegetales
Tobamovirus	CP	TMV; ToMV; AIMV	tabaco; tomate
Potexvirus	CP	PVX; CyMV; WCIMV	tabaco
Potyvirus	CP	PVY; TEV; PRV; PPV; MDMV; SMV; WMV II; ZYMV	tabaco; papa; papaya; maíz
Carlavirus	CP	PVS	tabaco; papa
Luteovirus	CP	PLRV	papa
Comovirus	CP	SLRSV	tabaco
Nepovirus	CP	ArMV	tabaco
Tobravirus	CP	TRV	tabaco
Ilavirus	CP	TSV	tabaco
Geminivirus	CP	TYLCV	tomate
Tospovirus	Gen N	TSWV; INSV; TCSV; GRSV	tabaco

Los acrónimos utilizados (en orden alfabético) son: AIMV: Alfalfa mosaic virus; ArMV: Arabis mosaic virus; CMV: Cucumber mosaic virus; CyMV: Cymbidium mosaic virus; GRSV: Groundnut ringspot virus; INSV: Impatiens necrotic spot virus; MDMV: Maize dwarf mosaic virus; PLRV: Potato leaf roll virus; PPV: Plum pox virus; PRV: Papaya ringspot virus; PVS: Potato virus; PVX: Potato virus X; PVY: Potato virus Y; SMV: Soybean mosaic virus; SSLRSV: Strawberry latent ringspot virus; TCSV: Tomato chlorotic spot virus; TEV: Tobacco etch virus; TMV: Tobacco mosaic virus; ToMV: Tomato mosaic virus; TRV: Tobacco rattle virus; TSV: Tobacco streak virus; TSWV: Tomato spotted wilt virus; TYLCV: Tomato yellow leaf curl virus; WCIMV: White clover mosaic virus; WMV II: Watermelon mosaic virus II; ZYMV: Zucchini yellow mosaic virus.

rística de cada virus, una menor cantidad de sitios de infección y un menor título viral. Se demostró que hay una correlación entre la resistencia y el nivel de expresión de la proteína de la cápside, que la protección actúa a nivel celular y es superada por altas dosis de inóculo (viriones). En algunos casos es superada por inoculación con ARN viral. La protección es más efectiva para el virus homólogo al que dio origen al transgén. Sin embargo, abarca también a virus y cepas relacionadas aunque la eficiencia se va reduciendo a medida que la relación filogenética se hace más lejana y disminuye la identidad entre la secuencia expresada en la planta transgénica y la secuencia del virus desafiante.

Las plantas transgénicas que expresaban el gen de cápside del virus TMV resultaron resistentes a la inoculación con partículas virales de TMV pero la resistencia era sobrepasada si se las inoculaba con ARN viral infectivo. Se postuló entonces que la protección se debía a la inhibición del desnudamiento viral en las células infectadas inicialmente. Varias líneas de evidencia apoyan esta hipótesis. Por ejemplo si se inoculan protoplastos derivados de plantas transgénicas que expresan la CP de TMV o plantas no transformadas con pseudoviriones de TMV que contienen ARNm que codifica para la proteína indicadora beta-glucuronidasa (GUS), se observa que hay una marcada disminución de la actividad GUS en los proto-

plastos derivados de las plantas transgénicas probablemente debida a la falla en el desnudamiento de los viriones. Más adelante se demostró que las proteínas de cápside mutagenizadas de forma que carecen de la habilidad de auto-agregarse no son capaces de conferir protección frente a TMV, y que las proteínas mutadas capaces de interactuar con sí mismas con afinidad más alta conferían mayor protección que la proteína de cápside salvaje. Es decir se estableció una relación directa entre el nivel de agregación de la proteína de cápside y el nivel de protección frente a TMV. Posteriormente se demostró que el estado de agregación de las proteínas de cápside de TMV en las plantas transgénicas correlaciona con el nivel de resistencia observado. Estos resultados sugieren que la resistencia por expresión de la cápside viral (CP) estaría mediada por determinadas configuraciones de la estructura cuaternaria de la cápside mas que por la expresión de la subunidad de cápside en la transgénica *per se*. Se propuso que el grado de regulación de la replicación viral por las agregados de la cápside en la planta transgénica determina el grado de resistencia mediada por la CP. Si bien estos trabajos apoyan la hipótesis de que en las plantas transgénicas para CP hay una inhibición en una etapa temprana de la infección, no se puede descartar que además, la expresión de proteína de cápside, impida o modifique etapas más tardías de la infección. Si se injerta una porción de planta transgénica que muestra protección mediada por cápside entre una base y un ápice no transgénicos y se inocula la planta injertada en la base no transgénica, se observa que el virus no puede moverse hacia el ápice, es decir que no puede atravesar la zona transgénica protegida. Sin embargo, la supresión del movimiento vascular involucra también el empaquetamiento y desnudamiento viral, y cabe la posibilidad de que la supresión del movimiento vascular sea una consecuencia secundaria de la inhibición del desnudamiento viral en las plantas expresando proteína de cápside.

Otro caso muy estudiado es el del virus PVX de la papa. Las plantas transgénicas para la cápside de PVX resultan protegidas ante la inoculación con virus o con ARN viral. Se pos-

tula que la proteína de cápside se une al origen de ensamblado localizado en el extremo 5' del ARN viral, suprimiendo de esta manera la traducción de la replicasa viral (cuyo gen está localizado en el mismo extremo). También es posible que inhiba el movimiento de PVX de célula a célula ya que la proteína de cápside es un cofactor esencial de la traslocación sistémica.

Como se desprende de los dos ejemplos descriptos, el mecanismo de protección mediado por la proteína de cápside no es único, y es particular para cada sistema virus-planta.

Además de obtenerse resistencia a virus mediante la expresión de proteínas de cápside (CP) virales, se logró obtener resistencia a virus mediante la expresión en plantas transgénicas de otras proteínas virales tales como la replicasa viral (REP) o de la proteína de movimiento viral (MP). Ambas estrategias se describen a continuación.

Protección debida a la expresión de la replicasa viral (REP) o de la proteína de movimiento viral (MP)

La resistencia mediada por la replicasa viral es la segunda aplicación más avanzada en el uso de genes derivados del patógeno para la obtención de plantas resistentes a virus. Esta resistencia fue primero demostrada en plantas de tabaco que expresaban el gen de la replicasa de TMV (género tobamovirus) y luego observada para diferentes familias de virus que incluyen los tobavirus, potex-, poty-, alfamo-, cucumo- y luteovirus entre otros. Los genes de replicasa viral confieren resistencia tanto a infecciones producidas por el ARN viral o por el virión y se ha demostrado que dan lugar a una resistencia muy efectiva y estable. Entre los ejemplos de resistencia mediada por replicasa viral se encuentra el uso de genes que poseen delecciones, modificaciones de secuencia, genes truncados y genes completos sin modificar. Existen ejemplos en los cuales la expresión de la proteína de replicasa es fundamental en el fenotipo resistente y ejemplos en los cuales la resistencia podría ser mediada por el ARN de la replicasa viral por lo que se ha sugerido que no hay un único mecanismo involucrado en la resistencia inducida por replicasa. Los me-

canismos de resistencia mediada por ARN se describen más adelante en éste capítulo.

Por último, la expresión de proteínas de movimiento disfuncionales o mutantes fue reportada como capaz de conferir una resistencia más amplia comparada con la resistencia mediada por CP o REP. Por el contrario, la expresión de proteínas MP sin modificar, por lo general, aumentan la infección viral. El mecanismo postulado en este caso implica la existencia de dominios funcionales compartidos por MPs de diferentes virus. Estos dominios podrían competir por factores celulares comunes requeridos para el movimiento y en consecuencia impedir el progreso de la infección de estos virus.

Mecanismo de protección debida al desencadenamiento de resistencia mediada por ARN

En 1992 se demostró, por primera vez, que se podía obtener resistencia a virus mediante la expresión de un ARNm de cápside viral no traducible, es decir no era necesaria la expresión de la proteína codificada por el transgén. A partir de entonces se publicaron numerosos trabajos profundizando la caracterización de este tipo de resistencia a virus, llamada en sentido amplio "resistencia mediada por ARN". Las plantas que muestran este tipo de resistencia presentan un fenotipo de inmunidad que se caracteriza porque no hay replicación viral detectable, no hay diseminación viral dentro de la planta y no hay síntomas debidos a la enfermedad o un fenotipo de recuperación que se caracteriza, éste último, por una infección inicial (con producción de síntomas) seguida por un crecimiento posterior resistente a la infección y asintomático. En cualquiera de los dos casos, y a diferencia de lo que ocurre en la protección mediada por la expresión de proteínas de cápsides virales, las plantas son solamente resistentes a la infección producida por virus estrechamente relacionados con el virus que dio origen al transgén. El análisis de estas plantas a nivel molecular demostró que en general contienen copias múltiples del transgén y que si bien presentan un alto nivel de transcripción en el núcleo, los niveles estables del ARNm del transgén en el citoplasma son muy bajos. Usualmente se observa además metilación de la región codificante del transgén.

En el año 1993 se correlacionó por primera vez la resistencia mediada por ARN con el fenómeno de cosupresión y se propuso que el ARN viral (o el endógeno en la cosupresión) era degradado en forma inducible y específica por un mecanismo desencadenado por la expresión del ARN del transgén. Este proceso que se llamó silenciamiento post transcripcional de genes (PTGS) se describió por primera vez en plantas, pero se ha encontrado también en hongos (donde se denomina "*quelling*") y animales como nematodos, moscas o mamíferos (donde se denomina interferencia mediada por ARN). Brevemente, el PTGS puede ser desencadenado eficientemente por transgenes nucleares que dan lugar a transcritos con estructura de ARN de doble cadena (ARNdc) o que expresan altos niveles o niveles aberrantes de transcritos. En plantas también puede ser desencadenado por la replicación de virus que generalmente produce intermediarios replicativos de ARNdc por lo que se concluyó que esta estrategia de resistencia mediada por ARN programa un mecanismo de resistencia antiviral preexistente. Una vez desencadenado el proceso, los intermediarios que contienen ARNdc son reconocidos por una nucleasa específica de ARNdc que los procesa en fragmentos de ARNs pequeños (llamados pequeños interferentes -"small interfering"- siARN) de ambas polaridades y de 21 y 24 nt de longitud. A su vez, se postula que los siARN actúan como guías para dirigir la maquinaria de degradación de ARN contra todo aquél ARN con homología a la secuencia desencadenante. Un aspecto a destacar es que el silenciamiento mediado por ARN es desencadenado localmente y luego transmitido a toda la planta vía una señal de silenciamiento móvil. Si bien se desconoce por el momento la naturaleza de la señal, se postula que ésta contiene un componente de ácido nucleico que explicaría la especificidad de secuencia del mecanismo de degradación y un componente proteico.

Utilizando los conocimientos que se fueron acumulando sobre el mecanismo de la protección mediada por ARN, se han diseñado y utilizado construcciones genéticas que contienen secuencias repetidas invertidas (IR) de transgenes virales. La transcripción da lugar a lar-

gos ARNdc que son muy eficientes precursores de siARNs. De esta manera se ha logrado aumentar el porcentaje de plantas silenciadas y por lo tanto la efectividad de la estrategia de resistencia mediada por ARN. Mientras que las estrategias clásicas que utilizan construcciones con transgenes simples en orientación sentido o antisentido dan lugar a un 5 al 20% de plantas transgénicas resistentes, utilizando construcciones de transgenes IR se obtienen más del 90% de las plantas transgénicas resistentes. Utilizando IRs fue posible desencadenar resistencia mediada por ARN en diferentes familias de virus. Se ha demostrado previamente que este mecanismo de resistencia no es efectivo ante virus cuya secuencia difiera en más de un 10% respecto de la secuencia del transgén. Con el objetivo de obtener una resistencia más amplia, se fusionaron fragmentos de 150 pb de secuencias virales pertenecientes a cuatro tospovirus en una simple construcción IR quimérica obteniendo con esta estrategia una alta frecuencia de plantas transgénicas con resistencia múltiple.

Dado que el PTGS es un mecanismo de defensa antiviral en plantas, resulta esperable que se haya seleccionado en los virus de plantas la capacidad de contrarrestar a este mecanismo. Congruentemente con esta especulación, se encontró que varios virus de plantas codifican proteínas supresoras del PTGS. Luego de una búsqueda exhaustiva de supresores de silenciamiento en una gran cantidad de virus de plantas, se concluyó que prácticamente todos los virus llevan supresores de silenciamiento, que los genes que los codifican tienen secuencias y origen evolutivo diverso, y que los distintos supresores actúan inhibiendo el silenciamiento a distintos niveles. Algunos como la proteína HC-Pro codificada por los potyvirus previenen la acumulación de los siARN, pero no eliminan la señal móvil que propaga el silenciamiento. Otros supresores, como la proteína p25 del virus PVX interfieren con la señal de propagación sistémica, y finalmente otros, como el codificado por el virus del achaparramiento del tomate (TBSV), suprimen el silenciamiento sólo en las nervaduras. Incluso se han encontrado en virus animales supresores de silenciamiento que son funcionales en plan-

tas. Es interesante destacar que varios de los supresores de silenciamiento virales descritos habían sido previamente caracterizados como proteínas responsables de la sintomatología, del movimiento viral y/o del fenómeno de sinergismo en la virulencia combinada de dos o más virus.

La posibilidad de la supresión del silenciamiento por parte de un virus que coexista con las plantas transgénicas protegidas por el mecanismo de silenciamiento génico debe ser tomada en cuenta ya que la infección de una planta silenciada con un virus heterólogo que lleva un supresor de silenciamiento puede dar lugar a la reversión del silenciamiento tornándola susceptible a la infección viral. Resulta importante entonces estudiar qué virus coinfectan un mismo hospedador en condiciones naturales y en lo posible utilizar plantas transgénicas con resistencia a ambos virus. En forma análoga a la estrategia descrita anteriormente es posible diseñar construcciones incorporando distintas secuencias virales pequeñas y conservadas correspondientes a los distintos virus contra los que se quiere obtener resistencia.

Recientemente, ha surgido una variante alternativa para la obtención de resistencia a virus mediada por ARN: el uso de microARNs (miARNs). Los miARNs son ARNs endógenos pequeños que regulan la expresión de genes en plantas y animales. En plantas, estos miARNs de 21 nucleótidos se procesan a partir de regiones de "stem loops" de transcritos primarios largos que luego se acoplan a complejos de silenciamiento donde en general dirigen la degradación específica de ARNs mensajeros complementarios a una de las cadenas del miARN. Se ha demostrado que se pueden realizar cambios en la secuencia de 21 nt del miARN sin alterar la biogénesis o la maduración del pre-miARN. Esto condujo a la idea de rediseñar miARNs de manera que tengan como blanco genes imprescindibles para la replicación del virus que se desea controlar. De esta manera se han obtenido plantas transgénicas resistentes a virus por expresión de miARNs artificiales (amiARNs) en plantas. Un grupo de investigadores modificó un miARN de Arabidopsis (el miR159) de manera de dirigirlo hacia los supresores de silenciamiento virales P69

del *Turnip yellow mosaic virus* y HC-Pro del *Turnip mosaic virus* y demostraron que plantas de *Arabidopsis* que expresan estos amiARNs son respectivamente resistentes a estos virus. De manera similar, otro grupo de trabajo diseñó un amiARN basado en el miR171 de tabaco dirigido al supresor de silenciamiento 2b del CMV y observó una correlación entre los niveles de expresión del miARN artificial y el nivel de resistencia al virus obtenido. Asimismo los autores compararon esta estrategia con la estrategia clásica de expresión de un “hairpin” de dcARN dirigida a esta misma secuencia y demostraron que la estrategia basada en el miARN artificial fue más efectiva, tanto en plantas transgénicas como en ensayos de expresión transiente.

Las ventajas de usar amiARNs con respecto a usar las construcciones de dcARN que desencadenen silenciamiento son 1) el mecanismo de resistencia mediado por miRNA en general no es sensible a la temperatura (hay excepciones). Se ha demostrado en cambio, que el silenciamiento mediado por dcARN es inhibido a temperaturas menores a 15 °C en *Nicotiana benthamiana*. 2) en el caso de los amiARNs las secuencias virales que se expresan en las plantas transgénicas son de menor tamaño que en las estrategias clásicas de silenciamiento. Esto es relevante dado que en las estrategias de resistencia mediada por dcARN se genera una población de siARNs con una gran cantidad de blancos potenciales endógenos. En cambio, en el caso de los amiRNAs los blancos potenciales son menores y pueden ser elegidos *a priori* con precisión. Sin embargo, esta última característica puede al mismo tiempo ser una desventaja, ya que se esperaría una durabilidad menor ya que un cambio en unos pocos nucleótidos del virus desafiante podría sobrepasar la resistencia desencadenada por un amiARN.

Un aspecto interesante a recalcar es que debido a que el mecanismo de silenciamiento implica una muy baja acumulación del ARN derivado del transgén y una nula acumulación de proteínas, este tipo de estrategia resulta atractiva desde el punto de vista de la evaluación de riesgos en cuanto a la bioseguridad de estos OGMs, en contraposición de la sobre-expre-

sión de genes que interfieran con el ciclo de multiplicación viral (como es el caso de la cápside u otras proteínas virales). Esto se debe a que la baja acumulación de ARN transgénico minimiza las posibilidades de una potencial recombinación homóloga con ARN de origen viral infectante. Por otro lado, la ausencia de la proteína codificada por el transgén minimiza drásticamente el análisis de riesgo alimentario del OGM y evita el riesgo de transcapsidación de otros virus en el caso en que el transgén codifique para la proteína de cápside viral funcional.

Resistencia a virus conferida por genes no virales

Además de la resistencia derivada del patógeno (PDR), en los últimos años se han explorado estrategias alternativas para la obtención de plantas transgénicas con resistencia a enfermedades virales. Entre ellas, las más promisorias son la expresión de anticuerpos antivirales en plantas o “plantibodies” y la expresión de proteínas que interfieren con la transmisión del virus por insectos vectores. Ambas estrategias se discutirán por separado más adelante. Otras alternativas involucran la expresión de genes de resistencia contra virus en especies diferentes de las cuales fueron aislados originalmente. Por ejemplo, la incorporación del gen N de tabaco en plantas de tomate confiere resistencia al *Tabacco mosaic virus* (TMV) y la incorporación del gen Sw5 de tomate en plantas de tabaco confiere resistencia a tospovirus. Otro enfoque promisorio es generar resistencia mediante el silenciamiento de genes de la planta esenciales para el ciclo de vida viral. En una reciente publicación, el silenciamiento por ARN interferente de los genes *NtTOM1* y *NtTOM3* (esenciales para la multiplicación de los tobamovirus) en *Nicotiana tabacum* dio como resultado la inhibición de la multiplicación del *Tomato mosaic virus* y otros tobamovirus, pero no afectó el crecimiento de las plantas. Otras estrategias incluyen el uso de la enzima 2'-5'- oligoadenilasa sintetasa de mamíferos en plantas, y de inhibidores naturales y específicos de la replicación viral como la expresión de la proteína inactivadora de ribosomas (PAP) de *Phytolacca americana* (“pokeweed” en in-

glés). La expresión de PAP en plantas de papa y tabaco transgénicas las protege frente a una variedad de virus, ya sea que éstos fueran inoculados mecánicamente o por áfidos vectores. En los últimos años se encontraron o rediseñaron varios tipos menos tóxicos y formas no tóxicas de estas proteínas las que, expresadas en plantas transgénicas, confieren resistencia a virus sin producir el efecto de la inactivación de los ribosomas. Por otro lado, se estudió la actividad antiviral de la proteína IRIP (proteína RIP obtenida de bulbos de iris), una ARN-N-glicosidasa, en plantas transgénicas de tabaco, observándose una reducción significativa de las lesiones producidas por el virus TMV con respecto a las plantas control.

Expresión de anticuerpos en plantas transgénicas

A pesar de que las plantas no sintetizan anticuerpos, la expresión de anticuerpos en plantas transgénicas es una estrategia prometedora para obtener resistencia a virus. La conservación de la estructura y afinidad de los mismos hacia una determinada proteína viral sería suficiente para interrumpir funciones esenciales e impedir, en consecuencia, la replicación viral.

Para que la estrategia sea efectiva es indispensable lograr altos niveles de expresión de los anticuerpos en el compartimiento celular donde ocurre la replicación viral. En los últimos años se han desarrollado protocolos sencillos para la selección de buenos anticuerpos, que incluyen la selección de anticuerpos monoclonales usando las tecnologías de hibridoma y genotecas utilizando la técnica de exhibición de epitopes en bacteriófagos o "*phage display*". En este sentido la obtención de bibliotecas de anticuerpos de cadena única (scFv) sintéticos, han impulsado la aplicación de esta estrategia.

En 1993 se demostró por primera vez que la expresión constitutiva de un anticuerpo de cadena única (scFv) dirigido contra la proteína de cápside del *Artichoke mottled crinkle virus* causaba una reducción en la susceptibilidad al virus, que se ponía de manifiesto por una baja en la incidencia de la infección y un retraso en la aparición de los síntomas. En 1996 se expresó un anticuerpo monoclonal de cadena única (scFv) contra la proteína de cápside del *Beet*

necrotic yellow vein virus en *Nicotiana benthamiana* y en el 2000, se mostró que la expresión de la cadena Fv contra la proteína de cápside del virus TMV en la membrana plasmática de plantas de tabaco transgénicas, confería resistencia al virus.

Otra variante de la misma estrategia consiste en el uso de scFvs dirigidos contra proteínas que no forman parte de la cápside viral y juegan un rol importante en la replicación, como la replicasa viral. Usando scFvs obtenidos contra la RNA polimerasa dependiente de ARN (RdRp) del *Tomato bushy stunt virus* (TBSV), se obtuvieron plantas de *N. benthamiana* con altos niveles de resistencia no solo contra el TBSV, sino también contra otros miembros de la familia *Tombusviridae* como el *Red clover necrotic mosaic virus*, el *Cucumber necrotic virus* y el *Turnip crinkle virus*. Recientemente se demostró que altos niveles de expresión en plantas de papa de un scFv dirigido contra la proteasa NIa de PVY daba protección completa contra PVY.

Por lo tanto, la expresión de anticuerpos dirigidos contra proteínas virales esenciales ha demostrado ser una alternativa interesante para obtener resistencia a virus.

Expresión de proteínas que interfieren con la transmisión viral por parte de insectos vectores en plantas transgénicas

La toxina BT de *Bacillus thuringiensis* ha sido muy efectiva para el control de insectos coleópteros y lepidópteros pero hasta el momento, no ha sido efectiva para controlar a los insectos que se alimentan del floema que pertenecen al grupo de los hemípteros. Este grupo de insectos, entre los que se encuentran los saltamontes ("*leafhoppers*") y las chicharritas ("*planthoppers*"), causan grandes daños de manera directa durante su alimentación y principalmente porque son transmisores de virus. Se ha demostrado que la expresión de lectinas en plantas confiere resistencia a este tipo de insectos. En particular, la expresión de la lectina GNA en floema de arroz en plantas transgénicas les confiere resistencia a la chicharra *Nilaparvata lugens* que transmite entre otros a los virus *Rice black streaked dwarf vi-*

rus, *Rice tungrovirus* y *Rice ragged stunt virus*. Una estrategia similar se utilizó exitosamente para controlar otro tipo de insectos como los áfidos: la expresión de ciertas lectinas de ajo en el floema de *Arabidopsis* disminuye la capacidad reproductiva del áfido *Myzus nicotianae*.

Una estrategia alternativa para obtener plantas resistentes a virus de manera indirecta se basa en la utilización de proteínas insecticidas del tipo de la PAD4. Esta proteína se expresa naturalmente en altos niveles durante la infección de *Arabidopsis* por el áfido *Myzus persicae* y modula un mecanismo endógeno de defensa. La expresión de esta proteína en el floema de plantas transgénicas causa la disminución del tiempo de alimentación y en el tamaño de las poblaciones del áfido.

Una tercera estrategia se basa en la expresión de proteínas de insectos en el floema de plantas transgénicas. Por ejemplo se ha demostrado que el *Tomato yellow leaf curl virus* (TYLCV) evita su destrucción dentro de la hemolinfa de la mosca blanca que lo transmite mediante una interacción estrecha con la pro-

teína del insecto GroEL. Se ha demostrado que plantas de tomate que expresan la proteína GroEL en el floema son resistentes al virus. Se espera que esta estrategia cobre mayor importancia a medida que se vayan identificando las funciones de las distintas proteínas de insectos en su relación con la transmisión de virus.

Plantas transgénicas con resistencia a virus cultivadas comercialmente, o en etapas avanzadas de experimentación

En los últimos años se ha autorizado el cultivo comercial y consumo de una variedad de plantas transgénicas con resistencia a virus basada en alguno de los mecanismos descritos (Tabla 2).

Existe otro grupo muy importante de plantas transgénicas con resistencia a virus que se encuentran en etapas avanzadas de experimentación o de pruebas piloto a campo. Es interesante constatar que los países en vías de desarrollo han adoptado esta tecnología y trabajan activamente en la obtención de plantas de cultivos de interés local con resistencia a virus (Tabla 3).

Tabla 2: Plantas transgénicas con resistencia a virus autorizadas para su comercialización. (fuente AG-Bios: <http://www.agbios.com/dbase.php>)

Cultivo	Evento	Virus	Transgén	Países
Ciruela	C5	PPV	Cápside	EEUU
Papaya	55-L63-1	PRSV	Cápside	Canadá y EEUU
Papa	RBMT21-129 21-350 22-082	PLRV	Replicasa	Australia, Canadá Japón, Corea, Filipinas, México y EEUU
	RBMT15-1001 SEMT15-02 SEMT15-15	PVY	Cápside	Australia, Canadá Japón, Corea, Filipinas, México y EEUU
Zapallo	ZW20	WMV, ZYMV	Cápside	Canadá y EEUU
	CZW-3	CMV, WMV, ZYMV	Cápside	Canadá y EEUU

Los acrónimos utilizados fueron: CMV: *Cucumber mosaic cucumovirus*; PRSV: *Papaya ringspot potyvirus*; PLRV: *Potato leafroll luteovirus*; PPV: *Plum pox virus*; PVY: *Potato virus Y*; WMV-2: *Watermelon mosaic virus 2*; ZYMV: *Zucchini yellow mosaic potyvirus*.

Tabla 3: Plantas transgénicas con resistencia a virus en etapas avanzadas de experimentación en laboratorio (e), pruebas piloto a campo (c) o comercialización (co) en países en vías de desarrollo (fuente: FAO. Bio.Dec www.fao.org/biotech/inventory_admin/dep/default.asp).

Cultivo	Virus	País
Aji	CMV y TMV	China (c)
	CVbMV	Tailandia (e)
Aji pimiento	PVY	Indonesia (e)
	CMV y TMV	Korea (e)
Algodón	CLCV	Pakistán (e)
	CYDV	China (e)
	Vigna mungo virus	India (e)
	Tungro virus	Malasia (e)
Arroz	RRSV	Tailandia (e)
	RDV	China (c)
	RTV	China (c), Malasia e Indonesia (e)
Arveja	BGMV	Brazil (c)
Banana	BTV	Filipinas (c) y Egipto (e)
Batata	SPFMV	Kenia (c), India y Filipinas (e)
Caña de azúcar	SCMV y Yellow virus	Brasil (c)
	SCMV	Egipto (c)
Chaucha	ABMV	Tailandia (e)
	AMV	Ucrania (e)
	FBNYV	Egipto (e)
Cítricos	Tristeza virus	India y Cuba (e)
	CPsV	Argentina (e)
	CVpD	Indonesia (e)
Garbanzo	CABMV	Zimbawe (c)
	VMYMV	India (e)
Maíz	MSV	Sudáfrica (e)
	MRCV	Argentina (e)
Maní	PSTV	Indonesia (e)
	IPCV	India (e)
Melón	CMV	México y China (c)
	ZYMV	Egipto (c)
Nuez mocada	Stripped virus	China (c)
Papa	PVY	Argentina, Tunes y Vietnam (e) y China (c)
	PLRV	Argentina (c), Vietnam, Filipinas y Cuba (e)
	PVY, PLRV	Brasil y Egipto(c), Chile, India y Colombia (e)
	PVX, PVY	Perú, Sudáfrica e Indonesia (e) y México (c)
Papaya	PMV	Bangladesh e Indonesia (e)
	PRSV	Malasia, Vietnam, India, Indonesia y Malasia (e)
		China, Brasil y México (c)
	RV	Filipinas (e)
	RSV	Cuba (c)
	PRV	Tailandia (e)
Pepino	ZYMV	Egipto (c)
	CMV -CGMMV	India (e)
Pimienta	CMV	Malasia (e)
	CVBMV, pepLCV	Tailandia (e)
Pimienta picante	CMV y TMV	República de Corea (c)
Pimienta dulce	CMV	China (c)
	Virus R	China (co)
Poroto	BGMV	Brasil (c)
Repollo	TuMV	China (c)
Tabaco	TSWV y PVY	Brasil (c)
	PVY	India (e), República de Corea (e)
	TMV	Indonesia y Rep. de Corea (e), China y México (c)
	BYDV	China (e)
	YMV	China (e)
	WYDRV	China (e)
Tomate	Geminivirus y Tospovirus	Brasil (c)
	Geminivirus	Cuba (e)
	CMV	Indonesia (e), México (c) y China (co)
	TYLCV	Tailandia, China y Egipto (e)
	ToLCV	India e Indonesia (e)
Uva	GLRaV, GFLV, GVA, GVB	Tunes (e)
Zapallo	PMV, PAMV y SMV2	México (c)
	ZYMV	Egipto (c)
Zucchini	PMV, PAMV, SMV2 y ZAMV	México (c)

Lecturas Recomendadas

- Abel, P. P., Nelson, R. S., De, B., Hoffmann, N., Rogers, S. G., Fraley, R. T. & Beachy, R. N. (1986). Delay of disease development in transgenic plants that express the tobacco mosaic virus coat protein gene. *Science* 232, 738-743.
- Akad, F., Eybishtz, A., Edelbaum, D., Gorovits, R., Dar-Issa, O., Iraki, N. & Czosnek, H. (2007). Making a friend from a foe: expressing a GroEL gene from the whitefly *Bemisia tabaci* in the phloem of tomato plants confers resistance to tomato yellow leaf curl virus. *Arch Virol* 152, 1323-1339.
- Baulcombe, D. C. (1996). Mechanisms of Pathogen-Derived Resistance to Viruses in Transgenic Plants. *The Plant cell* 8, 1833-1844.
- Boonrod, K., Galetzka, D., Nagy, P. D., Conrad, U. & Krczal, G. (2004). Single-chain antibodies against a plant viral RNA-dependent RNA polymerase confer virus resistance. *Nature biotechnology* 22, 856-862.
- Bucher, E., Lohuis, D., van Poppel, P. M., Geerts-Dimitriadou, C., Goldbach, R. & Prins, M. (2006). Multiple virus resistance at a high frequency using a single transgene construct. *The Journal of general virology* 87, 3697-3701.
- Canto, T. & Palukaitis, P. (1999). Replicase-mediated resistance to cucumber mosaic virus does not inhibit localization and/or trafficking of the viral movement protein. *Mol Plant Microbe Interactions* 12, 743-747.
- Ding, S. W. & Voinnet, O. (2007). Antiviral immunity directed by small RNAs. *Cell* 130, 413-426.
- Fraley, R. T., Rogers, S. G., Horsch, R. B., Sanders, P. R., Flick, J. S., Adams, S. P., Bittner, M. L., Brand, L. A., Fink, C. L., Fry, J. S., Galluppi, G. R., Goldberg, S. B., Hoffmann, N. L. & Woo, S. C. (1983). Expression of bacterial genes in plant cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 4803-4807.
- Golemboski, D. B., Lomonossoff, G. P. & Zaitlin, M. (1990). Plants transformed with a tobacco mosaic virus nonstructural gene sequence are resistant to the virus. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 6311-6315.
- Lindbo, J. A. & Dougherty, W. G. (1992). Untranslatable transcripts of the tobacco etch virus coat protein gene sequence can interfere with tobacco etch virus replication in transgenic plants and protoplasts. *Virology* 189, 725-733.
- Lindbo, J. A., Silva-Rosales, L., Proebsting, W. M. & Dougherty, W. G. (1993). Induction of a Highly Specific Antiviral State in Transgenic Plants: Implications for Regulation of Gene Expression and Virus Resistance. *The Plant cell* 5, 1749-1759.
- Niu, Q. W., Lin, S. S., Reyes, J. L., Chen, K. C., Wu, H. W., Yeh, S. D. & Chua, N. H. (2006). Expression of artificial microRNAs in transgenic *Arabidopsis thaliana* confers virus resistance. *Nature biotechnology* 24, 1420-1428.
- Palauqui, J. C., Elmayan, T., Pollien, J. M. & Vaucheret, H. (1997). Systemic acquired silencing: transgene-specific post-transcriptional silencing is transmitted by grafting from silenced stocks to non-silenced scions. *The EMBO journal* 16, 4738-4745.
- Pegadaraju, V., Louis, J., Singh, V., Reese, J. C., Bautor, J., Feys, B. J., Cook, G., Parker, J. E. & Shah, J. (2007). Phloem-based resistance to green peach aphid is controlled by *Arabidopsis* PHYTOALEXIN DEFICIENT4 without its signaling partner ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1. *Plant J* 52, 332-341.
- Prins, M., Laimer, M., Noris, E., Schubert, J., Wassenegger, M. & Tepfer, M. (2008). Strategies for antiviral resistance in transgenic plants. *Molecular Plant Pathology* 9, 73-83.
- Rao, K. V., Rathore, K. S., Hodges, T. K., Fu, X., Stoger, E., Sudhakar, D., Williams, S., Christou, P., Bharathi, M., Bown, D. P., Powell, K. S., Spence, J., Gatehouse, A. M. & Gatehouse, J. A. (1998). Expression of snowdrop lectin (GNA) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J* 15, 469-477.
- Sanford, J. C. & Johnston, S. A. (1985). The concept of parasite-derived resistance: deriving resistance genes from the parasite's own genome. *J Theor Biol* 113, 395-405.
- Tavloraki, P., Benvenuto, E., Trinca, S., De Martinis, D., Cattaneo, A. & Galeffi, P. (1993). Transgenic plants expressing a functional single-chain Fv antibody are specifically protected from virus attack. *Nature* 366, 469-472.
- Voinnet, O., Pinto, Y. M. & Baulcombe, D. C. (1999). Suppression of gene silencing: a general strategy used by diverse DNA and RNA viruses of plants. *Proc Natl Acad Sci U S A* 96, 14147-14152.
- Waterhouse, P. M., Graham, M. W. & Wang, M. B. (1998). Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 13959-13964.

V. CAPÍTULO 7

Obtención de plantas resistentes a enfermedades bacterianas

Adrián Vojnov, M. Mercedes Rivero, Diego Zappacosta.

Introducción

A pesar de que las plantas son en general resistentes a las infecciones producidas por la mayoría de los patógenos (bacterias, hongos y virus), cada una de ellas posee cierto grado de susceptibilidad a alguno de éstos fitopatógenos. El conocimiento de la interacción patógeno-hospedador, las herramientas utilizadas por unos para atacar y los mecanismos de defensa para evitar las consecuencias de este ataque por los otros, son tema de estudio de diversos grupos de investigación alrededor del mundo.

Conocer los factores de virulencia utilizados por las bacterias fitopatógenas y su mecanismo de acción, es importante para el desarrollo de plantas resistentes a enfermedades. Por otro lado, profundizar los conocimientos sobre los mecanismos de defensa vegetal, permite planear estrategias en el diseño de cultivos mejor adaptados al medio, ya sea incrementando la resistencia innata o a través de la introducción de genes de resistencia heterólogos.

Este capítulo es una breve reseña sobre las principales bacterias responsables de enfermedad en plantas, sus herramientas o factores de virulencia, su regulación, y otras estrategias importantes que utilizan durante el proceso infeccioso. Las distintas estrategias biotecnológicas para la producción de plantas resistentes, ya sea aquellas que ya se encuentran en el campo, como otras en desarrollo o de potencial utilización, también son presentadas en el capítulo.

Tipos de interacción planta-bacteria

Las plantas, como todos los organismos vivos, interactúan con el medio ambiente y en él con otros organismos, entre ellos se encuentran las bacterias. Ambos organismos, bacterias y plantas, intercambian señales, estableciendo una especie de diálogo. Las células vegetales emiten secreciones conteniendo

aminoácidos, azúcares y otros compuestos químicos, que pueden ser reconocidos como señales por los microorganismos del suelo e inducen en ellos una respuesta recíproca. La respuesta bacteriana puede ser muy distinta teniendo en cuenta el tipo de interacción que establece con las plantas. Así las bacterias fitopatógenas pueden establecer interacciones compatibles o incompatibles. En una relación compatible el patógeno infecta y enferma a la planta; esto ocurre sólo si las condiciones ambientales son favorables, si las defensas preformadas de la planta son inadecuadas, si la planta falla en detectar al patógeno, e incluso si las respuestas de defensa activadas son ineficientes. En una interacción incompatible las plantas resisten al ataque del patógeno. Esta resistencia puede ser inespecífica, a través de la denominada resistencia no hospedadora, basal o innata, en la cual el patógeno no encuentra condiciones favorables para infectar, o bien porque la planta presenta barreras estructurales adecuadas o sintetiza compuestos tóxicos que impiden la proliferación y colonización de la bacteria. La relación incompatible, y por lo tanto la resistencia, puede ser debida también a un reconocimiento específico. En este caso existe una base genética definida. Se trata de la presencia de genes de resistencia dominantes en el hospedador que le permiten reconocer genes de avirulencia del patógeno. En los años 40 del siglo pasado, Harold H. Flor propuso el modelo "*gen a gen*" (ver Figura 1). Dicho modelo establece que la resistencia se produce cuando la planta expresa un gen de resistencia dominante (*R*, proteína *R*) y el patógeno un gen de avirulencia dominante complementario (*Avr*, proteína *Avr*). Esta respuesta defensiva está frecuentemente asociada a una Respuesta Hipersensible (HR; del inglés *Hypersensitive Response*), que se caracteriza por una necrosis rápida y localizada en respuesta al ataque del patógeno. Es decir, frente a la invasión de tejidos vegetales por un microorganismo foráneo, la respuesta defensiva inducible más temprana es la muerte celular controlada. Esta reacción HR ocurre aproximadamente 24 horas después de que la planta percibe un patógeno potencial. Se trata de un fenómeno conocido desde hace varios deca-





Genotipo patógeno	Genotipo de la planta huésped	
	R1	r1
Avr1	 <p>Avr1 R1</p> <p>No hay enfermedad</p> <p>(Planta y patógeno son incompatibles)</p>	 <p>Avr1 r1</p> <p>Enfermedad</p> <p>(Planta y patógeno son compatibles)</p>
avr1	 <p>avr1 R1</p> <p>Enfermedad</p> <p>(Planta y patógeno son compatibles)</p>	 <p>avr1 r1</p> <p>Enfermedad</p> <p>(Planta y patógeno son compatibles)</p>

Figura 1. Modelo gen por gen. La figura muestra las combinaciones de genes involucradas en distintas interacciones de resistencia/enfermedad entre un patógeno y su hospedador. En los años 40 del siglo pasado, Harold H. Flor propuso este modelo que establece que la resistencia se produce cuando la planta expresa un gen de resistencia dominante (R) y el patógeno un gen de avirulencia dominante complementario (Avr). Este modelo explica los casos de compatibilidad de incompatibilidad planta-patógeno

nios, que comparte características generales con la apoptosis o muerte celular programada. El objetivo final es aislar al invasor en la zona donde se ha detectado la penetración del microorganismo patogénico.

Luego de una HR, la planta adquiere resistencia en tejidos distales al sitio primario de infección. Esta resistencia, que protege a toda la planta, es conocida como Resistencia Sistémica Adquirida (SAR; *Systemic Acquired Resistance*).

Principales bacterias fitopatógenas:

Las bacterias fitopatógenas capaces de infectar y desarrollar enfermedades en un gran número de especies vegetales de importancia económica, pertenecen a un reducido grupo de géneros. Los géneros de bacterias Gram-negativas más estudiados desde el punto de vista de su biología, impacto fitopatológico y

aspectos genético-moleculares son *Agrobacterium*, *Erwinia*, *Pseudomonas* y *Xanthomonas*. Estos organismos pueden ser cultivados en el laboratorio, y pueden inocularse fácilmente en plantas para realizar estudios de fitopatogenicidad. Por otro lado, las bacterias Gram-positivas, como *Clavibacter*, *Curtobacterium* y *Rhodococcus*, son más difíciles de manejar en condiciones controladas.

Erwinia chrysanthemi, *E. carotovora*, *E. amylovora* y otras 15 especies, son las causantes de pudriciones blandas debido a su capacidad para producir grandes cantidades de enzimas pectolíticas, capaces de macerar tejido parenquimatoso de un amplio rango de especies.

Pseudomonas syringae se clasifica en alrededor de 45 patovarietades y puede infectar un amplio rango de especies. Entre ellas: *P. syringae* pv. *phaseolicola* infecta el frijol causando la enfermedad conocida como “tizón de halo”; y, *P. syringae* pv. *tomato* produce la “mancha negra” del tomate.

Ralstonia (formalmente *Pseudomonas*) *solanacearum* es una bacteria de suelo que coloniza el floema de una amplia gama de plantas huésped, causando entre otras la podredumbre parda de la papa.

El género *Xanthomonas* está constituido por 20 especies que atacan a más de 350 vegetales. En particular *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri* (Xac) es el agente causal de la canchros de los cítricos, enfermedad que por los daños que produce, ha adquirido una importante socioeconómica trascendente en los países productores de cítricos. Por otra parte, *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*, es el patógeno causante de la pudrición negra en crucíferas, entre ellas *Arabidopsis*, y constituye un modelo de interacción planta-patógeno muy estudiado.

Otros géneros de bacterias fitopatógenas son *Agrobacterium*, *Rhodococcus*, *Spiroplasma*, *Xylella* y *Streptomyces*. *Xylella fastidiosa*, es la causante de la clorosis variegada de los cítricos, y fue la primera bacteria fitopatógena cuyo genoma fue secuenciado totalmente.

Las bacterias del género *Streptomyces* son procariontes filamentosos Gram-positivos que producen esporas como principal mecanismo de dispersión. Sólo unas pocas especies entre

las 400 descritas son patógenas de plantas. Las especies de *Streptomyces* fitopatógenas causan enfermedades a nivel de órganos y estructuras subterráneas de diversas especies vegetales. Por ejemplo, *Streptomyces scabies* causa la sarna de la papa (escaras a nivel de los tubérculos).

La adecuada identificación de las especies, subespecies y patovariedades de bacterias es fundamental, y de gran interés en el marco de estudios epidemiológicos y de impacto ambiental o ecológico. En la actualidad, existen herramientas genéticas y moleculares que se suman a la tradicional caracterización fenotípica de las diferentes bacterias. Entre ellas, se encuentran la secuenciación de ADN, la hibridación ADN-ADN, el análisis de isoenzimas y los marcadores moleculares.

Factores de virulencia bacterianos

Las bacterias fitopatógenas han desarrollado una serie de compuestos que contribuyen a los fines de invadir y colonizar los respectivos hospedadores. Estos compuestos o factores de virulencia, determinan la patogenicidad y el grado de virulencia del patógeno. Dependiendo de la interacción planta-bacteria, las bacterias producen factores, algunos de los cuales son comunes y otros específicos para cada interacción patógeno-hospedador.

Muchos de estos factores son proteínas que inyectan directamente en la célula hospedadora (proteínas efectoras) a través del sistema de secreción tipo III (SST-III), un sistema común entre las bacterias patógenas tanto de plantas como animales, y que se induce cuando la bacteria toma contacto con el hospedador. Lamentablemente para el agente patógeno, estas proteínas son moléculas ideales para ser reconocidas por el sistema de defensa de la planta (modelo *gen a gen*): a través de las proteínas de resistencia (proteína R) la planta puede "reconocer" la presencia de determinada proteína efectora (proteína Avr), desencadenando la respuesta hipersensible (HR).

Algunos de los factores de virulencia han sido caracterizados recientemente como supresores de la respuesta de defensa vegetal y le permiten a la bacteria promover su crecimiento y difusión dentro del tejido vegetal. Varios de

estos incluyen proteínas efectoras secretadas por el SST-III, pero también exopolisacáridos y fitotoxinas, han sido reseñadas en la literatura. Entre los efectores descritos, el AvrPtoB es uno de los mejores caracterizados. La proteína R Pto es una serina/treonina quinasa de tomate que confiere resistencia a *Pseudomonas syringae*, que expresen la proteína AvrPto. Pto y AvrPto interactúan físicamente, y esta interacción es necesaria para la activación de la resistencia. Se ha demostrado que la deposición de calosa constituye un mecanismo defensivo en plantas. En ausencia de Pto, AvrPto actúa suprimiendo dicho mecanismo, permitiéndole a la bacteria una sustancial multiplicación en el tejido vegetal. Por otro lado, AvrPtoB suprime la muerte celular programada iniciada por Pto pero también aquella iniciada por otras proteínas R, alterando la respuesta inmune vegetal. Otro ejemplo similar a los mencionados anteriormente, esta dado por HopM1. La proteína HopM1 es un efector producido por *Pseudomonas syringae*, *Erwinia amylovora* y *Pantoea stewartii* subsp. *stewartii* y que también modifica la respuesta de defensa.

Otros efectores producidos por *Pseudomonas syringae* pv. *phaseolicola*, VirPphA, AvrPphC y AvrPphF, previenen la detección del patógeno por parte del hospedador, mediante distintos mecanismos, entre ellos: inhibición de la expresión del gen *avr*, bloqueo de la secreción de la proteína Avr, interferencia entre el Avr y la proteína R, o supresión en el camino de señalización de la respuesta de defensa río abajo al reconocimiento del Avr.

Las cepas virulentas de *Pseudomonas syringae* producen diversas toxinas como: coronatina, faseolotoxina, tagetitoxina, tabtoxina, siringomicina, siringotoxina, etc. La toxina coronatina, promueve la virulencia de *P. syringae* actuando como un análogo del jasmonato y posee la capacidad de inducir susceptibilidad en *Arabidopsis thaliana*.

Diversas enzimas extracelulares son importantes factores de virulencia, ya que en su ausencia, la virulencia del patógeno disminuye considerablemente. La secreción de un amplio rango de enzimas capaces de degradar componentes de la pared celular de plantas vasculares y otros componentes celulares,

tienen un papel importante en enfermedades bacterianas como las podredumbres blandas y también en bacterias que causan necrosis o marchitamiento vascular. Entre éstas podemos mencionar enzimas pectolíticas, celulasas, proteasas, glicanasas, poligalacturonasas y esterases. La posesión de dichas enzimas garantiza una puerta de entrada a la planta o una vez adentro, la provisión de nutrientes para su multiplicación.

Las bacterias producen una enorme variedad de polisacáridos constituidos por diversos azúcares. Los exopolisacáridos (EPS) pueden estar asociados a la membrana externa formando capsulas o ser liberados en el medio extracelular. Estos EPS han sido involucrados en patogenicidad conjuntamente con otros (glucanos cíclicos) y como ocurre también con las enzimas antes mencionadas están sometidos a una compleja red de regulación.

Los EPS que han sido implicados en la interacción con el hospedador, facilitarían la diseminación del patógeno mediante mecanismos que en algunos casos ya se han dilucidado. El xantano, que es el polisacárido más importante producido por todas las *Xanthomonas*, actúa suprimiendo la defensa local siendo esta actividad dependiente de estructura del mismo. El xantano suprime el engrosamiento de la pared celular de la célula vegetal inducido por el ataque del patógeno (deposición de calosa), mediante el secuestro de iones calcio e interfiriendo con el camino de señalización que lleva a la activación de la calosa sintetasa.

En el caso de *Agrobacterium*, un patógeno que desarrolla tumores en la planta hospedadora, las hormonas vegetales son importantes factores de virulencia que el microorganismo produce: auxinas y citoquininas. La auxina principal producida es el ácido indolacético que modula el tiempo de incubación de la enfermedad. Las citoquininas que se producen son varias (derivados de la zeatina) y determinan el tamaño del tumor.

Organización en comunidades (biofilm), una estrategia bacteriana durante la interacción con la planta hospedadora

Las bacterias no viven aisladas sino que forman una comunidad estructurada, coordinada

y funcional que se denomina comúnmente biopelícula o biofilm.

Se ha podido observar una relación directa en la capacidad de producir biofilms y la virulencia de estas bacterias. Los biofilms son estructuras importantes en el desarrollo bacteriano y podrían ser un blanco muy apropiado para contrarrestar las enfermedades producidas por éstas en los respectivos hospedadores.

Entre las ventajas que le proporciona a la bacteria poseer la capacidad de desarrollar un biofilm, podemos mencionar: protección del medio ambiente; mayor disponibilidad de nutrientes; cooperación entre especies (microconsorcio; sintrofismo), y adquisición de nuevas características genéticas.

La formación de biofilms requiere de la capacidad de las bacterias de unirse a distintas superficies, en particular el tejido vegetal. Para lograr esta asociación, las bacterias utilizan diversas moléculas, entre ellas los EPS y las proteínas de superficie, siendo las funciones de motilidad importantes para el desarrollo de estas estructuras tridimensionales. La expresión de los genes involucrados en la síntesis de estas moléculas de adhesión, así como otros factores de virulencia, están regulados por mecanismos dependientes de la densidad celular.

Regulación de factores de virulencia y biofilm en bacterias fitopatógenas

La formación de biopelículas bacterianas es un proceso muy regulado. Cada especie responde a sus propias señales ambientales a través de un conjunto de mecanismos moleculares. A pesar de esta gran diversidad, hay un sistema conservado de regulación que responde a varios estímulos que son importantes para la asociación entre bacterias y plantas. El sistema de regulación de la formación de biofilm, al igual que algunos factores de virulencia, en particular las enzimas extracelulares y los EPS, son dependientes del número de bacterias presentes, o del mecanismo comúnmente denominado quórum sensing.

El fenómeno de quorum sensing fue reconocido en la década de los 60 en estudios realizados con la bacteria *Vibrio fischeri*. Esta bacteria marina bioluminiscente, produce luz sólo

cuando hay una gran cantidad de bacterias presentes. Se observó que la luminiscencia se producía por acumulación de un activador o molécula “autoinductora”. Esta molécula es producida por la bacteria y activa la luminiscencia cuando alcanza una determinada concentración crítica. Las bacterias son capaces de censar su densidad de población a través de la detección de esta molécula autoinductora. Al mecanismo del censado de la densidad celular se lo llamó quorum sensing y la molécula activadora producida por *V. fischeri* fue aislada en el año 1981, siendo identificada como una N-(3-oxohexanoyl)-homoserin lactona.

El quorum sensing es un proceso relativamente simple. Las acil-homoserin lactonas (HSL) son sintetizadas a un nivel basal por las acil-HSL sintetas (generalmente homólogas a las proteínas tipo LuxI de *V. fischeri*). Las moléculas de acil-HSLs sintetizadas son rápidamente liberadas por las células bacterianas por difusión. El incremento en el tamaño de la población bacteriana eleva la concentración de las acil-HSLs. A niveles elevados de concentración, las acil-HSLs interactúan con un factor de transcripción (homólogo a la proteína LuxR de *V. fischeri*) que modula la expresión de los genes regulados por quorum sensing.

Como se muestra en la Figura 2, en la regulación de factores de virulencia a través de

quorum sensing, las proteínas I y R juegan un rol central. La célula bacteriana (en gris) contiene una proteína I que es responsable de la síntesis de moléculas difusibles (en verde) de acil homoserin lactonas (A-HSLs), que actúan como señalizadoras. A una alta concentración celular, las moléculas señalizadoras interactúan con la proteína R. La interacción con la misma induce un cambio conformacional que aumenta su afinidad por determinadas secuencias de ADN (secuencias lux) presentes en las regiones promotoras de los genes regulados por acil homoserin lactonas.

Uno de los sistemas de quórum sensing mejor estudiados es el de *Ralstonia solanacearum*. Esta bacteria produce el exopolisacárido I (EPS I) y otros factores de virulencia que están regulados a través de una red sensorial. Para lograr la expresión diferencial de sus genes, *R. solanacearum* utiliza esta compleja red de cascadas regulatorias que censan los cambios ambientales y gatillan cambios en la expresión génica. Los componentes de la red son, en su mayoría, reguladores del tipo de dos componentes (sensor-regulador). Estos sistemas presentan un dominio sensor en el extremo N-terminal que puede unir señales específicas del medio extracelular y un dominio quinasa citoplasmático que dispara la fosforilación del componente regulador. La fosforilación acti-

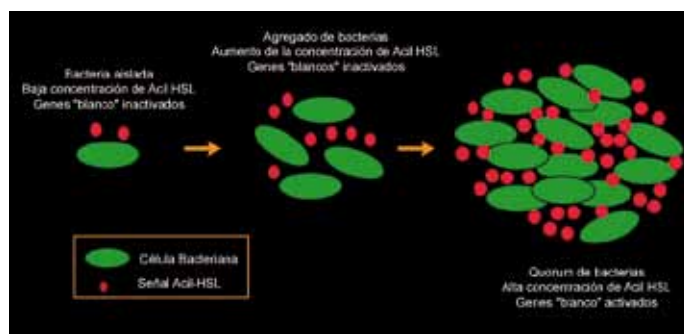


Figura 2. Quórum sensing. Modelo simplificado de la transducción de señales en quórum sensing, QS. Los microorganismos censan sus poblaciones a través de un sofisticado mecanismo de comunicación celular. Cuando la densidad celular alcanza un determinado umbral se dispara la expresión de determinados genes. Este tipo de regulación que controla diversas funciones biológicas, entre ellas las de virulencia, es conocido como autoinducción o *quorum sensing*. Las moléculas señalizadoras esenciales de este sistema son la acil-homoserin lactonas (acil-HSL).

va el dominio de unión a ADN presente en la región C-terminal de esta proteína, convirtiéndola en un activador transcripcional de los genes blancos. En *R. solanacearum* la densidad celular es censada mediante el éster metílico del ácido 3-hidroxi palmítico (3-OH.PAME). Un nivel elevado de 3-OH.PAME induce la producción de EPS I y de algunas exoenzimas. Estos factores de virulencia promueven el ataque de la bacteria.

En *Xanthomonas campestris* pv *campestris* (Xcc), un patógeno que afecta crucíferas, la producción de las enzimas extracelulares y de EPS está regulada por el grupo de genes *rpf* (regulación de los factores de patogenicidad), compuesto por 9 genes (*rpfA-I*). Los genes *rpfB* y *rpfF* están implicados en la regulación mediada por pequeñas moléculas difusibles denominadas DSF (del inglés *diffusible signal factor*), las cuales actuarían como comunicadoras intercelulares.

Genómica y bacterias fitopatógenas

Para las bacterias fitopatógenas la era genómica comenzó oficialmente con la publicación de la secuencia del genoma de *Xylella fastidiosa*, el agente causal de la clorosis variegada de los cítricos. Utilizando programas de predicción de secuencias se han encontrado en el genoma de esta bacteria (de más de 2,5 millones de pares de bases) unos 2.900 genes. Además de *X. fastidiosa*, ya se han secuenciado los genomas de cepas representativas de la mayoría de los grupos taxonómicos que contienen bacterias fitopatógenas de importancia. Entre ellos, varias especies del género de *Xanthomonas* y *Pseudomonas*. Para conocer el estado actual de la secuenciación de genomas en bacterias fitopatógenas se puede consultar la base de datos GOLD (ver Lecturas Recomendadas) donde se encuentra una lista actualizada de los proyectos de secuenciación.

La planta y su sistema defensivo

Los mecanismos moleculares implicados en el desencadenamiento de una respuesta defensiva en plantas, involucran el reconocimiento por parte de éstas de señales derivadas del patógeno. Estas señales o moléculas presentes en el patógeno pueden ser reconocidas por

la planta de manera inespecífica dirigiendo una respuesta general, o bien pueden ser detectadas específicamente por el producto de los genes de resistencia (*R*). Las primeras son moléculas presentes en la superficies de la mayoría de las bacterias fitopatógenas, como el lipopolisacárido (LPS) en la membrana externa de las bacterias Gram-negativas, o la flagelina, componente estructural del flagelo. El conjunto de estas moléculas se conoce como patrones moleculares asociados a patógenos (PAMPs). El reconocimiento específico, como se mencionó en secciones anteriores, involucra la interacción del producto de un gen de *Avr* del patógeno y el producto de un gen de *R* de la planta. En cualquiera de los casos (reconocimiento específico o inespecífico), la respuesta de la planta está constituida por una serie de eventos. En primer lugar, a través de la membrana plasmática se produce un rápido intercambio de iones con el medio extracelular. De esta forma, se incrementa la concentración intracelular de H^+ y Ca^{2+} , mientras disminuye la de Cl^- y K^+ . Este intercambio de iones es un prerrequisito para la activación de las proteínas quinasas activadas por mitógenos (MAPK; *mitogen-activating protein kinase*) y de la generación de especies de oxígeno reactivas (ROS; *reactive oxygen species*) a través de una NAD(P)H oxidasa asociada a membrana. Una vez activadas las MAPK, algunas son traslocadas al núcleo y otras son rápidamente fosforiladas y desfosforiladas. Finalmente, se produce la inducción transcripcional de un considerable número de genes en la célula vegetal, entre ellos los de las proteínas relacionadas a la patogenicidad (PR; *pathogenicity related proteins*) y los genes involucrados en la biosíntesis de fitoalexinas (metabolitos secundarios lipofílicos de bajo peso molecular y con actividad antimicrobiana).

Estrategias biotecnológicas para la obtención de plantas resistentes a bacterias fitopatógenas

- Interferencia con los factores de virulencia

Uno de los caminos empleados para neutralizar patógenos bacterianos es la alteración de la expresión de sus factores de virulencia, controlados a través del mecanismo de *quórum sensing* (estrategia de *quórum quenching*, QQ,

Figura 3). Consiste en interferir en la comunicación entre bacterias a nivel de la generación de la señal: por ejemplo la inhibición de la síntesis, la transferencia de estas moléculas señal o de sus precursores. Otros niveles de interferencia son el transporte y la recepción de la señal. Estrategias alternativas se relacionan con la degradación de las acil-HSL o con la utilización de moléculas que las imitan (provenientes de microorganismos o plantas). Algunos de estos compuestos han sido recientemente caracterizados, por ejemplo las furanonas que son metabolitos secundarios producidos por el alga roja *Delinella pulchra*, y que presentan una alta homología estructural con las HSLs.

Por otra parte, se han identificado distintas especies del género *Bacillus* como fuente importante de genes que codifican enzimas capaces de degradar factores de virulencia o moléculas que actúan en su regulación, por ejemplo, enzimas capaces de degradar polímeros

bacterianos. Así, algunas cepas de *B. subtilis* producen enzimas que degradan el xantano, polisacárido producido por todas las bacterias del género *Xanthomonas*.

Además, se han identificado otras especies del género *Bacillus* que producen acilhomoserina lactonasas (acil-HSLasa). Estas enzimas inactivan las HSLs mediante la hidrólisis de su enlace lactona. Diversas cepas de *Bacillus*, mediante el gen *aihA*, sintetizan acil-HSLasa. Este gen se expresó en plantas de *Nicotiana tabacum* y *Solanum tuberosum* y se evaluó su efecto en ensayos de infección con *Erwinia carotovora*. A partir de inoculaciones de hojas de tabaco y tubérculos de papa con esta bacteria, se observó que la expresión de la enzima interfería con la patogenicidad incrementando la resistencia vegetal a la infección.

Otra estrategia, enfocada a la alteración de la expresión de los factores de virulencia, consistió en la introducción del gen *expI* de *E.*

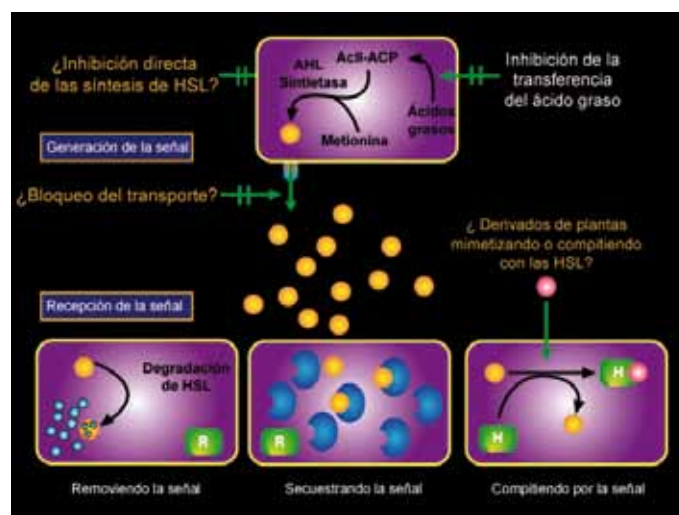


Figura 3. Quorum quenching. Diferentes estrategias pueden utilizarse para interferir la comunicación entre células bacterianas. Existen diferentes mecanismos que afectan la regulación por acil-HSL. Existen mecanismos bioquímicos que interfieren en la comunicación entre bacterias a nivel de la generación de la señal: por ejemplo la inhibición de la síntesis o de la transferencia de estas moléculas señal o de sus precursores. Existen además posibles interferencias en el transporte y en la recepción de la señal. Otras estrategias de interferencia a la comunicación entre células bacterianas se relacionan con la degradación de las acil-HSL. Algunos microorganismos son capaces de sintetizar compuestos que imitan a las acil-HSL con el objeto de interferir la comunicación entre otras especies y competir con ellas por nichos ecológicos.

carotovora. Este gen que codifica la enzima responsable de la síntesis de oxoacil-homoserina lactona (OHLs) se introdujo en plantas de *Nicotiana tabacum*. La presencia de OHLs en la planta al inicio del curso de la infección bacteriana indujo la expresión temprana de genes de virulencia del patógeno. Esta expresión temprana desencadenó una respuesta rápida de defensa que le permitió contrarrestar la infección.

- Introducción de genes de resistencia

Uno de los casos más exitosos en el control de enfermedades bacterianas es el del tizón bacteriano del arroz causado por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*. En este patosistema el estudio de la interacción patógeno-hospedador permitió desarrollar una estrategia para combinar genes específicos de manera de obtener una resistencia duradera. El *Xa21* es el primer gen de resistencia de arroz caracterizado. La proteína codificada por este gen posee un dominio de serina/treonina quinasa y es capaz de autofosforilarse en varios sitios en el curso de una interacción incompatible. *Xa21* confiere resistencia a la mayoría de las razas de *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* (Xoo). Otro de los genes de resistencia, aislados de arroz y que confiere resistencia a *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae*, es el gen *Xa26*. Si bien ambos genes codifican proteínas muy similares, el *Xa26* confiere resistencia tanto en plantas jóvenes como adultas; mientras que *Xa21* sólo tiene efecto en plantas adultas, lo que sugiere que estaría regulado por genes involucrados durante el desarrollo de la planta. Esta táctica de manipulación y expresión de genes R es la más utilizada tanto en mejoramiento clásico como con transgénicos.

El descubrimiento de genes *R* en diferentes cultivos como cebada, maíz y tomate se ha acelerado notablemente debido al desarrollo de las técnicas de mapeo, aislamiento y secuenciación. Son interesantes las similitudes halladas en la estructura de las proteínas R en especies de plantas mono y dicotiledóneas, lo que evidencia que los sistemas defensivos han sido conservados durante la evolución y diversificación de las plantas. Los genes *R* más comunes, codifican proteínas intracelu-

lares con dominios de unión de nucleótidos y secuencias repetidas ricas en leucinas (NB-LRR; *nucleotide-binding/leucine-rich repeat*) y con un dominio N-terminal variable, donde se observan motivos TIR (*Toll-like receptor*) o CC (*coiled coil*).

Un ejemplo de expresión heteróloga de un gen *R* es la introducción del gen *Bs2* de pimiento en plantas de tomate. Dicho gen confiere resistencia a cepas de *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Xcv) que contienen el gen de avirulencia *avrBS2*. Dado que diversas patovarietades de *X. campestris* poseen el gen *avrBS2*, se estima que el gen *Bs2* de pimiento podría conferir resistencia estable a campo a otras especies de plantas. Se obtuvieron plantas transgénicas de tomate que expresaban el gen de resistencia *BS2*. Para determinar el efecto de la expresión del gen, se midió el crecimiento de cepas isogénicas de *X. campestris* pv. *vesicatoria* conteniendo o no el gen de avirulencia *avrBS2*. Se inocularon plantas de tomate transgénicas y no transgénicas con ambas cepas. Sólo se observó resistencia en aquella planta transgénica *BS2* inoculada con las bacterias que portaban el gen *avrBS2*.

- Expresión de genes antimicrobianos de diverso origen

Péptidos antimicrobianos:

Entre los compuestos antibacterianos más difundidos y de mayor espectro de acción se encuentran los péptidos antimicrobianos. La amplia distribución de este tipo de moléculas en los reinos animal y vegetal sugiere que han cumplido un rol fundamental en la evolución de estos organismos multicelulares complejos. La mayoría de los péptidos antimicrobianos presentan una estructura antipática en forma de α -hélice, en la que diferentes aminoácidos catiónicos e hidrofóbicos se organizan espacialmente en sectores discretos de la molécula. Los péptidos lineales como la cecropina y la magainina sólo adoptan esta conformación una vez que se insertan en la membrana.

Los péptidos antimicrobianos actúan frente a los microorganismos en forma específica. La base de esta especificidad está determinada por la naturaleza diferencial de la membrana

de las células bacterianas y las células animales o vegetales. En las bacterias, la membrana se organiza de forma tal que la gran mayoría de fosfolípidos con carga negativa permanece expuesta al medio externo. En el caso de las células de mamíferos y de plantas, la membrana presenta sólo lípidos sin carga neta hacia el exterior, mientras que los lípidos con carga negativa se disponen hacia el interior de la célula, es decir, hacia el citoplasma. Por esta razón, los péptidos con carga positiva se unen electrostáticamente con los lípidos de carga negativa presentes en la cara externa de la membrana bacteriana, pero no interactúan con los lípidos que constituyen las membranas de las células superiores. El modelo Shai-Matsuzaki-Huang (Figura 4) grafica el mecanismo de acción de los péptidos antimicrobianos.

Se han expresado en plantas diferentes tipos de péptidos antimicrobianos. Entre ellos la sarcotoxina que es un péptido aislado originalmente a partir de la hemolinfa de larvas de

Sarcophaga peregrina por un grupo de científicos de la Universidad de Tokio (Japón). Este péptido posee 39 aminoácidos y pertenece al grupo de las cecropinas, con actividad lítica y antibacteriana contra muchas bacterias Gram-positivas y negativas. En estudios *in vitro*, la sarcotoxina ha resultado altamente eficiente en la inhibición del crecimiento de algunas bacterias fitopatógenas tales como *Xanthomonas axonopodis* pv. *citri*. Se ha comprobado que la expresión de sarcotoxina en plantas de tabaco, bajo el control de un promotor constitutivo, aumenta la resistencia de estas plantas a dos bacterias fitopatógenas: *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* y *Erwinia carotovora* subsp. *carotovora*.

Expresión de enzimas líticas del tipo lisozimas:

Estas enzimas catalizan la hidrólisis de la mureína, un constituyente de la pared celular bacteriana. Las lisozimas se localizan en las

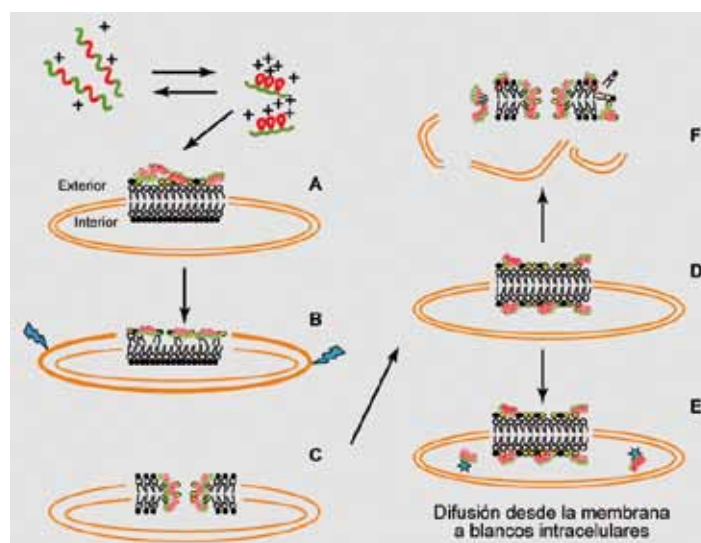


Figura 4. Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang. Se representa un péptido con su estructura en α -hélice. A: reconocimiento de la membrana bacteriana por parte de los péptidos. B: inserción del péptido a la membrana mediada por la atracción electrostática de cargas; adelgazamiento de la capa externa de la membrana; se generan tensiones en la bicapa (flechas). C: formación de poros en la membrana. D: transporte de péptidos y lípidos a la capa interna de la membrana. E: acción de los péptidos sobre "blancos" intracelulares (en algunos casos). F: colapso de la membrana bacteriana y ruptura de la célula. Los lípidos representados en amarillo poseen carga negativa. Los lípidos representados en negro no poseen carga neta.

vacuolas de numerosas especies vegetales por lo que entran en contacto con las bacterias fitopatógenas una vez que éstas han producido la lisis o ruptura de la célula vegetal. Pocas lisozimas vegetales han sido caracterizadas y clonadas, por lo que se han buscado lisozimas de otros orígenes para ser expresadas en plantas transgénicas, como las del bacteriófago T4 (los bacteriófagos son virus que infectan a las bacterias) y la del huevo de gallina. El gen de la lisozima del bacteriófago T4, uno de los miembros más activos de esta familia de enzimas bacteriolíticas, ha sido expresado en plantas de *Solanum tuberosum*. Las plantas transgénicas obtenidas fueron infectadas con la bacteria fitopatógena *Erwinia carotovora* susp. *atroseptica* bajo condiciones de laboratorio e invernáculo. Usando una alta presión de infección, se observó una reducción significativa en la maceración de los tejidos infectados. También se comprobó que la capacidad de brotación de los tubérculos transgénicos desafiados con el patógeno resultó sumamente disminuida.

Expresión de tioninas:

Las tioninas son polipéptidos ricos en cisteínas, presentes en el endosperma y en las hojas de los cereales, cuya acción no específica se basa en la permeabilización de las membranas celulares.

Como ejemplo, las secuencias codificantes de α -tioninas de cebada y trigo se transformaron en plantas de tabaco. Se seleccionaron las líneas transformadas y se las desafió en ensayos de inoculación con bacterias fitopatógenas (*Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* 153 y *P. syringae* pv. *syringae*). Se comprobó que las plantas transgénicas que expresaban el gen de la α -tionina presentaban menor proporción de lesiones necróticas, en comparación con las plantas no transgénicas.

Síntesis de fitoalexinas:

Entre las estrategias tendientes a incrementar el sistema defensivo de las plantas se incluye la síntesis de fitoalexinas, lo que generalmente involucra la modificación de vías biosintéticas complejas. Las fitoalexinas son compuestos químicos sintetizados por la planta en respuesta a una invasión microbiana. La

primera fitoalexina aislada y caracterizada fue la pisantina (se aisló en 1960 a partir de las vainas de *Pisum sativum*). Se trataba de un isoflavonoide pterocarpano. La naturaleza química de las fitoalexinas cubre prácticamente todo el espectro químico de los productos naturales. Recientemente se ha logrado la síntesis constitutiva de glucósidos del isoflavonoide daidzeína, un miembro de las fitoalexinas del tipo pterocarpano, en células de maíz, a través de la introducción de la enzima isoflavona sintasa de *Glycine max*.

Lecturas recomendadas:

- Agrios GN.** 2004. Plant Pathology. Elsevier Inc., Oxford, UK
- Collinge DB., Lund OS. and Thordal-Christensen H.** 2008. What are the prospects for genetically engineered, disease resistant plants?. European Journal of Plant Pathology, 121, 217-231.
- Gurr SJ. and Rushton PJ.** 2005. Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express?. Trends in Biotechnology, 23, 275-282.
- Loh J., Pierson EA., Pierson LS., Stacey G. and Chatterjee A.** 2002. Quorum sensing in plant-associated bacteria. Current Opinion in Plant Biology, 5:1369-1375.
- Vojnov AA., Dow JM. and Bouarab K.** 2007. Recent progress in understanding the roles of DSF-regulated virulence factors in Xanthomonas campestris pathogenicity. Pest Technology, 1, 117-126.
- Genomes OnLine Database (GOLD):** www.genomesonline.org

V. CAPÍTULO 8

Aproximaciones biotecnológicas para un manejo sustentable del estrés fúngico en la agricultura

Juan Carlos Díaz Ricci; Ursula Tonello;
Gustavo Martínez-Zamora; Sergio Salazar;
Nadia Chalfoun; Gabriel Vellicce;
Carlos Grellet; Paula Filippone;
Alicia Mamani; Marta Ontivero; y
Atilio Pedro Castagnaro

INTRODUCCIÓN

La relación entre las plantas y los hongos se remonta a hace alrededor de 400 millones de años, ya que hay evidencias de que el establecimiento de las primeras plantas sobre la superficie de la tierra fue facilitado por la interacción con hongos simbióticos. Esta asociación mejoró la capacidad de la planta para la adquisición de nutrientes y le permitió su adaptación a los cambios del medioambiente. A lo largo de la evolución, la habilidad de los hongos para infectar a las plantas surgió en forma repetida e independiente, lo que determinó el desarrollo de una diversidad de estrategias en los hongos fitopatógenos para evadir las defensas vegetales y completar su ciclo de vida en las plantas. Durante el desarrollo de la enfermedad se alteran en la planta procesos relacionados a la fotosíntesis, a la absorción de agua y minerales del suelo y su transporte al resto de la planta, al crecimiento y desarrollo, todo lo cual repercute negativamente en la agricultura.

El desarrollo de estrategias biotecnológicas para el manejo sostenible tanto en lo productivo como para la salud humana y ambiental, consiste en complementar el mejoramiento genético convencional de cultivos vegetales con el conocimiento generado por la investigación de las interacciones entre hongos y plantas, en particular de los factores relacionados a la patogenicidad en hongos y de los mecanismos de defensa en plantas. La aplicación de herramientas desarrolladas recientemente en el campo de la Biología Molecular como las técnicas que permiten secuenciar genomas

completos (por ejemplo, la pirosecuenciación), la posibilidad de evaluar los cambios en la expresión génica a gran escala y el desarrollo de la bioinformática, ha tenido un gran impacto en la generación de estos conocimientos. Otras fuentes que aportan también al desarrollo de la biotecnología asociada al mejoramiento genético vegetal son los marcadores moleculares de interés agronómico que se tratan en otros capítulos de este libro.

En este capítulo, nuestro objetivo es dar una breve introducción de los principales hongos causantes de enfermedades de plantas cultivadas, describir los mecanismos por los cuales los patógenos fúngicos pueden acceder a los tejidos vegetales y una vez establecidos en ellos, las tácticas que usan para su nutrición. Además se analizan brevemente las reacciones de defensa que pueden desarrollar las plantas frente a este ataque, y finalmente, comentar el aprovechamiento de este conocimiento para generar algunas estrategias biotecnológicas que permitan mejorar la agronomía de los cultivos respecto del control sustentable o mejor dicho, del manejo eficiente y eco-sistémico (se refiere a un sistema que involucra a la ecología en un sentido amplio) de enfermedades provocadas por hongos fitopatógenos.

PRINCIPALES HONGOS CAUSANTES DE ENFERMEDADES DE INTERÉS AGRONÓMICO

De las innumerables especies fúngicas conocidas sólo un pequeño número son capaces de producir enfermedades en plantas. En la actualidad, *Magnaporthe oryzae* es considerado el hongo que más daño produce a la agricultura mundial, porque afecta al arroz que es el cultivo vegetal más importante del planeta. Este fitopatógeno fúngico conjuntamente con *Ustilago maydis*, causante del carbón de la espiga del maíz, fueron seleccionados por consorcios internacionales para la secuenciación y el estudio en profundidad de su genoma, con lo que se han conseguido grandes avances en el conocimiento de sus mecanismos de infección.

Las diferentes especies de *Colletotrichum* que producen enfermedades en varios cultivos de interés con una incidencia severa en la economía, le siguen en importancia. Los hongos de este género provocan antracnosis en cerea-

les, legumbres y frutas. Aunque los hongos de estas especies atacan diferentes tejidos de la planta durante su desarrollo, en muchos casos el daño se produce después de la cosecha del fruto o del tejido u órgano de consumo, al igual que sucede con hongos del género *Penicillium*.

Otros patógenos fúngicos importantes pertenecen al género *Botrytis*, causantes de la podredumbre gris, los cuales tienen un amplio rango de hospederos, al igual que los de los géneros *Alternaria* y *Septoria*. Estos hongos causan daños en diferentes cultivos por la producción de toxinas que finalmente matan a la planta y pueden afectar también a los consumidores.

Lograr un manejo sostenible de las enfermedades conocidas con el nombre común de roya, cuyo agente etiológico pueden ser distintas especies de hongos fitopatógenos, es clave también para mejorar la agricultura mundial.

Para profundizar en el conocimiento de los hongos fitopatógenos se recomienda consultar la extensa bibliografía que está disponible en Agrios (2004), ya que esta breve enumeración sólo persigue un objetivo introductorio de lo que se tratará a continuación en este capítulo.

PROCESO DE INFECCION DE PLANTAS POR HONGOS PATOGENOS

Para producir la enfermedad, los hongos deben acceder al interior de los tejidos vegetales, penetrando en hojas, tallos y raíces directamente, o a través de heridas o aperturas naturales como estomas. Las partes aéreas de las plantas están cubiertas por una capa continua formada por un material de naturaleza lipídica denominada cutícula. La estructura y la composición de esta cubierta varían según la planta, órgano o estadio del crecimiento, pero básicamente está formada por una matriz de cutina y ceras. Los hongos fitopatógenos son los únicos que pueden acceder a los nutrientes vegetales a través de la cutícula por acción de enzimas denominadas cutinasas, que degradan la cutina.

Es importante tener en cuenta que de acuerdo al tipo de nutrientes que necesitan para completar su desarrollo, los hongos patógenos se pueden clasificarse en biotrofos y necrotrofos y el hecho que pertenezcan a un tipo u otro determina las características de sus mecanismos de infección. Los biotrofos son aquellos

que se nutren de los tejidos vivos del hospedero, mientras que los necrotrofos lo hacen a partir de tejidos muertos. Otros denominados hemibiotrofos se comportan como biotrofos y necrotrofos según el estadio de su ciclo vital considerado.

Las paredes de las células vegetales, formadas principalmente por polisacáridos complejos como celulosa, hemicelulosa, pectinas, compuestos fenólicos resistentes a hidrólisis como lignina, y en menor grado por proteínas, desempeñan un importante rol en la defensa contra patógenos. Esta barrera puede ser superada por algunos hongos gracias a que secretan enzimas capaces de hidrolizar sus componentes, permitiéndoles acceder a los tejidos y espacios intracelulares. Sin embargo, algunos eventos previos a la penetración han demostrado ser de gran importancia en el proceso infectivo, entre los que se encuentra: la adhesión de los conidios a la superficie de la planta, el reconocimiento del hospedero y la liberación de las señales apropiadas que permitan los procesos de morfogénesis relacionados al desarrollo del hongo, como se muestra en la Figura 1.

En general, el proceso de infección de plantas por parte de hongos fitopatógenos incluye una serie de etapas comunes a diferentes especies que pueden resumirse en los siguientes pasos, algunos de los cuales pueden verse en el esquema mostrado en la Figura 1 para hongos biotrofos (Fig. 1A) y hemibiotrofos en su etapa biotrófica (Fig. 1B):

- 1- Unión de las estructuras infectivas fúngicas a la superficie de la planta.
- 2- Germinación de conidios y formación de estructuras de infección en las partes aéreas del hospedero.
- 3- Penetración al hospedero.
- 4- Colonización de los tejidos vegetales.

1- Unión de las estructuras infectivas fúngicas a la superficie de la planta.

La adhesión de los conidios a la superficie del hospedero es el primer paso del proceso de infección y es indispensable para llevar a cabo las etapas posteriores del desarrollo. La naturaleza química del material usado por las distintas especies fúngicas para la unión es variable, como lo son también las condiciones del medio

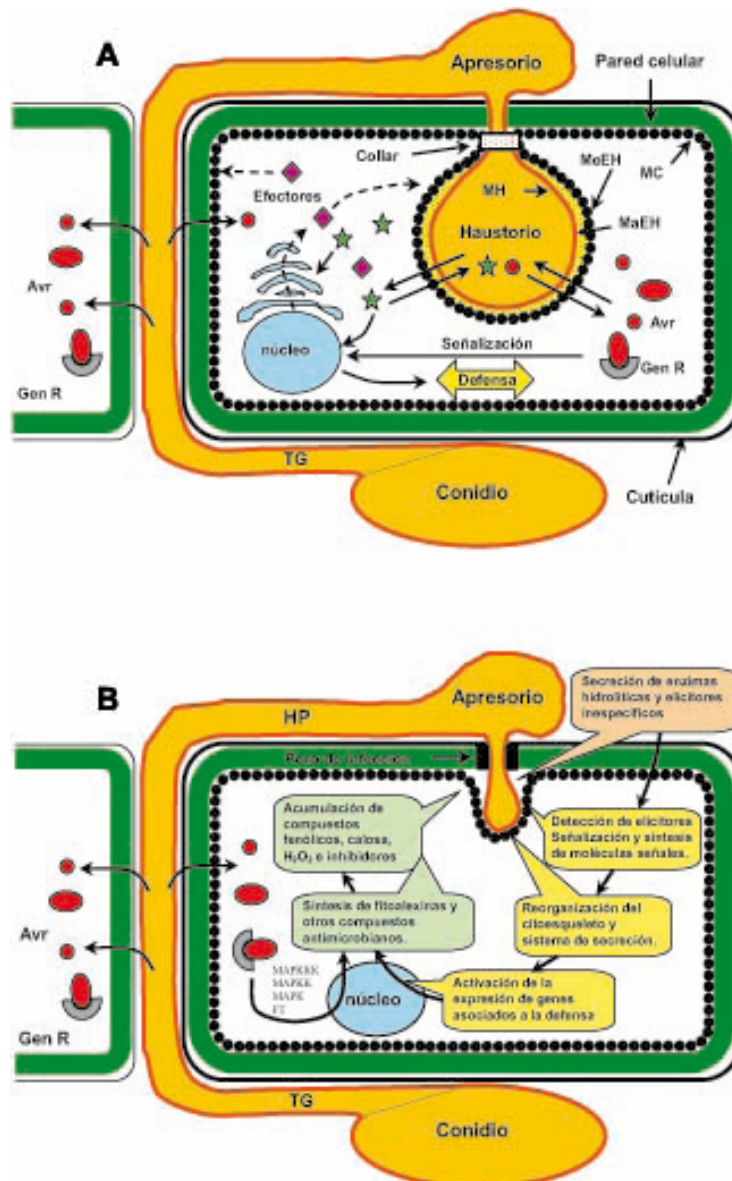


Figura 1: Esquema simplificado de las estructuras infectivas típicas de un hongo patógeno biotrófico obligado (A), hemibiotrófico en la fase biotrófica (B) y algunas de las vías de señalización activadas. Después de la adhesión del conidio a la superficie del tejido vegetal, este emite un tubo germinativo (TG) que crece hasta encontrar una zona de la superficie de la hoja (u otro tejido) donde se fija y desarrolla el apresorio. A partir de allí se produce la penetración de la papila infectiva que termina en otra estructura destinada a la nutrición del hongo, el haustorio. Nomenclatura: MC, membrana celular; MH, membrana haustorial; MeEH, membrana extrahaustorial; MaEH, matriz extrahaustorial; Avr, factor de avirulencia; Gen R, gen de resistencia (i.e. tipo TIR-NBS-LRR, CC-NBS-LRR), PRR (pattern recognition effector) o ETI (effector-triggered immunity); MAPK, (Map quinasas); FT, factores transcripcionales.

ambiente que inducen la adhesión. En el caso del hongo causante del tizón del arroz *Magnaporthe oryzae*, la humedad del ambiente o el rocío es necesaria para la hidratación del mucila-

go que se encuentra en el extremo de la conidia que se unirá a la superficie de su hospedero, en tanto que *Blumeria graminis* f. sp. *hordei* que produce la enfermedad llamada "oídio" en ce-

reales, no requiere un medio hidratado en esta fase inicial porque las esporas liberan cutinasas que modifican la superficie del hospedero y de la conidia, tornándolas más hidrofóbicas, favoreciendo la unión entre ambas y el desarrollo posterior del tubo germinativo.

2- Germinación de los conidios y formación de estructuras de infección en las partes aéreas del hospedero.

Los estímulos que determinan la germinación de los conidios son diversos, entre ellos la estimulación por contacto, condiciones del medioambiente (temperatura y humedad) y la disponibilidad de nutrientes. Durante este proceso se produce movilización de compuestos de reserva, polarización y biosíntesis de membranas y pared celular, hasta que finalmente emerge el tubo germinativo, hifa especializada que avanza por una corta distancia (ver Fig. 1A y 1B). El tubo germinativo censa la superficie del hospedero y si se perciben las señales físicas y químicas apropiadas, se inducen una serie de eventos que finalmente llevarán a la formación del apresorio (Fig. 1A y 1B). De este reconocimiento participan diversas proteínas fúngicas, como las integrinas, proteínas transmembrana que conectan eventos del medio externo con el citoesqueleto, o las hidrofobinas, que intervienen en el desarrollo de estructuras aéreas y en las interacciones de las hifas con superficies hidrofóbicas.

3- Penetración en el hospedero.

Para acceder a los nutrientes intracelulares del hospedero, los microorganismos patógenos deben llegar al apoplasto. Para conseguirlo pueden penetrar directamente a través de aperturas preexistentes como heridas o estomas; o usar una estrategia fisicoquímica combinada ejerciendo presión sobre las estructuras vegetales y secretando enzimas hidrolíticas durante 13permite el anclaje de la hifa infectiva y posibilita a su vez el crecimiento y fijación de otro órgano llamado haustorio (ver Fig. 1A).

4- Colonización del tejido del hospedero

Después de la penetración, los hongos se diseminan a partir del sitio de infección. En el caso de hongos biotrofos o hemibiotrofos en la primera fase de la infección, se establece

un área especializada en intercambio de nutrientes en la zona de contacto con la membrana, en la cual se ha detectado la presencia de transportadores de hexosas, aminoácidos y otras moléculas. Este tipo de interacción es posible debido a que, como ha sido demostrado en *Colletotrichum* y otras especies, en las áreas de contacto los patógenos enmascaran los componentes específicos de su pared celular como quitina, modificándolos químicamente, y así evitan ser reconocidos por los sistemas de defensa celulares.

En el caso de los biotrofos obligados como *Blumeria graminis* f.sp. *hordei*, patógeno de la cebada, cuando la hifa de infección se pone en contacto con la membrana plasmática de la célula del hospedero se inicia la formación del haustorio, que es una estructura de nutrición del hongo que se desarrolla en el interior de una célula epidermal por invaginación de la membrana plasmática. El haustorio tiene una estructura compleja en la que algunos de los componentes se forman a partir de la membrana celular de la planta llamada membrana extrahaustorial (MeEH, Fig. 1A) y otros son producidos por el hongo, como los componentes de la membrana haustorial (MH, Fig. 1A), matriz extrahaustorial (MaEH, Fig. 1A), etc. A través de este conjunto de estructuras, el hongo absorbe agua, minerales y otros nutrientes (Catanzariti et al., 2007).

En el caso de los hongos hemibiotrofos, esta estructura haustorial no llega a desarrollarse tanto, aunque cumple con las mismas funciones nutricionales para el hongo (Fig. 1B). En la segunda fase de desarrollo en los tejidos del hospedero, los microorganismos hemibiotrofos modifican su metabolismo, dando lugar al crecimiento de un nuevo tipo de hifa, una “hifa necrotrófica secundaria”, de menor diámetro que puede atravesar la membrana plasmática, ramificarse dentro de la célula y destruir posteriormente al hospedero.

Patógenos necrotrófos como *Botrytis cinerea*, después de degradar por medio de enzimas las paredes celulares del hospedero, producen una amplia variedad de compuestos fitotóxicos que afectan importantes procesos celulares, los que conducen a la degradación de componentes estructurales y funcionales de

la célula del hospedero, los que luego son usados por el hongo para su propia nutrición.

RESPUESTAS DE DEFENSA DE LA PLANTA.

En la naturaleza, las plantas están expuestas al ataque de organismos patógenos diversos como virus, bacterias, hongos, insectos y herbívoros, entre otros. Para hacer frente a ellos han desarrollado varios mecanismos de defensa que se desencadenan específicamente luego del reconocimiento del atacante, y que deben ser regulados para minimizar los efectos negativos de esta respuesta sobre otros procesos de la célula, como el crecimiento.

Como se dijo, a medida que invaden los tejidos del hospedero, las estructuras infectivas del hongo se ponen en contacto con la pared celular de las células vegetales y secretan una serie de enzimas conocidas como **enzimas de degradación de la pared celular** que incluyen, como se mencionó anteriormente, celulasas, poligalacturonasas, xilanasas y proteinasas (Fig. 1B). Los fragmentos de pared celular derivados de estas actividades enzimáticas pueden actuar también como elicitores de la respuesta de defensa vegetal, aunque en otros casos la suprimen. En los sitios donde se produce la degradación de la pared celular el hongo accede al apoplasto y su presencia es percibida por una serie de receptores que se encuentran en la membrana plasmática, denominados receptores de reconocimiento de patrones o RRP, capaces de reconocer epítopes conservados dentro de moléculas que son imprescindibles para la supervivencia del patógeno, las cuales en conjunto reciben el nombre de MAMPs, por las siglas en inglés de “Microbial Associated Molecular Patterns” (Glazebrook, 2005). Entre estas moléculas se encuentra la quitina, constituyente específico de la pared celular de los hongos que es reconocida por receptores RRP que poseen un dominio denominado Lys-M. La unión del ligando a estos receptores desencadena una serie de eventos subcelulares que inducen finalmente la expresión de genes relacionados a la defensa de la planta.

Como señal de la respuesta de defensa desencadenada en el hospedero, inmediatamente debajo del sitio de formación del apresorio, se

observa un reordenamiento de los componentes del citoplasma y migración del núcleo, en los que participan componentes del citoesqueleto como la actina (Fig. 1B). El espacio entre pared celular y membrana plasmática en el sitio de penetración comienza a engrosarse por el depósito de calosa, compuestos fenólicos, lignina, celulosa, pectina, proteínas como las glicoproteínas ricas en hidroxiprolina y peroxidases, formando la papila que rodea a la hifa de infección. La síntesis, deposición y ensamble de todos estos materiales está acompañada por la liberación de especies reactivas de oxígeno (ERO) entre las cuales se encuentra el peróxido de hidrógeno. Las ERO desempeñarían al menos tres funciones en la defensa de la planta: (i) crean el ambiente apropiado que promueve el proceso de lignificación y la formación de puentes cruzados entre residuos de aminoácidos de las proteínas de la pared celular (lo que las torna más resistentes al ataque de enzimas fúngicas), (ii) poseen también una acción tóxica directa sobre el patógeno frenando su crecimiento, y (iii) sirven como moléculas señales para inducir la expresión de algunos genes relacionados a la defensa.

A lo largo de la evolución y como modo de superar las respuestas inducidas en la planta, los hongos fitopatógenos han evolucionado hacia la producción de una serie de moléculas denominadas efectores fúngicos, las cuales pueden actuar a distintos niveles. La naturaleza química de estos efectores es diversa, lo que ha dificultado su identificación. Las plantas resistentes expresan proteínas productos de genes de resistencia o *R* (Fig. 1A), capaces de detectar la presencia de efectores (factores de avirulencia) y desencadenar eventos relacionados a la transducción de señales e.g. cascada de MAP quinasas (Fig. 1B) que finalmente activan una defensa efectiva en estos hospederos.

Como consecuencia de esta interacción, en la célula en contacto con el agente invasor y en aquellas que la rodean puede desencadenarse la respuesta de hipersensibilidad o HR, que consiste en un complejo pero organizado mecanismo de suicidio llamado también muerte celular programada (PCD), acompañado de la inducción de respuestas defensivas locales (LAR: resistencia local adquirida) y sistémicas (SAR: resistencia sistémica adquirida), siendo

estas últimas efectivas en sitios distantes del de infección. La respuesta de hipersensibilidad es considerada como uno de los factores más importantes que frena el desarrollo de los patógenos biotrofos o en la etapa biotrófica de los hemibiotrofos, impidiendo su acceso a los nutrientes y confinándolo al sitio inicial de la infección. Sin embargo, en el caso de patógenos necrotrofos, capaces de producir toxinas que inducen la muerte celular, tiene un efecto opuesto ya que facilita la colonización de las plantas.

Después del reconocimiento del patógeno se activan dos vías de transducción de señales principales, una dependiente de ácido salicílico y la otra que depende de etileno y ácido jasmónico. En muchos puntos estas vías se interconectan y modulan, fenómeno conocido como “cross-talk” (Dangl y Jones, 2001; Glazenbrook et al., 2003). En general y a modo muy simplificado hasta tanto se diluciden los mecanismos involucrados en la llamada resistencia horizontal o poligénica, se puede aceptar que la resistencia a organismos biotrofos se establece a través de la vía de transducción de señales dependiente de ácido salicílico, en tanto que la resistencia a necrotrofos depende de la vía de etileno/ácido jasmónico.

GENOMICA DE HONGOS PATOGENOS

La secuenciación de los genomas completos de muchas especies fúngicas permitió algunos avances en el conocimiento de los procesos biológicos relacionados a los mecanismos de proliferación de los hongos fitopatógenos en los tejidos del hospedero, e influyó en el diseño de las estrategias de investigación para tratar de responder sobre aspectos de este proceso que aún se desconocen.

En la actualidad se ha completado la secuenciación del genoma completo de algunos hongos causantes de importantes daños en cultivos como *Magnaporthe oryzae* (Dean et al., 2005) causante del tizón del arroz, *Ustilago maydis*, y *Fusarium*, entre otros; el estado de los proyectos de secuenciación de otros genomas fúngicos puede ser consultado en www.ncbi.nlm.nih.gov.

Sin embargo, el análisis de la gran cantidad de datos generados puede transformarse en un factor limitante, que requiere la creación de

mejores herramientas bioinformáticas, la conformación de grupos de investigación interdisciplinarios para dilucidar la función de los nuevos genes, y como desafío en el futuro, para integrar los conocimientos y aplicarlos en la agricultura a gran escala (Xu et al., 2006).

ESTRATEGIAS BIOTECNOLÓGICAS

Después de haber presentado los aspectos más sobresalientes de los procesos de interacción entre plantas y patógenos fúngicos, en esta sección se pretende dar algunas ideas y ejemplos de investigación que tienda a implementar estrategias agrícolas para un manejo sustentable y eficiente del estrés biótico en general y fúngico en particular, minimizando el impacto sobre el medio ambiente y la salud, tanto de consumidores como de operadores de toda la cadena agroindustrial. Se aborda la búsqueda y utilización de biocontroladores (bioinductores y biopesticidas propiamente dichos) de origen vegetal y microbiano, la caracterización de genes que pudieran estar involucrados en la defensa vegetal y la transferencia de los mismos por ingeniería genética.

1 - Inductores de la Respuesta de Defensa de Origen Microbiano y Vegetal

Uno de los procesos naturales que se intenta aprovechar para el desarrollo de estrategias de control de enfermedades, es la capacidad que tienen las plantas de defenderse del ataque de patógenos. Como se ha visto, se sabe que las plantas reaccionan ante un estrés biótico utilizando diversos mecanismos que se manifiestan cuando se ponen en contacto con un patógeno o con sustancias químicas derivadas de éstos. Esta interacción puede conducir a que la planta no contraiga la enfermedad o lo haga en forma muy débil si percibe a tiempo las señales del patógeno (inductores o elicitores) y logra inducir una respuesta de defensa, pero se enfermará si no logra detectarlas o si lo hace muy tardíamente (Dangl y Jones, 2001). En el primer caso se dice que la interacción es del “tipo incompatible” y el patógeno es “avirulento” y en el segundo, se trata de una “interacción compatible” y el patógeno es “virulento”.

Un hecho interesante que es la base de una de las estrategias de protección posibles, es

que algunos patógenos pueden comportarse como avirulentos con algunos genotipos de plantas y como virulentos con otros genotipos. Dicho en otras palabras, esto significa que “por alguna razón” ese patógeno puede desencadenar una respuesta de defensa en aquellos genotipos de planta donde establece una interacción del tipo “incompatible”. La Figura 2 muestra a modo de ejemplo como aislados de hongos patógenos del genero *Colletotrichum* pueden presentar diversos Índices de Severidad (IS) de la enfermedad (“antracnosis”) en frutilla, lo que pone en evidencia la existencia de patotipos (tipos o genotipos patogénicos). Hay cultivares de frutilla que se muestran muy resistentes para algunos patotipos ($1 < IS < 2$) mientras que son muy susceptibles para otros aislados del patógeno ($4 < IS < 5$); ver como ejemplo al cultivar Pájaro que presenta gran resistencia al aislado SS71 mientras que es altamente susceptible al aislado M11.

Este resultado sugiere que cuando las plantas son expuestas a un patógeno que se comporta como avirulento, es decir que establece

una interacción del tipo incompatible, no se enferman (o lo hacen en menor grado) porque que estos aislados inducen una serie de reacciones fisiológicas que conducen al desarrollo de una respuesta de defensa. Estudios posteriores confirmaron esta hipótesis, demostrando que el efecto observado se debe efectivamente a la inducción de una verdadera respuesta de defensa de la planta (Salazar et al., 2007). Este fenómeno nos permite imaginar que sería posible utilizar este tipo de interacciones entre plantas y microorganismos para desarrollar estrategias alternativas a las convencionales, para controlar la incidencia de enfermedades fúngicas. Sin embargo, si bien lo antedicho es cierto, para intentar una aplicación directa tienen que ser superado algunos inconvenientes que se discuten a continuación.

La debilidad de esta aproximación radica en que en los campos donde se realiza el cultivo, muchas veces los agricultores no utilizan una única línea genética del cultivo (cultivar o variedad), ni el cultivar específico para el cual el biocontrolador (patógeno avirulento) es efecti-

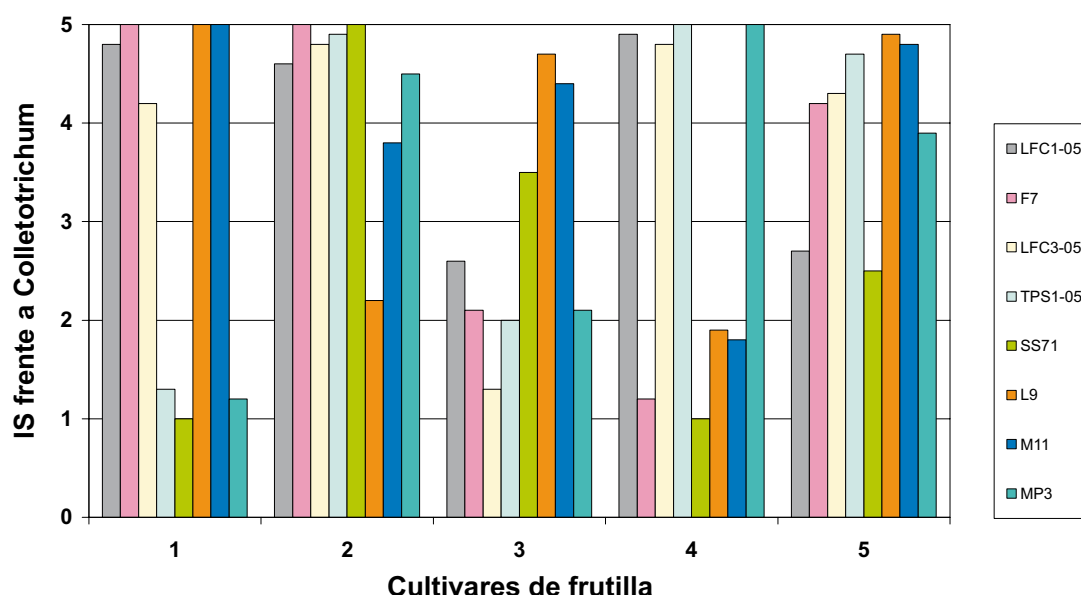


Figura 2: Susceptibilidad de cinco cultivares de frutilla a ocho aislados diferentes de *Colletotrichum* sp. La susceptibilidad es evaluada por el Índice de Severidad (IS) utilizando una escala de 1 a 5, siendo 1 muy resistente y 5 muy susceptible.

vo. Esta condición hace que la utilización de ese factor biótico para inducir la respuesta de defensa, aunque sea avirulento y efectivo para una variedad en particular, puede ser capaz de producir enfermedad en otro cultivar, provocando efectos no deseados en el cultivo.

Para solucionar este inconveniente se propuso la utilización de patógenos muertos o inactivados que conserven la capacidad de inducir la respuesta defensiva en el vegetal, o extractos provenientes de estos microorganismos inactivados, de otros no patógenos que contengan elicitores de la defensa (mantengan el poder inductor), o la utilización directa de compuestos vegetales capaces de intermediar o de actuar como inductores naturales de la defensa innata de las plantas.

Como se muestra en la Figura 3, se investigó la capacidad de extractos estériles de un patógeno de frutilla para inducir una respuesta de

defensa en plantas susceptibles de frutilla. Se pudo probar que la fracción particulada (EC) y soluble (sobrenadante, SN) de extractos de conidios obtenidos del aislado avirulento (M23) del hongo *Colletotrichum fragariae*, mostraron capacidad de inducir la respuesta de defensa en plantas sanas de frutilla cuando son aplicados en forma previa a la infección con un patógeno virulento de *C. acutatum*, y que la protección adquirida podría perdurar en el tiempo (ver Fig. 3, EC9, EC30, SN9 y SN30). Los Resultados mostraron que plantas tratadas de este modo, no manifiestan síntomas de la enfermedad aún hasta 50 días posterior a la infección (ver Fig. 3, EC50 y SN50; DSR = 1) y que ese efecto, del mismo modo que el producido por el hongo activo, se debía a la inducción de una respuesta de defensa de la planta (Chalfoun et al., 2007).

Desde el punto de vista tecnológico se po-

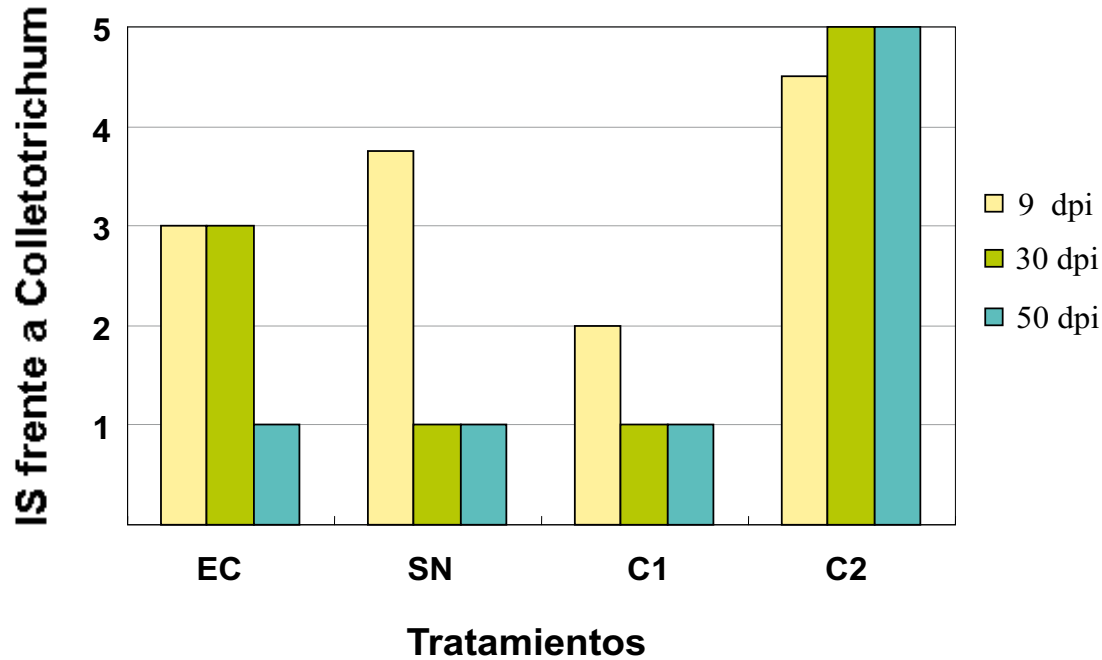


Figura 3: Evolución de la enfermedad evaluada como IS (índice de severidad) a los 9, 30 y 50 dpi (días posteriores a la infección con un aislado virulento de *C. acutatum*) de plantas de frutilla del cultivar Pájaro pretratadas con: EC, extracto estéril de conidios del aislado avirulento M23 de *Colletotrichum* sp.; SN, sobrenadante estéril de un cultivo del aislado avirulento M23 de *Colletotrichum* sp.; C1, conidios activos del aislado avirulento M23 de *Colletotrichum* sp.; C2, agua destilada estéril. La susceptibilidad es evaluada por el Índice de Severidad (IS) utilizando una escala de 1 a 5, siendo 1 muy resistente y 5 muy susceptible.

dría esperar que la utilización de estos extractos fúngicos solucione el problema mencionado arriba referido a la inconveniencia de usar patógenos vivos para el desarrollo de biocontroladores. Sin embargo, esta nueva estrategia también puede conllevar aspectos no tan ventajosos que deben tenerse en cuenta antes de intentar su utilización directa como agente de biocontrol. Los inconvenientes previsibles se refieren al grado de especificidad que pueden tener estos inductores con el cultivar utilizado, es decir, del espectro varietal de acción. Lo ideal sería que, por una simple cuestión de amortizaciones y costos, el efecto inductor fuera efectivo en muchas variedades de frutilla y aún mejor, en otros cultivos vegetales. Dicho de otra manera, que estos extractos pueden servir para proteger otras variedades u otras especies agrícolas de sus patógenos más agresivos. En este sentido, es recomendable realizar ensayos con otros cultivares y especies vegetales para comprobar el grado de especificidad que pueda manifestar este tipo de elicitors, ya que si se analiza el origen de ese “inductor” se podría pensar que se trata de una proteína del tipo Avr (proteínas del patógeno que interactúan específicamente con productos de genes de resistencia *R*), y por lo tanto tener efecto únicamente si son reconocidas por las proteínas codificadas por un gen *R* específico de la planta (Datta y Muthukrishnan, 1999). Esta última aseveración se sustenta en la teoría del reconocimiento “gen-a-gen” propuesta por de Flor ya en 1956, por lo que deberíamos esperar una respuesta muy específica, es decir, restringida a una especie e inclusive un cultivar determinado de la misma. En caso de ser cierta esta hipótesis, deberíamos esperar un rango de acción muy reducido de estos extractos, por lo que la aplicación de esta estrategia, quedaría reducida a un número pequeño de genotipos de una especie vegetal.

En estos casos habría que pensar en otra aproximación tecnológica que permita un uso más amplio de los elicitors de defensa. En ese sentido, se están investigando otros compuestos de origen natural con resultados interesantes, algunos de los cuales son extractos inactivos o proteínas purificadas de microorganismos como el “harpin” que es una es

una proteína derivada de la bacteria *Erwinia amylovora* con actividad elicitora de la defensa, o metabolitos secundarios (no proteicos) de plantas (Filippone et al., 2001). Se debería esperar que el mecanismo de inducción de la respuesta de defensa utilizado por estos productos o compuestos sea menos restringido al estar más conservado en el reino vegetal, lo que permitiría prever un rango de acción extendido no sólo a otras variedades comerciales de frutilla sino a otras especies cultivadas. Resultados preliminares obtenidos nos permiten abrigar esperanzas en esta dirección.

Todos estos resultados, nos hacen entrever un futuro muy promisorio en las investigaciones orientadas a la extracción, purificación y caracterización de moléculas con capacidad de inducir la respuesta defensiva de las plantas, ya sean de origen vegetal o microbiano, para la formulación de bioinductores de amplio espectro, capaces de tener actividad sobre diferentes variedades de distintos cultivos.

2 Utilización de Genes Potencialmente Involucrados en la Respuesta Defensiva

Otra estrategia posible consiste en utilizar genes involucrados en la defensa vegetal, que pudieran conferir resistencia total o al menos un incremento parcial de la resistencia en plantas de interés. Esto debería lograrse por expresión homóloga (e.g. cuando el gen que se introduce por vía no sexual proviene de la misma especie) o heteróloga (e.g. cuando el gen proviene de una especie distinta a la que se está transformando), utilizando herramientas de ingeniería genética. En estos casos, para incrementar las expectativas de éxito de esta estrategia, se suelen elegir variedades de alto potencial productivo pero susceptibles a las principales enfermedades. La pregunta que surge es qué tipo de genes convendría considerar y esa pregunta no tiene una respuesta trivial y es muy dependiente de la especie de interés y la información disponible sobre los genes que muestren algún valor potencial.

A grandes rasgos y hasta tanto se diluciden los mecanismos involucrados en la resistencia poligénica u horizontal, o se disponga de métodos para clonar (aislar) e introducir grandes porciones cromosómica por una vía no sexual,

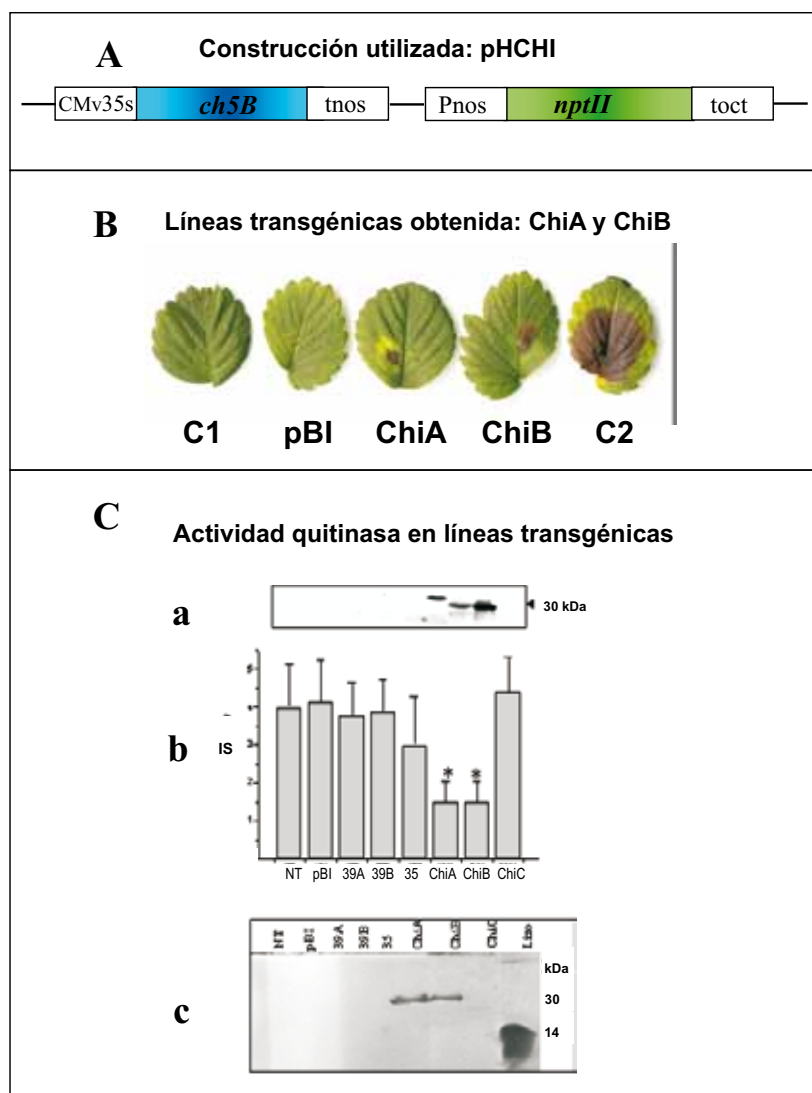


Figura 4: Aumento de la resistencia inducida por la expresión heteróloga de un gen de quitinasa (*ch5B*) proveniente de *Phaseolus vulgaris*. A) pHCHI, constructo utilizado para la expresión del gen de quitinasa en plantas de frutilla (cultivar Pájaro). CMv35s, promotor constitutivo proveniente del virus de mosaico del coliflor; tnos, terminador proveniente del gen de nopalino sintasa (*nos*) del plásmico Ti de *Agrobacterium tumefaciens*; Pnos, promotor proveniente del gen de la nopalino sintasa del plásmico Ti de *A. tumefaciens*; toct, terminador proveniente del gen de octopina sintasa (*oct*) del plásmico Ti de *A. tumefaciens*; *nptII*, gen de la neomicina fosfotransferasa que otorga resistencia a neomicina a los tejidos transformados de plantas. B) Resultados de ensayos de susceptibilidad al hongo patógeno *Botrytis cinerea* de hojas de plantas de frutilla (cv. Pájaro). C1, control de planta no transformada y no inoculada; pBI, control de planta transformada con el vector de expresión sin el inserto de la quitinasa y no inoculado; ChiA y ChiB, hojas de dos líneas plantas transformadas obtenidas en forma independiente e inoculadas con el patógeno; C2, control de planta no transformada e inoculada con el patógeno. La inoculación se realizó con 10 μ l de una suspensión de 10^6 conidios/ml. Las hojas fueron colocadas bajo condiciones controladas de temperatura, luz y humedad, evaluándose el desarrollo de la enfermedad a los 5 dpi. C) Evaluación de la expresión (a), índice de susceptibilidad (b) y actividad de la quitinasa en hojas de frutilla (c) no transformada (NT), transformada con el vector sin inserto (pBI), de líneas transgénicas que expresan (ChiA y ChiB) y que no expresan (39A, 39B, 35, ChiC) el gen de la quitinasa *ch5B*; Lizo, proteína utilizada como marcador de peso molecular correspondiente a Lysozima (figura extraída de Vellicce *et al.*, 2006)

se puede decir que los genes involucrados en la defensa vegetal y por tanto utilizables, pueden ser de dos tipos: (i) aquellos asociados a la respuesta de defensa y (ii) los denominados genes de resistencia de tipo *R*, los que pueden ser a su vez de varios tipos diferentes. Para que esta estrategia pueda tener alguna posibilidad de éxito, es necesario además que se cumplan algunas condiciones. Si se trata de un gen asociado a la respuesta defensiva, el producto de ese gen debe tener una actividad conocida que permita prever una acción deletérea sobre el patógeno (por ejemplo antibiótica) y consecuentemente de protección a la planta (Datta and Muthukrishnan, 1999). En cambio, si se trata de un gen de resistencia tipo *R* no hace falta conocer su actividad específica, pero si debe tener la capacidad de reconocer al patógeno en forma directa o indirecta por medio del producto de un gen *avr* del mismo (Axtell and Staskawicz, 2003; Mackey et al., 2002, 2003).

Entre los genes más promisorios, se pueden mencionar aquellos que codifica para alguna proteína relacionada con la defensa vegetal como ser: quitinasas, glucanases, entre las que tienen actividad enzimática hidrolíticas de componentes de la pared celular de hongos. Pero también pueden ser de genes que codifican para enzimas que no están relacionadas directamente con actividades hidrolíticas, pero están sin embargo relacionadas a la regulación del metabolismo de especies reactivas del oxígeno (i.e. glutathione S transferases o GSTs, superóxido dismutasas o SODs, peroxidasas, etc), al transporte de lípidos (i.e. lipooxygenasas, LTPs, etc.), o simplemente que no tengan actividad conocida, pero cuya participación en la respuesta de defensa haya sido probada (i.e. proteínas de transporte de calcio, receptores de etileno, MAMPs, etc.). Particularmente interesante son aquellos genes que aún cuando sus productos no poseen una actividad antibiótica directa, codifican para proteínas que participan en la señalización de la respuesta defensiva, ya sea por que regulan etapas de la cascada de señalización (i.e. NPR1, GSTs), o la expresión de genes asociados a la defensa (i.e. genes *R*) (Tang et al., 1999; Kim et al., 2002; Tonello et al., 2006; Martinez Zamora et al., 2008).

En los últimos años se ha incrementado el interés por la búsqueda de genes de resistencia, no sólo por la posibilidad de utilización para la obtención de variedades resistentes, sino para dilucidar mecanismos de control y regulación de la respuesta de defensa, y de factores que determinen la susceptibilidad o resistencia de la planta hacia un patógeno.

Este planteo permite visualizar al menos, tres estrategias posibles (no excluyentes) que pueden contribuir significativamente al mejoramiento fitopatológico de cultivares. Por un lado, se podría intentar por ingeniería genética aumentar la frecuencia de alelos (variantes génicas) de genes tipo *R* que contribuyan a incrementar la resistencia a enfermedades. Por otra parte, se podría bloquear o anular la expresión de genes de la planta que permiten el progreso de la enfermedad, o intentar sobre-expresar en variedades susceptibles, genes cuya actividad nos permita incrementar la resistencia. De esto se trata la siguiente sección.

3 Transferencia de Genes Involucrados en la Respuesta Defensiva por Ingeniería Genética

La estrategia consiste en utilizar recursos genéticos disponibles con alto potencial de rendimiento, e incorporar por ingeniería genética unos pocos genes ausentes en los genotipos de partida (variedades o cultivares), que le confieran un incremento de resistencia a enfermedades fúngicas. La literatura en ese sentido es tan extensa que para lo que se pretende en este capítulo sería imposible resumirla. Sin embargo, quisiéramos resaltar dos aspectos y detenernos sólo en uno de ellos: el primero se refiere al impacto socio-cultural que puede implicar la introducción de OGMs (organismos genéticamente modificados por ingeniería genética) en el mercado y el otro, a la factibilidad de lograr los mismos objetivos por otra metodología. Con respecto al primer aspecto mencionado, sólo diremos que desde el punto de vista científico hay que tener en cuenta por un lado, que el nuevo genotipo portador de los genes introducidos mantenga o mejore sus propiedades en relación a la salud de consumidores y operarios, y por otra parte, que los nuevos genes no puedan transferirse sin control a otras

especies vegetales emparentadas. Respecto de la posibilidad de alcanzar el mismo objetivo con otra aproximación tecnológica, como por ejemplo la mejora genética convencional o clásica, en este caso habría que evaluar el costo real, es decir, por ejemplo contraponer el tiempo necesario para introducir la característica por la vía convencional, con el requerido para lograr la desregulación y la autorización de uso del cultivar transgénico. También habría que conocer previamente, si la característica genética a transferir está o no en un germoplasma que pueda cruzarse y dar descendencia fértil con la especie cultivada o variedad que se desea mejorar.

Como ejemplo vamos a mencionar la interacción entre frutilla y dos patógenos fúngicos: *Colletotrichum acutatum* y *Botrytis cinerea*. El primero causante de la enfermedad llamada antracnosis y el segundo de la podredumbre o moho gris. Como puede verse en la Fig. 2, estudios fitopatológicos realizados de la interacción entre genotipos de *Colletotrichum* con distintos cultivares de frutilla (*Fragaria x ananassa*), muestran que un aislado particular de hongo puede atacar con distintos grados de severidad a diferentes cultivares de frutilla y también, que un cultivar de frutilla puede ser afectado de manera diferente por distintos aislados de hongos patógenos. Este resultado claramente muestra que no sólo hay variabilidad genética en los hongos patógenos para el carácter de patogenicidad/virulencia, sino que en la frutilla hay también variabilidad genética para el carácter de resistencia. Este dato es de gran importancia para analizar distintas estrategias alternativas para otorgar a cultivares de frutilla resistencia a la antracnosis o al moho gris. Esto significa que habrá que analizar bien, cuál metodología, si la clásica o la de transgénesis, conviene utilizar para transferir la característica desde el material genético poco domesticado a otro más domesticado. Concretamente todos los programas de mejoramiento genético del mundo intentan contestar esta pregunta.

Sin embargo, puede ocurrir que un cultivo determinado no muestre variabilidad genética para el carácter de resistencia hacia un patógeno, por lo que no sería posible mejorar el cultivo por una aproximación convencional (e.g.

cruzamientos y selección) y la obtención de un OGM que exprese un gen heterólogo que confiera resistencia, podría ser una alternativa muy adecuada. Este es el caso de la interacción entre frutilla y *Botrytis*: no se encontró ninguna variedad de frutilla con resistencia hacia *Botrytis*, por lo que se decidió incorporar la resistencia por ingeniería genética. En la Figura 4 se muestran resultados obtenidos para una variedad de frutilla (Pájaro) susceptible a la enfermedad de moho gris. La estrategia consistió en la expresión de un gen heterólogo (*ch5B*) que codifica para una proteína (Ch5B) del tipo PR asociada a la respuesta de defensa en poroto o *Phaseolus vulgaris*. En la Figura 4A se muestra la construcción utilizada para transformar el cultivar Pájaro de frutilla, con la cual se obtuvieron dos líneas transgénicas que expresaban la quitinasa en forma correcta y activa: ChiA y ChiB. También (Figura 4B) se muestran los resultados de un ensayo de infección con *Botrytis* en hoja desprendida, en el que se puede apreciar el grado de protección conferida por la expresión del transgen (o gen introducido por ingeniería genética) en plantas transformadas (ChiA y ChiB), en comparación con controles no transformados (C1, C2) o transformados con el plásmido sin el inserto del gen *ch5B* (pBI) (Vellíche et al., 2006, Qin et al., 2008). Esta enfermedad es de gran incidencia en casi todos los agro-ecosistemas donde se cultiva frutilla en el mundo. El gen *ch5B* utilizado codifica para una proteína con actividad quitinasa, cuya actividad antifúngica ya había sido previamente probada (Benhamou et al., 1993). Estos resultados permiten comprobar que la expresión de ese gen de quitinasa es capaz de disminuir la susceptibilidad (IS) de este cultivar hacia *Botrytis* (Fig. 4Ca y 4Cb) y que ese carácter estaba asociado a la actividad de esta quitinasa (Fig. 4Cc).

Otra estrategia interesante para el manejo de *Botrytis* en frutilla es aquella reportada por Hanhineva (2008). Su propuesta consistió en utilizar las propiedades antifúngicas de las iso-flavonas, sobre-expresando uno de los genes responsables de su síntesis, la *estilbeno sintasa*, en genotipos sensibles de frutilla. Así pudo demostrar que esta aproximación transgénica también permite obtener cultivares de frutilla con tolerancia al moho gris incrementada.

Estos resultados muestran claramente que la vía de la modificación genética por transgénesis, es una estrategia posible y puede contribuir efectivamente al manejo de enfermedades producidas por patógenos fúngicos, disminuyendo los riesgos de efectos nocivos para el medio ambiente y la salud humana, que tienen los fungicidas de origen sintético.

4 Conclusiones

En este capítulo se mostró como el conocimiento básico de los mecanismos de defensa y los factores involucrados en la respuesta defensiva o en la resistencia, permite diseñar desde la biotecnología, métodos racionales, sustentables e integrados, para afrontar el desafío que significa el control de enfermedades fúngicas en la agricultura, dentro de un marco de protección de la salud humana y del medio ambiente. Sin embargo, no podemos dejar de mencionar que hay aún un largo camino por recorrer, tanto para establecer protocolos validados a campo como para lograr que la desregulación de transgénicos, no afecte el progreso esperado y la disponibilidad de esta herramienta en los países menos desarrollados. Estos resultados también estimulan a continuar con el desarrollo de nuevas líneas de investigación que, con una base fuertemente científica, puedan brindar sustentabilidad social, económica y ambiental a la agricultura, que es la base ancestral y moderna de la producción de alimentos y por ende, del desarrollo de la humanidad.

Reconocimientos: Los trabajos mencionados en este capítulo fueron financiados parcialmente con fondos de Agencia Nacional de Promoción Científica y Tecnológica (FONCyT): PICTO 2004 759, Universidad Nacional de Tucumán: CIUNT 26/D346 y CONICET: PIP 6441. NCh y CG son becarios del CONICET, y JCDR y APC son investigadores del CONICET.

5 Bibliografía

Agrios GN. (2004). Plant Pathology. Elsevier Inc., Oxford, UK

Axtell MJ and Staskawicz BJ. (2003). Initiation of RPS2-specific disease resistance in Arabidopsis is coupled to the AvrRpt2-directed elimination of RIN4. Cell, 112, 369-377.

Benhamou N, Broglie K, Chet I and Broglie R (1993) Cytology of infection of 35S-bean chitinase transgenic canola plants by *Rhizoctonia solani*: cytochemical aspects of chitin breakdown *in vivo*. Plant J, 4, 295-305.

Catanzariti, A-M, Dodds, P.N. and Ellis, J.G. (2007). Avirulence proteins from haustoria-forming pathogens. FEMS Microbiol. Lett. 269:181-188.

Chalfoun NR, Muñoz Blanco J, Caballero Repullo JL, Castagnaro A, Díaz Ricci JC. (2007). Proteins secreted by an avirulent strain of *Colletotrichum* spp. induce resistance in strawberry. *Biocell* 31 (suppl): 124. Abstract PL-

Datta S.K and Muthukrishnan S. (1999) Pathogenesis-Related Proteins in Plants. CRC Press, Boca Raton, FL. pp 291-288

Dangl J.L. and Jones J.D.G. (2001). Plant pathogens and integrated defense responses to infection. Nature, 411, 826-833.

Dean RA, Talbot NJ, Ebbole DJ, Farman ML, Mitchell TK (2005) The genome sequence of the rice blast fungus *Magnaporthe oryzae*. Nature 434:980-86.

Filippone MP, Díaz Ricci JC, Castagnaro A and Farias RN. (2001). Effect of Fragarin on the Cytoplasmic Membrane of the Phytopathogen *Clavibacter michiganensis*. Molecular Plant-Microbe Interactions, 14, 925-928.

Flor HH (1956) The complementary genic systems in flax and flax rust. Advance Genetics, 8, 29-54.

Glazebrook J. (2005) Contrasting Mechanisms of Defense against Biotrophic and Necrotrophic pathogens. Ann Rev Phytopathol 43:205-27.

Glazebrook J, Chen W, Estes B, Chang HS, Nawrath C. (2003) Topology of the network integrating salicylate and jasmonate signal transduction derived from global expression phenotyping. *Plant J*. 34:217-28

Hanhineva, K. (2008). Metabolic engineering of phenolic biosynthesis pathways and metabolite profiling of strawberry (*Fragaria x ananassa*). *Kuopio Univ. Public. C. Nat. Environ. Sci.* 231: 1-89.

Kim YJ, Lin NC, Martin GB (2002) Two distinct *Pseudomonas* effector proteins interact with the Pto kinase and activate plant immunity. Cell, 109, 589-598.

Mackey D, Holt BF, Wiig A. and Dangl JL. (2002). RIN4 interacts with *Pseudomonas syringae* type III effector molecules and is required for RPM10-mediated resistance in Arabidopsis. Cell, 108, 743-754.

- Mackey D, Belkhadir Y, Alonso JM, Ecker JR and Dangl JL. (2003). Arabidopsis RIN4 is a target of the type III virulence effector AvrRpt2 and modulates PRP2-mediated resistance. *Cell*, 112, 379-389.
- Martínez Zamora, M.G., Castagnaro, A.P. and Díaz Ricci, J.C. (2008). Genetic diversity of Pto-like serine/threonine kinase disease resistance genes in cultivated and wild strawberries. *J.Mol. Evol.* 67, 211-221.
- Oin Y, Teixeira da Silva J, Zhang L, Zhang Sh (2007) Transgenic strawberry: State of the art for improved traits. doi:10.1016/J Biotechnology Advances 2007.12.004.
- Salazar, S.M.; Castagnaro, A.P.; Arias, M.E.; Chalfoun, N.; Tonello, U. and Díaz Ricci, J.C. (2007). Induction of a defense response in strawberry mediated by an avirulent strain of *Colletotrichum*. *European Journal of Plant Pathology*, 117, 109-122.
- Tang X, Xie M, Kim YJ, Zhou J, Klessig DF, Martin GB (1999) Overexpression of Pto activates defence responses and confers broad resistance. *The Plant Cell*, 11, 15-30.
- Tonello U, Mamani MA, Salazar SM, Grellet C, Tortora ML, Castagnaro AP and Díaz Ricci JC Antioxidant activity and SA accumulation associated to the defense response in strawberry. 42 Reunión Anual de SAIB. Noviembre 12-15, 2006. Rosario, Santa Fe, Argentina. Abstract PL-P32, p. 128.
- Vellicce, G.; Diaz Ricci, J.C.; Hernandez Garcia, L and Castagnaro, A. (2006). Enhanced resistance to *Botrytis cinerea* mediated by the transgenic expression of the chitinase gene ch5B in strawberry. *Transgenic Research*, 15, 57-68.
- Xu J, Peng Y, Dickman MB, Sharon A (2006) The Dawn of Fungal Pathogen genomics. *Ann Rev Phytopathol* 44:337-66.

V . CAPÍTULO 9

Utilización de cultivos de tejidos para la obtención y conservación de plantas libres de enfermedades.

Vilma C. Conci.

Cultivo de meristema

El cultivo de meristema ha sido utilizado con éxito para distintos objetivos, entre ellos la rápida clonación de material deseable (micropropagación), la conservación de germoplasma a bajas temperatura (criopreservación), y la obtención de plantas libres de patógenos sistémicos, entre ellos los virus.

Esta técnica consiste en aislar el meristema (explanto) y sembrarlo en un medio de cultivo adecuado que posibilite el desarrollo de una planta completa. El término cultivo de meristema por lo general, no es correctamente empleado, ya que en la mayoría de los casos, se siembra el domo meristemático acompañado por uno o dos primordios foliares. El domo es una estructura generalmente menor a 0,1 mm muy difícil de extraer en forma aislada, y de la cual resulta con frecuencia complicado obtener una planta completa. Para ello, es necesario un medio de cultivo con concentraciones de hormonas y sales equilibradas y condiciones ambientales estrictas, por consiguiente, esto ha llevado a que los resultados en ese sentido sean muy pobres. Por esta razón, en la mayoría de los casos, se utiliza el domo meristemático acompañado de 1 ó 2 primordios foliares. Quizás lo aconsejable sería utilizar el término cultivo de "yema", "brote" o "tallo". A pesar de ello, utilizaremos la denominación cultivo de meristema por ser esta la terminología más difundida, aunque no estrictamente correcta.

En general se considera que las plantas provenientes del cultivo de meristema son idénticas, u homólogas, a la planta madre de donde se extrajo el explanto. Por el contrario, las plantas derivadas de otros tejidos como callos, nucela, primordios florales o protoplastos, usualmente presentan distintos grados de va-

riabilidad. Esto último no es deseable para la producción de plantas libres de virus, donde el objetivo que se persigue es mejorar la sanidad de la planta sin modificar sus cualidades agronómicas. Es importante aclarar que han sido reportadas ciertas mutaciones en plantas provenientes de cultivo de meristema, pero con mucha menos frecuencia y menos importantes que las detectadas con otros sistemas de obtención de plantas *in vitro*.

Eliminación de virus

Los virus de plantas son responsables de importantes pérdidas en los rendimientos, llegando en algunos casos a ser limitantes para el cultivo. La mayoría de ellos no se transmiten por semilla, por lo tanto, las especies que se multiplican por esta vía, tienen la posibilidad de liberarse de estos patógenos en forma natural.

Por otra parte, las especies que se propagan exclusivamente en forma agámica no tienen esta ventaja. Cuando son infectadas sistémicamente por virus, estos son transmitidos desde la planta madre a la descendencia con alta eficiencia. Esta situación permite que la infección continúe de generación en generación y se disemine a diferentes regiones a través del comercio de estos propágulos (bulbos, tubérculos, esquejes, etc.). Ejemplo de ello son ajo, frutilla, frutales de carozo o pepita, yuca, papa, batata y numerosas especies ornamentales. En estos casos, la obtención y multiplicación de plantas libres de virus por medios artificiales juega un papel importante para mejorar la producción y calidad.

Una larga lista de especies han sido liberadas de virus a través de la regeneración de plantas *in vitro*. El sistema más frecuentemente utilizado y con mayores éxitos, es el cultivo de meristema suplementado, en algunos casos, por tratamientos de termoterapia o quimioterapia.

Distribución de los virus en las plantas

Los virus en las plantas no están uniformemente distribuidos. En las infecciones sistémicas, algunos están limitados al floema o a pocas células parenquimáticas adyacentes, otros involucran a todas, o casi todas las células de la planta. Algunos virus, dejan sectores sin infectar y sólo unos pocos invaden los nuevos tejidos meristemáticos.

Los meristemas suelen tener pocos o ningún virus. Las razones para ello no están esclarecidas completamente pero se mencionan como posibles las siguientes:

1.- Sistema vascular poco diferenciado. Los virus son rápidamente transportados a lo largo de toda la planta por el floema, y así se distribuyen sistémicamente. Los meristemas no tienen tejido vascular formado por lo tanto el avance es solamente a través del movimiento célula a célula. Se comprobó que el *Tobacco mosaic virus* (TMV) y el *Potato virus X* (PVX) avanzan 1 a 8 cm/h por el tejido vascular y 5 a 15 μm /h célula a célula. Por esta razón se supone que las células meristemáticas no están completamente invadidas por virus cuando están en activo crecimiento.

2.- Alta actividad metabólica. Presumiblemente es más difícil para un virus invadir células con alta actividad metabólica, como las células meristemáticas donde está ocurriendo activa mitosis.

3.- Altas concentraciones de auxinas. Se ha observado que altas concentraciones de 2,4-D en el medio de cultivo inhibe la multiplicación de los virus. Por lo tanto se puede suponer que las altas concentraciones de auxinas endógenas existentes en los ápices meristemáticos pueden producir un efecto similar.

4.- Algunos experimentos sostienen la hipótesis de que la habilidad de los meristemas para escapar de las infecciones virales se debe a un mecanismo de silenciamiento genético viral ocurrido en células meristemáticas, cuyo objetivo es la degradación del ARN viral. El silenciamiento génico es un mecanismo de regulación mediante el cual la célula impide la expresión de un gen. El silenciamiento génico postranscripcional implica la degradación de un ARN mensajero, impidiendo su traducción y de esta forma evitando la síntesis de la proteína correspondiente. Este proceso comienza en la célula a partir de ARN de doble cadena (ARNdc), el cual es procesado por una ARNasa tipo III denominada Dicer (o Dicer-like en plantas). El procesamiento genera fragmentos de 21-26 nucleótidos denominados pequeños ARNs de interferencia (siARN). El siARN se une al complejo de enzimas que degradarán el ácido nucleico (RISC, complejo de silencia-

miento inducido por ARN); este complejo separa la doble hebra del siARN y une sólo una de ellas. La hebra de siARN actuará como guía en la identificación de los ARNs mensajeros blanco de degradación a través del apareamiento de secuencias complementarias.

En algunos organismos como plantas e insectos, este proceso sirve como defensa frente a virus, ya que la mayoría de ellos producen ARN de doble cadena en algún momento del ciclo infeccioso. El mecanismo de silenciamiento puede inhibir la acumulación de virus en una célula e impedir que se difunda, dado que existe un proceso de diseminación sistémica del silenciamiento. Es decir, que la inducción del silenciamiento en la zona de infección genera una señal móvil que inicia el silenciamiento en zonas distantes del organismo. Esta señal podría moverse a través del floema, o de una célula a otra por plasmodesmos.

Existe además un mecanismo basado en un principio similar que regula la expresión de genes endógenos.

Algunos trabajos proponen un modelo de defensa en el cual ciertas proteínas involucradas en el silenciamiento suministran una señal que gatilla una inmediata respuesta de silenciamiento contra el virus en las zonas de crecimiento y en las nuevas hojas emergentes. De este modo el mecanismo de señal de silenciamiento podría explicar, al menos en parte, porque algunos virus, no invaden los meristemas de plantas infectadas.

Factores que pueden afectar la producción de plantas libres de patógenos sistémicos

Varios factores pueden afectar el desarrollo *in vitro* de una planta a partir de un meristema: el medio de cultivo empleado, el estado fisiológico del explanto, la concentración de hormonas endógenas, las contaminaciones internas o externas producidas durante el desarrollo del cultivo, el tamaño y localización del explanto, etc. Mencionaremos aquí algunas consideraciones haciendo especial referencia a aquellas que afectan la obtención de plantas libres de virus.

Localización del explanto. Frecuentemente se utilizan meristemas apicales y axilares

con buenos resultados para la producción de plantas libres de virus. Sin embargo es aconsejable el uso de yemas terminales ya que tienen un mayor crecimiento potencial que las yemas laterales. En general los meristemas más jóvenes se desarrollan mejor que los viejos y producen más plantas libres de virus que las yemas laterales, probablemente porque tienen un crecimiento más activo que las axilares. Sin embargo también es posible la obtención de plantas sanas a partir de yemas axilares.

Estación o momento de la extracción: los meristemas en activo crecimiento son los más recomendados por su alto potencial de desarrollo. Esto también favorece las posibilidades de obtener plantas libres de virus. Para especies vegetales con períodos de dormancia definidos los mejores resultados se obtienen cuando los meristemas están despiertos y comienzan a brotar. En el caso de ser necesario inducir la brotación, los tratamientos más usados consisten en someterlo a períodos de frío (variable según la especie), y/o el uso de ácido giberélico.

Tamaño del explanto utilizado. El meristema necesita una serie de requerimientos nutricionales para cumplir sus funciones de autopropagación y de generar células para formar tejidos definidos. Por lo tanto al ser retirado de la planta debe ser sembrado en un medio de cultivo apropiado, así rápidamente desarrolla una planta completa. Cuanto más pequeño sea el meristema más difícil será encontrar el medio de cultivo adecuado que permita un buen desarrollo. Se ha observado que sembrar sólo el domo meristemático, en general, no da buenos resultados. En la mayoría de los casos sólo produce callo que luego puede regenerar plantas. Como se mencionó anteriormente, la diferenciación a partir de callo implica un incremento en la posibilidad de mutaciones y variabilidad no deseada cuando se intenta obtener plantas genéticamente iguales a la planta donante del explanto. Por esta razón generalmente se cultiva el domo, con uno o dos primordios foliares, a partir del cual se obtiene con frecuencia una planta completa.

El tamaño del explanto así como el número de primordios que deba poseer, dependerá en cada caso del objetivo que se persiga, la

especie vegetal que se trate y el, o los, virus involucrados. En términos generales, cuanto más grande resulte el explanto mayor será la posibilidad de regenerar plantas, pero menor la posibilidad de obtener plantas libres de virus. Si por el contrario se parte de plantas ya saneadas, o lo que se desea es sólo la multiplicación del material *in vitro*, se podrán usar yemas o brotes de mayor tamaño y asegurar así el desarrollo de una planta sin mayores requerimientos nutricionales.

Existe un gradiente de incremento de concentración de virus desde el domo meristemático hacia los sucesivos primordios, que coincide con la diferenciación. Esto significa que la probabilidad de obtener plantas libres de virus es inversamente proporcional al tamaño del explanto utilizado. Explantos entre 0,2 y 0,5 mm son los que más frecuentemente producen plantas libres de virus. Sin embargo, también se han reportado buenos resultados con el empleo de meristemas más grandes. El tamaño recomendado es variable y depende del hospedante, de los tratamientos previos (termoterapia, quimioterapia, etc.) y el, o los, virus involucrados. En algunos casos, no sólo es importante considerar la especie de hospedante sino también el cultivar, ya que se han detectado notables diferencias entre ellos.

Por otra parte, es probable que el tamaño del meristema por sí solo no sea el que determina el éxito en la obtención de plantas libres de virus. Se han detectado numerosos virus en meristemas apicales de 0,1-0,5 mm en diferentes especies (clavel, *Nicotiana rustica*, *N. glauca*, *N. glauca*, *Chenopodium amaranticolor*, poroto, tabaco, tomate, petunia, papa). Sin embargo se ha logrado la obtención de plantas sanas con explantos de esos tamaños, o mayores, por lo que se podría suponer que la eliminación de virus ocurre también durante el proceso de cultivo *in vitro* o por alguna otra razón no aclarada todavía.

Desarrollo del cultivo

El primer paso es la extracción del meristema o explanto. Para ello se corta una porción de tejido de aproximadamente 1 cm que incluye el meristema y se desinfecta. Frecuentemente se realiza mediante una inmersión en

alcohol seguido de hipoclorito de sodio o calcio. Luego este trozo es llevado a una cámara de flujo laminar y con la ayuda de instrumental estéril y una lupa estereoscópica se procede a la escisión del explanto. Una vez extraído se coloca en un medio de cultivo adecuado y es mantenido bajo condiciones apropiadas de luz, temperatura y humedad para el desarrollo.

Fase I. Etapa de iniciación. El objetivo de esta etapa es el desarrollo del explanto en forma aséptica. En general ocurre primero un aumento del tamaño y luego el tejido puede ir tornándose lentamente verde. Posteriormente irán desarrollándose brotes o plantas completas y a partir de estas se pueden obtener yemas axilares.

Fase II. Etapa de multiplicación. En esta etapa el objetivo es la multiplicación activa del explanto para la producción de numerosas plantas a partir de una, constituyendo así un clon proveniente de un solo meristema, al que se conoce como mericlón. La multiplicación o micropropagación puede efectuarse por proliferación de brotes axilares, brotes adventicios, formación de embriones somáticos, etc., tratando siempre de evitar la formación de callo como paso previo a la diferenciación. La etapa de multiplicación puede involucrar varios repiques del material a medio de cultivo fresco. Se ha visto con frecuencia que la tasa de multiplicación varía con el tiempo de permanencia del explanto en el medio de cultivo. Es frecuente que después de 2 ó más subcultivos aumente el número de yemas que se producen a partir de un explanto. No es aconsejable mantener el material indefinidamente en esta etapa ya que se ha observado un aumento de la variabilidad cuando las plantas son mantenidas por largos períodos en estas condiciones. En general se considera que 10-12 subcultivos es lo máximo que debería mantenerse el material en esta etapa.

Fase III. Etapa de acondicionamiento para el transplante a tierra. Frecuentemente las plantas desarrolladas *in vitro* no poseen raíces o si las tienen muchas veces no son funcionales; y en general, tiene malas conexiones vasculares con el tallo. A nivel foliar puede estar alterada la producción de clorofila. Los estomas suelen no funcionar o hacerlo muy lentamente,

y la capa de cera epicuticular es muy reducida.

La formación de raíces adventicias es relativamente fácil de conseguir en plantas herbáceas, y difícil en leñosas. Existe una etapa de inducción de raíces, de iniciación del crecimiento y de elongación de las mismas. En esta fase del crecimiento se suele incrementar la intensidad de luz para favorecer la rusticación de las plantas, pero hay que cuidar que ésta no afecte a las raíces. Se puede mejorar esto cubriendo con aluminio la base de los tubos o usando 0,3% de carbón activado en el medio de cultivo para proporcionar sombra a las raíces.

En las plantas que se propagan por bulbos, tubérculos, rizomas, etc., se puede inducir la formación de los mismos *in vitro* para mejorar la eficiencia en el transplante, ya que éstos pueden ser cosechados del tubo de ensayo y sembrados directamente en tierra sin mayores dificultades.

Transplante. En el momento del transplante, es importante no dañar las raíces. Es necesario lavarlas cuidadosamente para retirar los restos de agar, debido a que los medios de cultivo ofrecen un buen sustrato para el desarrollo de hongos y bacterias que pueden afectar el desarrollo de la planta en el suelo.

El mayor problema en esta etapa, es la deshidratación debido a algunas características de las plantas cultivadas *in vitro*: reducida cera epicuticular, lentitud de movimiento estomático, abundantes espacios intercelulares, dificultades en las conexiones del tallo y la raíz. Por lo cual conviene transferir las plantas a macetas y mantenerlas con alta humedad relativa por los primeros 15 días. También se han observado buenos resultados con el uso de rocío artificial o neblina. Otra práctica frecuente es cubrir las plantas con polietileno o recipientes de vidrio transparente, a modo de cámara húmeda, y descubrirlas progresivamente hasta destaparlas completamente al cabo de 3 ó 4 semanas.

Multiplicación del material *ex vitro*

Las plantas libres de patógenos deben ser multiplicadas bajo condiciones controladas para evitar su recontaminación. Una vez rusticadas y adaptadas nuevamente a las condiciones *ex vitro* pueden ser multiplicadas bajo

jaulas anti-vectores todo el tiempo que se considere necesario. En esta etapa es importante evitar que las plantas se reinfecten. Es recomendable la esterilización del suelo para evitar la contaminación con nematodos y hongos que en algunos casos son transmisores de virus. Las jaulas deben estar revestidas de malla muy fina para evitar la entrada los vectores. Por la misma razón, es recomendable una doble puerta de acceso. Periódicamente la malla debe ser controlada para detectar roturas. Es recomendable aplicar insecticidas y mantener libre de malezas, que puedan actuar como reservorio de vectores tanto dentro como fuera de la jaula. Si bien el material introducido a las jaulas debe ser previamente controlado respecto a su sanidad, es conveniente, en esta etapa, repetir los análisis para detectar rápidamente si se evidencia una infección y eliminarla antes de que se propague. En estas condiciones es posible mantener "plantas madres" por mucho tiempo, como un stock de material libre de virus a partir del cual realizar sucesivas multiplicaciones.

La etapa de multiplicación masiva, o a gran escala, se realiza a campo en áreas aisladas de focos de contaminación. Esta etapa se extiende todo el tiempo necesario hasta obtener el número requerido de individuos como para realizar una producción comercial. Si el área protegida está lo suficientemente alejada de plantas infectadas y se evita el acceso de los vectores, es posible mantener estas plantas por muchos ciclos de cultivo. Son fundamentales en esta etapa los análisis periódicos que permitan llevar un registro del estado sanitario del material.

Alternativas para mejorar la eficiencia en la producción de plantas libres de virus

Termoterapia. Es la técnica más antigua utilizada para la liberación de patógenos en plantas. Pero sólo con el empleo de altas temperaturas, difícilmente se consigan plantas libres de virus. Mantener las plantas enfermas por períodos prolongados a altas temperaturas disminuye la concentración de virus en la planta, pero al llevarlas nuevamente a condiciones normales, en poco tiempo recuperan el nivel original.

Una práctica muy usada es la combinación de la termoterapia y el cultivo de meristemas. Esto implica mantener las plantas en termoterapia por un período variable de tiempo y temperatura (entre 34 y 38°C desde una a varias semanas), luego se realiza la extracción del meristema, se siembra en el medio de cultivo y se continua con los pasos convencionales para su desarrollo.

Esta práctica no es efectiva para todos los virus por igual, depende del virus y del hospedante. Se ha visto que un mismo virus en distintas especies se inactiva en forma diferente. Generalmente esta práctica ha resultado más efectiva en virus de partículas alargadas, y menos eficiente para virus poliédricos.

Podría suponerse que cuanto más largo es el tratamiento con calor sería más efectivo, sin embargo no resulta siempre así. En crisantemo y ajo, por ejemplo, se ha observado que tratamientos de 10-30 días pueden ser efectivos para la liberación de algunos virus, en cambio tratamientos mas prolongados no siempre producen mayor porcentaje de plantas sanas. Además dificultan la implantación del tejido condiciones *in vitro*, traduciéndose en un número menor de plantas obtenidas.

En algunos casos la combinación de bajas temperaturas (5°C) seguido del cultivo de meristema fue utilizada con éxito para la limpieza de virus. Esta práctica se aplicó sobretodo en el caso de viroides, que se desarrollan bien con altas temperaturas.

Quimioterapia. El uso de antivirales sería la solución definitiva para estas enfermedades, sin embargo hasta ahora no se ha encontrado un compuesto así. Algunas sustancias químicas ocasionan una disminución en la concentración de virus, y atenúan o suprimen los síntomas que produce la infección, pero suspendido el tratamiento se recupera la concentración viral. Se han evaluado diferentes sustancias, la más utilizada es la Ribavirina (1-b-D-ribofuranosyl-1, 2, 4-triazole-3-carboxamide, VirazoleTM es el nombre comercial). Sin embargo un problema importante con este compuesto es su fitotoxicidad, que depende de la dosis empleada y de la especie tratada. El éxito del proceso en muchos casos requiere de varios meses de tratamiento y la fitotoxicidad puede constituir una dificultad.

Un modo adecuado de empleo de los antivirales es la combinación con el cultivo de meristema. En algunos casos han sido aplicados directamente a los meristemas *in vitro*, colocando el antiviral en el medio de cultivo. Las plantas son mantenidas bajo la acción del antiviral por largos períodos que incluyen varios subcultivos.

También se han obtenido plantas libres de virus a partir de callos a los que previamente se aplicó Ribavirina, aunque la práctica no ha sido eficiente en todos los casos.

Electroterapia. El método consiste en aplicar corriente eléctrica a yemas por un período variable de tiempo para obtener plantas libres de patógenos. Se supone que la aplicación de electricidad produce la degradación de las partículas y pérdida de infectividad. Esta técnica ha sido implementada para liberar de mosaico al almendro cv Caetanuccia. En este caso, brotes de 9,6 mm se sometieron a 500 V por tiempos variables y luego se injertaron sobre pies sanos (obtenidos por semilla). Con 5 minutos de tratamiento los resultados fueron buenos, y con 20 minutos se obtuvo completa inactivación viral. El método también ha sido empleado para eliminar bacterias de caña de azúcar, *Potato leaf roll virus* de papa, *Dasheen mosaic virus* de aráceas y *Banana streak virus* de banana, entre otras. La eficiencia de la técnica puede depender del cultivar, el patógeno y el genotipo.

Cultivo de domo proveniente del disco basal (del inglés, *stem-disc dome culture*). El procedimiento consiste en la obtención de plantas libres de virus a partir del cultivo de estructuras con forma de domo, diferenciadas a partir del cultivo del disco basal de dientes de ajo. Se ha informado la diferenciación de 20-30 brotes a partir del cultivo del disco basal de dientes de ajo en 1 mes de cultivo. Originalmente, el método se llamó cultivo del disco basal (*stem-disc culture*). Una modificación posterior de esta técnica que consiste en la extracción de las estructuras con forma de domo y su cultivo en medio adecuado, permite obtener plantas libres de virus.

Microinjerto de ápices caulinares *in vitro* para obtención de plantas de naranjo libres de virus. La técnica consiste en extraer el meriste-

ma de la variedad a injertar, y luego sembrarlo sobre la superficie decapitada del epicótilo de una plántula proveniente de semilla crecida *in vitro*. Se trabaja con plántulas crecidas *in vitro*, de aproximadamente 2 semanas de edad. Se las extrae del tubo y se corta el epicótilo y el ápice de la raíz (dejando un trozo de 4-6 cm). Los cotiledones y yemas axilares también se eliminan. En la base del tallo cortado se practica una incisión en forma de "T" invertida, donde se coloca el meristema (domo con 1, o 2 primordios foliares) proveniente de la planta de campo que se desea injertar. Las plantas microinjertadas se colocan en medio de cultivo adecuado para su desarrollo, y cuando tienen 2-3 hojitas, se injertan en plantas normales de vivero.

Análisis de las plantas obtenidas

Como hemos visto existen varias alternativas para obtener plantas libres de virus a partir del cultivo de meristemas, y si bien contamos con lineamientos o consideraciones generales para aumentar las posibilidades de éxito, no hay proceso que ofrezca total seguridad. La etapa decisiva en este sistema es el análisis de las plantas obtenidas, cuando comprobamos si realmente se alcanzó el objetivo. Empleando el mismo protocolo, en el mismo momento, con el mismo material, es posible obtener plantas sanas y plantas que aún permanecen infectadas. Por lo tanto, la única forma de diferenciarlas será mediante pruebas o tests que establezcan su estado sanitario. El éxito de un programa de producción de plantas libres de virus no depende de la obtención de un alto porcentaje de plantas sanas en la primera etapa, sino de al menos unas pocas plantas madres realmente libres de patógenos, que luego podremos multiplicar por diferentes sistemas. Es recomendable analizar las plantas madres más de una vez para asegurar su sanidad, es preferible que sea en etapas diferentes a lo largo del proceso, y en lo posible por técnicas distintas.

Para realizar un análisis confiable hay que tener en cuenta varios factores que son específicos para cada combinación planta-patógeno. La elección de la técnica de análisis dependerá del patógeno y de las posibilidades para realizarla. Es importante el empleo de sistemas

de alta sensibilidad que nos permitan detectar los virus aún en bajas cantidades. Sin embargo no existe una prueba que sea infalible, siempre hay un límite de concentración del patógeno por debajo del cual no puede ser detectado. Para evitar errores en este sentido es recomendable tener en cuenta algunas consideraciones. Como ya se ha mencionado, la concentración de virus no es igual en todas las partes de una planta, por lo tanto, es recomendable establecer en que tipo de tejidos u órganos se concentra el patógeno, y realizar la prueba a partir de ellos. Del mismo modo, se ha comprobado que existen fluctuaciones en la concentración viral a lo largo del ciclo de cultivo, por lo tanto es conveniente realizar las pruebas en varias ocasiones o bien, si se conoce, en aquel punto en que virus alcanza su mayor título. Esto es sobretodo importante cuando se prueba el material transferido a campo.

Cuanto más temprano descartemos las plantas contaminadas más seguro será el sistema. Una planta infectada siempre es un foco de contaminación, y por más cuidados que se tengan siempre se corren riesgos. Cuando las plantas están *in vitro*, en general, la concentración de virus es muy baja, probablemente debido a las condiciones de cultivo, la concentración de hormonas en el medio, u otros factores no muy claros. Sin embargo las plantas no deben dejar de analizarse en esta etapa.

Frecuentemente se menciona el empleo de la técnica inmunoenzimática de doble sándwich de anticuerpos (DAS-ELISA). Esta técnica tiene varias ventajas: permite el análisis simultáneo de muchas muestras (96 celdas por placa, varias placas por ensayo), es relativamente fácil y de bajo costo. Sin embargo, no es lo suficientemente sensible como por ejemplo para detectar virus en muestras de plantas *in vitro*. En estos casos, muchas de las plantas *in vitro* que dan resultados negativos mediante DAS-ELISA resultan positivas cuando se prueban por otra técnica más sensible. Algunas variantes como ELISA en membrana de nitrocelulosa, o *dot blot* (las proteínas se aplican directamente en las membranas, sin pasar por los procesos de electroforesis y transferencia; el revelado es similar al de un *western blot*), también han sido empleadas con resultados

satisfactorios, sin embargo cuando se las utiliza solas fallan en la detección de muchas plantas infectadas (falsos negativos).

Mejores resultados se han obtenido con el empleo de técnicas que combinan la serología con la microscopía electrónica como son la inmunoelectromicroscopía con o sin decoración (ISEM ó ISEM-D). Estas técnicas son altamente sensibles y permiten la observación directa del virus por lo cual no hay falsos positivos y no se requiere un antisuero de alta calidad para su desarrollo. El inconveniente es que no son de uso masivo debido a que es engorroso analizar gran cantidad de muestras, y a que el equipamiento que se requiere (microscopio electrónico) es altamente costoso.

Las técnicas basadas en la detección de los ácidos nucleicos han mostrado un gran desarrollo y evolución en la última década, y son utilizadas con frecuencia debido a su alta sensibilidad y especificidad. El uso de sondas moleculares ha dado buenos resultados. La reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y sus variantes son las técnicas de mayor sensibilidad que se cuenta hasta el presente. Entre ellas se mencionan: PCR anidado, transcriptasa reversa (RT)-PCR, inmuno captura (IC) RT-PCR, entre otras. Esto posibilita detectar los virus, aún en bajísimas concentraciones. Si bien estas pruebas son altamente sensibles, aún no son de uso masivo.

Para obtener resultados confiables es recomendable la combinación de varias pruebas, es decir aprovechar la practicidad del ELISA y la sensibilidad de las técnicas moleculares, de ISEM, u otras. En este caso las plantas que resultan negativas a ELISA pueden ser luego analizadas por una técnica más sensible y disminuir así el número de pruebas complicadas o costosas.

Como se mencionó anteriormente, la concentración de virus en las plantas *in vitro* en general es baja, por lo tanto se corre el grave riesgo de considerar como sanas, plantas que en realidad están infectadas. Por esta razón se hace casi obligatorio repetir los análisis en las plantas *ex vitro*. Es necesario dejar pasar cierto tiempo antes de hacer el análisis para que el virus, si está presente, tenga la posibilidad de incrementar su concentración y resulte más

fácil detectarlo. En esta etapa es frecuente la utilización de ELISA en cualquiera de sus variantes, con buenos resultados.

En algunos casos el sistema que resulta más eficiente para analizar las plantas obtenidas, es el empleo de plantas indicadoras. El injerto es la forma más segura de transmitir un virus y esto es lo que se emplea como sistema de diagnóstico. Se realiza un injerto desde la planta que se desea probar a plantas susceptibles (indicadoras) y que desarrollan síntomas evidentes de la presencia del patógeno. El inconveniente en este tipo de análisis, es que hay que esperar que la planta obtenida *in vitro* sea transferida a suelo y que desarrolle lo suficiente como para extraer una porción de tejido (hoja, yema, brote, etc., según el tipo de injerto). Además necesitamos un operador con habilidad para realizar el injerto con éxito, y luego, mantener las plantas injertadas en condiciones adecuadas hasta que aparezcan los síntomas. En algunos casos este tiempo puede ser muy prolongado. A pesar de los inconvenientes que se mencionan, para algunas especies, este sigue siendo el método más seguro. Por ejemplo en frutilla, una especie afectada por más de 20 enfermedades diferentes de las que en muchos casos ni siquiera se ha caracterizado el agente causal, la transmisión a plantas indicadoras resulta la prueba más efectiva. En este caso se injerta el folíolo medio de la planta que se desea probar a plantas indicadoras en las cuales los patógenos van a dar síntomas notables. Algunos virus se van a manifestar después de 2 ó 3 semanas de realizado el injerto, en otros casos la bibliografía menciona que los síntomas aparecen recién después de 6 meses, ó incluso 1 año. Con frecuencia no es posible identificar que virus es el que está presente, pero es posible determinar si la planta está infectada.

En vid parte de los virus son analizados mediante ELISA, sin embargo para otros se utiliza el injerto a plantas indicadoras. Algunos de los virus pueden ser detectados en pocas semanas, pero para síndromes como el del tallo estriado o agujereado (*stem pitting/grooving*) por ejemplo, es necesario esperar entre 8 y 12 meses.

Consideraciones respecto a los análisis de virus

En general, cuando se habla de las plantas liberadas de virus se emplean términos como "plantas libres de virus" "planta sana", "saneada", sin que se defina que virus fueron eliminados ni que pruebas se emplearon para comprobar su eliminación. El concepto de plantas libres de virus debería estar acotado a los virus analizados. En el caso de plantas que son afectadas por un conjunto de virus diferentes sería necesario realizar un análisis independiente para cada uno de ellos y señalar el, o los, virus de los cuales ha sido liberada o probada. Por otra parte debe definirse la técnica de análisis empleada, ya que no todas tienen la misma sensibilidad. Todas las técnicas tienen un límite de sensibilidad por debajo del cual no son capaces de detectar la presencia del patógeno. Por consiguiente, dependiendo de la sensibilidad de la técnica que se use, el porcentaje de plantas supuestamente "libres de virus" puede variar. Lo correcto sería entonces hablar de plantas negativas a los virus probados y mencionar las técnica usada.

Ejemplos de sistemas de producción de plantas libres de patógenos sistémicos

Producción de plantas de ajo libres de virus.

Conci V.C., Cafrune E., Perotto C. y Quevedo V. INTA-IFFIVE. Córdoba. Argentina.

Entre los patógenos que afectan al cultivo de ajo los virus son los responsables de las mayores pérdidas en los rendimientos, ocasionando entre un 20 y 80% de disminución en el peso de los bulbos. Las infecciones causadas por numerosos virus, si bien no causan la muerte de la planta, producen enfermedades crónicas. Debido a que el ajo se propaga exclusivamente de forma agámica, las plantas infectadas por diferentes combinaciones de estos virus los transmiten a las sucesivas generaciones y a las distintas regiones de producción. La utilización de materiales libre de virus, obtenido por cultivo de meristemas, es por el momento la única forma de control utilizada.

En trabajos realizados en Argentina se ensayaron tratamientos de termoterapia con agua y con aire caliente, previos a la extracción de los meristemas. Los mejores resultados se obtuvieron con aire caliente, con un 30-100% de plantas "libres de virus". En algunos cultivares no se consiguieron plantas "libres de virus" sin el empleo de termoterapia; mientras que algunos genotipos fueron liberados sólo con el empleo del cultivo de meristema.

En la Figura 1 se describe el procedimiento utilizado para la obtención de las plantas de ajo libres de virus. Se inició con la extracción del meristema incluyendo el disco basal. Se desinfectó y se extrajo el explanto constituido, en este caso, por el domo más un primordio foliar. Se sembró en medio de iniciación para desarrollar una planta completa (Fig. 1A). Las plantas obtenidas se analizaron mediante ISEM-D, con antisueros específicos para los virus de interés. Las plantas que resultaron negativas a todas las pruebas se transfirieron a medio de micropropagación (Fig. 1B). Luego de varios ciclos *in vitro* muchas plantas bulbifican espontáneamente y otras deben ser inducidas (Fig. 1C). Los minibulbillos obtenidos *in vitro* se cosecharon y se sembraron en suelo estéril. Las plantas que no formaron bulbos se transfirieron a maceta y se mantuvieron en cámara húmeda por un período de tiempo variable luego, se las adaptó de manera paulatina a las condiciones naturales de humedad y temperatura (Fig. 1D-E). Las plantas *ex vitro* se probaron mediante DAS-ELISA para constatar su estado sanitario, y se mantuvieron bajo jaulas anti-vectores. Los bulbos cosechados se conservan en lugar fresco y seco hasta la época de siembra. Las sucesivas multiplicaciones se realizaron en jaulas donde se continuó analizando las plantas, mediante pruebas de DAS-ELISA (Fig. 1F-G). Los bulbos producidos se entregaron a semilleros que realizan la multiplicación en áreas aisladas de otros cultivos de *Alliaceae*, hasta obtener el número de bulbo-semilla suficiente como para iniciar una producción comercial.

La implementación de programas tendientes a la producción de plantas de ajo libre de virus y el control de enfermedades es importante ya que en Argentina rigen normativas para la fiscalización de semilla de ajo. Estas normas

establecen una serie de categorías de semilla (Básica, subcategoría Preinicial, Inicial y Fundación; Registrada, subcategoría A y B; y Certificada), cada una de las cuales contempla un valor máximo tolerado para la presencia del virus *Onion yellow dwarf virus*, responsable en nuestra región de las mayores pérdidas en los rendimientos. Sin embargo, dado el avance de los conocimientos respecto al daño que producen otros virus, seguramente algunos otros serán considerados en el futuro.

Plantas cítricas libres de enfermedades.

Costa N., Plata M.I. y Anderson C.

INTA EEA. Entre Ríos, Argentina.

Las enfermedades producidas por virus, viroides y otros organismos similares producen importantes pérdidas económicas en los cítricos de todo el mundo. Algunas provocan la muerte de las plantas y otras disminuyen la producción y la calidad de la fruta, causando pérdida de vigor y de longevidad de la planta. Las principales enfermedades causadas por este tipo de microorganismos son psorosis, tristeza, exocortis y cachexia. Estas enfermedades se han extendido, debido a la propagación vegetativa de material infectado. Es normal encontrar varias virosis en una misma planta y en muchos países como Argentina, casi la totalidad de las plantas adultas están afectadas por alguna virosis.

La psorosis y otras enfermedades se transmiten mediante el injerto de yemas. Una vez hecho el injerto, la planta puede permanecer con la enfermedad latente durante muchos años. Las yemas que se extraigan de una planta con enfermedad latente originarán plantas enfermas.

Los países con citricultura de avanzada han basado su éxito en el empleo de Programas de Certificación utilizando plantas libres de enfermedades.

La termoterapia y la obtención de plantas nucleares han sido técnicas muy utilizadas para este objetivo. Actualmente en gran parte de los países citrícolas, que tienen programas de eliminación de virus y viroides, se utiliza la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*.

La combinación de las técnicas de termoterapia y de microinjerto de ápices caulinares *in*

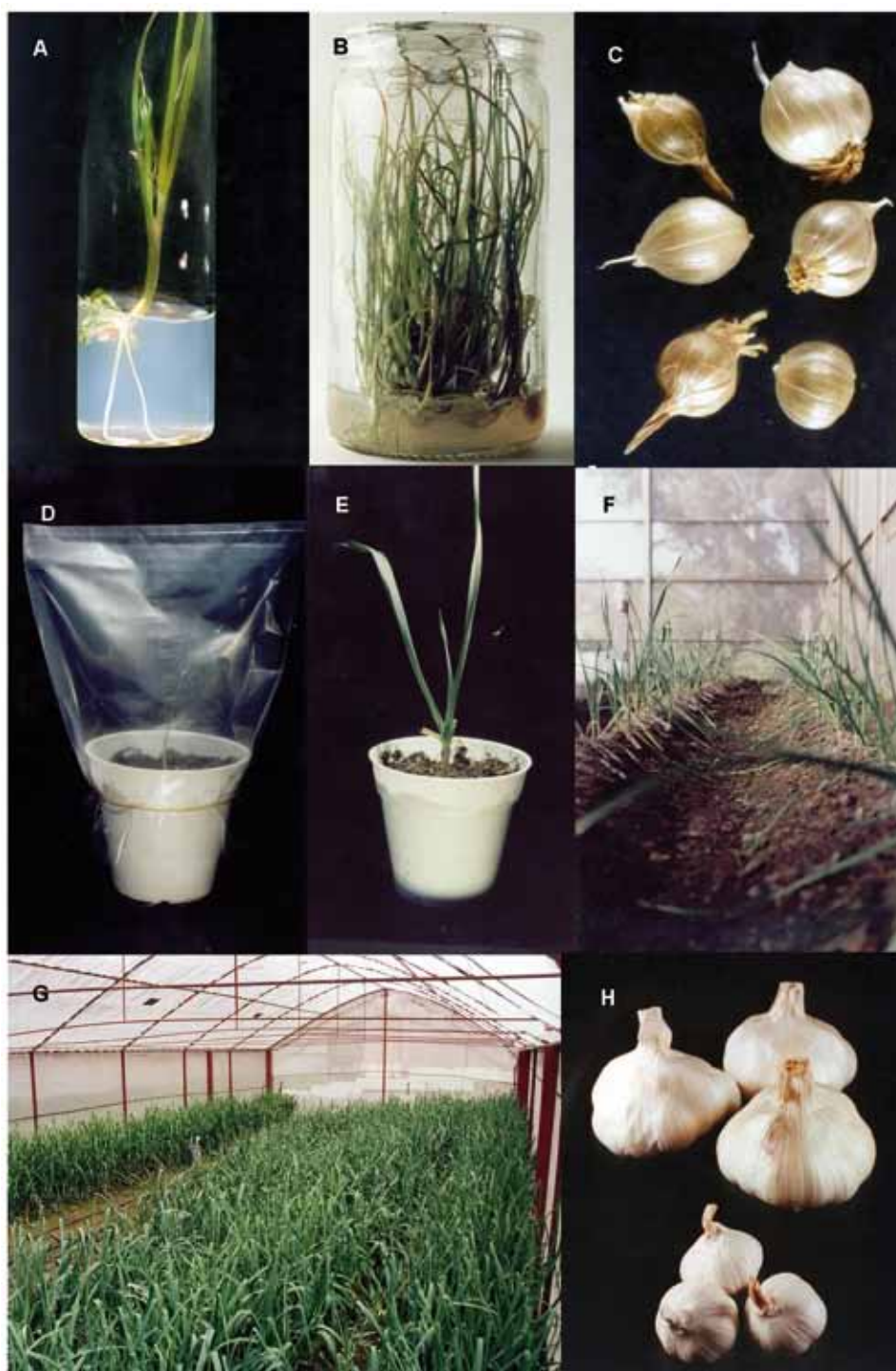


Figura 1.- Producción de plantas de ajo libres de virus. A: planta en medio de iniciación. B: micropropagación. C: bulbillos obtenidos *in vitro* (microbulbillos). D: planta transferida a tierra y mantenida en cámara húmeda. E: planta adaptada a las condiciones *ex vitro*. F: plantas en suelo bajo jaula antiáfidos. G: multiplicación a gran escala bajo jaula antiáfidos. H: bulbos de ajo libre de virus (arriba) e infectados (abajo).

vitro logra obtener un alto porcentaje de plantas cítricas libres de virus.

En la Figura 2 se describe el procedimiento para la obtención de plantas cítricas libres de virus. En primer lugar se selecciona una planta candidata en base a las introducciones de variedades cítricas de copa y portainjerto que se realizan a los Bancos de Germoplasma, de selecciones locales y de variedades obtenidas en los programas de mejoramiento. Una vez

seleccionada la planta, se la somete a termoterapia y cultivo de tejido, empleado la técnica de microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. Esta técnica comprende las siguientes etapas: preparación del portainjerto, preparación del ápice, injerto, cultivo de plantas injertadas e injerto sobre un plantín vigoroso. Las plantas obtenidas por microinjerto no presentan caracteres juveniles y en las plantas obtenidas no se han observado anomalías con respecto a la planta madre (Fig. 2).

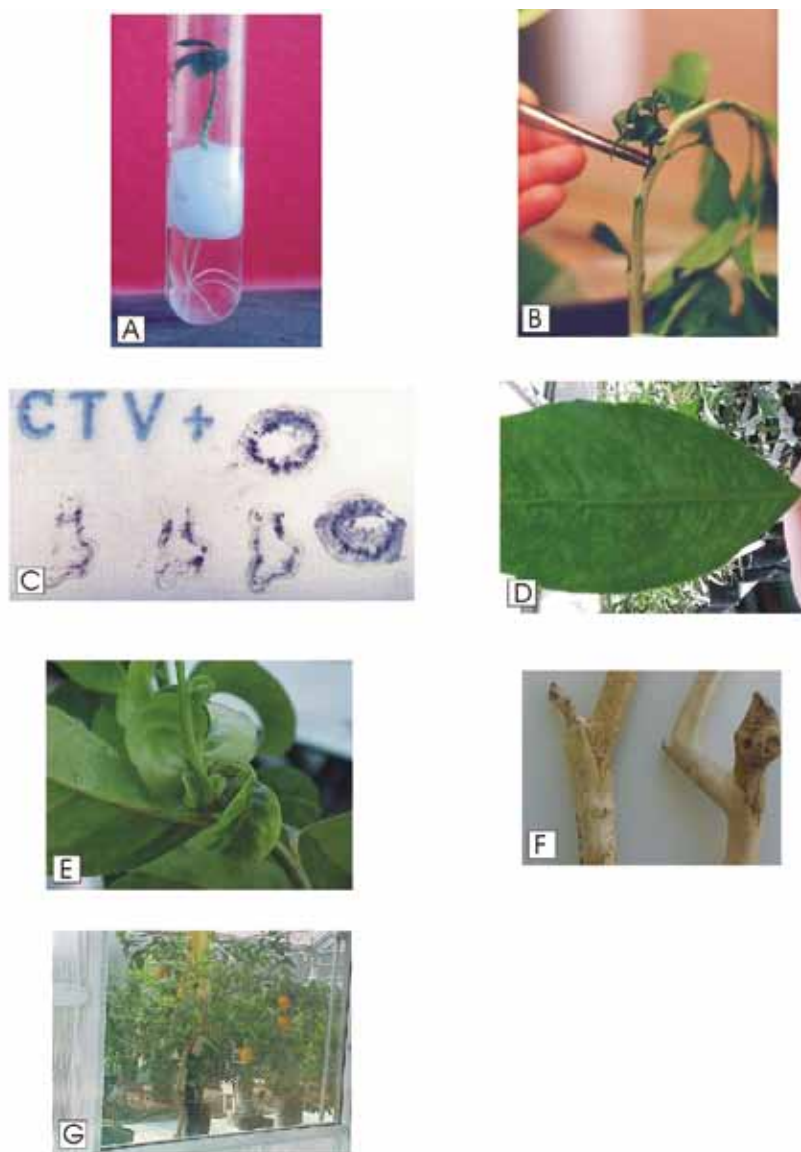


Figura 2. Obtención de plantas cítricas libres de enfermedades. A: planta obtenida por microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. B: injerto sobre un plantín vigoroso. C: membrana de inmunoinpresión-ELISA con huellas de tallos de plantas infectadas con tristeza. D: moteado causado por psorosis. E: epinastia causada por exocortis. F: acanaladuras causadas por cachexia-xiloporosis. G: invernáculo con plantas madres libres de enfermedades.

El éxito de la técnica depende en gran medida del tamaño del tejido extraído y del patógeno a eliminar. En el caso de exocortis, tristeza y cachexia, el porcentaje de plantas libres es superior al 90%. El virus de la psorosis de los cítricos es bastante más difícil de eliminar.

Una vez obtenida la planta de microinjerto y cuando tiene tamaño suficiente se realizan las pruebas de diagnóstico para comprobar que estén libres de patógenos. Las técnicas de diagnósticos para cada enfermedad pueden ser varias pero, en caso de existir organismo nacionales o internacionales de referencia, es conveniente emplear aquellas reconocidas o recomendadas por ellos. Por ejemplo en este caso podría tratarse de PROCITRUS (proyecto INTA para la obtención, producción, mantenimiento y distribución de portainjertos y cultivos de especies cítricas con identidad varietal y estado sanitario controlado), o el Programa Nacional de Certificación de Cítricos. En este caso existe una normativa específica para el funcionamiento de los laboratorios de diagnóstico de enfermedad en cítricos, aprobado por INASE y SENASA, ambos dependientes de la SAGPyA (Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación).

Producción de *Prunus* libres de virus.

Docampo DM. INTA-IFFIVE.

Córdoba, Argentina.

Monitoreos realizados en especies frutales del género *Prunus* del área frutícola templada Argentina evidenciaron el deterioro sanitario de plantaciones en producción y de propagación. Una de cada cuatro plantas analizadas se encontró infectada por uno o más virus. Varios factores facilitaron esta situación: carencia de controles sanitarios, ineficacia de los métodos empleados en los análisis, dispersión por vectores, diseminación de materiales infectados por la comercialización.

Un Sistema de Certificación Sanitaria de Plantas Perennes se fundamenta en producir el número de plantas requeridas por el mercado a partir de una *Planta Inicial*. Básicamente requiere: 1) Obtener la *Planta Inicial* de cultivares y/o portainjertos seleccionada por sus caracteres agronómicos, pureza varietal y su estado sanitario. Constituye el material fundacional del cual derivará todo el material certificado; 2) Un

Monte Fundación. Plantas de reserva y donante de materiales de propagación, generalmente constituido por tres plantas de cada cultivar o portainjerto obtenidas por propagación agámica de la *Planta Inicial*; 3) Un monte de *Plantas de Base* con al menos diez plantas por cultivar y/o portainjerto, derivadas propagación agámica del *Monte Fundación*. Son las Plantas Madres de Propagación, sometidas a rigurosos controles sanitarios y varietales, anuales; 4) Producción de *Plantas Certificadas* para viveros expendedores derivadas propagación agámica de *Plantas de Base*.

Obtención de la Planta Inicial. 1) Seleccionar plantas por su pureza varietal y condiciones agronómicas candidata a *Planta Inicial*. 2) Determinar su estado sanitario mediante transmisión a plantas indicadoras, pruebas serológicas, moleculares y/o microscopía electrónica. 3) Si ninguna de las plantas resulta libre de patógenos sistémicos, aplicar termoterapia seguida de cultivo de meristemas. Los controles sanitarios de las plantas regeneradas permitirán seleccionar la *Planta inicial*.

Termoterapia y cultivo de meristemas. 1) Enraizar en suelo estéril estacas de las plantas seleccionadas, y/o de portainjertos de Sanidad Certificada para injertar yemas de las candidatas a *Planta Inicial*. 2) Colocar las plantas enraizadas y con brotes (en actividad) en cámaras donde reciban terapia con aire caliente. 3) Temperatura: varía con la relación cultivar-patógeno. En general se usa 34-38 °C. 4). Fotoperíodo: 16 h de luz (tubos fluorescentes de luz blanca, 3,5-4,0 Klux). Riego diario. Humedad relativa: 60 y 80%. 5) Tiempo: varía con la relación planta-patógeno. Oscila entre 3 y 7 semanas. 6) Retirar las plantas de la termoterapia. A continuación extraer los meristemas de las yemas desarrolladas durante el tratamiento y sembrar en medio de cultivo *in vitro*.

Micropropagación. 1) Sembrar meristemas de 0,3-0,5 mm (con uno o dos primordios foliares), e identificar el material. 2) Repicar e identificar individualmente cada yema del yemario originado. Cada una originará un clon. 3) Repicar las yemas manteniendo la individualización del clon. No superar diez ciclos de micropropagación. 4) **Control Sanitario.** Antes de la tercera multiplicación, tomar al menos 3 plantas de cada clon y analizar la presencia de los pa-

tógenos que se estableció eliminar. Mantener estas plantas al menos una semana fuera de la cámara de cultivo, bajo luz, temperatura y humedad adecuada para que los patógenos, si los hubiera, incrementen su población para facilitar su detección. El control sanitario deberá incluir transmisión a plantas indicadoras, pruebas serológicas, microscopía electrónica y técnicas moleculares. Eliminar los clones que no superen el control.

Aclimatación. 1) Descalzar las plantas regeneradas lavando cuidadosamente sus raíces bajo chorro de agua hasta retirar la totalidad del agar. 2) Plantar en terrinas plásticas desinfectadas con NaOCl al 15 %, en una mezcla de turba, mantillo y perlita 1:1:1 estéril. 3) Colocar las terrinas en cámaras del 90-100% de humedad relativa, luz continua (tubos fluorescentes de luz blanca 3,5-4,0 Klux), Temperatura entre 15-35 °C. 4) A los 30 días transplantar a cestillos. Mantenerlos bajo túneles de polietileno en invernadero. 5) Retirar el plástico lentamente, una parte cada 2-3 días hasta su retiro definitivo. 6) *Control Sanitario*. Como se describió anteriormente.

Lecturas recomendadas

Ayabe M. and Sumi S. 2001. A novel and efficient tissue culture method-“stem-disc dome culture”- for producing virus-free garlic (*Allium sativum* L.). Plant Cell Rep., 20, 503-507.

Canteros B. 2001. Cancrosis de los Citrus en el Litoral Argentino. IDIA XXI Año 1, 23-27.

Chang T.T. 1988. The case for large collections. In Brown A.H.D., Frankel O.H., Marshall D.R. and Williams J.T. (eds). The use of plant genetic resources. Cambridge University Press, Reino Unido. pp 123-35.

Conci V.C. 1997. Virus y Fitoplasmas de ajo. In Burba J.L. (ed). 50 temas sobre producción de ajo. EEA-INTA La Consulta, Mendoza, Argentina. Vol. 3. pp 267-293.

Conci V.C. y Nome S.F. 1991. Virus free garlic (*Allium sativum* L) plants obtained by thermotherapy and meristem tip culture. J. Phytopathology, 132, 189-192.

Docampo D.M., Haelterman R.M. y Guerra G.D. 1990. Distribución del PNRSV, PDV y PLV en Prunoideas de Áreas Frutícolas de la República Argentina. RIA, 22, 280-285.

Fraccioli G. and Marani F. 1998. Virus elimination by meristem tip culture and tip micrografting. In: Hadidi A., Khetarpal R.K. and Koganezawa H.

(eds). Plant virus disease control. The American Phytopathology Society. St. Paul, Minnesota, USA. pp 346-380.

Gella Fañanas R. 1993. Obtención de planta certificada. Servicio de Investigación Agraria. Diputación General de Aragón. España. pp 33.

Hernandez R. et al, 2001. “Electrotherapy” Technique eliminates viral and bacterial infection from plant shoot-tip cultures. INIVIT, Santo Domingo, Cuba.

Hu C.Y. and Wang P.J. 1983. Meristem shoot tip, and bud cultures. In: Evans D.A., Sharp W.R., Ammirato P.V. and Yamada Y. (eds). Handbook of plant cell culture. Techniques for propagation and breeding. Vol 1 Collier Macmillan Publishers. London. pp 177-227.

Kartha K.K. 1981. Meristem culture and cryopreservation-methods and applications. In: Thorpe A.T. (ed). Plant tissue culture methods and applications in agriculture. Department of Biology, University of Calgary, Calgary, Alberta, Canada. pp 181-211.

Kartha K.K. 1984. Elimination of virus. In Vasil I.K. (ed). Cell culture and somatic cell genetics of plants. Academic Press, Inc. pp 577-585.

Navarro L. 1979. Microinjerto de ápices caulinares in vitro para la obtención de plantas de agrios libres de virus. Bol. Serv. Plagas, 8, 127-148.

Ogawa J.M., Zehr E.I., Bird G.W., Ritchie D.F., Uriu K. and Uyemoto J. K. 1995. Compendium of stone fruit diseases. APS press. The American Phytopathological Society. pp 95.

Palacio-Bielsa A., Foissac X. and Duran-Vila N. 1999. Indexing of Citrus viroids by imprint hybridisation. European Journal of Plant Pathology, 105, 897-903.

Quacquarelli A., Gallitelli D., Savino V. and Piazzolla P. 1980. The use of electric current for obtaining mosaic-free almonds. Acta Phytopathologica Academiae Scientiarum Hungaricae, 15, 251-255.

Ravnikar M., Plaper I., Uzman R. and Zel J. 1994. Establishment of an efficient method for virus elimination in meristem cultures and regeneration of high quality plants. Proc. of IPBA, Rogla. December, 5-7, 97-102.

Schwach F., Vaistij F.E., Jones L. and Baulcombe D.C. 2005. An RNA-Dependent RNA polymerase prevents meristem invasion by Potato virus X and is required for the activity but not the production of a systemic silencing signal. Plant Physiology, 138, 1842-1852.

Walkey D.G.A., Webb M.J.W., Bolland C.J. and Miller A. 1987. Production of virus-free garlic (*Allium sativum* L.) and shallot (*A. ascalonicum* L.) by meristem-tip culture. Journal of Horticultural Science, 62, 211-220.

V. CAPÍTULO 10

Obtención de plantas resistentes a insectos

Dalia Lewi; Clara Rubinstein

Breve introducción sobre manejo de plagas en agricultura y sistemas de control

Aplicaciones de la biotecnología en el control de insectos plaga

La preocupación pública por los riesgos inherentes al uso de pesticidas para el control de insectos estimuló la búsqueda y el desarrollo de alternativas menos riesgosas para el ambiente. La adición de genes mediante la ingeniería genética para desarrollar variedades vegetales con resistencia a insectos es una herramienta muy útil para complementar el mejoramiento genético vegetal. Mediante diversos métodos, ya se han transferido a varias especies vegetales numerosos genes provenientes de un amplio rango de plantas y bacterias, que confieren resistencia a insectos, enfermedades y tolerancia a herbicidas. En la experiencia sumada hasta el momento, los genes transferidos son heredados normalmente a las progenies sin efectos adversos en las plantas que los contienen, y las plantas transgénicas han mantenido los niveles de resistencia a campo. En todos los casos, la transgénesis debe estar integrada a un sistema de manejo de plagas ecológicamente sustentable.

En el año 2007, de las 114 millones de hectáreas que se cultivaron globalmente con OVGs (Organismos Vegetales Genéticamente Modificados), un tercio (42 millones) fueron de eventos con resistencia a insectos. Ya se han obtenido transformaciones estables en unas 100 especies vegetales, entre las cuales se incluyen maíz, trigo, soja, tomate, algodón, papa y arroz. También se han obtenido eventos que combinan la resistencia a insectos con la resistencia a herbicidas en maíz y algodón.

Tanto las técnicas de transformación genética vegetal como las de ingeniería genética ya

son rutina en muchos laboratorios de desarrollo tecnológico e investigación. No obstante, algunos aspectos como el aislamiento de genes candidatos y su efectiva expresión en plantas aún son estudiados y ajustados.

Las estrategias exploradas en la búsqueda de genes que pueden generar resistencia a insectos en vegetales son diversas. El espectro de genes candidatos a aportar resistencia a distintas plagas para la agricultura puede provenir de diversas fuentes, tanto vegetales como bacterianas. También se está investigando la posibilidad de conferir resistencia mediante el uso de técnicas que involucran interferencia de ARN (RNAi). Los genes que producen endotoxinas, como los Bt, derivados de la bacteria del suelo *Bacillus thuringiensis*, son los más explorados y los únicos que hasta el momento tienen aplicación comercial.

Dada la numerosa cantidad de genes relevados e identificados como posibles fuentes de resistencia a insectos, se podrían agrupar según el origen de las secuencias candidatas en: i) genes de origen bacteriano (Bt); ii) genes de origen vegetal (inhibidores de proteasas, quitinasas, avidina, lectina); iii) secuencias de insectos (estrategia de RNAi)

i) *Bacillus thuringiensis* (Bt)

El microorganismo *Bacillus thuringiensis*, comúnmente conocido como Bt, es una bacteria aeróbica, gram positiva que se encuentra naturalmente en el suelo y ha sido utilizada como insecticida biológico desde hace más de medio siglo. Descubierta en Japón en 1902, esta bacteria produce proteínas de inclusión en forma de cristales, llamadas δ -endotoxinas o proteínas Cry, durante la esporulación. Estos cristales son específicamente tóxicos para insectos, especialmente los lepidópteros. Luego de la ingestión de los cristales, las toxinas actúan a nivel del intestino de la larva. Los cristales son disueltos por los jugos alcalinos del intestino que convierten a las protoxinas en fragmentos tóxicos -toxinas- que dañan las células del epitelio intestinal de las larvas. En mamíferos superiores no existen sitios de reconocimiento de estas toxinas, razón por la cual no resultan tóxicas para humanos.

Las preparaciones de cristales son usadas como insecticida desde hace más de 60 años

en numerosos cultivos, especialmente en huer-
tas orgánicas. Los cristales individuales suelen
ser una mezcla de toxinas, cada una de las
cuales posee especificidad sobre un tipo de in-
sectos. Respecto a su utilización en biotecnolo-
gía, una de las ventajas que poseen las toxinas
derivadas de Bt en el contexto de los eventos
transgénicos, es la especificidad con la que ac-
túan. Por tratarse de eventos que contienen un
gen codificante para un tipo de toxina, se ob-
serva que la actividad insecticida es específica
hacia los insectos plaga que se quiere contro-
lar en cultivos que expresan estas proteínas.
Esto constituye una ventaja sobre otros siste-
mas de control, ya que los insectos que no son
plaga, así como los insectos benéficos, no son
afectados. Además, esta especificidad permite
implementar sistemas de manejo integrado de
plagas para combatir otros insectos que no son
controlados por estas toxinas.

Hasta el momento existen alrededor de 400
genes aislados que codifican para toxinas di-
ferentes (para mayor detalle: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). In-
icialmente se las clasificó según la especifici-
dad biológica (*cry I* para Lepidópteros, *cry II*
para Lepidópteros y Dípteros, *cry III* para Co-
leópteros, y *cry IV* para Dípteros). En cambio,
la nomenclatura actual se basa en la identidad
aminoacídica de la proteína. También se optó
por cambiar los números romanos por arábigos
(Por ejemplo, la CryIIIa actualmente se deno-
mina Cry3A).

Los primeros intentos para expresar las
toxinas Bt en plantas fueron algo infructuosos
debido al origen bacteriano de los genes, es-
pecialmente por el alto contenido en nucleóti-
dos AT (adenina y timina), que produce bajos
niveles de expresión. Para solucionar estos in-
convenientes se han mejorado las secuencias
eliminando algunos sitios de poliadenilación,
mejorando la codificación para los codones e
incrementando el contenido de GC. Estos cam-
bios mejoraron la expresión hasta alcanzar el
0.2% - 0.3% del total de proteína soluble en
plantas transgénicas.

La primera especie vegetal transformada
con estos genes fue el tabaco, en 1986. Ac-
tualmente ya se han podido expresar los ge-

nes de proteínas *Cry* mediante transgénesis
en numerosas especies vegetales: forestales
(álamo, eucalipto, alerce), cereales (maíz, tri-
go), leguminosas (garbanzo, soja, maní), hor-
tícolas (papa, tomate, repollo, brócoli, batata),
y frutales (manzano, frutilla). Todos los cultivos
comerciales aprobados con resistencia a in-
sectos poseen genes derivados de Bt (tabla 1).

Manejo del cultivo Bt: refugios

Para que el uso y la aplicación exitosa de
la tecnología de resistencia mediante la expre-
sión de genes derivados de Bt pueda perpe-
tuarse en el tiempo se debe considerar el uso
de refugios. La posibilidad potencial de desa-
rrollo de resistencia a las plantas insecticidas
es considerado uno de los temas principales
de preocupación sobre esta tecnología, debido
a que ya han aparecido casos de resistencia a
productos para espolvorear, derivados de Bt.
Por esta razón, el desarrollo de planes de ma-
nejo de la resistencia de insectos es de suma
importancia. De las estrategias consideradas,
la más efectiva es la alta expresión de las pro-
teínas entomotóxicas en las plantas junto a la
siembra de refugios de plantas no Bt. Por otro
lado, la segunda generación de plantas de al-
godón Bt, combina dos tipos de proteínas in-
secticidas para un mismo insecto blanco. Este
apilamiento de genes Bt, en combinación con
una buena estrategia de manejo de refugios,
conferirá la máxima capacidad de protección a
la tecnología Bt contra la resistencia de inse-
ctos.

ii) Genes de origen vegetal

Inhibidores de proteasas: el desarrollo po-
tencial de resistencia a las toxinas derivadas
de genes Bt en lepidópteros ha disparado di-
versas investigaciones para generar nuevas
estrategias de control de insectos que puedan
a su vez preservar esta biotecnología amigable
para el ambiente. Los inhibidores de proteasas
(IP) son candidatos posibles para mejorar la
toxicidad de Bt contra lepidópteros, agregando
la posibilidad de control de coleópteros, dípte-
ros y otros insectos.

Los IP son parte del sistema de defensa de
la planta contra el ataque de los insectos y se
pueden encontrar en hojas, frutos, tubérculos
o semillas. Para poder digerir sus alimentos,

Tabla 1. Cultivos resistentes a insectos aprobados por país. Fuente: www.isaaa.org; www.agbios.com

País	Cultivo con genes de resistencia a insectos	Año de la primera liberación a campo
Australia	algodón	2003
Brasil	algodón	2005
	maíz	2008
Burkina Faso	algodón	2008
	algodón	2003
Canada	papa	1995
	maíz	1996
	batata	1995
China	algodón	1997
	alamos	2005
Honduras	maíz	2002 (precomercial)
India	algodón	2002
Indonesia	algodón	2001
Irán	arroz	2004
Japón	algodón	1997
	maíz	1996
Mejico	algodón	1997
Filipinas	maíz	2002
	algodón	1997
Sudáfrica	maíz	1997
	algodón	1995
EE UU	maíz	1995
	tomate	1998
	papa	1995
Unión Europea (España, Francia, Alemania, Rep. Checa, Polonia, Portugal, Eslovaquia y Rumania)	maíz	1997
Uruguay	maíz	2003

muchos insectos producen proteinasas, como la tripsina, o enzimas semejantes a la quimotripsina. Las proteínas antimetabólicas, como las IP, interfieren en el proceso digestivo de los insectos susceptibles y, de esta manera, afectan su crecimiento y desarrollo. Tomando este concepto, se han transformado plantas con secuencias de genes IP que, escoltados por promotores adecuados, pueden expresar altos niveles de estas proteínas. Los IP se encuentran comúnmente en los alimentos derivados de vegetales y son fácilmente inactivados con la cocción. Teniendo en cuenta esta precaución, la expresión de genes que codifican para IP en plantas se puede considerar como una estrategia segura.

El primer ejemplo exitoso de resistencia a insectos expresando IPs fue la expresión de genes inhibidores de tripsina de caupí (*CpTi*) en 1987. A partir de ese momento, se han introducido numerosos genes IP en diferentes es-

pecies. Se ha observado que no siempre estos genes actúan como antimetabolitos efectivos, sino que hay un gradiente de efectividad frente a diferentes insectos y que, además, muchas veces no son tan efectivos como los genes Bt. En base a estas observaciones se debe optimizar la interacción entre el IP introducida y la proteasa blanco del insecto para incrementar la acción del gen expresado en la planta transgénica.

Otra estrategia para mejorar los niveles de control puede ser utilizar más de un gen IP para interferir en diferentes proteasas del insecto. En este sentido, la combinación exitosa de diferentes secuencias de IPs formando multidominios para el control de trips (*Thysanoptera: Thripidae*) abre un abanico de nuevas posibilidades.

También se ha propuesto el uso de IPs en combinación con los genes Bt, debido a que las entomotoxinas Bt activadas pueden estar

sujetas a proteólisis o degradación por las proteinasas, derivando en fragmentos no tóxicos. Estos casos de resistencia o estados menos sensibles podrían evitarse si se combinan estos genes con los inhibidores de tripsina o quimotripsina del insecto. La combinación de genes de endotoxinas con genes derivados de plantas, como los IP, ofrece nuevas oportunidades y estrategias para el control de insectos.

Otros ejemplos de aplicación de IP son la expresión del gen de esporamina (inhibidor de tripsina) de batata, en *B. oleracea*, la sobreexpresión de hidroxiprolina en tabaco para control de lepidópteros, o la introducción de inhibidores de tripsina de garbanzo en algodón para control del coleóptero picudo del algodónero *Anthonomus grandis*.

- **Genes inhibidores de alfa amilasa:** así como los IP, los inhibidores de α -amilasa son producidos por las plantas como un mecanismo natural de defensa contra insectos. La toxicidad de los inhibidores de α -amilasa se produce mediante la interferencia en la digestión de los carbohidratos. Recientemente se ha aislado el gen inhibidor de α -amilasa de caupí y se ha demostrado el efecto tóxico sobre gorgojos de papaya.
- **Lectinas:** son proteínas con unión específica a carbohidratos. El rol principal que se les atribuye es el fenómeno de reconocimiento biológico que involucra células y proteínas. Para ser clasificadas como lectinas, las proteínas de unión a carbohidratos deben poseer por lo menos dos sitios de unión. Esta característica les permite aglutinar o precipitar estructuras que contienen residuos de azúcares. Se ha determinado que algunas lectinas vegetales poseen un mayor o menor efecto entomotóxico o actividad insecticida. La toxicidad sería consecuencia de la interacción con las glicoproteínas intestinales. Las diferencias en el nivel de toxicidad se pueden deber a que evolutivamente las plantas desarrollaron propiedades bioquímicas y fisicoquímicas diferentes, como la especificidad en la unión a carbohidratos. El espectro de plagas que se pueden controlar con estos genes

se amplía notablemente. Numerosos trabajos informan que ya se han introducido genes de lectinas (como la GNA, de *Gallanthus nivalis* L. aglutinina) en cultivos para el control de insectos lepidópteros, dípteros, coleópteros y homópteros. Un mecanismo de acción propuesto con la GNA es que al ser succionado por los insectos, se une al epitelio del intestino y pasa a la hemolinfa, actuando como entomotóxico. Expresando las GNA se han podido obtener plantas transgénicas de papaya resistentes a ácaros. Expresando lectinas de cebolla (llamadas ASAL) se han controlado áfidos en plantas de mostaza. Como en otros casos de genes provenientes de plantas, las lectinas pueden combinarse con otros genes, como por ejemplo, con distintos tipos de Bts, para combatir plagas de lepidópteros y de homópteros a la vez. Por ejemplo, la lectina PTA (de la planta medicinal china *Pinellia ternata*) ha mostrado efectos sobre áfidos en combinación con genes Bt en trigo.

Algunas lectinas tienen limitaciones en su aplicación en alimentación de mamíferos superiores debido a su toxicidad, como en el caso de las contenidas en el germen de trigo, que poseen fuertes propiedades insecticidas. Otras lectinas como la GNA se consideran no tóxicas para este grupo debido a su baja capacidad de unión en el intestino.

- **Quitinasas:** son enzimas digestivas que rompen las uniones glucosídicas de la quitina, sustancia que compone las paredes celulares de hongos, el exoesqueleto de algunos gusanos, y cutículas de insectos, nematodos y artrópodos. Se encuentran en organismos que deben digerir su propia quitina o la de otros individuos como hongos o animales. Pueden funcionar como tóxicas para insectos si son capaces de degradar la capa de quitina de las membranas que protegen el epitelio intestinal. En plantas superiores la expresión génica de las quitinasas se activa por la invasión de patógenos, por lo que se cree que cumplen un rol importante de defensa. Ya se ha comprobado

la acción inhibitoria sobre el crecimiento de hongos, pero la aplicación en el control de insectos aún no está fehacientemente descripta.

- *Avidina*: es una glicoproteína que se encuentra en la clara del huevo de gallina y tiene la propiedad de secuestrar la vitamina biotina. Al ser ingerida por el insecto en una concentración mayor a 100 ppm, la avidina puede ocasionar una deficiencia letal de esta vitamina y evitar el desarrollo de insectos durante el almacenamiento de granos. Por lo tanto, la avidina expresada en los granos puede ser efectiva como biopesticida para un amplio espectro de especies de insectos. Los datos sobre la efectividad y especificidad de acción de las avidinas no están tan completos como en el caso de las entomotoxinas Bts, pero se considera que podrían usarse como alternativa o complemento de esta tecnología. Se ha expresado en maíz para producir biomoléculas, pero podría utilizarse en un futuro también para biocontrol.
- *Polifenol oxidasas*: las enzimas llamadas polifenol oxidasas (PPOs) catalizan la oxidación de compuestos fenólicos a quinonas. Frecuentemente su inducción se asocia con la respuesta de las plantas a señales o daños producidos por patógenos o insectos. Por estas observaciones se sugiere que tendrían la capacidad de conferir resistencia tanto a enfermedades provocadas por bacterias como por insectos. Como ejemplos de aplicación se han publicado trabajos de resistencia a lepidópteros en álamo y en tomate. La manipulación de la actividad de PPOs para generar resistencia también podría ser un componente del manejo integrado de plagas.
- *Combinación de genes*: muchos de los genes candidatos para resistencia a insectos plaga que pueden ser usados en transformación genética son muy específicos o a veces medianamente efectivos. Para cubrir más posibilidades de control y evitar las posibles apariciones de resistencia, es recomendable plan-

tear sistemas de apilamiento de distintos genes en la misma planta. Asimismo, sería más efectivo combinar sistemas de genes que participen en sistemas metabólicos diferentes. Para efectuar una sinergia efectiva entre la biotecnología y el mejoramiento genético, las distintas estrategias planteadas de expresión de genes en plantas, a su vez, deben ser incluidas dentro del sistema de manejo integrado de plagas.

iii) Estrategias de ARN de interferencia (ARNi)

Los organismos eucarióticos poseen una maquinaria común de silenciamiento génico de secuencias específicas que es disparado por la presencia de ARNs de doble cadena (dsRNA). Este proceso se conoce como "interferencia del RNA" (RNAi) en animales y "silenciamiento génico post transcripcional" en plantas (PTGS).

El silenciamiento de algunos genes esenciales en insectos, mediado por los dsRNA, puede inducir el cese de la ingestión y, eventualmente la muerte. La utilización de la estrategia del ARN de interferencia para control de insectos requiere de una llegada eficiente al sitio de acción (tanto vía ingestión o por aplicación tópica) de las moléculas de dsRNA. Los genes candidatos blanco ideales para silenciar de esta manera podrían ser los que codifican para proteínas con funciones esenciales para el insecto. Se ha estudiado la transcripción de algunas secuencias de genes provenientes de insectos lepidópteros en plantas de maíz transgénicas (como por ejemplo, una porción del gen de la ATPasa de *Diabrotica virgifera virgifera*), bajo promotores constitutivos, verificándose una merma en el daño a nivel de las raíces. Asimismo, se ha estudiado la posibilidad de control combinando mediante el uso de ARN de interferencia, de más de un gen en termitas *Reticulitermes flavipes*.

Este enfoque alternativo al control de plagas puede ser efectivo también en combinación con genes Bt, tanto para control de lepidópteros como de coleópteros, según la secuencia que se introduzca en la planta. Por ejemplo, para el control del lepidóptero (*Helicoverpa armigera*) del algodón, del cual se han encon-

trado algunos individuos resistentes en China a los genes Bt, se demostró que la expresión de la secuencia de la enzima que degrada el gossipol en la oruga (que le permite tolerar la presencia de esa sustancia) es efectiva para el control de la plaga.

Esta nueva estrategia para el control de insectos plaga en plantas parece ser muy prometedora, ya que las secuencias génicas de los insectos para usar como blanco pueden ser muy específicas y relativamente fáciles de obtener.

Cultivos Bt comercializados- beneficios de la tecnología

Control biológico

Los enemigos naturales, como los predadores y parasitoides, cumplen una función ecológica y económica importante en cuanto al mantenimiento de la población de insectos herbívoros por debajo de los umbrales de daño económico. De esta manera contribuyen a los sistemas sustentables de manejo integrado de plagas (MIP).

También se conocen algunos factores que afectan a los insectos plaga que interactúan con los enemigos naturales y, consecuentemente, con la función de control que éstos aportan. De manera similar, la resistencia derivada de la ingeniería genética en plantas podría tener impacto sobre el control biológico, pero se ha comprobado que los cultivos transgénicos disponibles a la fecha que expresan proteínas Cry derivadas de *Bacillus thuringiensis*, no tienen efectos sobre los enemigos naturales debido a su restringido espectro de actividad. Sin embargo, el hecho que los insectos plaga son eficientemente controlados por los cultivos Bt tiene inevitables consecuencias sobre los enemigos naturales que se especializan en esas especies tanto como hospedantes como predadores. Pero, por otra parte, se ha demostrado una disminución en el uso de insecticidas en los cultivos Bt, lo que ha beneficiado significativamente a los organismos de control biológico. Como consecuencia, esta tecnología puede contribuir a la conservación de los enemigos naturales, deviniendo en una herramienta muy útil para el manejo integrado de plagas.

Reducción de micotoxinas

Uno de los beneficios indirectos de los cultivos Bt es la reducción del nivel de contaminación por micotoxinas en maíz. Las micotoxinas son metabolitos secundarios de los hongos que colonizan los cultivos. Se consideran contaminantes inevitables en los alimentos y aún las mejores tecnologías no pueden eliminar completamente su presencia. El daño por insectos es uno de los factores que predisponen a la contaminación por micotoxinas en maíz debido a que abren la puerta de entrada a los hongos a través de los canales que realizan en los tallos. Por esta razón, cualquier método que reduce el daño de orugas, también reduce el riesgo de contaminación por hongos, y se ha observado que los maíces Bt muestran una reducción significativa del nivel de las micotoxinas más comunes. En Argentina, en los años favorables a la acumulación de fumonisinas (por presencia de *Fusarium verticillioides* y *F. proliferatum*), las concentraciones de esta micotoxina son en un 40% menores en los híbridos Bt que en las respectivas isolíneas de maíz.

Reducción de plaguicidas

Durante el año 2006 los cultivos GM han reducido la aplicación de pesticidas en 286 millones de kg (equivalente a un 40% del volumen de pesticidas anual aplicado en la Unión Europea), disminuyendo así el impacto del uso de pesticidas sobre el ambiente en un 15,4%. Según una investigación de la IUPAC (Unión Internacional de Química Pura y Aplicada) entre los años 2002 y 2007, la adopción de cultivos resistentes a insectos redujo el uso de insecticidas, especialmente en el algodón Bt en Estados Unidos, así como también en Australia, India, China y Sudáfrica. El algodón Bt se ha incorporado a las prácticas de manejo integrado de plagas para evitar que los insecticidas afecten los insectos benéficos. Además, la reducción del uso de insecticidas debido al uso de algodón y maíz Bt benefician directamente a los productores, aumentando el margen bruto.

Aumento del rendimiento

Todos los reportes acerca de los beneficios de la adopción de cultivos Bt mencionan como un punto de gran relevancia el aumento de los

rindes en comparación con las tecnologías convencionales. En países como Argentina, China, Méjico, India y Sudáfrica se verifican incrementos de rendimiento entre 11% y 65%, mientras que los costos por el menor uso de disminuyen entre 40 a 77%.

Menor uso de agua

Al disminuir el número de pulverizaciones con insecticidas, la tecnología Bt contribuye al uso racional del agua.

Beneficios e impactos de la tecnología según el país adoptante

Los beneficios de estas tecnologías pueden observarse en diferentes contextos y desde diversos aspectos. Cada país adoptante de los eventos transgénicos con resistencia a insectos ha transitado por experiencias exitosas por razones tanto económicas, ecológicas y/o sociales.

La adopción de la tecnología muchas veces se mide en términos de beneficio económico. Pero se ha determinado que hay factores institucionales que influyen indirectamente en el nivel y la distribución de las ganancias, como la capacidad de investigación en institutos nacionales, las políticas en derecho de propiedad intelectual, la capacidad de regulación en seguridad ambiental y alimenticia, y la existencia de mercados permeables a estas tecnologías.

Estados Unidos

El primer país adoptante de algodón y maíz Bt fue Estados Unidos. El beneficio por el uso de estos dos eventos fue de \$19 millones en 1996 y de \$190 millones en 1997. En el primer ciclo de cultivo de algodón Bt se redujeron en un 70% las aplicaciones de insecticidas y hubo un incremento de 7% en el rendimiento. Actualmente el 50% de los cultivos OGM tienen lugar en EE UU, ocupando más de 50 millones de hectáreas.

India

India es el país que siembra la mayor superficie de algodón, y donde 60 millones de personas están relacionadas con este cultivo. En el 2002, unos 54.000 agricultores cultivaron

50.000 hectáreas de algodón Bt. Cinco años después, en 2007, el área de algodón Bt llegó a 6,2 millones de hectáreas, cultivadas por 3,8 millones de pequeños productores y de escasos recursos. Cabe destacar que más de 9 de cada 10 productores que sembraron algodón Bt en 2005, también lo hicieron en 2006 y en 2007. El algodón Bt ha aumentado los rendimientos hasta en un 50%, ha reducido el uso de insecticidas a la mitad, con las correspondientes consecuencias para el ambiente y la salud, y ha incrementado los ingresos de los productores en US\$ 250 o más por hectárea. A nivel nacional, el incremento en los ingresos de los productores derivados del uso del algodón Bt fue estimado para 2006 entre US\$ 840 millones y US\$ 1,7 mil millones. Además, la producción del algodón se duplicó, e India, que tenía uno de los rendimientos más bajos en el cultivo de algodón, pasó a ser un exportador, en lugar de un importador de algodón.

Cabe mencionar que en India hay nuevos productos de la biotecnología en desarrollo, como la berenjena Bt, un importante cultivo alimenticio y comercial que puede beneficiar a unos 2 millones de productores pequeños y de bajos recursos. La berenjena Bt se encuentra en estado avanzado de ensayos a campo, y se espera su aprobación en un futuro cercano.

China

La historia del algodón en China está bien documentada y es un importante caso de estudio sobre la adopción de cultivos transgénicos por parte de productores pequeños y de bajos recursos. Aunque India inició la siembra de algodón Bt en 2002, seis años después que China, ya en 2006 India había plantado 0,3 millones de hectáreas de algodón Bt más que China, y 2,4 millones de hectáreas más que China en 2007. Sin embargo, como las plantaciones de algodón son mucho más pequeñas en China (tienen en promedio 0,59 hectáreas) que en India (1,63 hectáreas), el número de pequeños productores que cultivaron algodón Bt en China en 2007 (7,1 millones) fue casi el doble que en India (3,8 millones), lo que equivale al 69% de las 5,5 millones de hectáreas del algodón cultivadas en China. Según los estudios realizados por el Centro para la Política Agrícola China

CCAP, el algodón Bt en China, en promedio, aumenta el rendimiento en un 9,6%, reduce el uso de insecticidas en un 60%, con consecuencias positivas tanto para el ambiente como para la salud de los productores, y genera un incremento en los ingresos de US\$ 220 por hectárea. Además, China ya ha sembrado casi un cuarto de millón de álamos Bt. En un estudio realizado entre 2002 y 2007, se ha encontrado que además de controlar el principal lepidóptero en el algodón (*Helicoverpa armigera*), reduce la presencia de esta plaga en otros cultivos no OGM, disminuyendo la necesidad de pulverizar con insecticidas. Entre los desarrollos actuales se encuentra el arroz transgénico resistente a plagas (larvas de lepidópteros) que una vez que se cultive comercialmente, aumentaría el rendimiento un 2-6% y reduciría el uso de insecticidas en casi un 80%.

Irán

En el año 2004, Irán aprobó la siembra comercial de arroz resistente a insectos. Fue el primer país en aprobar arroz GM para cultivo y consumo. El evento contiene el gen Cry1Ab, introducido en la variedad popular aromática □ llamada *Tarom molaii*, confiriéndole resistencia a la oruga del tallo, plaga que afecta el 25% de la cosecha cada año. Durante 2005-2006 Irán sembró unas 4000 hectáreas de arroz Bt. Se observó que esta variedad rinde 200 kg más que su contraparte no OGM. Actualmente todavía no se produce arroz GM en forma comercial.

Filipinas

Un ejemplo muy interesante de cultivos GM es el de la berenjena en Filipinas. Este cultivo de gran importancia económica (US\$ 32 millones) es atacado por muchas plagas de insectos, entre ellos el más destructivo es el lepidóptero *L. orbonalis*, *Guenée*. Para combatir esta plaga algunos productores pulverizan insecticidas hasta dos o tres veces por semana. Se están desarrollando eventos con incorporación de genes Bt, y pronostican que su adopción significará un aumento en el rendimiento, reducción de costos y de las labores, y un incremento del beneficio de US\$ 909/ha comparado con las variedades de cultivo actual.

Unión Europea

El maíz Bt se sembró por primera vez en España en el 1998. Entre 1998 y 2002, mediante un convenio entre productores y compañías semilleras, se sembraron pequeñas superficies (5% del total del maíz), llegando a 58000 has en 2006. En Francia se sembraron pequeñas superficies, así como en Portugal y Alemania entre 1998 y 2000. Hasta el año 2005 hubo pequeños incrementos en el área sembrada, y en el año 2006, se sembraron aproximadamente 65000 has de maíz Bt en siete Estados Miembros de la UE. El primer impacto de la adopción del maíz Bt se tradujo en mayores rindes (10% o más) debido al control de los lepidópteros plaga más importantes de esas zonas, en comparación con los maíces convencionales. Las ganancias generadas por el uso de los maíces Bt fueron entre 65 y 141 €/ha más que en los cultivos convencionales. En algunas regiones además, se mejoró la calidad de grano mediante una reducción significativa del nivel de micotoxinas.

Argentina

En el año 1998 se han aprobado por primera vez en Argentina los eventos de maíz y algodón con resistencia a insectos para su producción y comercialización. A partir de allí se aprobaron otros eventos Bt en maíz. La superficie sembrada fue incrementándose desde 13 mil y 5 mil has hasta 2,5 millones y 162 mil has en la campaña 07/08 para maíz y algodón respectivamente. En 2007, el incremento anual comparado con 2006, fue de 1,1 millones de hectáreas, equivalentes a una tasa anual de crecimiento del 6%. En el caso de maíz ya se han aprobado, para su cultivo en la campaña 07/08, eventos apilados de tolerancia a herbicidas con resistencia a insectos. La tasa de adopción de estos eventos para la producción se puede observar en la figura 1. En la tabla 2 se detallan los eventos aprobados en la Argentina hasta agosto de 2008.

- *Maíz Bt*: el beneficio de la adopción de la tecnología Bt consiste en la prevención de las pérdidas de rendimiento causadas por el ataque de *Diatraea Saccharalis* (barrenador del tallo) en su estado larval. Se estima que las pérdidas en la región



Figura 1. Superficie con cultivos Bt en Argentina. Fuente: Argenbio 2008.

pampeana por esta plaga alcanzan los 170 millones de dólares y que además, la adopción de híbridos Bt incrementó en un 10% el rendimiento del cultivo (es decir, que evitó pérdidas de producción de esa magnitud).

- **Algodón Bt:** el algodón Bt provee resistencia al complejo principal de plagas (*Helicoverpa gelotopoeon* y *H. Zea* comúnmente asociadas con *Heliotis virescens*) y también al gusano de la hoja (*Alabama argillacea*), la lagarta rosada (*Pectinophora gossypiella*) y otros lepidópteros (*Spodoptera* spp). Pero no provee resistencia contra insectos coleópteros o succionadores (chinchas y homópteros). Se ha determinado que la reducción en la cantidad de insecticidas pulverizados durante el período de cultivo Bt oscila entre 43% y 55%. La mayoría de las reducciones son en insecticidas muy tóxicos (de clases I y II), como organofosforados, carbamatos y piretroides sintéticos, que causan problemas de residuos y son tóxicos para los insectos benéficos. Se ha estimado el impacto de la adopción de algodón Bt como el equivalente a un 30% de aumento neta de producción por hectárea. El aumento de producción corresponde a la reducción

de las pérdidas causadas por ataques de lepidópteros.

Lecturas recomendadas

- Baum J A, Bogaert T, Clinton W, Heck G R, Feldmann P, Ilagan O, Johnson S, Plaetinck G, Muniyikwa T, Pleau M, Vaughn T & Roberts J. 2007. Control of coleopteran insect pests through RNA interference. *Nature Biotechnology* 25, 1322-1326.
- Brookes G. 2007. The benefits of adopting genetically modified insect resistant (Bt) maize in the European Union (EU): first results from 1998-2006; PG Economics Ltd www.pgeconomics.co.uk.
- Christeller J T, Malone L A, Todd J H, Marshall R M, Burgess E P J, Philip B A. 2005. Distribution and residual activity of two insecticidal proteins, avidinand aprotinin, expressed in transgenic tobacco plants, in the bodies and frass of *Spodoptera litura* larvae following feeding. *Journal of Insect Physiology* 51, 1117-1126.
- Farias L R, Costa F T, Souza L A, Pelegrini P B, Grossi-de-Sá MF, Neto S M, Bloch C Jr, Laumann R A, Noronha E F, Franco O L. 2007. Isolation of a novel *Carica papaya* α -amylase inhibitor with deleterious activity toward *Callosobruchus maculatus*. *Pesticide Biochemistry and Physiology*, 87, 255-260.
- Integration of Insect-Resistant Genetically Modified Crops within IPM Programs Series: Progress in Biological Control, Vol. 5 Ed: Romeis, Jörg;

Tabla 2. Eventos con resistencia a insectos aprobados en Argentina (hasta junio de 2008).

Nombre del Evento de Transformación	Solicitante	Fecha aprobación	Gen	Resolución	Otros países con el mismo evento aprobado
MON 531	Monsanto Argentina	16/07/1998	<i>cry1Ac</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-73 (B.t.k)	SAGPyA N°428	Australia, Brasil, Canadá, China, UE, India, Japón, Corea, Méjico, Filipinas, Sudáfrica, EEUU
MON 810	Monsanto Argentina	16/07/1998	<i>cry1Ab</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> HD-1.	SAGPyA N° 429	Australia, Brasil, Canadá, China, UE, India, Japón, Corea, Méjico, Filipinas, Sudáfrica, Suiza, Taiwán, Uruguay, EEUU
Bt 11	Novartis Agrosem	27/07/2001	<i>cry1A(b)</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> subsp. <i>kurstaki</i> cepa HD-1; <i>pat</i>	SAGPyA N° 392	Australia, Brasil, Canadá, China, UE, Japón, Corea, Méjico, Filipinas, Rusia, Sudáfrica, Suiza, Taiwán, Reino Unido, Uruguay, EEUU
TC 1507	Dow AgroSciences y Pioneer Argentina	15/03/2005	<i>cry1F</i> de <i>Bacillus thuringiensis</i> var. <i>aizawai</i> ; gen <i>pat</i> de <i>Streptomyces viridochromogenes</i>	SAGPyA N° 143	Australia, Canadá, China, UE, Japón, Corea, Méjico, Filipinas, Sudáfrica, Suiza, Taiwán, EEUU
NK603 x 810	Monsanto	28/08/2007	Híbrido derivado del cruzamiento entre las líneas parentales NK603 y MON810	SAGPyA N° 78	UE, Japón, Corea, Méjico, Filipina, Sudáfrica
1507 x NK603	Dow AgroSciences y Pioneer Argentina	28/05/2008	Evento apilado derivado del cruzamiento de las líneas 1507 y NK603 con tolerancia a herbicida y resistencia a lepidópteros.	SAGPyA N° 434	UE, Japón, Corea, Méjico, Filipinas

- Shelton, Anthony M.; Kennedy, George. 2008. XVIII, 446 p. Springer Netherlands.
- Mao Y B, Cai W J, Wang J W, Hong G J, Tao X Y, Wang L J, Huang Y P & Chen X Y (2007) Silencing a cotton bollworm P450 monooxygenase gene by plant-mediated RNAi impairs larval tolerance of gossypol. *Nature Biotechnology* 25:11, 1307-1313.
- Mayer A M. 2006. Polyphenol oxidases in plants and fungi: Going places? A review *Phytochemistry* 67, 2318–2331.
- McCafferty H, Moore P H, Zhu Y J. 2008. Papaya transformed with the *Galanthus nivalis* GNA gene produces a biologically active lectin with spider mite control activity. *Plant Science*, 175, 385–393.
- Ralph, S G. 2008. Analysis of 4,664 high-quality sequence-finished poplar full-length cDNA clones and their utility for the discovery of genes responding to insect feeding. *BMC Genomics*, 9:57.
- Raney T. 2006. Economic impact of transgenic crops in developing countries. *Current Opinion in Biotechnology*, 17:1–5.
- Trigo E J y Cap E J. 2006. Diez Años de Cultivos Genéticamente Modificados en la Agricultura Argentina. www.argnebio.org.
- Wang J and Constabel C P. 2004. Polyphenol oxidase overexpression in transgenic *Populus* enhances resistance to herbivory by forest tent caterpillar (*Malacosoma disstria*). *Planta* 220, 87–96.
- Wu F. 2008. Field Evidence: Bt Corn and Mycotoxin Reduction. ISB News Reporter www.isb.vt.edu.
- Wu M. 2008. Suppression of Cotton Bollworm in Multiple Crops in China in Areas with Bt Toxin-Containing Cotton. *Science* Vol. 321, 1676-1678.

V. CAPÍTULO 11

Aplicaciones biotecnológicas al manejo de malezas: Eventos de resistencia a herbicidas en cultivos.

Germán Ferrari
Julio E. Delucchi

Marcadores moleculares

Es muy importante destacar que la incumbencia de la biotecnología aplicada al manejo de malezas no se limitan solamente a la obtención de plantas transgénicas con resistencia herbicidas. Así, el uso de marcadores moleculares tiene gran importancia para la correcta identificación taxonómica de malezas y para el conocimiento de las relaciones genéticas entre poblaciones, el estudio del modo de reproducción y del flujo de genes con las plantas cultivadas. Los recientes avances en la caracterización funcional de los genomas vegetales están encontrando creciente aplicación en este campo. La genómica funcional permite identificar genes cuyas formas mutantes son letales, constituyendo éstos blancos ideales para su inhibición por un herbicida. Por otra parte, la utilización de micro arreglos permite estudiar a nivel genómico los efectos de “herbicidas candidato” sobre la expresión génica. Estos datos deben ser luego confirmados en estudios proteómicos.

Las aplicaciones de los marcadores moleculares son muy diversas y es de esperar que se les encuentren nuevos usos. Por ahora se están utilizando en la diferenciación de individuos, discriminación entre clones, análisis filogenéticos y taxonómicos, mapeo de genomas, cuantificación de variabilidad génica intra e inter específica, mejoras genéticas, detección de infecciones o propensión a sufrirlas, localización de resistencia a enfermedades y dispersión de especies entre otras.

Un ejemplo de aplicación del uso de marcadores moleculares en malezas es la epidemiología molecular de sorgo de Alepo (*Sorghum halepensis*) resistente a glifosato. Los primeros casos se manifestaron en el noroeste argenti-

no y al año 2009 hay reportados casos en el norte de Buenos Aires, Córdoba y el noreste argentino, comprometiendo el cultivo de soja y maíz, cuya estrategia de manejo de malezas, está basada en el uso de glifosato. Existe un proyecto que plantea el uso de marcadores moleculares y secuenciación nucleotídica para caracterizar la dinámica de la dispersión y caracterización molecular del mecanismo de resistencia de dicha maleza.

Instrumentos genómicos y de la proteómica

La proteómica es el estudio de la estructura y función de las proteínas, incluida su forma de actuar e interactuar dentro de las células. A partir del conocimiento profundo del metabolismo celular en las malezas es posible la identificación de blancos, tanto para sitio de acción de los herbicidas como para fuente de resistencia aplicables a cultivos. Por medio de esta tecnología fue detectada en el maíz la enzima Glutathión S-transferasa (GST) (Frear y Swanson, 1970), que tiene la capacidad de detoxificar, por medio de conjugación a herbicidas electrofílicos como la atrazina, acetoclor y metolaclor.

Posteriormente ocurrió el descubrimiento y aislamiento del gen *psbA*, proveniente de los cloroplastos de varias especies de malezas, que confiere resistencia conspicua a herbicidas con acción sobre el fotosistema II como la atrazina. A partir de este descubrimiento pudieron obtenerse plantas de tabaco con el gen *psbA* mutado para otorgarle resistencia a atrazina por selección fotomixotrófica* (*sistema de cultivo de in-vitro).

Cultivo de tejidos, selección in vitro y mutagénesis para el desarrollo de cultivos con resistencia a herbicidas.

Las técnicas de mutagénesis y selección in vitro o a campo, han permitido el aislamiento de individuos con resistencia a herbicidas, que en muchos casos, han alcanzado el nivel de utilización comercial. La obtención de cultivos Clearfield® (maíz, girasol, colza, trigo, arroz, entre otros), resistentes a diferentes principios activos de la familia de las imidazolinonas o la soja STS®, resistente a sufonilureas, ambos grupos inhibidores de la enzima acetolactato

sintetasa (de ahora en más en este texto, acetohidroxiácido sintetasa, o AHAS), son ejemplo de ello. Estos cultivos fueron obtenidos a través de la inducción de mutaciones y posterior selección, por la acción de los mencionados herbicidas, de los individuos resistentes.

Cultivos resistentes a herbicidas obtenidos por ingeniería genética

La ingeniería genética permite la introducción de variabilidad genética, útil para el mejoramiento de los cultivos por métodos no sexuales. La resistencia a herbicidas fue una de las primeras aplicaciones de la ingeniería genética de plantas, dichos mecanismos de resistencia ya se conocían a partir de estudios con aislamientos bacterianos resistentes, selección in vitro de células vegetales y de resistencia a campo en cultivos y malezas. Por lo tanto, resultaba claro que el fenotipo de resistencia podía obtenerse a partir de la introducción de genes individuales.

A partir del conocimiento de las secuencias codificantes que pudieran conferir resistencia a ciertos herbicidas en plantas y disponer de las herramientas para su correcta expresión, fue factible la obtención de cultivos resistentes. Sumado a esto, un grupo de empresas con marcado interés por diversificarse hacia el negocio de semillas, para desarrollar cultivos resistentes a sus moléculas herbicidas, hicieron posible la obtención de plantas transgénicas con resistencia exclusiva a dichos herbicidas o bien, combinada con resistencia a insectos.

Según un informe del ISAAA (Servicio para la Adquisición de Aplicaciones Agro-biotecnológicas), en 2007, 114.3 millones de hectáreas en todo el mundo, un 12% más que en 2006, fueron sembradas con cultivos genéticamente modificados (GM). El 57% de estas hectáreas correspondieron a soja, el 25% a maíz, el 13% a algodón y el 5% restante a canola. Estas superficies significaron el 64%, 24%, 43% y 20% de las áreas totales de cada uno de esos cultivos, respectivamente. En Argentina, en la campaña 2007/08, prácticamente el 100% de la superficie de soja fue sembrada con soja tolerante al herbicida glifosato, mientras que el maíz y el algodón transgénicos ocuparon el 74% y el 90% del área destinada a esos cultivos,

respectivamente. La superficie total de cultivos GM en Argentina ascendió a 19,85 millones de hectáreas en la campaña 2007/08, un 8% más que en la campaña anterior.

El proceso de inserción de genes implica la obtención de organismos genéticamente modificados, en este caso particular, de cultivos transgénicos. El primer cultivo transgénico obtenido por este método fue la denominada soja RR (soja Roundup Ready®) resistente a la acción herbicida del glifosato, por medio de la transferencia de un gen, desde una especie de *Agrobacterium* al genoma de la soja. Dicho gen también fue introducido en el maíz, generando el híbrido de maíz RR (maíz Roundup Ready®). Por otra parte, también se obtuvo el maíz Liberty Link®, resistente a glufosinato de amonio, herbicida no selectivo conocido comercialmente como Liberty®. En este último caso, el gen incorporado codifica para una enzima (fosfotricin-N-acetil transferasa), responsable de convertir al glufosinato en un metabolito inocuo para el cultivo.

Objetivos buscados en el desarrollo de cultivos resistentes a herbicidas

- Resolver un problema de malezas para el que no haya herbicidas disponibles.
- Reemplazar las combinaciones de herbicidas actualmente en uso por nuevos herbicidas.
- Reemplazar un herbicida de altas dosis por uno de bajas dosis.
- Reemplazar a un herbicida pre-emergente por uno post-emergente.
- Reemplazar herbicidas con propiedades ecológicas y/o toxicológicas inferiores.

Estos objetivos dan un marco de referencia para encarar el desarrollo de cultivos con resistencia a un herbicida, teniendo en cuenta que, el desarrollo de cultivos tolerantes debe priorizar la utilización de herbicidas con los menores efectos nocivos para el medio ambiente. Es importante comprender que existen diferentes problemas de malezas en cultivos particulares no resueltos aún y que se trata de una situación dinámica donde las malezas evolucionan permanentemente como respuesta a las prácticas de control empleadas por los agricultores.

Estrategias para obtener cultivos resistentes a herbicidas mediante ingeniería genética

- Incrementar la expresión de la proteína blanco del herbicida.
- Alterar el sitio de acción del herbicida.
- Introducir genes que permitan la detoxificación del herbicida.

Cabe mencionar que, de las estrategias mencionadas sólo las dos últimas han producido aplicaciones comerciales. En la tabla inferior son enumerados los principales eventos de resistencia a herbicidas aplicados en cultivos y su modo de acción.

Resistencia a Glifosato

En el año 1974 se introdujo al mercado el herbicida Roundup® cuyo ingrediente activo es el ácido glifosato (n-fosfonometil glicina). Este es un herbicida pos emergente de amplio espectro, no selectivo y seguro desde el punto

de vista ambiental (baja toxicidad para organismos no blanco, bajo movimiento en el agua subterránea y persistencia limitada).

El glifosato inhibe en plantas, bacterias, algas, hongos y parásitos apicomplejos, la 5-enolpiruvil shikimato-3-fosfato sintetasa (EPSPS), enzima clave para la síntesis de aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). La EPSPS es codificada en plantas por un gen nuclear cuyo producto activo se localiza en los plástidos. En las plantas, esta ruta biosintética (ruta del shikimato) tiene lugar en el cloroplasto. El glifosato actúa como un inhibidor competitivo ocupando el lugar del PEP (fosfoenolpiruvato) en el complejo enzimático. La unión de este herbicida a la enzima nativa bloquea su actividad e impide el transporte del complejo EPSPS-shikimato 3-fosfato al cloroplasto. La enzima producida por el gen mutado (*epsp^{s*}*) tiene una menor afinidad por el glifosato y es catalíticamente activa en presencia del herbicida (Figura 1).

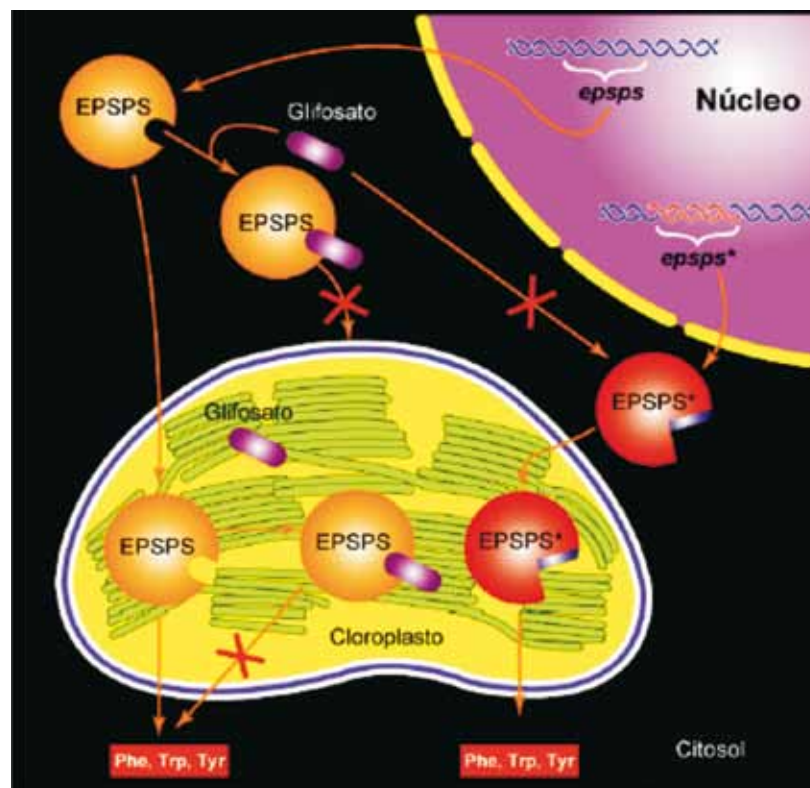


Figura 1. Esquema de la inhibición por el ácido n-fosfonometil glicina (glifosato) sobre la enzima EPSPS susceptible y la incompatibilidad del sitio de acción al mismo herbicida en la enzima EPSPS* mutante. Fuente: Mentaberry, A. 2007

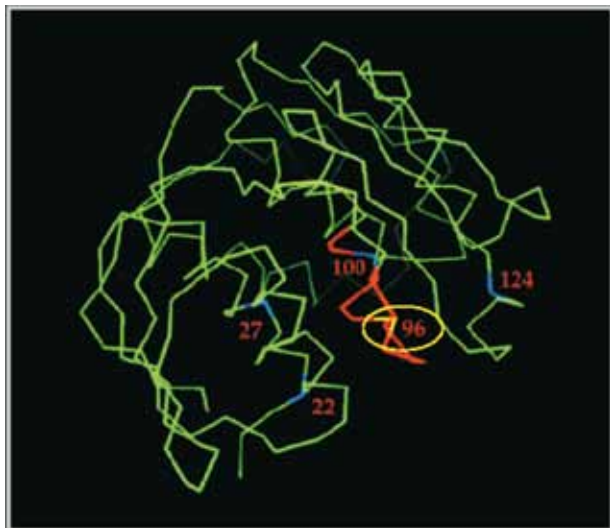


Figura 2. Estructura de la EPSP sintetasa de *E. coli*. Los residuos del sitio activo están marcados en azul. La región en rojo es una región altamente conservada. La conversión de la Gly 96 a Ala transforma a la enzima en resistente a glifosato. Mentaberry, A. 2007

Desarrollo de plantas transgénicas
resistentes a glifosato

EPSPS resistente a glifosato de la cepa CP4 de *Agrobacterium tumefaciens* (*cp4 epsps*).

El gen que codifica la EPSPS se clonó inicialmente en bacterias y se demostró que el incremento de su expresión, logrado mediante la localización del mismo en un plásmido multicopia, confiere resistencia al herbicida. Se obtuvieron así plantas transgénicas de petunia que expresaban un ADNc codificante para la pre-proteína completa EPSPS de esa misma especie bajo control del promotor 35S del virus del mosaico del coliflor. Estas plantas resultaron altamente tolerantes al herbicida. Otra estrategia explorada fue la búsqueda de formas variantes de la EPSPS que tuvieran simultáneamente baja afinidad por el glifosato y buena actividad catalítica. Se demostró que las plantas transgénicas que expresaban una EPSPS heteróloga con estas características, tenían muy buena respuesta frente al herbici-

da. A partir de estos descubrimientos, se aisló el gen que codifica una EPSPS resistente a glifosato proveniente de la cepa CP4 de la bacteria *Agrobacterium tumefaciens* (*cp4 epsps*).

Asimismo, se demostró en varias especies vegetales (zanahoria, petunia, tabaco, alfalfa y soja) que la selección gradual con glifosato en cultivos celulares permite obtener líneas celulares con resistencia al herbicida mediada por un proceso de amplificación génica.

Gen *gox*, que codifica la enzima glifosato oxidoreductasa

Esta es la enzima responsable del proceso de degradación del glifosato por la ruta del ácido aminometilfosfónico (AMPA). Se observó que el glifosato es rápidamente degradado por bacterias del suelo, el catabolismo de este herbicida puede producirse por la ruta de la C-P liasa (observada en *Pseudomonas* sp.) o por la del AMPA a partir *Achromobacter* sp. El gen *gox*, codificador de la enzima glifosato oxidoreductasa, es obtenido a partir de la cepa LBAA de *Achromobacter* sp y puede ser incorporado al genoma vegetal para sintetizar dicha enzima y así conferir resistencia por degradación del principio activo.

La utilización del gen *cp4 epsps* para obtención de plantas transgénicas tolerantes a glifosato, ha resultado más eficiente que la del gen *gox*. Se han observado en varios casos que la expresión de este último, en presencia del herbicida, está asociada a síntomas que sugieren fitotoxicidad de los productos de degradación.

Desarrollo de productos comerciales resistentes a glifosato

- **Soja:** promotor 2x35S / secuencia codificante *cp4 epsps* (1996).
- **Canola:** Promotor FMV (Figwort mosaic virus) / secuencia codificante *cp4 epsps* y promotor FMV / secuencia codificante *gox* (1996).
- **Algodón:** promotor FMV / secuencia codificante *cp4 epsps* (versión sintética con optimización de uso de codones; 1997).
- **Maíz:** promotor de actina 1 de arroz / secuencia codificante *cp4 epsps* y promotor 2x35S / secuencia codificante *cp4 epsps* (2001).

Resistencia a glufosinato de amonio

El glufosinato de amonio es un herbicida de contacto de amplio espectro que se utiliza para controlar malezas en post-emergencia, como defoliante para acelerar el secado de granos previo a la cosecha, o para el control total de la vegetación en suelos no cultivados. Fue desarrollado por Hoechst en los años 70 y es comercializado en más de 40 países bajo distintos nombres comerciales, Basta®, Rely®, Finale® y Challenge®. El L-glufosinato (L-fosfinotricina) es un inhibidor competitivo reversible del lugar del L-glutamato en el complejo enzimático de la glutamino sintetasa, que desempeña un papel crucial en la vía de asimilación primaria y secundaria del amonio en las plantas. La asimilación primaria comprende el amonio originado a partir del nitrato absorbido del suelo por las raíces y la secundaria comprende la reasimilación del amonio libre que se forma en la planta como consecuencia de la deaminación de aminoácidos y la fotorespiración. En las plantas tratadas con glufosinato, la inhibición de la reacción que produce glutamina a partir del glutamato conduce a una rápida acumulación de amonio, la fotosíntesis y la síntesis de proteínas decrecen. El conjunto de estos procesos producen la muerte de la planta unos pocos días luego del tratamiento.

Obtención de plantas transgénicas resistentes a glufosinato

El bialafos, un producto de fermentación de *Streptomyces hygroscopicus*, se comercializa en Japón desde 1984 bajo el nombre de Herbiace®. Este es un pro herbicida natural que consiste en L-glufosinato y dos residuos L-alanina. En las células vegetales, el bialafos se convierte en L-glufosinato por acción de endopeptidasas.

A partir de la cepa *Tu494* de *Streptomyces hygroscopicus*, se clonaron los genes *bar* y *pat*, ambos codifican para la síntesis de la enzima fosfinotricin-acetil transferasa (proteína PAT), que convierte al L-glufosinato en una forma acetilada sin actividad herbicida y que permite a estas bacterias defenderse de la acción tóxica del glufosinato que ellas mismas producen. Las primeras plantas con niveles de resisten-

cia a herbicidas suficiente para su uso agrícola se obtuvieron expresando constitutivamente el gen *bar* (tabaco, tomate y papa). Actualmente, ambos genes se encuentran en varios cultivos transgénicos que tienen status comercial así, Aventis comercializa en Canadá, la canola Liberty Link® desde 1995 y en el año 1997 se aprobó en EEUU la soja y el maíz Liberty Link®.

Herbicidas que inhiben la acetohidroxiácido sintetasa

La acetohidroxiácido sintetasa (AHAS), más conocida por su antigua denominación de acetolactato sintetasa (ALS), es una enzima clave en la biosíntesis de los aminoácidos ramificados leucina, valina e isoleucina (Fig. 3).

Los herbicidas inhibidores de la AHAS se han difundido debido a que presentan varias ventajas:

- Se utilizan en dosis muy bajas que pueden llegar a 2 g. ia/ha.
- Son de amplio espectro.
- Poseen actividad residual en el suelo.
- Permiten una amplia ventana de aplicación y buen margen de seguridad para el cultivo.
- Presentan baja toxicidad para mamíferos.

La AHAS es un blanco muy particular, ya que es inhibida por herbicidas que pertenecen a varios grupos químicos, entre ellos, las sulfonilureas y las imidazolinonas. Ambos son relativamente recientes y el primero de ellos fue comercializado en 1982 (clorsulfuron, una sulfonilurea). Las sulfonilureas actúan como inhibidor competitivo del piruvato sobre el sitio catalítico de la enzima y las imidazolinonas actúan como inhibidor no competitivo con respecto al piruvato (Fig. 4). La expresión de AHAS es necesaria siempre que haya síntesis de proteínas, por ello esta enzima se expresa a lo largo del ciclo de vida de la planta, catalizando el primer paso de las dos ramas de la biosíntesis de aminoácidos ramificados, proceso que en las plantas se localiza en los cloroplastos. Los inhibidores de la AHAS se unen a dominios de la misma que no corresponden al sitio catalítico, esto provoca que las mutaciones puntuales que afectan la unión de un herbicida a

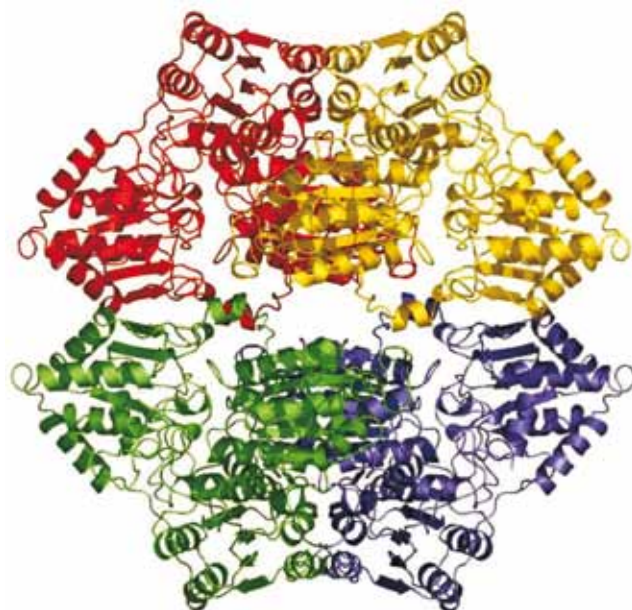


Figura 3. Representación de la enzima AHAS de *Arabidopsis thaliana* mostrando sus 4 sub-unidades idénticas. Fuente: Dr. Ronald G. Duggleby

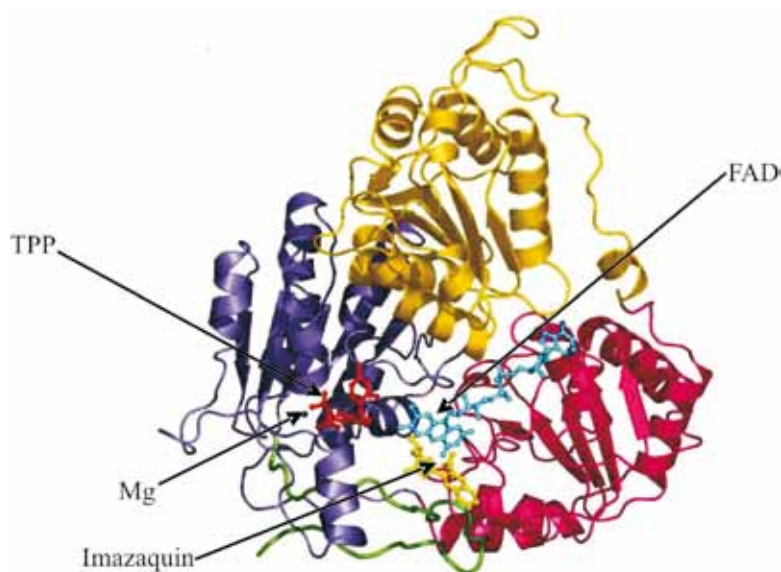


Figura 4. Sub-unidad de AHAS mostrando sus tres sectores junto con la Tiamina piro fosfato (TPP) en color rojo y los cofactores Mg^{2+} , y flavin dinucleotido (FAD). En amarillo puede verse el sitio de acción ocupado por el herbicida imazaquin. Fuente: Dr. Ronald G. Duggleby

la AHAS, no modifiquen su actividad catalítica. Como consecuencia, se han descrito en malezas, varias sustituciones de aminoácidos que

convierten a la AHAS sensible en una forma de la enzima resistente a por lo menos un herbicida sin perder su funcionalidad.

Surgimiento de malezas resistentes a las AHAS

El extenso y reiterado uso de los inhibidores de la AHAS hizo que, a pesar de su reciente difusión, la resistencia a los mismos haya evolucionado rápidamente en las malezas. Así, hay actualmente más especies o biotipos de malezas resistentes a este grupo de herbicidas que a cualquier otro. En la mayoría de los casos la resistencia que surge en las malezas se debe a alteraciones en el sitio blanco del herbicida como origen de una mutación puntual. Existen una gran cantidad de mutaciones responsables de la resistencia a los inhibidores de la AHAS, por ejemplo las mutaciones en los genes que codifican dicha enzima, resultando en algún cambio de cualquiera de los cinco aminoácidos que la forman. Por ejemplo, un cambio en *Pro 197* provee alta resistencia a las sulfonil ureas pero no a las imidazolinonas, mientras que la sustitución de *Ala122* resulta en resistencia solamente a IMI. Una mutación en *Trp591* provee resistencia a las dos familias de herbicidas y es muy posible que ocurran mutaciones múltiples que generen resistencia múltiple al conjunto de inhibidores de la AHAS. Los diferentes

patrones de resistencia a los inhibidores de las AHAS sugieren que los sitios de unión de cada familia no sean idénticos (Fig. 5). El gran número de biotipos resistentes se debe en parte a que existen muchos aminoácidos que al ser sustituidos transforman a la AHAS en resistente. La resistencia a las AHAS puede dividirse en 3 categorías:

- Biotipos resistentes a todos los inhibidores de las AHAS: sulfonil-ureas (SU), imidazolinonas (IMI), triazolopyrimidinas (TP), y pyrimidinylthiobenzoatos (PTB)
- Biotipos resistentes a IMI y PTB solamente.
- Biotipos resistentes a SU y TP solamente.

Obtención de cultivos resistentes a inhibidores de la AHAS

A mediados de la década del 80 se obtuvieron importantes avances en el desarrollo de líneas de arroz tolerante o resistente a herbicidas IMI, principalmente por una selección masiva en cultivos de tejidos. En 2001 y 2002 las variedades resistentes a IMI fueron introducidas en el sur de EEUU bajo el nombre comercial de

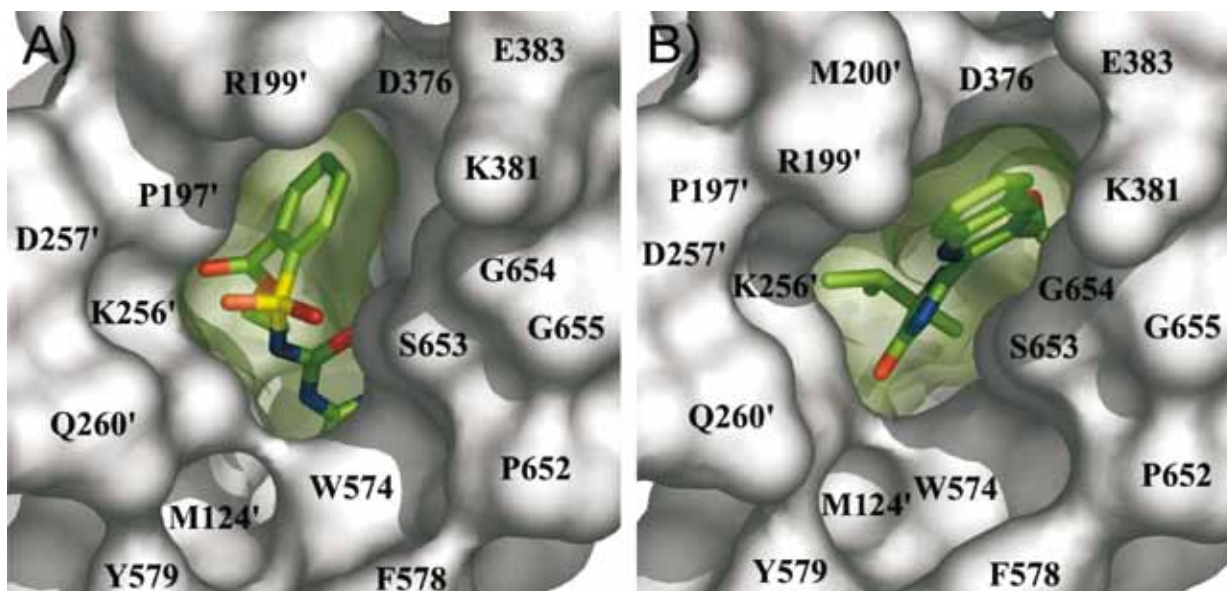


Figura 5. A) Clorimuron-etil posicionado en el sitio activo de la AHAS de *Arabidopsis*. La molécula es inclinada en torno al grupo sulfonil los anillos aromáticos obstruyen el canal de acceso al sitio activo de la enzima mientras que el resto de la molécula se mete en éste. B) Imazaquin bloqueando el acceso al sitio activo de la AHAS, su posición es mucho más superficial en comparación al clorimurón Fuente: Dr. Ronald Duggleby

Clearfield®. Estas variedades no fueron modificadas por la inserción de genes extraños sino que son mutantes seleccionados y desarrollados con variedades siguiendo el método clásico de fitomejoramiento. La tecnología Clearfield®, proveniente de una mutación natural en plantas de girasol silvestre (*Helianthus annuus*), ha sido incorporada en el cultivo comercial de girasol. El trigo de primavera resistente a las imidazolinonas fue liberado comercialmente en Canadá en 2004 (IR Trait). En remolacha azucarera fue desarrollada la resistencia a IMI y sulfonilureas por selección de células somáticas *Sir-13* y *93R30B*. Las sojas STS® (sulfonilurea-tolerant soybeans) fueron obtenidas en 1993 por métodos de selección tradicional y poseen el gen *Als1* que otorga resistencia natural a este tipo de herbicida.

Mediante tratamientos mutagénicos de microsporas y posterior cultivo y selección in vitro, se han obtenido plantas resistentes a imidazolinonas (colza), de esta misma manera, se obtuvieron plantas resistentes a imidazolinonas por mutagénesis química de semillas y posterior selección a campo en arroz, trigo y maíz. Respecto de la obtención de plantas transgénicas, fueron obtenidas plantas de algodón resistentes debido a la expresión de una AHAS de tabaco mutagenizada in vitro y lino con la expresión de una AHAS de *Arabidopsis* spp.

Resistencia a las triazinas

La aparición de la resistencia a las triazinas en algunas especies de malezas, aportó una buena oportunidad para desarrollar cultivos resistentes por técnicas de selección clásica. La fuente de genes utilizada por los criadores estaba normalmente limitada por las barreras reproductivas que existen entre las especies, pero la aparición de un biotipo de *Brassica campestris* resistente permitió el desarrollo de la canola resistente a las triazinas. El citoplasma de *B. Campestris* resistente fue transferida a *Brassica napus* var. *Oleífera* por retrocruzas combinada con selección citogenética. Así OAC Triton® fue la primera canola resistente a triazinas que apareció comercialmente en Canadá.

Dentro de este grupo, la atrazina es uno de los herbicidas más usados en el mundo, estos herbicidas son inhibidores fotosintéticos. Su

mecanismo de acción consiste en unirse a la proteína *D1*, ubicada en la membrana tilacoide del cloroplasto, impidiendo así su unión a la plastoquinona y bloqueando el transporte de electrones hacia el Fotosistema I. La atrazina se usa en cultivos como maíz y sorgo, que presentan resistencia a la misma por tener capacidad metabólica de detoxificarlo por medio de la glutatión-s-transferasa, que fija un tripéptido de glutatión a compuestos hidrofóbicos como la atrazina. Este mecanismo, está involucrado en el metabolismo de las triazinas y las cloracetanilidas. Una vez que el glutatión es unido al herbicida, este se transforma en un compuesto no tóxico y es removido hacia la vacuola. Este es uno de los mecanismos enzimáticos de protección frente a compuestos xenobióticos, una de las estrategias de la resistencia a herbicidas.

Selectividad por alteraciones en el sitio blanco del herbicida

En el contexto de reiterado uso de triazinas en monocultivo de maíz, se han identificado biotipos de malezas con resistencia a las mismas. Esta resistencia se basa en la alteración del sitio blanco de estos herbicidas. La proteína *D1* está codificada por el gen *psb A*, que está ubicado en el genoma del cloroplasto. En varias especies vegetales se ha reportado como base molecular de la resistencia a triazinas una mutación de puntual en el codón 264 del mencionado gen, que produce una sustitución de *serina* por *glicina* (Figura 6) en la forma resistente. Un reemplazo de *isoleucina* por *Val219* en *Poa annua* es la responsable de la resistencia de este biotipo al diuron y metribuzin. En *Portulaca oleacea* una sustitución de *Ser264* a *treonina* provee resistencia a linuron. La resistencia de los inhibidores del fotosistema II basada en cambios del sitio de acción es de herencia materna, por ser origen de una mutación del ADN del cloroplasto. Este tipo de herencia es de bajo potencial de expansión ya que no se diseminan por medio del polen.

La proteína 32 kDa (proteína de unión a *Qb* o *D1*) fue identificada como sitio de unión de las triazinas en *Amaranthus hybridus*. Esta proteína integra el núcleo del centro de reacción del Fotosistema II. En líneas resistentes de *Amaranthus*, se vio que las triazinas no se unían a

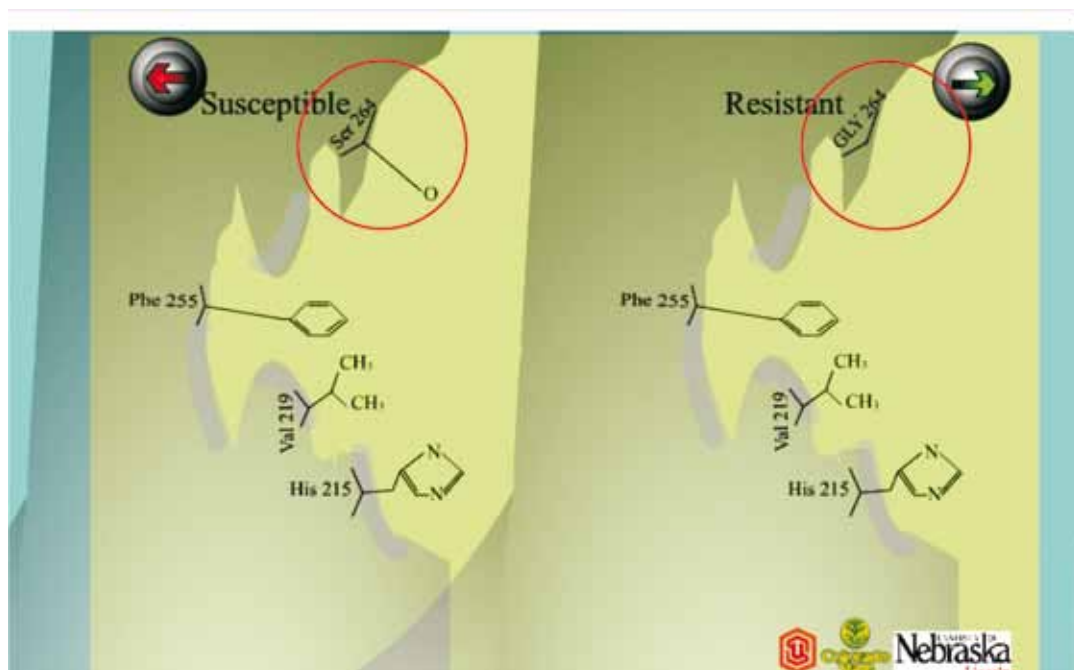


Figura 6. Fragmento de la proteína D1 que es punto de unión de la plastoquinona y sitio de acción de las triazinas, mostrando la sustitución de *serina* de la forma susceptible por *glicina* en la forma resistente a atrazina, en el codón 264. Fuente: Mallory-Smith, 2006.

la proteína y se encontró una mutación puntual de *Ser* a *Gly* en la posición 228. Se observaron mutaciones similares de la *Ser* 264 a *Gly* en la proteína de 32 kDa de *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chenopodium album* y *Solanum nigrum*.

La búsqueda de resistencia por ingeniería genética se ha orientado a la introducción de proteínas de 32 kDa mutadas en plantas transgénicas y a la detoxificación de atrazinas mediante la introducción de un gen que codifica glutatión-S-transferasa (GTS). El segundo enfoque ha dado mejores resultados.

Resistencia a hidroxibenzonitrilos

Los hidroxibenzonitrilos son también inhibidores del fotosistema II en especies dicotiledóneas. Por esta razón, cuando se aplican sobre dicotiledóneas resistentes a los mismos, se suele incluir un herbicida de acción graminicida, de modo de ampliar el espectro de control de malezas. Se obtuvieron plantas transgénicas de algodón, colza y tabaco que expresan una secuencia codificante para una nitrilasa,

obtenida de *Klebsiella pneumoniae sub. sp. ozanae*. Estas plantas son resistentes a campo a los herbicidas ioxynil y bromoxynil y han sido liberadas comercialmente en algunos países. Al ser el glifosato menos costoso y de mayor espectro de control que los hidroxibenzonitrilos, en 2004 fue el último año de comercialización de algodón BXN1 y colza BXN.

Resistencia a Dicamba

Es un herbicida auxínico que se utiliza como pre y post emergente en el control de malezas latifoliadas anuales y perennes. Recientemente se logró aislar el gen de la dicamba monooxigenasa (DMO) de *Pseudomonas maltophilia*, la cual confiere tolerancia a dicamba. Esta enzima está involucrada en la conversión del dicamba en un compuesto no tóxico como el ácido 3,6 dicloro-salicílico. La inserción de este gen provee a las plantas latifoliadas resistencia al herbicida. Actualmente se encuentra en desarrollo y proceso de inscripción en USA la soja y el algodón resistentes a dicamba por la inserción de este gen.

Otras resistencias metabólicas

Genes de bacterias

Se obtuvieron plantas transgénicas de varias especies, resistentes al ácido 2,4-dicloro fenóxiacético (2,4-D; regulador de crecimiento de tipo auxínico) por expresión de una monooxigenasa con gran especificidad de sustrato, obtenida de *Alcaligenes eutrophus* (gen *JMP134 tfdA*), una bacteria de suelo capaz de utilizar el 2,4-D como sustrato fuente de carbono. A partir de esta bacteria, también, se lograron plantas transgénicas que expresan una secuencia codificante para una dehalogenasa, que confiere resistencia al herbicida dalapon (inhibidor de la síntesis de lípidos), así como una secuencia codificante para una carbamato hidroxilasa, obtenida también de *Alcaligenes sp.* que confiere resistencia al herbicida metolaclor (perteneciente al grupo de las cloroacetamidas que inhiben la síntesis de lípidos).

Genes eucarióticos

Fueron obtenidas plantas de tabaco que expresan una glutatión S-transferasa de maíz, resistentes a cloroacetamidas, plantas transgénicas de papa con expresión constitutiva de 3 secuencias codificantes para citocromo-P450 monooxigenasas humanas. Se expresó en papa, bajo control de un promotor inducible por benzotiadiazol, una secuencia que codifica la citocromo-P450 monooxigenasa de rata, sola o fusionada con una de levadura. Las plantas fueron resistentes a herbicidas del grupo de las fenilureas. Se obtuvieron plantas de tabaco y *Arabidopsis* con expresión constitutiva de una citocromo-P450 monooxigenasa de topinambur (*Helianthus tuberosus*). Estas resultaron resistentes a fenilureas.

Comentarios finales

El descubrimiento de nuevos herbicidas no es una tarea sencilla ni económica. Para tener alguna oportunidad de ser comercializado, un herbicida, deberán tener buena actividad biológica contra un amplio espectro de malezas, ser no tóxico para cultivos, mamíferos e invertebrados, tener poca residualidad en el suelo y un costo de producción favorable. En este contexto, el desarrollo de cultivos con resistencia

a los herbicidas no selectivos ya existentes, es una opción interesante para ser explorada por la industria agroquímica respecto al desarrollo de nuevos herbicidas. Debe remarcarse que esto implica un cambio de paradigmas tecnológicos: antes, se desarrollaban herbicidas para su uso en cultivos particulares; ahora, se modifican genéticamente los cultivos para favorecer el uso de herbicidas particulares. La capacidad de los científicos para desarrollar nuevos eventos transgénicos útiles en cultivos y la expectativa de utilización de los mismos es actualmente muy alta. Sin embargo, surgen cuestiones que podrían afectar el futuro desarrollo de este tipo de tecnología. ¿Cómo afectará la opinión pública y los actuales sistemas regulatorios a los nuevos eventos transgénicos? ¿Habrá suficientes mercados globales que justifiquen la inversión que implica su desarrollo? ¿Aceptarán los consumidores la proliferación de nuevos organismos genéticamente modificados (OGM) en Europa? La demanda de los productores por los OGM puede ser muy alta, pero globalmente el comprador debe también negociar respecto de la situación de los gobiernos y la sociedad para determinar la viabilidad de los nuevos eventos transgénicos. La expansión futura en esta área dependerá de cómo se responda a estas cuestiones.

Bibliografía de consulta

- Babczynski, P; Zelinski, T. 1991. Mode of action of herbicidal ALS-inhibitors on acetolactate synthase from green plant cell cultures, yeast, and *Escherichia coli*. Pesticide science 31:3, pp. 305-323.
- Barry, G, Kishore, G, Padgett, S, Taylor, M, Kolacz, K, Weldon, M, Re, D, Eichholtz, D, Fincher, K & Hallas, L. 1992. Inhibitors of amino acid biosynthesis: strategies for imparting glyphosate tolerance to crop plants. pp. 139 - 145. In: Biosynthesis and Molecular Regulation of Amino Acids in Plants. Singh et al. (eds.). American Society of Plant Physiologists.
- Beverdort, WD and Kott, LS. 1987. Development of triazine resistance in crops by classical plant breeding. Weed Science. 35: 9-11.
- Bijman, J and Bogaardt, MJ. 2000. AgrEvo Monograph. Netherlands: Agricultural Economics Research Institute. Available on the World Wide Web at: <http://technology.open.ac.uk/cts/pita/>

- AnnC4-mono-agrevo.pdf.
- CASAFE (Cámara Argentina de Sanidad Agropecuaria y fertilizantes). 2008. Biotecnología, cultivos genéticamente modificados. Disponible en www.casafe.org/
- Castle, LA, Gusui, W and McElroy D. 2006. Agricultural input traits: past, present and future. Current Opinion in Biotechnology. Elsevier 17:105–112
- Clive J. 2006. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2006. Ithaca NY. International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA).
- Croughan, TP. 1994. Application of tissue culture techniques to the development of herbicide resistant rice. La. Agric 37:325–26.
- Duggleby, R, University of Queensland, Brisbane, Australia. Publicado en PNAS 103:569-573.
- Duke, SO. 1997. Herbicide-Resistant Crops: Agricultural, Environmental, Economic, Regulatory, and Technical Aspects. The Quarterly Review of Biology, September 1997, vol. 72, no. 3.
- Frear DS; Swanson HR. 1970. Biosynthesis of S-(4-ethyl-amino-6-isopropyl-amino-2-s-triazino) glutathione: partial purification and properties of a glutathione S transferase from corn. Phytochemistry 9:2123-2132.
- Hatzios KK. (ed). 1997. Regulation of Enzymatic Systems Detoxifying Xenobiotics in plants, 139-154. Kluwer Academic Publishers. Netherlands.
- Heap, IM. 2006. International survey of herbicide resistant weeds. Available at <http://www.weedscience.com> [Consultado 22/09/09].
- Herman, PL; Behrens, M; Chakraborty, S; Chrastil, BM; Barycki, J; Weeks, DP. 2005. A three-component dicamba o-demethylase from *Pseudomonas maltophilia*, strain DI-6. J Biol Chem 280:24759-24767.
- Irigoyen JH, Sabbatini MR, Vernava MN. 2008. Cultivos resistentes a herbicidas: ¿es la herramienta confiable del futuro? www.continuar.uns.edu.ar/portalead/malezas.
- Mallory-Smith, C; Namuth, D. 2006. Herbicide Resistance: Mechanisms, Inheritance, and Molecular Genetics. Accessed: 2009 http://plantandsoil.unl.edu/croptechology2005/weed_science.
- Mentaberry, A. 2007. Agrobiotecnología. Aplicaciones de la biotecnología al control de malezas. <http://www.fbmc.fcen.uba.ar>. Acceso: 09/2009.
- Pang, SS; Guddat, LW and Duggleby, RG. 2004. Crystallization of Arabidopsis thaliana acetohydroxyacid synthase in complex with the sulfonyleurea herbicide chlorimuron ethyl. Acta Cryst. D60, 153-155.
- Sigematsu, Y; Sato, F; Yamada, Y. 1989. The Mechanism of Herbicide Resistance in Tobacco Cells with a New Mutation in the QB Protein 1 Plant Physiol. 89(3): 986–992.
- Stalker, DM; McBride, KE; Malyj, LD. 1988. Herbicide resistance in transgenic plants expressing a bacterial detoxification gene. Science 1988, 242:419-423.
- Tranel, PJ and Wright, TR. (2002). Resistance of weeds to ALS-inhibiting herbicides: What have we learned? Weed Science, 50: 700-712.
- TSai Chin-Ju; Wang Chang-Sheng; Wang Ching-Yuh. 2006. Physiological characteristics of glufosinate resistance in rice. Weed Science, vol. 54 4: 634-640.
- Van Boxtel, VJ, Eskes, A and Berthouly, M. 1997. Glufosinate as an efficient inhibitor of callus proliferation in coffee tissue. In Vitro Cell Dev. Biol.-Plant 33: 6-12.
- Wright, T; Bascomb, N; Sturmer, S and Penner, D. 1998. Biochemical Mechanism and Molecular Basis for ALS-Inhibiting Herbicide Resistance in Sugarbeet (*Beta vulgaris*) Somatic Cell Selections. Weed Science, 46:1, pp. 13-23.

V, CAPITULO 12

Obtención de plantas tolerantes a distintos tipos de estreses abióticos

Florencia del Viso, Andrea F. Puebla, Néstor Carrillo y Raquel L. Chan

Factores abióticos que causan estrés en plantas. Efectos sobre los cultivos de interés agronómico

Los cambios desfavorables en el ambiente, provocados por factores climáticos y edáficos, generan estrés de tipo abiótico en las plantas afectando severamente su productividad. Los estreses abióticos constituyen la principal causa de pérdidas en los cultivos. Estas pérdidas de productividad superan a veces, según cálculos estimativos, el 50%. Las estrategias de mejoramiento clásico indicaron que los caracteres de tolerancia a estreses ambientales son caracteres cuantitativos y difíciles de seleccionar.

Existen numerosos factores abióticos naturales causantes de estreses para las plantas. Las actividades antropogénicas han agravado esta problemática. Como resultado global, el 22 % de los suelos cultivados es salino y las áreas sometidas a déficit hídrico se expanden continuamente.

En este capítulo nos enfocaremos en la descripción de los estreses abióticos que más afectan el crecimiento, desarrollo y productividad de los cultivos; así como en las estrategias que se han implementado con el objetivo de obtener las variedades de especies agronómicamente importantes mejor adaptadas a situaciones de estrés.

El déficit hídrico

La disponibilidad de agua es el factor más importante que afecta los cultivos. La sequía causa deshidratación celular por remoción de agua hacia los espacios extracelulares resultando en la reducción del volumen vacuolar y citosólico, en la reducción del crecimiento vegetativo por disminución de la tasa fotosintética, y en la producción de especies reactivas de oxígeno (EROS) que afectan negativamente las estructuras celulares y el metabolismo.

La primera respuesta observada en plantas sometidas a un estrés hídrico severo es el cierre de los estomas para prevenir la pérdida de agua por transpiración, lo que provoca una disminución de la tasa fotosintética y de la actividad ribulosa 1,5-bisfosfato carboxilasa/oxigenasa (RubisCO). La disminución en el CO_2 intracelular provoca un aumento en el transporte de electrones con una concomitante producción de EROS, incluyendo anión superóxido, peróxido de hidrógeno (H_2O_2) y oxígeno singlete.

Los cambios bioquímicos y fisiológicos asociados a la adaptación al estrés hídrico incluyen variaciones en la fluidez y en la composición de las membranas, acumulación de osmolitos, y cambios en las interacciones proteína-proteína y proteínas-lípidos.

Salinidad

Las altas concentraciones salinas en los suelos afectan a las plantas en al menos dos formas. En primer lugar dificultan a las raíces la extracción de agua del suelo y en segundo lugar resultan tóxicas para toda la estructura vegetal. Las diferentes especies varían en su tolerancia al estrés salino. Existen especies sensibles como el arroz, el maíz y la soja, mientras que otras como la alfalfa o la cebada presentan una mayor tolerancia.

Los efectos causados por el estrés salino son esencialmente la disrupción del equilibrio osmótico e iónico por exceso de sodio (Na^+), y la producción de EROS. Niveles tóxicos de Na^+ afectan la actividad de diversas enzimas y causan la desorganización de las membranas, la reducción del crecimiento, y la inhibición de la expansión y la división celular.

La reducción del crecimiento como consecuencia del estrés salino presenta dos fases. La primera (fase osmótica) es una respuesta rápida, que causa una pronunciada detención del crecimiento de la planta y el cierre de los estomas. La segunda (fase iónica) se caracteriza por una necrosis de las hojas causada por la acumulación de Na^+ . En algunas especies, las raíces de las plantas exhiben la capacidad de excluir al Na^+ . En otras, existe una tolerancia específica de tejido al Na^+ y al anión cloruro (Cl^-), que involucra la compartimentalización de estos iones intracelularmente, así como tam-

bién la excreción de sales por medio de glándulas especializadas.

Las temperaturas extremas

El estrés por temperatura que experimentan las plantas puede clasificarse en tres tipos: bajas temperaturas sobre cero (del inglés *chilling*), temperaturas de congelamiento (del inglés *freezing*) y altas temperaturas.

Altas temperaturas

En la actualidad, el calentamiento global acentúa los efectos adversos de las altas temperaturas sobre los cultivos, incrementando las pérdidas de productividad en tasas de hasta el 17% por cada grado Celsius de aumento de la temperatura ambiente durante la estación de crecimiento vegetativo.

El estrés por altas temperaturas está determinado tanto por el aumento de la temperatura ambiental por sobre la óptima inherente a cada especie, como por la radiación solar. Las hojas son los órganos que más sufren este tipo de estrés.

Las altas temperaturas, al igual que las bajas, afectan la fluidez y la permeabilidad de las membranas celulares y conducen a la apertura estomática para refrigerar la hoja.

Bajas temperaturas

El frío es un factor relevante que causa serias consecuencias en la productividad de las especies vegetales. Las especies adaptadas a climas templado-fríos, como los cereales de invierno, toleran bajas temperaturas sobre cero (0 – 15 °C), y aún temperaturas de congelamiento si son expuestas a un proceso conocido como aclimatación. En contraste, las especies de climas tropicales y subtropicales, como el maíz, el arroz o el tomate, son sensibles a las bajas temperaturas y en su mayoría carecen de mecanismos de aclimatación.

La consecuencia más importante del congelamiento es el daño a las membranas celulares. Éstas son afectadas por la disminución de la fluidez y la deshidratación que sufren durante el congelamiento. La fluidez de las membranas depende de la temperatura y de la proporción de ácidos grasos insaturados presentes.

Vías de señalización de las respuestas.

Regulación de la expresión génica.

Las plantas han adquirido durante su evolución la capacidad de modificar eventos específicos del desarrollo como respuesta a los cambios en las condiciones ambientales, y de este modo optimizar la utilización de los nutrientes disponibles. Esta plasticidad representa una ventaja significativa ya que el programa de expresión de genes que gobierna el desarrollo puede variar de acuerdo a las condiciones externas.

Las plantas perciben las señales del medio ambiente y las transmiten a la maquinaria celular. De esta forma activan procesos utilizando mecanismos complejos que les permiten aclimatarse. La respuesta consiste, en general, en cambios en el tipo, cantidad o actividad de determinadas proteínas de la planta, generando componentes útiles para las nuevas condiciones y eliminando los superfluos. Esto implica la activación o inactivación de los genes a partir de los cuales estas proteínas son sintetizadas. Los procesos de activación e inactivación suelen estar gobernados por un lado, por factores de transcripción y por otro por la presencia de elementos presentes en las regiones promotoras de los genes regulados. Además de este nivel de regulación de la expresión génica (transcripcional), existen otros puntos de regulación que incluyen las vías de procesamiento de los ARN mensajeros, el transporte de los mismos una vez maduros, su traducibilidad, y por último el procesamiento y transporte de las proteínas sintetizadas. Recientemente se han descrito mecanismos de silenciamiento de genes mediados por micro-ARNs, como un punto importante de regulación de la expresión génica (para una revisión ver Sunkar y col., 2007).

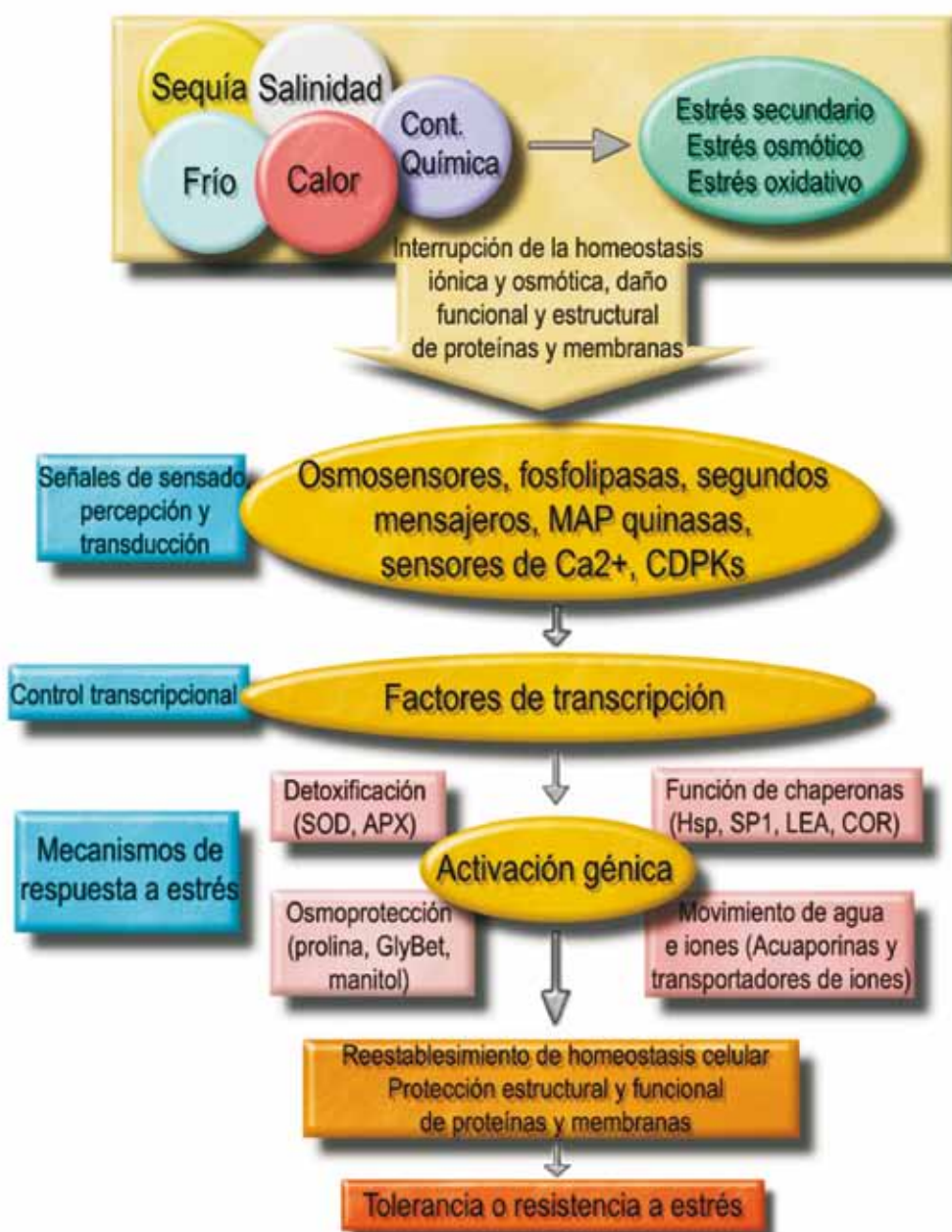
Obtención de plantas transgénicas con tolerancia mejorada a distintos tipos de estrés de origen abiótico

Como se ha comentado, los mecanismos de adaptación a condiciones ambientales adversas son controlados por redes moleculares involucradas en la percepción del estrés, la transducción de las señales, y la regulación de la expresión de genes efectores. Estas cascadas activan mecanismos protectores para res-

tablecer la homeostasis, y proteger y reparar biomoléculas y membranas dañadas (Figura 1). En consecuencia, la manipulación de genes que ayuden a mantener las funciones de células y componentes podría, en principio, incrementar la tolerancia a estrés. La mayor parte de las estrategias empleadas para mejorar el rendimiento de plantas bajo condiciones adversas se han basado en el fortalecimiento de estos sistemas endógenos (Figura 1). En los últimos

años se realizaron numerosos estudios detallados sobre el desarrollo de tolerancia a estrés abiótico, muchos de ellos basados en la determinación de perfiles de transcritos y amplitud genómica, que proporcionaron el conocimiento indispensable para el desarrollo racional de tolerancia a estrés.

Diferentes fuentes de estrés (sequía, heladas, salinidad) disparan una respuesta en cierto modo única, que posee a la vez elementos



Adaptado de Vinocur y Altman, 2005

comunes e idiosincrásicos respecto a otras respuestas y a vías metabólicas y morfogenéticas del organismo. Existe una significativa superposición y entrecruzamiento (del inglés *cross-talk*) entre tales redes de decisiones, que puede resultar sinérgica o antagónica. Aunque esta observación abre posibilidades de obtener tolerancia cruzada a diferentes fuentes de estrés mediante una única intervención transgénica, también limita el número de intervenciones útiles, y a menudo requiere una regulación sofisticada del transgén para prevenir impactos indeseables en el crecimiento y desarrollo vegetal.

Las estrategias de ingeniería genética empleadas para incrementar la supervivencia bajo condiciones de estrés han intentado fortalecer la expresión de cuatro grandes grupos de genes: *i*) genes involucrados en la transmisión de señales; *ii*) reguladores transcripcionales; *iii*) genes que codifican proteínas involucradas en la tolerancia, como proteínas del *shock* térmico (HSP) y enzimas antioxidantes; y *iv*) genes que codifican enzimas involucradas en la síntesis de metabolitos protectores. Discutiremos brevemente cada una de las estrategias. En las Tablas 1 a 3 se describen algunos casos.

Genes involucrados en la cascada de señales

Varios genes inducibles por estrés cuyos productos intervienen en la transmisión de señales de la respuesta han sido identificados y caracterizados exhaustivamente, incluyendo fosfolipasas y quinasas de proteínas pertenecientes a las familias MAP (del inglés *mitogen-activated protein*), y SOS (del inglés *salt-overly-sensitive*). Puesto que operan en un nivel alto de la cascada de decisiones de la respuesta, constituyen por definición excelentes puntos de intervención para obtener tolerancia generalizada. Varios de estos genes han sido introducidos en plantas resultando en líneas con fenotipos tolerantes a diversas fuentes de estrés.

A título de ejemplo, la expresión constitutiva de la MAP quinasa quinasa quinasa 1 de tabaco en maíz, activa una cascada de señales oxidativas que confiere tolerancia aumentada a heladas, calor y salinidad en las transformantes; protegiendo la fotosíntesis y otros metabolismos bajo condiciones adversas.

Sin embargo, esta estrategia no está exenta de problemas ya que la expresión constitutiva de este tipo de genes suele afectar rutas no vinculadas al estrés y, muy a menudo, se asocia con retardos de crecimiento y alteraciones en el metabolismo basal. Tales inconvenientes podrían evitarse mediante el uso de promotores inducibles por estrés en lugar de constitutivos; la situación refleja la dificultad de manipular reguladores clave sin contar con reglas generales para identificar puntos de intervención adecuados.

Los factores de transcripción

Los factores de transcripción (FTs) juegan un rol central en la elaboración de la respuesta ambiental y el programa morfogenético de la planta. Se trata de proteínas que actúan en *trans*, capaces de reconocer blancos de secuencias específicas de ADN (elementos *cis*) localizadas en las regiones promotoras de determinados genes. La regulación de la expresión génica está gobernada en gran medida por la interacción de los FTs con esta clase de elementos *cis*, induciendo o reprimiendo distintas vías de transducción de señales a través de un efecto dominó.

En plantas, se han identificado y caracterizado numerosos genes que codifican FTs. De hecho, en *Arabidopsis thaliana* y *Oryza sativa*, cuyos genomas fueron completamente secuenciados, se identificaron unos 1500 genes que codificarían FTs. Esta identificación se realizó en base a la presencia de dominios o motivos conservados, y caracterizados funcionalmente en FTs de otros reinos. Sin embargo, en plantas, no más de un 10 % de estas secuencias han sido aisladas y estudiadas fehacientemente, asignándoles la función de FT a las proteínas codificadas. Además se debe tener en cuenta que la similitud entre proteínas de organismos que pertenecen a distintos reinos, no necesariamente implica que se encuentren involucradas en la regulación de los mismos eventos.

Los FTs vegetales se clasifican en familias y subfamilias de acuerdo al grado de conservación de la secuencia de aminoácidos, al tamaño, y a la composición estructural de los genes codificantes.

Algunos FTs fueron caracterizados funcionalmente y, en casi todos los casos, se observó que intervienen en varias vías de señalización. Así por ejemplo, las proteínas de las familias MYB, MYC, b-Zip y HD-Zip participan en las respuestas a distintos tipos de estrés abiótico; mientras que las proteínas de la familia WRKY se relacionan tanto con la respuesta al ataque por organismos patógenos, como a la respuesta frente a estrés abiótico.

En las estrategias donde los FTs vegetales han sido sobreexpresados, expresados de manera ectópica, o silenciados, se observó que las plantas transformantes presentaban respuestas alteradas a las condiciones medioambientales, tanto por la acción de factores bióticos como abióticos (ver Tabla 2). En algunos casos la duplicación o triplicación de genes que

codificaban proteínas de tipo WRKY, provocó la falta de respuesta en mutantes silenciadas. En otros, se obtuvieron plantas con respuestas mejoradas a distintos tipos de estrés al mismo tiempo, corroborando la hipótesis de que los factores de transcripción actúan simultáneamente en diferentes vías de señalización.

Dentro de los FTs específicamente vinculados a respuestas ambientales, existe un grupo de genes bien caracterizados cuya acción se ubica en el inicio de la cascada de señalización en respuesta a estrés abiótico. Este grupo se encuentra representado por *Rd29A* de *A. thaliana*. En los promotores de los genes de este grupo se identificaron las secuencias denominadas ABRE (del inglés *ABA-responsive element*, elemento de respuesta a ABA) y DRE/CRT (*dehydration-responsive element/C-re-*

Tabla 2. Obtención de plantas tolerantes a déficit hídrico utilizando factores de transcripción de origen vegetal (Adaptada de Umezawa y col., 2007)

Clasificación	Nombre del gen	Planta transformada	Planta de la cual proviene el gen	Sistema de expresión	Experimentos realizados	Parámetros medidos	Año
Familia AP2/ERF	DREB1/CBF	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	Supervivencia	1998
	DREB1/CBF	Arabidopsis	Arabidopsis	Arabidopsis RD29AP	Retención de agua	Supervivencia	1999
	DREB1/CBF	DREB1B/CBF1	Tomate	CaMV35SP	Retención de agua	Crecimiento y desarrollo	2002
	DREB1/CBF	CBF4	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	Supervivencia	2002
	DREB1/CBF	ZmDREB1A	Arabidopsis	CaMV35SP	Disecación	Electrolitos	2004
	DREB1/CBF	DREB1C/CBF2	Arabidopsis	Knock out	Disecación	Supervivencia	2004
	AP2/ERF	SHN1/WIN1	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	Desarrollo	2004
	DREB1/CBF	DREB1A/CBF3	Trigo	Arabidopsis RD29AP	Retención de agua	Supervivencia	2004
	DREB1/CBF	DREB1A/CBF3	Tabaco	Arabidopsis RD29AP	Retención de agua	Supervivencia y fotosíntesis	2004
	DREB1/CBF	DREB1A/CBF3	Arroz	MaizUbi-1P	Retención de agua	Supervivencia	2005
	AP2/ERF	WXP1	Alfalfa	CaMV35SP	Retención de agua	Supervivencia	2005
	DREB2	DREB2A (forma activa con delección interna)	Arabidopsis	CaMV35SP, Arabidopsis RD29AP	Retención de agua	Supervivencia	2005
Proteínas con dominio básico asociado a cierre de leucinas (bZIP)	ABF3, AREB2/ABF4	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	Supervivencia	2002
	AREB1/ABF2	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	Crecimiento y supervivencia	2004
	ABF3	Arroz	Arabidopsis	Maiz Ubi-1P	Retención de agua	Supervivencia	2005
	AREB1/ABF2 (forma activa con una delección interna)	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua, deshidratación	Fotosíntesis y supervivencia	2005
	AREB1/ABF2 (forma activa fosforilada)	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	deshidratación	Supervivencia	2005
	bZIP)						
MYB/MYC	AtMYC2, AtMYB2	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Tratamiento con manitol	Supervivencia	2002
	CpMYB10	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	Electrolyte leakage	2004
	AtMYB60	Arabidopsis	plantaginum	ARN de interferencia	Retención de agua	Supervivencia, crecimiento y retención de agua	2005
	R2R3-MYB		Arabidopsis				
Proteínas con dedos de zinc	ZPT2-3	Petunia	Petunia	CaMV35SP	Deshidratación	Supervivencia	2003
	CAZFP1	Arabidopsis	Petunia	CaMV35SP	Retención de agua	Supervivencia	2004
	STZ	Arabidopsis	Pimiento	CaMV35SP	Retención de agua	Supervivencia, contenido de clorofila	2004
	HAHB4	Arabidopsis y maíz	girasol	CaMV35SP y promotor HAHB4	Deshidratación, ataque con insectos, retención de agua	Supervivencia, conductancia	
HD-Zip (homeodominio asociado a cierre de leucinas)						Supervivencia, área foliar, turgencia, desarrollo	
	ANAC019/055/072	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	Supervivencia	2004
Otros							
NAC							

peat, elemento de respuesta a deshidratación). Los FTs de la familia EREBE/AP2 unen las secuencias de tipo DRE/CRT y los de la familia b-ZIP los elementos ABRE. La expresión de los genes de la familia *EREBE/AP2* se induce a bajas temperaturas mientras que los de tipo *DREB* lo hacen por estrés osmótico. Los FTs de tipo b-Zip AREB1 y AREB2 son regulados positivamente por ácido abscísico (ABA).

La sobreexpresión de este tipo de genes produjo plantas con tolerancia aumentada a factores abióticos. En los casos de *DREB1* y 2 en *A. thaliana* las plantas transgénicas resultaron tolerantes a déficit hídrico. Por otra parte, la expresión heteróloga de *DREB1B/CBF1* de *A. thaliana* en tomate, además de conferir una elevada tolerancia a sequía, también lo hizo frente a estrés oxidativo y al generado por frío. Apparently el mecanismo de tolerancia ocurre vía el cierre estomático rápido, el incremento en la concentración de prolina y el aumento de la actividad catalasa, que provoca la reducción en la acumulación de H_2O_2 . Es interesante destacar que la transformación cruzada con genes homólogos de arroz dio como resultado el mismo efecto protector.

Un FT que actúa por un mecanismo diferente es WXP1 perteneciente a la familia AP2 de *Medicago truncatula*. Cuando se expresó de manera ectópica en alfalfa, las plantas transformadas presentaron tolerancia a déficit hídrico vía la sobreproducción de cera en las hojas, y evitando de esta forma la evaporación por transpiración.

Otro ejemplo de genes que intervienen en distintas vías es el del FT *HAHB4* de girasol. La expresión de este gen es regulada positivamente por estrés hídrico, salino y la presencia de las hormonas ABA, etileno y ácido jasmónico. La expresión ectópica de este gen bajo el control de un promotor constitutivo fuerte en plantas de *Arabidopsis*, generó líneas notoriamente más tolerantes a condiciones de sequía y/o salinidad. Sin embargo, y tal como se refirió en ejemplos anteriores, la expresión constitutiva del gen provocó cambios morfológicos y retraso en el desarrollo, eventos indeseables desde el punto de vista agronómico. La complejidad de la acción de los FTs se ve reflejada también en el hecho de que la expresión ec-

tópica de *HAHB4* en plantas de *Arabidopsis* y maíz confiere tolerancia al ataque de insectos, e incluso al daño mecánico; aunque también resulta en hipersensibilidad al ataque de bacterias patógenas, al menos en *Arabidopsis*.

Nuevamente, la utilización de promotores inducibles en reemplazo de los constitutivos presenta una alternativa viable. Cuando se modifican los factores adecuados, la morfología y el proceso de desarrollo se tornan indistinguibles de las plantas controles sin transformar, alcanzando buenos niveles de tolerancia.

Proteínas que confieren tolerancia a estrés

Muchas situaciones adversas como la sequía, el calor extremo y la salinidad, pueden causar desnaturalización e inactivación de biomoléculas. Las HSP, las proteínas LEA (llamadas así por su abundancia en la embriogénesis tardía, del inglés *late-embryogenesis-abundant*) y las chaperonas moleculares, son capaces de suministrar protección contra estos efectos favoreciendo el adecuado plegamiento y ensamblado de enzimas y otras proteínas. Los resultados de algunos ensayos señalan una correlación positiva entre los niveles de varias chaperonas y la tolerancia a estrés. Se observó también que la expresión de estos genes es inducida durante episodios de adversidad ambiental, y varios de ellos han sido utilizados para diseñar y generar plantas transgénicas tolerantes (ver Tabla 1). Por ejemplo, la introducción de HSP101 de *Arabidopsis* en arroz condujo a un aumento de la termotolerancia, mientras que la sobreexpresión de proteínas LEA resultó en mayor resistencia a la sequía.

Por otro lado, la producción aumentada EROS también resulta frecuente frente a muchas situaciones de estrés. Las EROS cumplen un doble rol: participan en la transducción de señales, pero al mismo tiempo contribuyen al daño por oxidación de membranas y biomoléculas, el cual es responsable de gran parte del deterioro que sufre la planta. Por lo tanto, la manipulación de enzimas antioxidantes como peroxidasas y dismutasas ofrece otra oportunidad para prevenir los daños oxidativos ocasionados por el desafío ambiental. Por desgracia, la aplicación de esta estrategia está lejos de

Tabla 1. Obtención de plantas tolerantes a déficit hídrico usando como herramientas genes que codifican proteínas protectoras (adaptada de Umezawa y col., 2007)

Clasificación	Nombre del gen	Planta transformada	Organismo del cual se obtuvo el gen	Sistema de expresión	Experimentos realizados	Parámetros medidos	Año
Metabolismo de osmoprotectores	Fructan os	SacB	Tabaco	B. subtilis b	CaMV35SP	5–10% PEG (tierra)	1995
	Trehalos a	TPS1	Tabaco	S. cerevisiae b	CaMV35SP	Disecación	1996
	myo -inositol	IMT1	Tabaco	Iceplant	CaMV35SP	Retención de agua	1997
	Prolina	P5CS	Arroz	Mothbean	AIPCABA-inducible	Retención de agua	1998
	Trehalos a	OtsA, OtsB	Tabaco	E. coli b	CaMV35SP	Regado limitado	1998
	Fructan os	SacB	Remolacha	B. subtilis b	CaMV35SP	Regado limitado	1999
	Glicina -betaina	COX	Arabidopsis/ canola/ Tabaco	A. pascens b	CaMV35SP	Regado limitado	2000
	Galactinol	AtGolS2	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	2002
	Trehalosa	TPSP	Rice	E. coli b	ABA-inducible/ rbcS P	Retención de agua	2002
	Trehalosa	TPSP (OtsA+OtsB)	Arroz	E. coli b	Ubi -1P de maíz	Retención de agua	2003
	Manitol	TPSP (OtsA+OtsB)	Trigo	E. coli b	Maiz Ubi -1P	Regado limitado	2003
	Poliaminas	ADC	Arroz	D. stramonium b	Maiz Ubi -1P	20% PEG (soil)	2004
	Poliaminas	SPDS	Arabidopsis	C. ficifolia	CaMV35SP	Retención de agua	2004
	Prolina	P5CS	Petunia	Arabidopsis , arroz	CaMV35SP	Retención de agua	2005
	Trehalosa	TPS1	Tomate	S. cerevisiae b	CaMV35SP	Retención de agua	2005
Proteínas de protección	LEA (del inglés late embryogenesis abundant)	HVA1	Arroz	Cebada	Arroz Act -1P	Retención de agua	1996
	LEA	HVA1	Trigo	Maiz Ubi -1P	Maiz Ubi -1P	Retención de agua	2000
	Chaperone	BiP	Tabaco	Cebada	CaMV35SP	Retención de agua	2001
	Heat shock protein	AyHsp17.6A	Arabidopsis	Soja	CaMV35SP	Retención de agua	2001
	LEA	HVA1	Arroz	Arabidopsis	Arroz Act -1P	Retención de agua	2001
	LEA	LEA	Col china	Cebada	CaMV35SP	Retención de agua , ensayos a campo	2004
	LEA	LEA	Canola	Canola	CaMV35SP	Retención de agua , ensayos a campo	2005
	Proteínas capt adoras de especies reactivas de oxígeno (EROS)	MnSOD	Alfalfa	N.	CaMV35SP	Retención de agua	1996
	Detoxificación	MsALR	Tabaco	plumbaginifolia	CaMV35SP	Retención de agua	1996
	Lípido per óxido	PARP	Canola	Alfalfa	CaMV35SP (RNAi)	Callos	1996
Others	NAD+ ruptura	CDT1	C. plantagenium	—	Agrobacterium pg5	Retención de agua	2000
	transporte de iones	AVP1	Arabidopsis	C. plantagenium	CaMV35SP	Retención de agua	2005
	biosíntesis de ABA	AtNCE3	Arabidopsis	—	CaMV35SP	Cultivo en hidroponía y tierra	1997
	estomas	Chi-NADP-ME	Tabaco	Arabidopsis	Agrobacterium MAS	Supervivencia de los callos	2001
	transporte de iones	CYP707A3	Arabidopsis	Arabidopsis	Knockout	Supervivencia de los callos	2002
	estomas	—	—	Maiz	—	Desarrollo	2005
	estomas	—	—	Arabidopsis	—	Crecimiento del tallo	2005
	estomas	—	—	—	—	Conductancia estomática , desarrollo	2005
	estomas	—	—	—	—	Supervivencia y transpiración	2005
	estomas	—	—	—	—	Supervivencia y transpiración	2005

ser sencilla, ya que diferentes miembros de la red antioxidante en plantas responden de manera diferente a distintos tratamientos hostiles. Se han obtenido en consecuencia niveles variables de tolerancia mediante la expresión de enzimas antioxidantes. Por ejemplo, la sobreexpresión de superóxido dismutasas fue capaz de incrementar la supervivencia y tolerancia a estrés en arveja y tabaco, pero no en alfalfa.

Síntesis de metabolitos protectores

Se ha identificado una amplia gama de metabolitos capaces de mitigar los efectos deletéreos del estrés osmótico y del estrés oxidativo que acompañan a muchas situaciones

ambientales hostiles (Figura 1). Se trata de amino ácidos (como prolina), aminos (glicina-betaina, poliaminas), azúcares y azúcares alcoholes (trehalosa, manitol), y antioxidantes (glutación, ascorbato, tocoferoles). Otros solutos compatibles son los fructanos, polímeros de fructosa, cuyo incremento está relacionado al proceso de aclimatación a las bajas temperaturas en especies tolerantes de gramíneas. Así por ejemplo, plantas transgénicas de arroz y tabaco que producen fructanos mostraron un incremento en la tolerancia a las bajas temperaturas. No obstante, la modulación de una única reacción enzimática, aún cuando se trate de la etapa limitante, está generalmente regu-

lada por la tendencia de la célula a restituir la homeostasis metabólica, limitando el potencial de este enfoque.

Los intentos de sobreexpresar trehalosa y manitol en arroz y maíz, respectivamente, condujeron a aumentos moderados en los niveles de estos compuestos cuando se manipuló una única enzima. La modificación de varias etapas dentro de una misma vía puede ayudar al control de los flujos metabólicos de una manera más predecible. Por ejemplo, la ingeniería de varias reacciones en las correspondientes rutas permitió obtener altos niveles de glicina-betaína y de trehalosa en plantas. La determinación de perfiles metabólicos globales en plantas se ha convertido en una herramienta imprescindible para comprender cambios inducidos por estrés en metabolitos protectores.

Estrategias sustitutivas

Un elemento común a muchas situaciones de estrés que ha surgido de los análisis de amplitud genómica en *Arabidopsis* es la declinación universal de la proteína de hierro-azufre ferredoxina (Fd), resultado que además se ha confirmado por ensayos bioquímicos. Fd juega un rol central en la distribución de electrones desde la cadena de transporte electrónico a numerosas vías cloroplásticas, incluyendo la fijación de CO₂, la asimilación de nitrógeno y azufre, el metabolismo de aminoácidos y la desaturación de ácidos grasos. Además participa en varios procesos regulatorios (vía tiorredoxina), disipativos y morfogenéticos (síntesis de fitocromos y de ácido jasmónico). La regulación negativa de la expresión mediante un ARN antisentido ha permitido observar los efectos negativos de la caída de Fd: las plantas presentaron fenotipos cloróticos y enanos, indicando que su disminución puede ser extremadamente dañina para un organismo sometido a estrés. Por lo tanto, Fd constituye un excelente candidato para intervenciones transgénicas.

Desafortunadamente, la posibilidad de incrementar el contenido de Fd mediante ingeniería genética está limitada por la fuerte regulación postranscripcional de la expresión, que depende de secuencias ubicadas dentro de la región codogénica, lo que hace virtualmente imposible la mutagénesis. Una alternativa atractiva

proviene de estudios realizados en microorganismos fotosintéticos, cianobacterias y algas. Estos organismos, al igual que las plantas, están sometidos a estrés ambiental especialmente en los océanos donde las condiciones suelen ser extremas, y sufren disminuciones del mismo tipo en los niveles de Fd.

En tales condiciones, algas y cianobacterias responden al desafío ambiental mediante estrategias sustitutivas. Se trata del reemplazo de las proteínas lábiles al estrés por otras resistentes, mediante la inducción de la expresión de los genes que las codifican. El reemplazo más conspicuo es precisamente el de Fd por flavodoxina (Fld), una flavoproteína soluble que contiene mononucleótido de flavina y cuyas propiedades como transportadora de electrones son prácticamente idénticas a las de Fd. Sin embargo, a diferencia de Fd que se encuentra ampliamente distribuida en plantas, animales y bacterias, Fld ha desaparecido del genoma de los eucariotes superiores, incluyendo plantas, y sus considerables ventajas adaptativas se perdieron irreversiblemente mucho antes de la colonización de la tierra firme.

Es interesante hacer notar que a pesar de los eones de divergencia evolutiva entre plantas y cianobacterias, la proteína Fld aislada de estas últimas es capaz de interactuar productivamente con las enzimas homólogas, sugiriendo que podrían actuar corrigiendo las consecuencias negativas de la disminución de Fd en plantas estresadas.

Efectivamente, líneas transgénicas de tabaco que acumulan una Fld de cianobacteriana en cloroplastos desarrollaron tolerancia aumentada a diversas fuentes de estrés abiótico (incluyendo sequía, radiaciones, heladas, altas temperaturas y alta luz), así como también a los efectos tóxicos del herbicida de contacto paraquat y a nitroderivados. La tolerancia desarrollada fue dependiente de la dosis, y de la capacidad de la Fld transgénica de interactuar con los sistemas endógenos de transporte electrónico, reemplazando a Fd a medida que esta declina como consecuencia del estrés. Resultados preliminares indican que los mismos niveles de tolerancia pueden obtenerse en cultivos de interés agronómico como maíz, cebada, colza, tomate y papa (Tabla 3).

Tabla 3. Obtención de plantas tolerantes a déficit hídrico usando como herramientas genes involucrados en las vías de señalización (adaptada de Umezawa y col., 2007)

Clasificación	Nombre del gen	Planta transformada	Planta de la cual fue aislado el gen	Sistema de expresión	Experimentos realizados	Parámetros medidos	Año
Proteínas-quinasas CDPK							
	OsCDPK7	Arroz	Arroz	CaMV35SP	Retención de agua	Crecimiento del tallo, expresión génica, marchitez,	2000
	GSK3/Shaggy	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	Supervivencia	2001
	MAPKKK	Maíz	Tabaco	CaMV35SP	Estrés hídrico	Número de hojas, tamaño de fruto	2004
	SnRK2	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	Supervivencia, expresión génica	2004
Otros							
Medidor de calcio	CBL1	Arabidopsis	Arabidopsis	Agrobacterium MAS	Retención de agua	Supervivencia, expresión génica	2003
14-3-3 Proteína	GF14l	Algodón	Algodón	CaMV35SP	Retención de agua	Senescencia, contenido de clorofila, fotosíntesis	2004
CC-NBS-LRR	ADR1	Arabidopsis	Arabidopsis	CaMV35SP	Retención de agua	Supervivencia, expresión génica	2004
Farnesyl-transferasa	ERA1	Arabidopsis, canola	Arabidopsis	CaMV35SP/ RD29AP (antisentido)	Retención de agua, ensayos a campot	Supervivencia, pérdida de agua, productividad de semilla, contenido de aceite	2005

Del laboratorio al campo

En la obtención de tolerancia a campo, el pronóstico se complica aún más dado que las plantas en su ambiente natural están sometidas a varias adversidades en forma simultánea, en lugar de una sola condición (tal como se estudia en el laboratorio). Esto puede agravar el daño que sufre por el organismo y al mismo tiempo, desencadenar rutas protectoras diferentes e incluso opuestas. Por ejemplo, la sequía es normalmente acompañada por cierre estomático para prevenir la pérdida de agua, mientras que las altas temperaturas conducen a aperturas de los estomas para bajar la temperatura foliar mediante evaporación. Sin embargo, calor y deficiencia de agua normalmente van juntas en el campo. Algunos investigadores han sugerido que el desarrollo de tolerancia contra una combinación de estreses podría requerir una respuesta única que no puede preverse por la mera adición de genes inducidos durante cada episodio individual de estrés. El conocimiento existente sobre este tipo de tolerancia es virtualmente nulo, lo cual podría explicar en parte por qué algunas plantas transgénicas con tolerancia aumentada desarrolladas en el laboratorio, no muestran mejoras en el rendimiento cuando son ensayadas a campo.

Perspectivas

En consecuencia, uno de los mayores desafíos es el desarrollar plantas transgénicas con

tolerancia aumentada a distintos tipos de estrés, sobre todo a aquellos que se dan en forma simultánea en determinadas regiones. Lograr esto implica conocer las complejas relaciones entre distintas vías de transducción de señales que participan en cada una de las respuestas. ¿Cuál sería la estrategia entonces? Obtener un mapa de todos los genes esenciales para el desarrollo de tolerancia a una combinación de estreses abióticos puede ser, además de costoso, un trabajo faraónico. Por otra parte, la resistencia a múltiples estreses pareciera estar ligada genéticamente a la penalidad de retardos en el desarrollo así como a disminuciones en los rendimientos. Sin embargo, desde el punto de vista opuesto, una reducción del rendimiento ocasionada por la estrategia utilizada es mucho más alentadora que el rendimiento cero causado por la combinación letal de varios tipos de estrés.

Una estrategia posible sería la de analizar la expresión génica en plantas que al ser sometidas a una combinación de estreses severos, sobrevivan o los toleren mejor que sus pares. Este tipo de resistencia sugiere la presencia de mutaciones detectables en los análisis de expresión.

También es fundamental la experiencia de mejoradores y productores. Son ellos quienes saben qué tipo de estrés o combinación de ellos, afecta más a cada cultivo y en cada región. Las combinaciones pueden ser muy di-

ferentes y por consiguiente los estudios y soluciones buscadas.

Lecturas Recomendadas

- Bartels D. and Sunkar R. 2005. Drought and salt tolerance in plants. *Crit Rev Plant Sci*, 24, 23-58.
- Chinnusamy V., Zhu J. and Zhu J.K. 2007. Cold stress regulation of gene expression in plants. *Trends Plant Sci*, 12, 444-451.
- Dezar CA., Gago GM., González DH. and Chan RL. 2005. *Hahb-4*, a sunflower homeobox-leucine zipper gene, confers drought tolerance to *Arabidopsis thaliana* plants. *Transgenic Res*, 14, 429-440.
- Gutterson N. and Zhang JZ. 2004. Genomics application to biotech traits: a revolution in progress? *Curr Opin Plant Biol*, 7, 226-230
- Mahajan S. and Tuteja N. 2005. Cold, salinity and drought stresses: An overview. *Arch Biochem Biophys*, 444, 139-158.
- Manavella PA., Arce AL., Dezar CA., Bitton F., Renou JP., Crespi M. and Chan RL. 2006. Cross-talk between ethylene and drought signaling pathways is mediated by the sunflower *Hahb-4* transcription factor. *Plant J.*, 48, 125-137.
- Mittler R. 2006. Abiotic stress, the field environment and stress combination. *Trends Plant Sci.*, 11, 15-19.
- Mittler R., Vanderauwera S., Gollery M. and van Breusegem F. 2004. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci.*, 9, 490-498.
- Munns R. and Tester M. 2008. Mechanisms of salinity tolerance. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 59, 651-681.
- Riechmann JL. 2002. Transcriptional regulation: a genomic overview. *The Arabidopsis book*. Ed: American Society of Plant Biologists.
- Rizhsky L., Liang H., Shuman J., Shulaev V., Davletova S. and Mittler R. 2004. When defense pathways collide. The response of *Arabidopsis* to a combination of drought and heat stress. *Plant Physiol.*, 134, 1683-1696.
- Shinozaki K., Yamaguchi-Shinozaki K. and Seki M. 2003. Regulatory networks of gene expression in the drought and cold stress responses. *Curr Opin Plant Biol*, 6, 410-417.
- Sunkar R., Chinnusamy V., Zhu J. and Zhu J.K. 2007. Small RNAs as big players in plant abiotic stress responses and nutrient deprivation. *Trends Plant Sci*, 12, 301-309.
- Tognetti VB., Palatnik JF., Fillat MF., Melzer M., Hajirezaei MR., Valle EM. and Carrillo N. 2006. **Functional replacement of ferredoxin by a cyanobacterial flavodoxin in tobacco confers broad-range stress tolerance.** *Plant Cell*, 18, 2035-2050.
- Thomashow ME. 1999. Plant cold acclimation: freezing tolerance genes and regulatory mechanisms. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 50, 571-599.
- Umezawa T., Fujita M., Fujita Y., Yamaguchi-Shinozaki K. and Shinozaki K. 2006. Engineering drought tolerance in plants: discovering and tailoring genes to unlock the future. *Curr. Op. Biotechnol.*, 17, 113-122.
- Vij S. and Tyagi A.K. 2007. Engineering trends in the functional genomics of the abiotic stress response in crop plants. *Plant Biotechnol. J.*, 5, 361-380.
- Vinocur B. and Altman A. 2005. Recent advances in engineering plant tolerance to abiotic stress: achievements and limitations. *Curr. Opin. Biotechnol.*, 16, 123-132
- Zhang JZ., Creelman RA and Zhu JK. 2004. From laboratory to field. Using information from *Arabidopsis* to engineer salt, cold and drought tolerance in crops. *Plant Physiol.*, 135, 615-621
- Zimmermann P., Hirsch-Hoffmann M., Hennig L. and Gruissem W. 2004. GENEVESTIGATOR. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox. *Plant Physiol.*, 136, 2621-2632

V. CAPÍTULO 13

Manipulación genética del metabolismo secundario en plantas

Alicia Zelada, María Binaghi

Metabolitos primarios y secundarios.

Los metabolitos presentes en las plantas pueden ser divididos en dos grupos fundamentales: los metabolitos primarios y los metabolitos secundarios. Se denomina metabolismo primario de las plantas a los procesos químicos que intervienen en forma directa en la supervivencia, crecimiento y reproducción de las plantas. Por ejemplo, son procesos químicos pertenecientes al metabolismo primario: la fotosíntesis, la respiración, la síntesis de proteínas, la diferenciación de tejidos, y en general la formación de carbohidratos, lípidos y proteínas que intervienen en estos procesos o son parte estructural de las plantas. En consecuencia los aminoácidos destinados a la formación de proteínas, los carbohidratos y los ácidos grasos que intervienen en estos procesos son denominados metabolitos primarios. En contraposición a este concepto podemos definir los metabolitos secundarios como todos aquellos compuestos que no son esenciales *per se* para las funciones vitales de las plantas, pero que juegan un rol importante para su supervivencia en los ecosistemas. La principal función de los metabolitos secundarios es actuar como mediadores en las interacciones entre las plantas y su medio ambiente. Muchos de estos compuestos cumplen funciones de defensa contra predadores y patógenos, actúan como agentes alelopáticos (compuestos que son liberados para ejercer efectos sobre otras plantas), o sirven para atraer a los polinizadores o a los dispersores de las semillas. Se caracterizan por ser especie-específicos, es decir que su producción está limitada a una especie o a un grupo de especies dentro de un grupo filogenético, y suelen producirse en estructuras especializadas y de forma tejido específica.

Los metabolitos primarios y secundarios no se diferencian por su estructura química o su origen biosintético, sino sólo por diferencias

funcionales. De esta manera podemos encontrar metabolitos secundarios con estructuras químicas similares a metabolitos primarios, pero que cumplen funciones muy diferentes.

Según sus características biosintéticas podemos clasificar a los metabolitos secundarios en tres grupos principales (Figura 1):

- terpenos, compuestos lipídicos derivados del isopentenil difosfato (IPP)
- fenilpropanoides, compuestos fenólicos derivados de la vía del shikimato o del malonato.
- alcaloides, compuestos nitrogenados derivados de aminoácidos.

La importancia económica de los metabolitos secundarios se ha acrecentado en los últimos años, y ello ha estimulado el interés en el estudio de su metabolismo y, en particular, en la modificación de ciertas rutas biosintéticas mediante técnicas de ingeniería genética. Por otra parte, un mayor conocimiento de las propiedades biológicas de muchos metabolitos secundarios ha llevado a la revalorización de estos compuestos como fuente de nuevas drogas y compuestos de utilidad para las industrias farmacéutica (antibióticos, anticancerígenos), agropecuaria (insecticidas, herbicidas), alimenticia (pigmentos, saborizantes, conservantes) y cosmética (esencias colorantes), entre otras.

Ingeniería genética del metabolismo secundario en plantas.

La ingeniería metabólica se puede definir como el redireccionamiento de una o más reacciones enzimáticas en una vía biosintética para producir nuevos compuestos, aumentar la producción de compuestos preexistentes, o disminuir la producción de compuestos no deseados. Se trata de un campo de aplicación relativamente nuevo que es muy dependiente del conocimiento bioquímico y fisiológico. Debido al uso de trazadores radioactivos, ya hacia 1975 se disponía de nociones generales adecuadas sobre la relación producto-sustrato en muchas vías metabólicas. El desarrollo rápido de este campo ocurrió a partir de la disponibilidad de herramientas de biología molecular, como el clonado de genes, el uso de promotores y las técnicas de transformación, las cuales

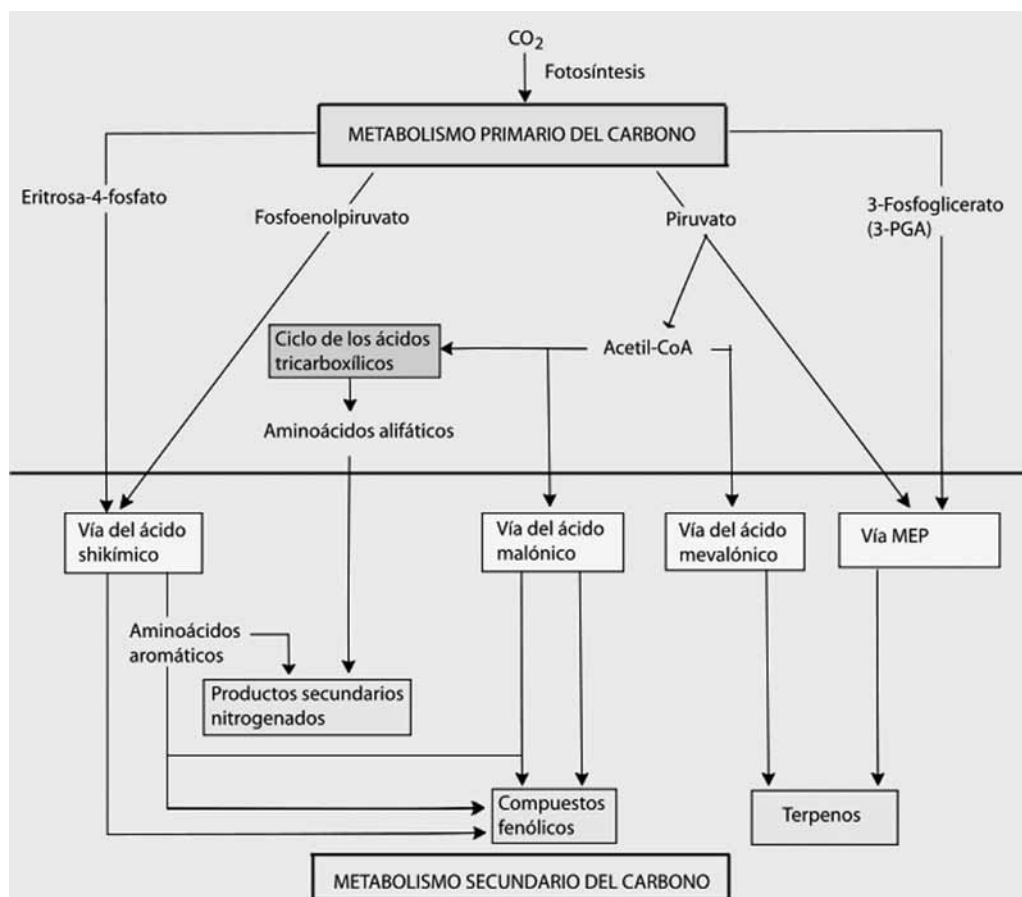


Figura 1. Vías generales del metabolismo secundario de las plantas. Se presentan las tres principales vías biosintéticas de los metabolitos secundarios: terpenos, compuestos fenólicos o fenilpropanoides y productos nitrogenados o alcaloides.

permitieron explorar los mecanismos moleculares que regulan la producción de metabolitos secundarios. De esta forma, a partir de la década de los 80, se logró un progreso significativo en la disección de muchas vías biosintéticas y en la sobreexpresión de genes heterólogos, lo que permitió los primeros avances. Desde entonces se han logrado numerosos resultados exitosos y un número aún mayor de resultados no esperados. El conocimiento ganado ha conducido a concebir el funcionamiento del metabolismo como el de una gran red de reacciones químicas interrelacionadas, en que la modificación de un sólo componente puede producir un impacto considerable en el metabolismo de todo el organismo. Aún así, el metabolismo secundario es un blanco particularmente atractivo para mejorar el rendimiento de un producto determinado sin que ello afecte mar-

cadamente procesos esenciales para la planta. Sin embargo, para lograr esto de una manera relativamente controlada, no basta con conocer los componentes (enzimas y metabolitos) que participan de una determinada vía metabólica. También se debe conocer la regulación de esta vía (pasos limitantes, mecanismos de retroalimentación) y su relación con otras vías biosintéticas (vías competitivas). También es importante conocer la compartimentalización celular de la ruta en estudio y la participación de tejidos o de órganos especializados en la producción de determinados metabolitos.

Manipulación genética del metabolismo secundario por sobreexpresión o inhibición de la producción de enzimas

La manipulación genética del metabolismo secundario tiene como objetivo el aumento o

disminución de la producción de un compuesto que se encuentra normalmente presente en una planta, o bien la producción de un nuevo compuesto que no es naturalmente producido por la misma.

Para aumentar la producción de un compuesto es necesario aumentar su biosíntesis o disminuir su catabolismo. El aumento de la biosíntesis puede realizarse por sobreproducción de las enzimas implicadas en la vía biosintética o bien por inhibición de una vía competitiva que aumenta indirectamente la síntesis del compuesto por redireccionamiento de metabolitos. La disminución del catabolismo se logra por disminución de la producción de enzimas que utilizan el compuesto deseado para la obtención de otros compuestos.

Para disminuir la producción de un compuesto no deseado se debe aumentar su catabolismo o disminuir su biosíntesis. Esto se puede lograr por sobreproducción de enzimas de la vía catabólica o por inhibición de la producción de enzimas de la vía biosintética.

El conocimiento de los genes involucrados en una vía metabólica permite aumentar las actividades de dichas enzimas por sobreexpresión de sus respectivos genes a partir de promotores inducibles o constitutivos. Por otra parte, la utilización de técnicas de ARN antisentido y, más recientemente, de ARN de interferencia (ARNi), nos permite disminuir específicamente la expresión de determinadas enzimas a través del silenciamiento postranscripcional de los genes que las codifican.

Uso de los factores de transcripción en la manipulación del metabolismo secundario.

Se acepta actualmente que el control del flujo metabólico a través de una vía biosintética se encuentra en más de un paso de esta vía. Estos "puntos" de control (pasos limitantes) pueden ser modificados por condiciones ambientales, metabólicas o del desarrollo y son, en última instancia, responsables de la productividad de la planta. La distribución del control regulatorio hace que la modificación del metabolismo por sobreexpresión o inhibición de unos pocos genes estructurales sea difícil de alcanzar.

A pesar de los esfuerzos realizados para identificar los pasos limitantes de diferentes

vías metabólicas, la sobreexpresión de genes estructurales sólo ha permitido obtener aumentos del flujo metabólico de moderados a muy pequeños. Conocer los factores de transcripción que regulan una determinada vía metabólica nos permite inducir la expresión de toda la vía metabólica en su conjunto por sobreexpresión del o los genes que codifican dichos factores. Esta estrategia ha permitido obtener aumentos del flujo metabólico significativamente mayores que los obtenidos por sobreexpresión o inhibición de genes estructurales. Este efecto se debe a que los factores de transcripción al controlar en forma simultánea la expresión de la mayoría de los genes comprendidos en una vía determinada, permiten eludir las restricciones generadas por la existencia de pasos limitantes. Además, la modulación del flujo metabólico utilizando factores de transcripción no requiere de la identificación, aislamiento y caracterización molecular de los genes que componen la vía en cuestión. Sin embargo, la modificación del metabolismo a través de la expresión de factores de transcripción no es una panacea para resolver todos los problemas de la ingeniería metabólica de plantas. Como es obvio, los factores de transcripción no pueden inducir vías metabólicas que no están presentes en la planta, por lo que, en estos casos, es necesario introducir todos los genes necesarios para recrear las mismas en las plantas de interés. Por esta razón, la ingeniería genética de genes estructurales continuará aún siendo necesaria para resolver muchos problemas de la ingeniería metabólica.

Entre los primeros factores de transcripción descritos en plantas se encuentran los factores R y C1, involucrados en el control de la biosíntesis de antocianinas de la aleurona de maíz. La inducción de la vía de la síntesis de antocianinas en células indiferenciadas de maíz pudo inducirse por sobreexpresión de estos dos factores de transcripción. Asimismo, la sobreexpresión de estos factores en arroz produjo la activación de la vía de síntesis de las antocianinas, lo que se tradujo en un aumento de la resistencia del arroz a la infección por un patógeno fúngico. Este ejemplo muestra que la acumulación de un producto natural puede modificarse por la sobreexpresión de zterpenos.

Monoterpenos: los aceites esenciales contienen monoterpenos volátiles que son almacenados en los pelos glandulares de la epidermis. Estos aceites esenciales se obtienen de flores, de frutos, de hierbas y especias y son usados en perfumes y saborizantes. Algunas de las plantas más utilizadas para la obtención de este tipo de compuestos son: la menta (mentol) y el limón (limoneno). Algunas plantas emiten terpenos volátiles después que los insectos se han alimentado de ellas. Estos atraen a los enemigos naturales del insecto predador y actúan como un mecanismo de defensa contra el mismo.

Sesquiterpenos: los aceites esenciales de hierbas y especias también contienen sesquiterpenos. Algunos sesquiterpenos actúan en los mecanismos de defensa de la planta produciendo fitoalexinas como la rosina y otras sustancias repelentes de herbívoros.

Diterpenos: Las resinas contienen diterpenos. Cuando los canales que transportan la resina son dañados, la descarga de la resina sirve como una barrera química y física a la alimentación de los insectos. Por otro lado, los diterpenos se polimerizan cuando la resina es expuesta al aire y contribuye a sellar las heridas. Ciertos escarabajos de la corteza han adquirido la capacidad de metabolizar los monoterpenos contenidos en la resina de las coníferas, convirtiéndose en depredadores especializados. Algunos diterpenos son muy importantes en aplicaciones medicinales ya que poseen propiedades antiinflamatorias, antimicrobianas y antiespasmódicas. Una de las drogas más potentes contra ciertos tipos de cáncer es un diterpeno, el paclitaxel (Taxol), obtenido originalmente de la corteza del tejo del Pacífico (*Taxus brevifolia*).

Triterpenos: El algodóncillo de Siria (*Asclepias syriaca*) contiene triterpenos que se acumulan en las larvas de las mariposas Monarca, un lepidóptero que se alimenta de esta planta. En los adultos, los triterpenos son almacenados en las alas de la mariposa y ello las vuelve tóxicas para sus depredadores, los pájaros. El triterpeno digitalis, obtenido de la dedalera o digital (*Digitalis purpurea*), fortalece y enlentece el músculo cardíaco. Fue desarrollado como droga hacia el final del siglo XVIII basándose

en un remedio casero (té hecho con hojas de la planta guante de zorro púrpura) y se usaba para tratar la angina de pecho.

Tetraterpenos: Entre los tetraterpenos se encuentran los carotenoides, compuestos que son de gran importancia como suplementos dietarios. Los carotenoides son sintetizados *de novo* a partir de geranil-geranil difosfato por todos los organismos fotosintéticos. Participan en la captación de la luz y en la protección por el exceso de luz blanca. Muchas bacterias no fotosintéticas (*Erwinia herbicola*, *Thermus aquaticus*, *Deinococcus radiodurans*) y hongos (*Neurospora crassa*, *Phycomyces blakesleeana*) sintetizan también carotenoides. En las plantas, los carotenoides se acumulan en cloroplastos y en cromoplastos. Se puede encontrar un amplio rango de carotenoides en los cromoplastos (por ejemplo, licopeno en fruto de tomate, β -caroteno en raíces de zanahoria, luteína y zeaxantina en endosperma de maíz).

La investigación, el desarrollo y el uso de productos naturales como agentes terapéuticos y nutricionales, especialmente aquellos derivados de plantas, ha crecido mucho a lo largo de estos años. Uno de los desarrollos con mayor éxito y publicidad fue la obtención del arroz transgénico rico en β -carotenos. La vitamina A es un nutriente esencial cuya carencia en humanos puede afectar severamente la visión, la reproducción y la función inmune. Se estima que en el mundo existen 124 millones de niños deficientes en vitamina A y que una provisión adecuada podría evitar de 1 a 2 millones de muertes anuales. El arroz es uno de los principales alimentos para millones de personas. La parte comestible del arroz consiste básicamente en el endosperma, compuesto por gránulos de almidón y cuerpos proteicos, pero carece de los nutrientes esenciales para el mantenimiento de la salud, como es la provitamina A (β -caroteno). El hecho que el arroz sea la principal fuente de alimentos de muchas poblaciones contribuye al problema de la deficiencia en vitamina A, convirtiéndose en un serio problema de salud pública. El arroz produce geranil-geranil difosfato, precursor de los carotenos, pero carece de las enzimas correspondientes a esta ruta biosintética. Para completar la vía de síntesis del β -caroteno es necesario

introducir por ingeniería genética 4 enzimas: la fitoeno sintetasa, la fitoeno desaturasa, la caroteno desaturasa y la licopeno ciclasa. Alternativamente, para simplificar el trabajo de transformación, el número de enzimas puede ser reducido utilizando una fitoeno desaturasa bacteriana que es capaz de reemplazar a las dos desaturasas vegetales (Figura 2). La introducción de la vía de síntesis de β -caroteno en arroz se efectuó por transformación con *Agrobacterium tumefaciens* portando vectores que contenían los siguientes genes: a) gen de fitoeno sintetasa (*psy*) de *Narcissus pseudonarcissus* bajo el control del promotor glutelina específico de endosperma (Gt1); b) gen de la fitoeno desaturasa (*crtI*) de *Erwinia uredovora* conteniendo la secuencia para el péptido de tránsito de la subunidad menor de la Rubisco de arveja bajo el control del promotor 35S del *Cauliflower mosaic virus* (CaMV); c) gen de la licopeno ciclasa (*lcy*) de *Narcissus pseudonarcissus* conteniendo la secuencia para un péptido de tránsito que permite la importación a plástidos bajo el control del promotor 35S de

CaMV. Los granos de arroz obtenidos a partir de las plantas transgénicas eran de color amarillo debido a la producción de β -caroteno, esta característica fenotípica fue la que inspiró el nombre de esta líneas transgénicas como "Arroz dorado" o en inglés "Golden rice".

Ingeniería metabólica de la síntesis de flavonoides.

Los flavonoides pertenecen a una de las principales clases de metabolitos secundarios. Se caracterizan por ser compuestos polifenólicos de estructura aromática presentes en todos los tejidos vegetales. Son una familia muy diversa de compuestos que se caracterizan por ser sintetizados a partir de una molécula de fenilalanina y 3 de malonil-CoA (Figura 3). Esta estructura puede sufrir modificaciones y adiciones de grupos funcionales (glicosilaciones, metilaciones o acetilaciones) generando una gran diversidad de flavonoides. Hasta el presente, han sido identificados más de 5.000 flavonoides diferentes. Estos se clasifican según su estructura base en 5 grupos: chalconas, flavononas, flavonoles, dihidroflavonoides y antocianinas.

Esta clase de metabolitos secundarios se encuentran presentes en casi todas las familias de plantas, principalmente en la epidermis de hojas, tallos, raíces, flores, semillas y frutos. Por su condición de polifenoles, los flavonoides actúan como antioxidantes protegiendo a las plantas contra la radiación UV (como por ejemplo los flavonoles kemferol y quercetina). Por otro lado, presentan un rol fundamental en la defensa de la planta frente a depredadores (fitoalexinas) y sobre el desarrollo y crecimiento de otra planta vecina frente a estreses ambientales (alelopatía). También, se encuentran involucrados en los procesos de floración, polinización (a través del color u olor que le dan las antocianinas a las flores) y en

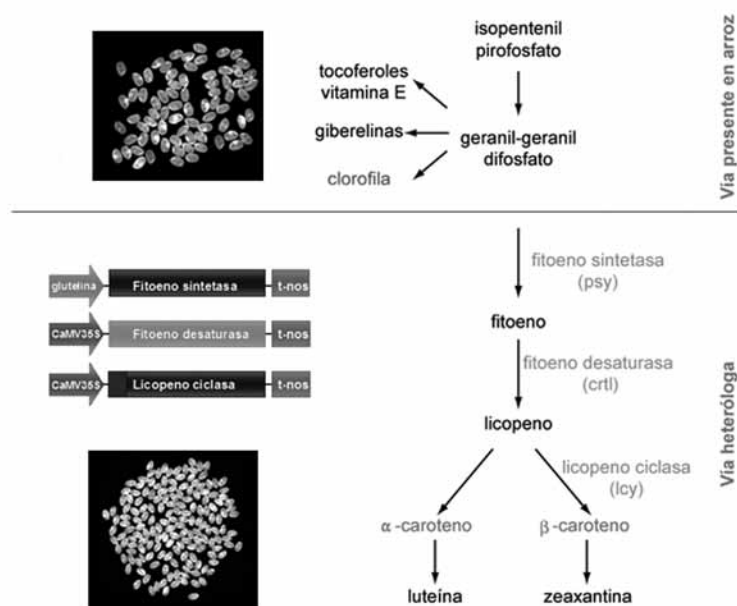


Figura 2. Manipulación del metabolismo de los terpenoides en plantas de arroz. Arroz dorado. Se presenta la vía de síntesis del geranil-geranil difosfato en arroz y la obtención de carotenos por sobreexpresión en arroz de las enzimas heterólogas fitoeno sintetasa, fitoeno desaturasa y licopeno sintetasa.

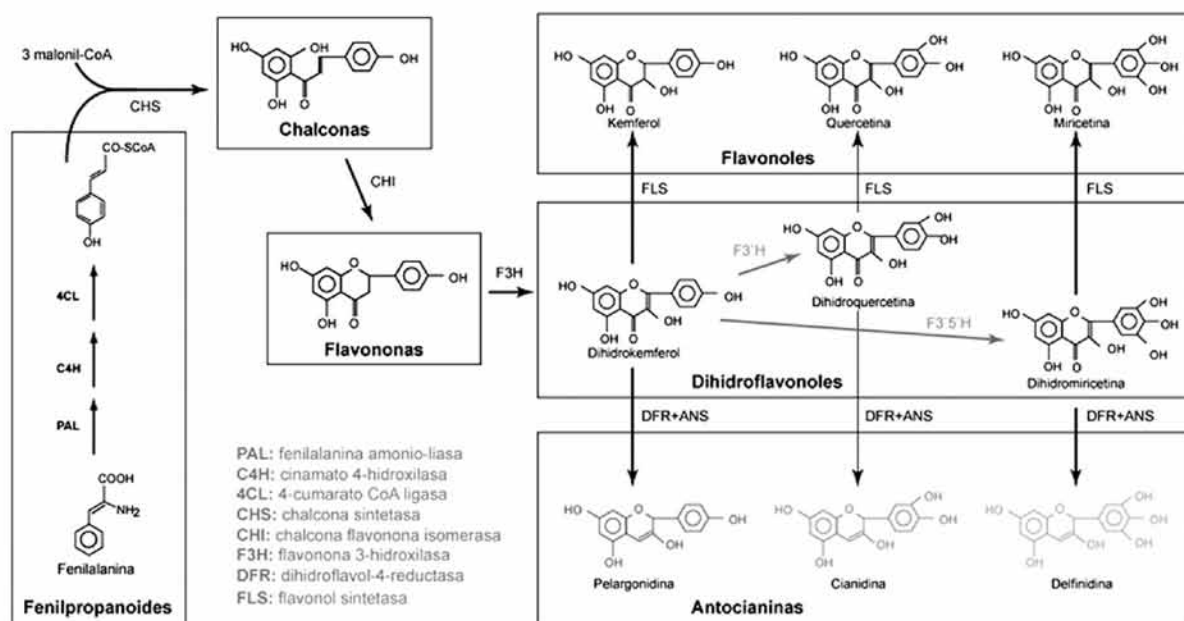


Figura 3. Vías de síntesis de los flavonoides. Los flavonoides se clasifican según su estructura central aglicona en 5 grupos: chalconas, flavononas, flavonoides, dihidroflavonoides y antocianinas.

la simbiosis vegetal (por inducción de la nodulación de bacterias fijadoras del nitrógeno).

Este tipo de polifenoles son importantes económicamente porque contribuyen al sabor, aroma y color de los alimentos y bebidas. Además en los últimos años han adquirido una gran importancia en la salud humana debido a estudios que sugieren que estos compuestos presentan un efecto protector frente a ciertas enfermedades y pueden actuar como antialérgicos. Debido a las propiedades benéficas para la salud humana y a su importancia económica, las vías biosintéticas de los flavonoides han sido extensamente estudiadas. Esto ha permitido el desarrollo de la ingeniería metabólica aplicada al mejoramiento nutricional de ciertos cultivos como también a la producción de flores de corte. Una de las primeras aplicaciones de la ingeniería metabólica fue la manipulación de la vía de síntesis de flavonoides y antocianinas para cambiar el color de las flores. Esto se debió principalmente a que era una de las vías más conocidas y los resultados eran fácilmente observables. Es inusual encontrar la gama completa de colores dentro de las especies flo-

rales convencionales. En *Petunia hybrida*, una de las plantas en que la vía de síntesis de antocianinas ha sido más extensamente estudiada, se producen derivados de delfinidinas y de cianidinas pero no derivados de pelargonidina. Esto se debe a la especificidad de la enzima dihidroflavonol 4-reductasa de petunia, la cual no puede reducir al precursor de pelargonidina, el dihidrokemferol, en kemferol. Sin embargo, hace casi dos décadas se obtuvo una variedad de petunias anaranjadas que representa el primer producto exitoso de modificación del color de las flores por ingeniería genética. Esto se logró transformando una variedad de petunia blanca con el gen de la dihidroflavonol 4-reductasa (*df*) de maíz. La variedad de petunia blanca (mutante RLo1) acumula dihidrokemferol debido a que los genes *f3'h* (3'-flavonoide hidroxilasa) y *f3'5'* (3'-5'-flavonoide hidroxilasa) se hallan afectados por mutaciones; en consecuencia, produce flores que no muestran pigmentación. La transformación de esta variedad con el gen de maíz condujo a la producción y acumulación de pelargonidina, obteniéndose flores de petunia color anaranjado (Figura

4). Muchos de estos transformantes sufrieron inestabilidad epigenética (expresión inestable debido a la metilación del promotor), no pudiéndose obtener cultivares uniformemente coloreados, lo cual impidió su comercialización. Sin embargo, los investigadores de la empresa Novartis lograron obtener petunias anaranjadas uniformemente coloreadas por introgresión del gen *dfr* en plantas de petunia. Otro ejemplo exitoso es el desarrollo de claveles violetas por la empresa australiana Florigene. En los años 90 los investigadores de esta compañía tenían como proyecto la obtención

de rosas azules. Con este fin clonaron y sobreexpresaron en rosas dos enzimas de petunia encargadas de sintetizar el pigmento azul del finidina, sin embargo los resultados que obtuvieron no fueron los esperados. A pesar de obtener líneas transgénicas estables para dichas enzimas, las rosas no presentaban coloración azul debido a la influencia del pH vacuolar en la coloración de los pigmentos. Cuando aplicaron la misma estrategia para la transformación de claveles los resultados fueron sustancialmente diferentes, lograron desarrollar exitosamente seis líneas de claveles transgénicos que van desde el color lila hasta el violeta. Los claveles modificados genéticamente se encuentran actualmente disponibles en muchas partes del mundo. Estos claveles transgénicos han sido sometidos a un riguroso escrutinio regulatorio y, en principio, no presentan mayores riesgos para el ambiente que los obtenidos por métodos convencionales debido a que la mayoría de estos claveles son infértiles y a que la dispersión de semillas se ve limitada ya que las flores son removidas de la planta cuando están aún cerradas.

Una cantidad creciente de evidencias sugiere que los flavonoides son potentes antioxidantes y que un aumento en su consumo diario podría reducir el riesgo de enfermedades cardiovasculares y prevenir ciertos tipos de cáncer. Por esta razón, existe gran interés en la obtención de cultivos comestibles que produzcan altos niveles de flavonoides. Uno de los principales candidatos para desarrollar este tipo de tecnología es el tomate. El tomate produce en su piel pequeñas cantidades de flavonoides, lo cual nos confirma la existencia de la vía de síntesis de flavonoides en esta planta y la potencialidad de aumentar sus niveles de producción. A partir de la manipulación genética de la expresión de factores de transcripción se logró obtener líneas de tomate transgénicos capaces de producir niveles cinco veces mayores de flavonoles que la variedad salvaje. Los factores de transcripción que regulan la síntesis de flavonoles en diversas plantas forman parte de dos familias principales: la familia C1, tipo MYB y la familia R, tipo MYC. Los autores sobreexpresaron en tomate los factores de transcripción C1 y L1 de maíz. Y en forma

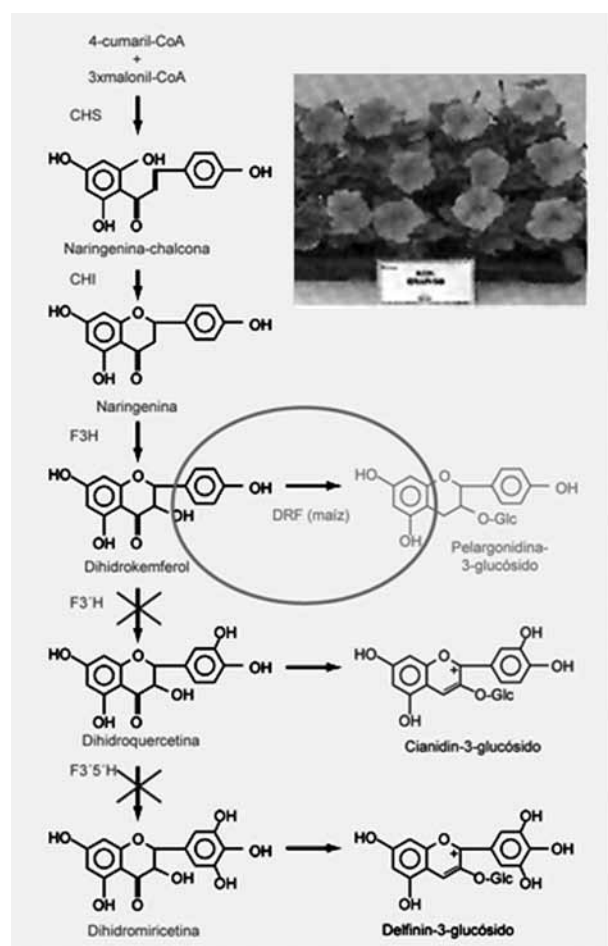


Figura 4. Manipulación del metabolismo de las antocianinas en *Petunia hybrida*. La expresión del gen *dfr* de maíz en una línea de petunia que acumula dihidroquercetina debido a dos mutaciones en los genes *f3'h* y *f3'5'* induce la síntesis del pigmento pelargonidina (pelargonidina-3-glucósido), de color ladrillo. Las petunias blancas no sintetizan

simultánea, transformaron plantas de tomates con pares de construcciones diferentes: a) gen *C1* bajo la regulación del promotor constitutivo 35S de CaMV y el gen *L1* bajo la regulación del promotor específico de fruto E8 (*35SC1/E8L1*); b) genes *C1* y *L1* bajo la regulación del promotor específico de fruto E8 (*E8C1/E8L1*). Dado que los factores *C1* y *L1* actúan en forma coordinada se asumió que ambas estrategias, la sobreexpresión individual y combinada de los factores de transcripción, conducirían al incremento específico de flavonoles en el fruto. La cantidad y tipo de flavonoles fue determinada por HPLC (cromatografía líquida de alto rendimiento, del inglés *High Performance Liquid Chromatography*) a partir de pulpa de tomates controles y transgénicos. En este trabajo se demuestra que sólo hubo producción de flavonoles en las plantas que expresaban los dos factores, lo que comprueba que ambos son requeridos para activar completamente esta vía. Además, se observó un aumento de la actividad antioxidante de los tomates transgénicos *35SC1/E8L1* debido a la acumulación de los flavonoles kemferol y naringenina.

Ingeniería metabólica de la síntesis de alcaloides

Los alcaloides son el grupo de metabolitos secundarios más representativo, numeroso y diverso en la naturaleza. Debido a esto son muy difíciles de definir en forma general y precisa. Sin embargo, el carácter común que presentan, es que en su estructura poseen un anillo heterocíclico con uno o más átomos de nitrógeno. Son sintetizados a partir de aminoácidos o de sus derivados inmediatos y se clasifican según su esqueleto carbonado. Hasta el momento se ha estimado que las plantas son capaces de producir 12.000 especies de alcaloides diferentes.

La importancia de los alcaloides dentro de las plantas radica en que constituyen un reservorio de nitrógeno para la misma. Por otro lado, al igual que algunos flavonoides, actúan como sustancias alelopáticas en la defensa frente a otras especies vegetales, como así también, frente al ataque de ciertos patógenos o depredadores. También actúan protegiendo a las plantas del efecto de las radiaciones ultravioletas.

Los alcaloides producidos por las plantas constituyen uno de los grupos de productos naturales que provee mayor cantidad de compuestos farmacológicamente activos. En la actualidad diversos tipos de alcaloides son utilizados tanto en la medicina tradicional como en la homeopatía. Generalmente actúan sobre el sistema nervioso central a nivel del sistema nervioso parasimpático y simpático. En medicina, son utilizados para el tratamiento de enfermedades mentales como así también para calmar el dolor, ya que muchos de estos metabolitos son compuestos psicoactivos: morfina (*Papaver somniferum*), atropina (*Atropa belladonna*), colchicina, entre otros. Existen otros tipos de alcaloides que son también farmacológicamente importantes debido a su uso en el tratamiento de tumores. Se trata de la vinblastina, vincristina y la camptotecina. Otro alcaloide de extrema relevancia en medicina es la quinina (*Cinchona officinalis*), droga principal en el tratamiento de la malaria.

La ingeniería genética aplicada a la manipulación de la biosíntesis de estos compuestos ha generado varios éxitos durante los últimos años. Uno de los casos más interesantes es el desarrollo de plantas de café transgénicas (*Coffea canephora*) con bajo contenido de cafeína. Existe una creciente demanda de café libre de cafeína debido a los efectos adversos que este compuesto produce en personas sensibles. El café descafeinado que consumimos en la actualidad se obtiene mediante un proceso industrial costoso y que da como resultado un café con menos sabor. La biosíntesis de cafeína en plantas de café involucra tres enzimas: CaXMT1, CaMXMT1 (ambas teobromina sintetetas) y CaDXMT1 (cafeína sintetasa), que agregan grupos metilos a la xantosina en forma sucesiva para producir cafeína. La obtención de plantas de café con menor contenido de cafeína fue lograda por inhibición de la expresión de la enzima CaMXMT1. La expresión de la enzima fue inhibida por sobreexpresión de ARNs de interferencia (ARNi) dirigidos contra la región 3' no codificante del gen *CaMXMT1*. Las bacterias de *A. tumefaciens* conteniendo los vectores con las construcciones de ARNi, fueron usadas para transformar plantas de *Coffea canephora*. En las líneas transformadas se

analizaron los niveles de expresión de las tres enzimas por RT-PCR (transcripción reversa - reacción en cadena de la polimerasa). El resultado indicó no sólo la supresión de CaMXMT1 sino también de las otras dos enzimas. Esto se debió a la elevada homología entre las secuencias codificantes de las enzimas. La reducción en los niveles de ARNm de CaXMT1, CaMXMT1 y CaDXMT1 sugería una disminución en la actividad de las enzimas. Esto fue confirmado directamente midiendo las cantidades de sus productos, teobromina y cafeína, por HPLC. Las hojas jóvenes de las líneas transformadas presentaron una reducción del 30 - 80% en el contenido de teobromina y un 50 - 70% en el contenido de cafeína. Los autores también han logrado plantas descafeinadas de *Coffea arabica*, especie de la que se produce el 70% del café comercializado mundialmente, utilizando la misma técnica.

Otro ejemplo de ingeniería metabólica en alcaloides es la obtención de plantas transgénicas de *Papaver somniferum* con altos niveles de morfina, codeína y tebaína. Estos compuestos son muy importantes en la industria farmacéutica debido a sus propiedades analgésicas. La eficiencia de extracción a partir de frutos y tallos secos de este tipo de alcaloides depende de su nivel de acumulación en la planta. Es por eso que el aumento de los niveles de estas sustancias traería como consecuencia un beneficio económico debido al menor uso de tierras, la disminución costos de extracción, almacenamiento y transporte. Una de las estrategias utilizadas para aumentar la concentración de estos alcaloides fue la de sobreexpresar el gen que codifica la enzima salutaridinol 7-O-acetiltransferasa (SalAT), involucrada en la vía de síntesis de la morfina y sus derivados. La sobreexpresión de esta enzima en la mayoría de las líneas transgénicas resultó en un aumento en las concentraciones de morfina, codeína y tebaína en los frutos. La línea transgénica con mayor contenido de estos compuestos aumentó en un 42% su contenido total de este tipo de alcaloides.

Perspectivas de la manipulación genética del metabolismo secundario.

En los últimos años, se han sobreexpresado numerosos genes, ya sea en sus plantas de

origen o en otras especies. En algunos casos, la sobreexpresión resultó en un aumento de la acumulación de los compuestos deseados. Sin embargo, en otros resultó sólo en el aumento de la enzima codificada por el propio gen o, peor aún, en la producción de compuestos no deseados. Estos resultados evidencian la complejidad de las redes metabólicas y la limitada capacidad existente para predecir las consecuencias de sobreexpresar determinados genes estructurales. Esta situación prevalecerá aún por cierto tiempo, en tanto y en cuanto no se cuente con mayor información sobre la composición de las vías metabólicas que se desean modificar. En este sentido, la utilización de factores de transcripción para activar vías metabólicas completas parece ser actualmente una estrategia prometedora. En los próximos años, el principal desafío será obtener mayor información acerca de la regulación metabólica a todos los niveles: genético, enzimático, de la compartimentalización, del transporte y de la acumulación. Dado que los metabolitos secundarios son especie-específicos, la información genética obtenida de *Arabidopsis thaliana* será de utilidad limitada, por lo que la secuenciación de otras especies de interés será de gran valor en este campo. A su vez, será necesario integrar los datos obtenidos de los estudios genómicos con los de los estudios proteómicos y metabolómicos, lo que permitirá generar un panorama más completo del conjunto de las interacciones regulatorias. Cuando el objetivo de la modificación del metabolismo secundario sea mejorar la calidad nutricional de un cultivo comestible, será necesario considerar el riesgo de que la modificación realizada conduzca a la producción de compuestos tóxicos no deseados. Para poder disminuir este riesgo, se requiere conocer con la mayor precisión posible el perfil de los metabolitos que produce la planta, lo que es corrientemente conocido como su "metaboloma". Sin embargo, no existen en la actualidad métodos que nos permitan obtener este perfil en forma completa. En muchos casos, los métodos cromatográficos, como la cromatografía gaseosa y la cromatografía líquida de alta resolución, separan pobremente componentes con propiedades físicas muy distintas. La espectrometría HNMR (del inglés

Proton Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy, espectroscopía de resonancia magnética nuclear de ^1H), que detecta todos los compuestos presentes con la misma sensibilidad, no puede registrar compuestos minoritarios. De esta manera, para el análisis del metaboloma se deberán utilizar simultáneamente diferentes métodos y, a su vez, mejorar las técnicas actuales.

A pesar del limitado conocimiento actual de las vías metabólicas, se han obtenido ya resultados muy interesantes, lo que demuestra el gran potencial de la ingeniería genética en la modificación del metabolismo secundario. Esta capacidad se traducirá en el futuro en numerosas aplicaciones en campos tales como *molecular farming* (producción de moléculas de interés en organismos genéticamente modificados), fortalecimiento nutricional y resistencia a patógenos.

Lectura recomendada

- Gantek P. Memelink J. 2002. Transcription factors: tools to engineer the production of pharmacologically active plant metabolites. *Trends Pharmacology Science*, 23, 563-9.
- Petersen. 2007. Current status of metabolic phytochemistry. *Phytochemistry*, 68, 2847-2860.
- Verpoorte R. and Memelink J. 2002. Engineering secondary metabolite production in plants, *Current Opinion in Biotechnology*, 13, 181-187.

V. CAPÍTULO 14

Mejoras de calidad en alimentos

Clara Rubinstein y Gabriela Levitus

Entre las aplicaciones biotecnológicas de la ingeniería genética para el mejoramiento de variedades alimentarias se encuentran ejemplos variados que incluyen la biofortificación de cultivos con mayores cantidades de nutrientes específicos, el desarrollo de variedades con perfiles composicionales más saludables o seguros, y el desarrollo de alimentos funcionales, con determinada actividad benéfica sobre la salud.

Asimismo, existen numerosos desarrollos que apuntan a mejorar características organolépticas u otras que resulten importantes desde el punto de vista de la tecnología de alimentos o su comercialización. En este capítulo se revisarán brevemente algunas de estas aplicaciones, así como los criterios utilizados en la evaluación de la inocuidad y aptitud nutricional para este tipo de mejoras.

Si bien el foco de este trabajo es el mejoramiento vegetal, es importante notar que los desarrollos biotecnológicos abarcan a otros organismos igualmente importantes desde el punto de vista alimentario, ya sea como materias primas o porque son fuente de adyuvantes, suplementos, aditivos o preservantes. En efecto, numerosos microorganismos, así como especies animales, pueden ser mejorados utilizando herramientas biotecnológicas. Estas pueden incluir a la ingeniería genética, aunque es de práctica común mejorar los microorganismos utilizados en los procesos fermentativos mediante genética clásica, en particular por motivos económicos, dados los costos de aprobación regulatoria de un organismo transgénico y también por un tema de aceptación en ciertos mercados. Un ejemplo de la aplicación de tecnología recombinante en este campo, es la mejora obtenida en cepas bacterianas utilizadas en la producción de lácteos fermentados (yogur, quesos, etc.). Estas cepas son sensibles a la infección por fagos (virus de bacterias), causando pérdidas económicas

importantes en la industria alimentaria. Hoy es posible contar con cepas recombinantes resistentes a la infección viral.

En cuanto al mejoramiento animal, el uso de marcadores moleculares es actualmente posible como herramienta gracias a los avances en la genómica animal. El uso de tecnologías recombinantes para este fin puede ejemplificarse en el desarrollo del salmón "AquaAdvantage" (de la empresa Aqua Bounty Farms), que tiene la capacidad de crecer hasta el tamaño para la comercialización (entre 2,5 y 4,5 kg) en un año y medio, mientras que las prácticas de cría convencionales requieren dos a tres años para lograr el mismo fin. Estos nuevos salmones podrían también contribuir a una práctica de acuicultura más sustentable, colaborando con la reducción de la sobrepesca de ejemplares salvajes y bajando los costos para los consumidores.

Los especialistas en genética animal también están usando biotecnología para obtener carnes más saludables, como por ejemplo, carnes vacunas y porcinas con mejores perfiles de ácidos grasos.

Finalmente, las técnicas de clonación y otras, como la bio-nanotecnología, también aportarán soluciones a los mejoradores y a los tecnólogos alimentarios en el corto y mediano plazo.

En cuanto a las aplicaciones de la ingeniería genética para el mejoramiento de especies vegetales alimentarias, son muy diversos los proyectos que se están desarrollando. La biotecnología puede ayudar a aumentar el valor nutritivo y la seguridad de muchos cultivos, en particular, aquellos que son la base de la dieta en muchos países en desarrollo.

Biofortificación

Las deficiencias nutricionales de las dietas afectan seriamente el desarrollo físico y mental con graves consecuencias para el rendimiento educativo, laboral, y por lo tanto, limitando o reduciendo las oportunidades para aquellos que las sufren y sus potenciales contribuciones a la sociedad. La Organización Mundial para la Salud (OMS) ha reconocido que estas deficiencias tienen graves efectos sobre la salud y la calidad de vida de al menos dos mil millones de personas.

Una nutrición inadecuada también contribuye a una mortalidad infantil aumentada a causa de enfermedades infecciosas, algunas de las cuales no serían fatales para niños bien alimentados.

Las deficiencias en micronutrientes, como hierro, vitamina A, yodo, zinc y ácido fólico, afectan especialmente a niños y mujeres en edad reproductiva, resultando en una morbilidad y mortalidad importantes. En este sentido, es obvio que la resolución de estos problemas en el largo plazo y a gran escala se alcanzará únicamente cuando sea posible acceder a una dieta variada, balanceada y abundante.

Algunos nutrientes clave suelen añadirse directamente a los alimentos en el momento de la elaboración, aunque es posible también enriquecerlos indirectamente, es decir, a través del mejoramiento vegetal. Esto es lo que se denomina biofortificación, término definido por el CODEX en 2007 como: “la adición indirecta de nutrientes esenciales u otras sustancias a los alimentos con el fin de lograr una mejora de la nutrición o de la salud”.

Es interesante resaltar que la reunión de Consenso de Copenhagen de 2008, en la que se reunieron economistas de todo el mundo para ponderar los desafíos globales y establecer soluciones prioritarias, concluyó que la biofortificación es una de las posibilidades más aplicables a la solución de las deficiencias nutricionales respecto de otras estrategias, considerando que con 75 millones de dólares es posible cubrir:

- La suplementación con vitamina A para un año, para 37,5 millones de chicos en edad pre-escolar en Bangladesh, India y Pakistán.
- La fortificación con hierro para un año, para 375 millones de personas, aproximadamente un 30% de la población de Bangladesh, India, y Pakistán.
- El desarrollo y difusión de variedades mejoradas (biofortificación por métodos convencionales o utilizando marcadores moleculares) de arroz y trigo ricos en hierro y zinc para el Sudeste Asiático, que estarían disponibles año tras año a través de la semilla.

La transformación genética mediante tecnologías de ADN recombinante es uno de los instrumentos que pueden usarse para biofortificar las materias primas alimenticias, ya que permite al animal o a la planta producir el nutriente adicional, como por ejemplo, beta caroteno en el arroz. Otro ejemplo de estas iniciativas es el desarrollo llevado adelante por científicos de la Universidad de Nehru en la India, que utilizaron un gen identificado en el amaranto sudamericano para aumentar el contenido de proteínas de la papa en un 30% y también el nivel de aminoácidos esenciales, normalmente no presentes en las variedades convencionales.

El caso del arroz dorado:

Cerca del 70% de la población mundial basa su dieta en cereales. El arroz es el cereal más importante para la nutrición humana y provee el 30% de la ingesta de energía de la población asiática. El maíz está en tercer lugar después del trigo como uno de los tres cultivos más importantes. Si bien el grano de maíz es usado fundamentalmente para alimentación animal en los países desarrollados, es la base dietaria en muchos países de América Latina y África. Otros cultivos, como la batata o papa dulce, son cultivos secundarios también importantes para países de Europa del Este y África, y en particular, para los agricultores de subsistencia. La mayor parte de los cultivos, y por lo tanto los alimentos derivados de ellos, son deficientes en uno o más nutrientes esenciales (aquellos que deben ser incorporados a través de la dieta). Por esto, la dieta de mucha gente que depende de estos cultivos en países en desarrollo resulta deficiente y es poco diversa, lo que aumenta los riesgos de deficiencias nutricionales.

El arroz dorado (Golden Rice), denominado así por su color ámbar, es un ejemplo de este tipo de modificaciones y fue desarrollado para expresar provitamina A (beta-caroteno) en altas cantidades, con la idea de contribuir a aliviar las deficiencias en vitamina A en países del sudeste asiático y otros.

Actualmente, está en desarrollo el llamado “Golden Rice 2”, la segunda generación de este arroz, que expresa mayores cantidades de beta-caroteno respecto de la primera ver-

Para lograr esta modificación, se insertaron dos genes: el gen *psy* de la fitoeno sintetasa de maíz y el gen *crtl*, codificante para la caroteno desaturasa de la bacteria *Erwinia uredovora* (Figura 1).

La biodisponibilidad del beta-caroteno expresado en el Golden Rice 2 se ha evaluado, y se estima que 70 gramos de arroz crudo podrían proveer el 60% de la ingesta recomendada (en los EEUU) para lactantes de 1 a 2 años de edad. La porción de arroz convencional promedio para un niño de esa edad en Tailandia, por ejemplo, es de 160 gramos.

La evaluación de inocuidad de este evento sigue las recomendaciones del *Codex Alimentarius*, utiliza al arroz convencional como comparador y examina riesgos y beneficios potenciales. Las evidencias hasta el momento recopiladas para este evento, indican que:



La fitoeno sintetasa cataliza el paso limitante de la biosíntesis de carotenoides en plantas, resultando la del maíz la más eficiente desde el punto de vista de la acumulación de carotenoides totales y beta-caroteno en arroz. De hecho, el Golden Rice 1 contiene cerca de 1,6 µg de carotenoides totales/gramo de peso seco de grano, mientras que el Golden Rice 2 contiene hasta 37 µg/gramo de peso seco de grano, de los cuales 31 µg/g es β-caroteno.

Para poder ser utilizada como vitamina A, el beta-caroteno debe ser absorbido y convertido

- La composición global del Golden Rice 2, de acuerdo con las recomendaciones de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico), no se ha alterado, excepto en la vía metabólica modificada, según lo esperado.
- El análisis bioinformático de la fitoenodesaturasa de *Erwinia* no muestra relación con alérgenos, toxinas o anti-nutrientes.
- La fitoeno sintetasa de *Zea mays* es comúnmente consumida, es decir, tiene historia de uso seguro en alimentación.
- El beta caroteno está biodisponible



Figura 2: Comparación entre el arroz convencional (izq), Golden Rice 1 (centro) y Golden Rice (der). (Tomado de Paine et al, 2006).

Alimentos más saludables o seguros

Modificación en la composición de los aceites

Ya existen en el mercado diferentes variedades de oleaginosas que producen aceites con perfiles de ácidos grasos más saludables, algunas de ellas transgénicas. Las modificaciones introducidas apuntan a obtener menor cantidad de ácidos grasos saturados (los menos saludables), y enriquecer la composición de los aceites en ácidos grasos mono o poli-insaturados (más deseables desde este punto de vista). Estas modificaciones introducen pasos metabólicos ausentes o bien silencian partes de una vía metabólica, logrando derivar la síntesis a los productos deseados.

Por ejemplo, se ha logrado la conversión de ácido linoleico en ácidos omega 3 similares a los encontrados en aceites de pescado, asociados con beneficios para la salud cardiovascular. Del mismo modo, es posible evitar o eliminar la hidrogenación industrial de los aceites, que genera las indeseables grasas “trans”, de conocidos efectos negativos sobre la salud. El proceso de hidrogenación es necesario para estabilizar los aceites o para conseguir grasas sólidas para diferentes aplicaciones alimentarias. Reducir el nivel de ácido linolénico o bien aumentar la cantidad de ácidos grasos como el esteárico, son dos de las estrategias de mejoramiento utilizadas por los investigadores que están desarrollando estas semillas.

Eliminación de alérgenos y toxinas

En cuanto al potencial alergénico de ciertos alimentos, la biotecnología también puede contribuir a mejorar la seguridad de las materias primas. El 95% de las alergias alimentarias puede ser atribuida a un grupo de ocho alimentos, entre los que se encuentran el maní, la leche, la soja, el pescado, el huevo, etc. No sólo se han hecho grandes progresos en la identificación de una serie de proteínas alergénicas responsables de estas intolerancias, sino que también se ha tenido éxito en bloquear o eliminar genes codificantes para alérgenos. En efecto, las técnicas de silenciamiento mediado

por ARN de interferencia han sido aplicadas a la reducción de alérgenos en diferentes especies, como la proteína P34 de soja, el alérgeno de arroz de 14-16kda o las proteínas Lyc e1 Lyc e 3 de tomate.

Asimismo, existen desarrollos que se enfocan en la eliminación de toxinas naturalmente presentes en algunos cultivos alimentarios, como los glicoalcaloides de la papa o los compuestos cianogénicos de la mandioca.

El caso del maní

Utilizando la tecnología de ARN de interferencia es posible silenciar a los alérgenos más potentes del maní. Un trabajo reciente mostró que es posible suprimir la expresión de Ara h 2 y Ara h 6 en forma específica utilizando esta tecnología.

Se han identificado once proteínas alergénicas en el maní (denominadas Arah 1- 11). Entre éstas, Ara h 2 y Ara h 6, se han reconocido como los alérgenos más potentes. Entre un 80 y un 90% de los pacientes alérgicos al maní, presentan anticuerpos IgE específicos, anti-Arah 2 y 6 y el reconocimiento de estos alérgenos persiste por más de un año luego del desafío alimentario en niños. Los genes codificantes para estos polipéptidos fueron silenciados en plantas transgénicas, y las pruebas de unión a inmunoglobulina E confirmaron una reducción en el *binding* a estas proteínas, según lo esperado, sugiriendo que estas técnicas constituyen una estrategia promisoriosa para desarrollar maní y otros cultivos hipoalergénicos.

Modificaciones funcionales

Además de agregar nuevos nutrientes, es posible también aumentar los beneficios para la salud de los denominados alimentos funcionales. Estos son alimentos que contienen niveles significativos de componentes biológicamente activos que confieren beneficios que van más allá de cubrir las necesidades básicas de calorías, aminoácidos o ácidos grasos esenciales, vitaminas o minerales. Algunos ejemplos de alimentos considerados funcionales, son la cebolla y el ajo, debido a componentes que aumentan la respuesta inmune o reducen el colesterol o bien los glucosinolatos presentes en las coles, que estimulan enzimas con propiedades anti-cancerígenas. Del mismo modo, los antioxidantes encontrados en alimentos como

el té verde, el vino, el chocolate, etc., son también considerados componentes funcionales.

El caso del tomate

Investigadores de la Universidad de Purdue y del Departamento de Agricultura de los EEUU lograron tomates que contienen una cantidad tres veces mayor del antioxidante licopeno que las variedades convencionales. El consumo de licopeno se ha asociado con un menor riesgo de cáncer de próstata y mama, y con menores niveles en sangre de colesterol “malo”.

También en tomate, se está trabajando en el aumento de antocianinas, del mismo modo asociadas a numerosos efectos benéficos para la salud. Dos genes (*Del* y *Ros1*) originarios del genoma de una planta ornamental (“conejito”, *Antirrhinum majus*) fueron introducidos en plantas de tomate convencional. Estos genes inducen la expresión de enzimas clave en la síntesis y el transporte de antocianinas a las vacuolas de las células del tejido que conforma la pulpa del tomate. El resultado final es un aumento de tres veces en el contenido de estas antocianinas, que se refleja en el color violeta o púrpura de estos tomates (Figura 3). Es importante aclarar que no hay variedades de tomate transgénico disponibles en el mercado aún (ni estas ni otras), y que estos desarrollos se encuentran en fase experimental.

De manera similar, se está trabajando en la USDA para aumentar el contenido de ácido elágico en frutillas, un compuesto protector contra el cáncer.

Otras modificaciones



Figura 3: Tomates violeta con alto contenido de antocianinas y tomates rojos sin modificar. Foto del Centro John Innes Centre

Las técnicas biotecnológicas se están utilizando ampliamente para obtener mejores características en alimentos e ingredientes, ya sea para facilitar los procesos industriales o hacerlos más atractivos para los consumidores. Prolongar la vida útil de frutas y vegetales, crear variedades sin semillas, extender la disponibilidad geográfica de frutas de estación, mejorar el sabor y la textura de productos como tomates, pimientos o peras, y crear variedades de té y café libres de cafeína, son todas mejoras posibles mediante la aplicación de estrategias biotecnológicas, algunas de las cuales incluyen a la ingeniería genética como herramienta.

Por ejemplo, una estrategia utilizada para mejorar la calidad de las papas, es modificar la relación almidón/agua. Las papas con un mayor contenido de almidón son más saludables porque absorben menos aceite al freírlas y requieren menos energía para su procesamiento. Otro ejemplo es el uso de tomates obtenidos mediante variación somaclonal que contienen un 30% menos agua y pueden procesarse de manera más eficiente para producir sopas, pasta de tomate o ketchup.

En cuanto a la prolongación de la vida útil post-cosecha, se han desarrollado tomates y frambuesas de maduración retardada, utilizando técnicas de control de etileno)

La siguiente tabla muestra los numerosos cultivos y mejoras que se encuentran en etapas de experimentación y/o de desarrollo.

Lecturas y sitios recomendados

- ArgenBio www.argenbio.org
Batista J et al, 2007. Evaluación de inocuidad alimentaria de organismos genéticamente modificados, Criterios y recursos para su implementación. UNU-Biolac-RNBio-ILSI (disponible en www.ilsa.org.ar. Biotecnología)
Bouis H. 2007. The potential of genetically modified food crops to improve human nutrition in developing countries. J. Dev. Stud. 43:79–96
Butelli E et al., Enrichment of tomato fruit with health-promoting anthocyanins by expression of select transcription factors, Nat Biotechnol, 26:1301–8, 2008.
Chu Y, Faustinelli P, Ramos ML, Hajdich M, Stevenson S, Thelen JJ, Maleki SJ, Cheng H y Ozias-Akins P. Reduction of IgE Binding

- and nonpromotion of *Aspergillus Flavus* fungal growth by simultaneously silencing Arah6 and Arah2 in peanut. *Journal of Agricultural and Food Chem.* 2008, 56, 11225-11233
- Codex Alimentarius http://www.codexalimentarius.net/web/index_es.jsp
- Copenhagen Consensus www.copenhagenconsensus.com
- Current Opinion in Biotechnology 2006, 17:130–138
- Golden Rice www.goldenrice.org
- Grant, R - Where's the Super Food? *The Scientist*, Volume 23, Issue 9, Page 30
- Harvest Plus www.harvestplus.org
- ILSI www.ilsa.org www.ilsa.org.ar
- ILSI, IFBIC: Nutritional and Safety Assessments of Foods and Feeds Nutritionally Improved through Biotechnology: Case Studies. *J. Food Science and Comp. Rev. Food Sci & Food Saf.* 2008
- Informe de la OMS: *Modern Food Biotechnology, Human Health and Development: An Evidence-Based Study*, 2005. www.who.int/foodsafety
- Kinney AJ, Metabolic engineering in plants for human health and nutrition, Morris J. et al., "Nutritional impact of elevated calcium transport activity in carrots," *PNAS*, 105:1431–35, 2008.
- Paine JA et al, "Improving the nutritional value of Golden Rice through increased pro-vitamin A content," *Nat Biotech*, 23:482–87, 2005.
- Tang G. et al., "Golden Rice is an effective source of vitamin A," *Am J Clin Nutr*, 89:1776–83, 2009.
- The *Guide to Biotechnology 2008*, Biotechnology Industry Organization (BIO), Editors Roxanna Guilford-Blake, Debbie Strickland. www.bio.org
- Unnevehr L, Pray C, Paarlberg R. 2007. Addressing micronutrient deficiencies: alternative interventions and technologies. *AgBioForum* 10:124–34
- Ursin, V. 2003. Modification of Plant Lipids for Human Health - Development of Functional Land-Based Omega-3 Fatty Acids. Symposium - Improving Human Nutrition through Genomics, Proteomics and Biotechnologies. *Journal of Nutrition*. 133: 4271-4274.
- Ye X. et al., "Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm," *Science*, 287:303–5, 2000.

V. CAPÍTULO 15

Fitorremediación

María Eugenia Segretin*, Paula Bey* y
Alejandro Mentaberry

* Ambas autoras contribuyeron por igual

Introducción

La autotrofia es una de las características más importante de las plantas, dado que les permite utilizar la energía solar y el CO₂ como fuentes de energía y carbono, respectivamente. Como consecuencia, las mismas dependen de sus raíces para incorporar agua del medio que las rodea y, con ella, compuestos minerales, nitrógeno y otros nutrientes. Junto con éstos, las plantas absorben compuestos tóxicos de origen variado por lo que, a lo largo de la evolución, han generado mecanismos de detoxificación que les permiten sobrevivir en ambientes adversos. Estos mecanismos pudieron haberse originado a partir de sistemas naturales de defensa contra aleloquímicos liberados por organismos competidores, incluyendo microorganismos, insectos y otras plantas.

La “fitorremediación” consiste en la utilización de las plantas y de los microorganismos asociados a las mismas con fines de descontaminación del medio ambiente. En este contexto, las plantas pueden considerarse como sistemas naturales de extracción y tratamiento de contaminantes. A diferencia de los métodos de tratamiento tradicionales, la energía requerida para su funcionamiento proviene del sol, el costo de mantenimiento es reducido y los efectos indeseados son mínimos.

Muchas actividades humanas, como la minería, la agricultura, la industria y las operaciones militares, han provocado la contaminación de grandes superficies, incluyendo sitios con altos niveles de concentración de compuestos tóxicos (por ejemplo luego de un derrame accidental) o con niveles escasamente detectables. Luego de largos períodos de exposición, estos últimos pueden ser perjudiciales para la salud humana y de otros organismos debido a efectos acumulativos. Los procedimientos actualmente utilizados para el tratar sitios conta-

minados son muy caros y, como consecuencia de ello, muchos terrenos privados se abandonan en lugar de remediarse. Solamente en Estados Unidos, se gastan entre 6.000 y 8.000 millones de dólares anuales para el tratamiento de zonas contaminadas, valores que, a escala mundial, alcanzan sumas de 25.000 y 50.000 millones de dólares.

Los métodos actualmente utilizados para la remediación ambiental se pueden clasificar en fisicoquímicos y biológicos. Los métodos fisicoquímicos incluyen la excavación, transporte y lavado de suelos, la extracción, bombeo y tratamiento de aguas contaminadas y el tratamiento de aguas contaminadas mediante precipitación, intercambio iónico, ósmosis reversa y microfiltración. Todos estos procedimientos son altamente costosos e impracticables si se trata de grandes superficies de tierra o volúmenes de agua.

Los métodos biológicos más utilizados se basan en agregar o estimular el crecimiento de bacterias que degraden o transformen el contaminante a tratar. Para que este enfoque resulte exitoso, se deben considerar factores tales como la capacidad de supervivencia de los microorganismos, la accesibilidad o bio-disponibilidad del compuesto contaminante y la presencia de inductores de las respectivas actividades enzimáticas. Muchos compuestos orgánicos son recalcitrantes a la degradación y no pueden ser utilizados como fuente de carbono por los microorganismos involucrados. Además, los contaminantes son generalmente metabolizados por enzimas que utilizan otro sustrato natural, por lo que la presencia de éste puede ser necesaria para inducir la expresión de los genes correspondientes. Por otra parte, el éxito de un proceso de biorremediación depende de la presencia de fuentes de carbono y energía suficientes en el sitio a tratar, por lo que usualmente se requiere adicionar considerables cantidades de nutrientes para promover el crecimiento bacteriano.

La fitorremediación: aplicaciones, ventajas y desventajas

La fitorremediación es una técnica de reciente desarrollo que permite descontaminar de manera eficiente compuestos tóxicos orgáni-

cos e inorgánicos. La mayoría de los contaminantes orgánicos son generados por la acción del hombre, siendo muchos de ellos carcinogénicos. Se producen como consecuencia de derrames (combustibles y solventes) y actividades agrícolas (pesticidas, herbicidas), industriales (deshechos químicos y petroquímicos) o militares (explosivos y armas químicas). Dependiendo de sus propiedades, pueden ser degradados en la raíz de la planta, o incorporados a tallos y hojas para su degradación, secuestro o volatilización. Algunos ejemplos de compuestos orgánicos eficientemente descontaminados por fitorremediación incluyen solventes orgánicos (tricloroetileno), herbicidas (atrazina), explosivos (trinitrotolueno), hidrocarburos derivados del petróleo (gasolina, benceno, tolueno, hidrocarburos aromáticos policíclicos) y bifenilos policlorinados (dioxinas, polietileno), entre otros. En comparación con los contaminantes inorgánicos, son relativamente menos tóxicos para las plantas, ya que son menos reactivos y no se acumulan.

Los contaminantes inorgánicos pueden estar presentes naturalmente en la corteza terrestre y/o en la atmósfera, o resultar de actividades humanas como la minería, la industria, el transporte y la agricultura. A diferencia de los compuestos orgánicos, no pueden ser degradados por las plantas, pero pueden acumularse en las partes cosechables de las mismas. Algunos ejemplos exitosos de fitorremediación de esta clase de contaminantes incluyen, entre otros, macronutrientes vegetales (nitratos y fosfatos), elementos traza (Cr, Cu, Fe, Mn, Mo, Zn), elementos no esenciales (Cd, Co, F, Hg, Se, Pb, V y W), e isótopos radioactivos (^{238}U , ^{137}Cs y ^{90}Sr). Muchos de estos compuestos son normalmente necesarios para el desarrollo de las plantas, pero cuando se acumulan en exceso generan estrés oxidativo dañando a las células vegetales.

Más allá de la naturaleza química del contaminante, la fitorremediación puede utilizarse para detoxificar sustratos de naturaleza sólida, líquida o gaseosa. Entre las principales aplicaciones de esta técnica pueden mencionarse el tratamiento de:

- **Sustratos sólidos:** sitios militares (metales, explosivos), suelos agrícolas (herbi-

cidas, pesticidas, metales, selenio), sitios industriales (compuestos orgánicos, metales), minas (metales) y sitios de tratamiento de maderas (hidrocarburos aromáticos policíclicos);

- **Sustratos líquidos:** aguas residuales (nutrientes, metales), drenajes agrícolas (nutrientes, fertilizantes, As, Se, B, pesticidas, herbicidas), efluentes industriales (metales), efluentes de minería (metales);
- **Sustratos gaseosos:** aire (óxidos de nitrógeno, SO_2 , ozono, CO_2 , gases neurotóxicos, partículas de hollín, hidrocarburos volátiles).

La fitorremediación presenta una serie de ventajas sobre otras técnicas de descontaminación que podrían resumirse de la siguiente manera: a) costos energéticos muy inferiores debido al uso de energía solar; b) empleo de tratamientos *in situ*, con las consiguientes reducciones de costos y riesgos para los humanos; c) adaptabilidad para la descontaminación de grandes superficies o para la "finalización" de áreas restringidas en plazos prolongados; d) mayor velocidad de degradación para el caso de determinados compuestos; e) menor producción de residuos secundarios.

Asimismo, es importante considerar también las limitaciones inherentes a esta técnica, entre las cuales pueden incluirse: a) la fitotoxicidad puede limitar el crecimiento de las plantas en áreas fuertemente contaminadas; b) la penetración de las raíces restringe la utilidad de la técnica a profundidades de hasta 3-4 m, y al tratamiento aguas poco profundas; c) en algunos casos el proceso de remediación suele ser muy prolongado, siendo más lento en los suelos que en los cuerpos de agua; d) la biodisponibilidad de los compuestos o metales puede constituir un factor limitante para una captación eficaz; e) las contaminaciones potenciales de las cadenas alimentarias y de las napas de agua son riesgos que deben considerarse seriamente; f) los productos de degradación *in planta* (procesos de fitodegradación) no están bien establecidos en muchos casos; g) el marco regulatorio para procesos de fitorremediación se halla aún en proceso de elaboración.

Algunas de las limitaciones mencionadas pueden atenuarse introduciendo modificaciones a las técnicas utilizadas. Por ejemplo, la profundidad de captación puede incrementar-

se mediante implantación de árboles en perforaciones profundas o mediante el bombeo de aguas contaminadas para irrigar plantas fitorremediadoras. Asimismo, la biodisponibilidad de ciertos contaminantes puede incrementarse mediante el agregado de compuestos que aumenten su solubilidad.

El mercado actual de la fitorremediación en Estados Unidos representa entre 100 y 150 millones de dólares al año (en 1999 fue de cerca de 45 millones de dólares), repartiéndose en un 80% para el tratamiento de contaminantes orgánicos y un 20% para contaminantes inorgánicos. Este mercado es todavía incipiente si se considera que la fitorremediación abarca sólo un 0,5% del mercado total de remediación (la biorremediación en su conjunto representa cerca del 2% del mercado total). El uso de este tipo de técnicas no es aún significativo en Europa, pero se espera que, debido a las inversiones realizadas en este campo, se vaya ampliando en el corto y mediano plazo. La Tabla 1 muestra una comparación de los costos de descontaminación para diferentes compuestos tóxicos con distintas estrategias. Como puede verse, en el caso de los contaminantes listados la fitorremediación resulta la opción menos costosa.

Estrategias de fitorremediación

El término fitorremediación engloba diferentes estrategias para descontaminar el entorno mediante el uso de las plantas. Estas estrate-

gias se resumen en la Figura 1 y se detallan a continuación. Su uso depende de la superficie y características del ambiente a remediar y de la naturaleza del contaminante, siendo posible implementar combinaciones de las mismas en algunos casos

- **Fitoextracción:** esta estrategia tiene como fin concentrar el contaminante en tejidos cosechables de las plantas (principalmente en la parte aérea). El material cosechado puede convertirse en cenizas, usarse con fines no alimentarios o, como en el caso de algunos metales, para reciclar el contaminante ("fitominería"). Esta técnica se usa principalmente para la remediación de metales y de otros tóxicos inorgánicos (Se, As, radionucleótidos).
- **Fitoestimulación/rizodegradación:** el propósito de esta estrategia es facilitar la degradación de contaminantes presentes en la rizósfera mediante la actividad de microorganismos (bacterias y hongos) asociados a las plantas. Es comúnmente usada para remediar contaminantes orgánicos hidrofóbicos que no pueden ser incorporados por las plantas, pero que pueden ser degradados por los microorganismos. Los ejemplos más destacados de aplicaciones de esta estrategia se refieren a hidrocarburos aromáticos policíclicos, bifenilos policlorinados e hidrocarburos derivados del petróleo.

Tabla 1. Adaptada de Chappell, 1998

Contaminante	Costo de Fitorremediación	Costo estimado usando otras tecnologías
Metales	U\$D 87,5 por m	U\$D 250 por m
petróleo	U\$D 70.000 por sitio	U\$D 850,000
4 Ha de tierra contaminada con plomo	U\$D 500,000	U\$D 12 millones
Radionucleótidos en agua superficial (4.000 litros)	U\$D 2 a U\$D 6	No determinado
1 hectarea a 15 cm de profundidad (varios contaminantes)	U\$D 2.500 a U\$D 15.000	No determinado

Adaptada de Chappell, 1998.

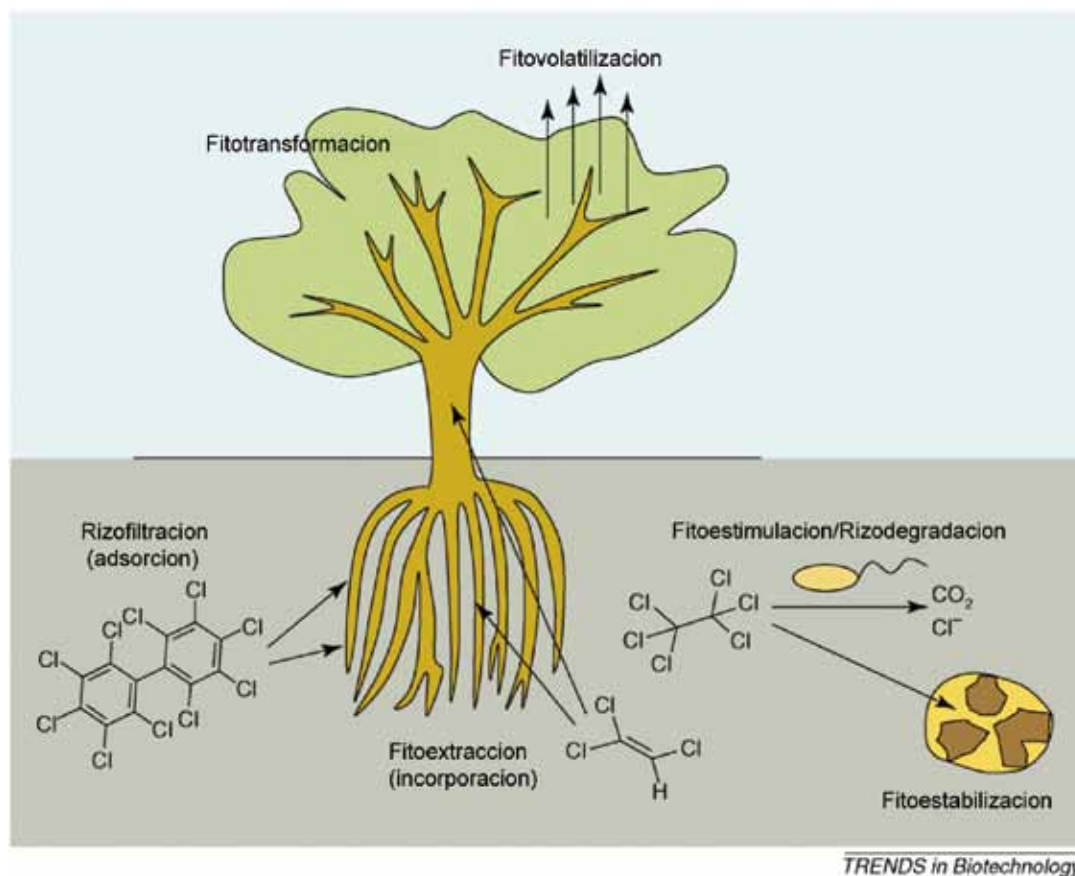


Figura 1. Procesos involucrados en la fitorremediación. La fitorremediación puede involucrar varios procesos: los contaminantes en el suelo y en el agua subterránea pueden ser incorporados a los tejidos vegetales (fitoextracción), o adsorbidos a las raíces (rizofiltración); los contaminantes dentro de la planta pueden ser transformados por enzimas vegetales (fitotransformación), o volatilizados y liberados a la atmósfera (fitovolatilización); los contaminantes del suelo pueden ser degradados por microorganismos de la rizósfera (biorremediación rizosférica), o incorporados al material del suelo (fitoestabilización). Adaptado de van Aken, 2008

- **Fitoestabilización:** esta estrategia se basa en utilizar plantas para estabilizar *in situ* los contaminantes del suelo. Por este medio, se previene el filtrado o escape de los contaminantes a capas más profundas o a napas de agua y se los convierte en formas menos biodisponibles (por ejemplo, por precipitación en la rizósfera). Para implementar este enfoque pueden plantarse coberturas vegetales en sitios contaminados, o árboles que actúan como barreras hidráulicas, tanto para contaminantes orgánicos como inorgánicos.
- **Fitodegradación/fitotransformación:** mediante esta estrategia, las plantas degradan los contaminantes orgánicos mediante actividades enzimáticas propias, generando así subproductos no tóxicos o menos tóxicos. El procedimiento ha resultado útil para compuestos orgánicos que se movilizan fácilmente en los tejidos de la planta, como los herbicidas, el trinitrotolueno, y el tricloroetileno.
- **Fitovolatilización/fitotransformación:** en este caso, las plantas incorporan el contaminante y lo convierten a formas volátiles que se liberan luego a la atmósfera a través de la transpiración. Este procedimiento permite extraer elementos como el selenio y algunas formas del mercurio de barros y suelos, para luego liberarlos a la atmósfera como vapor detoxificado. Puede utilizarse para

compuestos orgánicos con formas volátiles (tricloroetileno) y para compuestos inorgánicos que pueden existir en forma volátil, como Se y Hg.

- **Rizofiltración:** este procedimiento consiste en la eliminación de tóxicos de ambientes acuáticos mediante el sistema radicular de la planta. En este proceso, las plantas son crecidas en hidroponía para luego ser transplantadas al cuerpo de agua contaminado, donde adsorben y acumulan metales en sus raíces. Si el proceso se realiza en contenedores, es relativamente caro de implementar, siendo más bien apropiado para volúmenes pequeños de aguas residuales contaminadas, por ejemplo, con compuestos inorgánicos peligrosos como radionucleótidos.

Los procesos mencionados no son mutuamente excluyentes. Por ejemplo, en un terreno anegado artificialmente, pueden ocurrir simultáneamente procesos de acumulación, estabilización y volatilización de los contaminantes. Algunos ejemplos de diseños planteados de fitorremediación que resultan de la combinación de las estrategias mencionadas se esquematizan en la Figura 2.

Características deseables en una planta para fitorremediar

El diseño del sistema a utilizar para la descontaminación variará según el tipo de compuesto contaminante y su concentración, y de las condiciones específicas del sitio a remediar. Uno de los factores más importantes a determinar es la selección de la especie vegetal. En general, se utilizan especies de rápido cre-

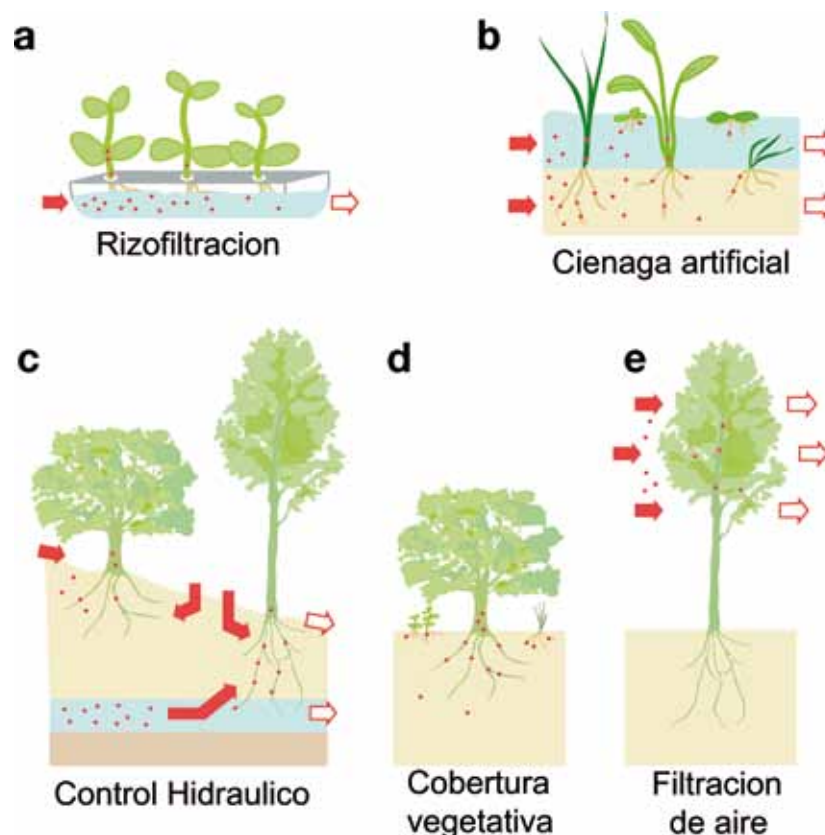


Figura 2. Esquemas de fitorremediación para tratar diferentes sustratos contaminados. Tecnologías de fitorremediación utilizadas para remediar distintos sustratos contaminados: agua, suelo y/o aire. Los círculos rojos representan al contaminante. Adaptado de Pilon-Smith, 2007

cimiento, fáciles de crecer y mantener, y que desarrollen gran cantidad de biomasa. Pueden utilizarse plantas, árboles, pastos o algas, prefiriéndose en algunos diseños las especies autóctonas para no modificar la flora local. Las especies más utilizadas comprenden las freatófitas (plantas de raíces profundas como el álamo, sauce, algodónero), las pasturas (debido a que sus raíces son particularmente aptas para retener el suelo), las legumbres (porque permiten la fijación simbiótica de N₂) y las acuáticas (que permiten la degradación de contaminantes en ciénagas artificiales). Como es obvio, la especie seleccionada deberá descontaminar eficientemente la sustancia tóxica.

Cada estrategia de fitorremediación requiere la presencia de características especiales en la planta a utilizar. Por ejemplo, si se desea emplear la técnica de fitoextracción para contaminantes inorgánicos, éstos deben concentrarse en la planta en altos niveles, translocarse eficazmente y acumularse en los tejidos cosechables. En un esquema basado en fitodegradación, se requerirán sistemas radiculares densos y abundantes y altos niveles de enzimas degra-

dativas. En cambio, si se emplea una estrategia de fitoestimulación, es importante que la planta tenga una gran superficie radicular y produzca los exudados necesarios para promover el crecimiento microbiano.

Existen especies de plantas conocidas como “hiperacumuladoras” que tienen la capacidad de acumular compuestos fitotóxicos (particularmente metales) en concentraciones entre 50 y 500 veces superiores a una planta promedio. El alto poder de concentración del compuesto tóxico, sumado a un sistema eficiente de transporte desde la raíz al tallo, califica a las hiperacumuladoras como candidatas promisorias para ciertos procesos de detoxificación (Tabla 2).

Procesos biológicos que afectan la fitorremediación

El proceso de fitorremediación depende de una serie de procesos biológicos: aquellos relacionados con las interacciones a nivel rizosférico; los mecanismos de captación, translocación y tolerancia presentes en la planta; la presencia de quelantes vegetales involucrados en transporte y almacenamiento, y el movimiento

Tabla 2. Adaptada de Cherian, 2005

Hiperacumuladoras	Metal	Plantas comunes	Contaminantes y entorno
<i>Thlaspi caerulescens</i>	zinc(Zn), cadmio (Cd)	Mostaza parda	Metales pesados, selenio y radionucleótidos en el suelo
<i>Berkheya coddii</i>	níquel (Ni)	álamo	Solventes clorados y nitratos en aguas subterráneas, metales pesados en el suelo
<i>Astragalus racemosus</i>	selenio (Se)	Álamo carolino	Solventes clorados en agua subterráneas; metales, nitratos
<i>Pteris vittata</i>	arsénico (As)	Lenteja de agua	Desechos explosivos en aguas subterráneas
<i>Ipomoea alpina</i>	cobre (Cu)	mora	Hidrocarburos aromáticos policíclicos (PAHs) en el suelo
<i>Haumaniastrum robertii</i>	cobalto (Co)	girasol	Radionucleótidos en aguas subterráneas
<i>Iberis intermedia</i>	talio (Tl)	pastos	Metales pesados e hidrocarburos en el suelo
<i>Gysophila spaerocephala</i>	boro (B)	alfalfa, enebro	Hidrocarburos en suelos y aguas subterráneas

Adaptada de Cherian, 2005

de los contaminantes en los ecosistemas hacia niveles tróficos superiores. Algunos de los parámetros más importantes relacionados con estos procesos se comentan a continuación:

- **Biodisponibilidad del contaminante:** la biodisponibilidad de un contaminante depende fuertemente de sus propiedades químicas, en particular de su hidrofobicidad y volatilidad. Por ejemplo, las moléculas de extrema hidrofobicidad (bifenilos policlorados, hidrocarburos aromáticos policíclicos y otros hidrocarburos) se unen fuertemente a la materia orgánica y no se disuelven en el agua atrapada en sus poros, presentando así baja biodisponibilidad. Las propiedades del suelo también influyen sobre la biodisponibilidad; los suelos arcillosos y con mayor concentración de materia orgánica retienen más agua que los suelos arenosos y tienen más sitios de unión para iones (especialmente cationes). La biodisponibilidad de los contaminantes inorgánicos que están presentes como cationes es afectada por el pH del suelo (los pHs ácidos la incrementan porque los reemplazan por protones en los sitios de unión). Las condiciones medioambientales son otro parámetro importante; por ejemplo, la temperatura y la humedad pueden aumentar la migración de contaminantes disueltos en agua. Dada la importancia de este factor sobre la fitorremediación, existen numerosas estrategias para aumentar la biodisponibilidad de los contaminantes, que incluyen el agregado de quelantes y la acidificación de los suelos en el caso de los metales (fitoextracción asistida) y el agregado de surfactantes para contaminantes hidrofóbicos.
- **Procesos rizosféricos:** en la rizósfera, la zona comprendida hasta 1 mm de distancia de la raíz, existe una mayor concentración de microorganismos como consecuencia de la liberación de fotosintatos. Muchos poseen capacidad remediadora y la liberación de metabolitos secundarios por parte de la planta puede activar en ellos la expresión de genes relacionados con la degradación de contaminantes. En la rizósfera ocurren procesos que pueden contribuir a incrementar la biodisponibilidad del contaminante. Algunos ejemplos de estos procesos son: a) la liberación de biosurfactantes bacterianos que aumentan la solubilidad de compuestos hidrofóbicos; b) la liberación de exudados vegetales que promueven la síntesis de biosurfactantes bacterianos; c) la liberación de enzimas vegetales y bacterianas capaces de modificar algunos compuestos orgánicos aumentando su biodisponibilidad; d) la liberación de quelantes por parte de plantas y bacterias (sideróforos, ácidos orgánicos y fenólicos) que permiten incrementar la disponibilidad de metales; e) la extrusión de protones por las plantas para acidificar el suelo; f) la liberación de enzimas vegetales que convierten los metales en formas menos tóxicas o más biodisponibles (por ejemplo, CrVI a CrIII).
- **Captación por la planta:** el proceso de captación depende de la naturaleza del contaminante. Por lo general, las plantas no poseen transportadores específicos para los contaminantes orgánicos, los cuales son en su mayoría productos de la actividad humana. De acuerdo con su grado hidrofobicidad, estos compuestos difunden a través de los tejidos vegetales. En cambio, los contaminantes inorgánicos son incorporados mediante transportadores de membrana preexistentes debido a que son naturalmente utilizados como nutrientes o guardan relación con compuestos normalmente captados por las plantas. Por ejemplo, el arsenato es incorporado por transportadores de fosfato y el selenato por transportadores de sulfato. A pesar de que son poco reactivos, su acumulación causa toxicidad debido a que dañan la estructura celular mediante estrés oxidativo y reemplazan nutrientes esenciales.
- **Quelación y compartimentalización:** estos procesos que incluyen distintos tipos de conjugaciones y modificaciones,

o bien el secuestro en localizaciones subcelulares donde no interfieren con el metabolismo celular, le permiten a las plantas tolerar distintos contaminantes. Algunos de estos procesos se resumen en la Figura 3.

- **Degradación:** este proceso puede aplicarse solo a contaminantes de tipo orgánico, que pueden ser completamente catabolizados (proceso que se denomina "mineralización" y que tiene como productos CO_2 , H_2O y/o Cl_2), o bien parcialmente degradados a intermediarios estables que se almacenan en la planta

como conjugados. La degradación puede ocurrir tanto en raíces como en la parte aérea de la planta mediante enzimas que modifican los grupos laterales de los compuestos orgánicos permitiendo así su solubilización. Algunas enzimas involucradas en este proceso son las dehalogenasas, mono/di-oxigenasas, peroxidasas, lacasas, nitrilasas, fosfatasas y nitroreductasas.

Diseño de un esquema de fitorremediación

El diseño del sistema a utilizar para la des-

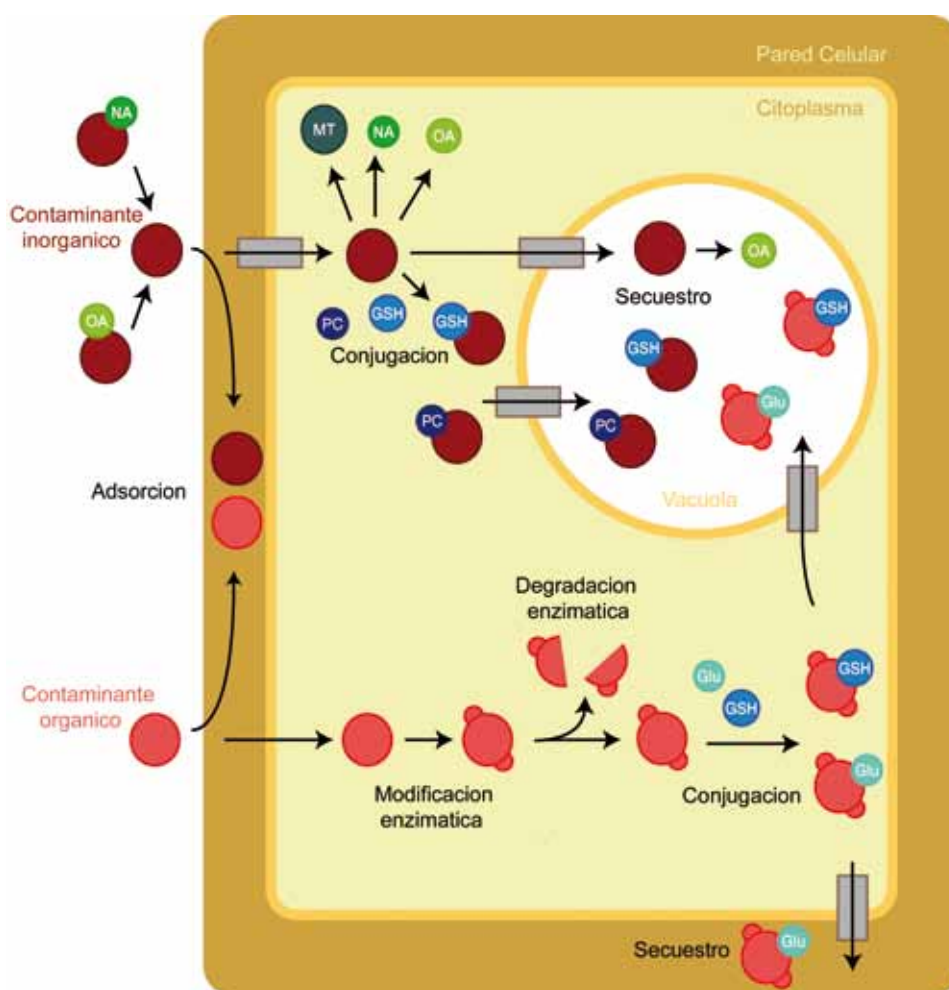


Figura 3. Mecanismos de tolerancia de las células vegetales a contaminantes orgánicos e inorgánicos. La detoxificación generalmente involucra procesos de conjugación seguidos por el secuestro activo del complejo en la vacuola y/o el apoplasto, lugares donde el contaminante genera menos daño. Los compuestos quelantes mostrados en el esquema son: GSH: glutatión, Glu: glucosa, MT: metalotioneínas, NA: nicotinamina, OA: ácidos orgánicos, PC: fitoquelatinas. Los transportadores activos se muestran como cajas con flechas. Adaptado de Pilon-Smith, 2007

contaminación variará según la naturaleza de los compuestos contaminantes, la concentración de los mismos y las condiciones del sitio a remediar. La estrategia de fitorremediación a utilizar es muy importante, ya que el diseño del sistema dependerá de ello. Algunos factores clave a tener en cuenta son:

- **Naturaleza de los contaminantes y selección de la especie vegetal:** para asegurar la correcta elección del sistema de fitorremediación, es necesario establecer fehacientemente el tipo de contaminación. Con el fin de utilizar el sistema más apropiado, pueden realizarse ensayos a pequeña escala para comparar la efectividad de distintas especies de plantas. Es necesario analizar también la cantidad y las características de los compuestos que la planta produce y/o libera.
- **Esquema y densidad de las plantaciones:** la densidad de plantación dependerá de la planta utilizada y del tipo de aplicación. Es importante calcular la cantidad de biomasa producida por unidad de superficie a lo largo del tiempo y, si es necesario realizar plantaciones sucesivas que permitan alcanzar tasas de descontaminación adecuadas.
- **Tasa de captación del contaminante y tiempo de limpieza requerido:** el tiempo total requerido para un determinado esquema de fitorremediación dependerá de las variables apuntadas anteriormente. La tasa de descontaminación puede determinarse aplicando distintas ecuaciones desarrolladas especialmente con este fin.
- **Irrigación, insumos agronómicos y mantenimiento:** la frecuencia y cantidad de las lluvias y las características del clima regional son factores que podrían determinar la necesidad de agua para riego, lo que presupone la existencia costos adicionales para los procesos de fitorremediación terrestre. Es importante analizar los procesos de movimiento y destinación final del agua. Por ejemplo, un árbol maduro es capaz de liberar más de 760 litros de agua por año. En algunos casos, las plantas liberarán al ambiente

productos menos tóxicos que el contaminante original mediante el proceso de transpiración. Otros costos importantes a considerar en el esquema son los de implantación, fertilización, mantenimiento y control, y tareas de cosecha y recolección. Finalmente, no debe excluirse la ocurrencia de eventos recurrentes en la agricultura, tales como plagas, sequías, heladas o la depredación por animales, los que pueden introducir situaciones no previstas en el esquema planteado. Por esta razón, es recomendable disponer de estrategias de contingencia para asegurar el éxito del programa.

Estrategias para incrementar la eficiencia de la fitorremediación

Se han planteado diferentes estrategias para mejorar la eficiencia de los sistemas de fitorremediación haciendo uso de plantas transgénicas. Algunas de estas estrategias son: a) aumento de la incorporación de contaminantes mediante la sobreexpresión y/o alteración de la especificidad de distintos transportadores de membrana, o la expresión y secreción de proteínas o compuestos quelantes; b) aumento de la eficiencia de degradación de contaminantes orgánicos mediante sobreexpresión de enzimas específicas; c) aumento de la acumulación de metales pesados, mediante expresión de enzimas capaces de favorecer su conjugación a moléculas tales como el glutatión y/o las fitoquelatinas.

En muchos casos, los genes utilizados para hacer más eficiente la fitorremediación provienen de animales o de microorganismos, ya que éstos poseen el complemento enzimático necesario para degradar y/o mineralizar las moléculas orgánicas, complementando así las capacidades metabólicas de las plantas. En la medida en que se diluciden las bases moleculares y fisiológicas de los procesos de captación, transporte y acumulación de los contaminantes en las plantas fitorremediadoras, será posible encarar nuevas estrategias de modificación genética en otras especies vegetales. Otras líneas de investigación promisorias apuntan a incrementar la eficiencia del proceso de fitorremediación mejorando las interaccio-

nes entre las plantas y sus microorganismos endófitos, ya sean naturales o genéticamente modificados.

Ejemplos de fitorremediación

La fitorremediación para la descontaminación de aguas, suelos y aire ha resultado exitosa en un número considerable de casos. Los ejemplos de estas aplicaciones van desde pruebas al nivel de laboratorio o escala piloto, hasta procedimientos a gran escala en zonas afectadas por determinados contaminantes. A continuación se resumen algunos de los casos exitosos.

Fitorremediación de mercurio: el mercurio, presente naturalmente en la corteza terrestre, es un metal capaz de causar graves daños cerebrales, cardíacos, hepáticos y pulmonares tanto en animales como en humanos. Se han utilizado distintas técnicas para minimizar el impacto ambiental del mercurio, y uno de las más promisorias es el uso de plantas para extraer este elemento de aguas contaminadas. Por ejemplo se ha demostrado que el pequeño helecho *Azolla caroliniana* es capaz de remover hasta el 93% del mercurio presente en una muestra de agua contaminada en sólo 12 días. Por otro lado, se observó que plantas acuáticas como la milhojas acuática (*Myriophyllum aquaticum*), o la menta de agua (*Mentha aquatica*) remueven el 99,8% del mercurio en un periodo de 21 días. Investigaciones similares, realizadas con el jacinto de agua (*Eichornia crassipes*), la lechuga de agua (*Pistia stratiotes*), el junco de agua (*Scirpus tabernaemontani*) y el taro (*Colocasia esculenta*) refuerzan el posible uso de plantas para la remoción de mercurio de aguas contaminadas.

Una estrategia alternativa es el uso de plantas genéticamente modificadas. Se han realizado pruebas de concepto en *Arabidopsis thaliana*, tabaco, canola y álamo introduciendo los genes *merB* y *merA* de *Desulfovibrio desulfuricans*, que codifican una organomercurio liasa y una mercurio reductasa. La primera es capaz de transformar las formas tóxicas del mercurio (metilmercuriales), en compuestos más inocuos (mercurio iónico y metano); mientras que la segunda permite transformar el mercurio iónico en mercurio elemental. La ex-

presión combinada de los genes *merB* y *merA* en una misma planta ha permitido la obtención de líneas que resisten concentraciones de fenilmercurioacetato 100 veces mayores a las que resisten las plantas no transgénicas (Figura 4).



Figura 4. Plantas de *Arabidopsis* que expresan tanto *merA* como *merB* son altamente resistentes a mercurio orgánico. La expresión de ambos transgenes permite que el metilmercurio o el PMA se convierta a formas menos tóxicas, como Hg(0). Las plantas MerA/MerB (panel inferior izquierdo) crecen en presencia de altas concentraciones de PMA (5 μ M) pero las transgénicas simples MerA (panel inferior derecho), MerB y las plantas no transgénicas, mueren. Tomada de Meagher y Heaton; 2005.

Fitorremediación de fenol: los contaminantes fenólicos son considerados altamente peligrosos debido a su carcinogenicidad, su alta toxicidad, y su resistencia a la degradación. En general, esta clase de contaminantes se genera a partir de diversas actividades industriales dentro de las que se encuentran las refinerías de petróleo, la producción de plásticos, y el tratamiento de maderas. Los métodos convencionales para eliminarlos son costosos y poco eficientes, incluso pueden generar subproductos que resultan aún más perjudiciales que los compuestos originales. Un método interesante para su descontaminación es el tratamiento enzimático, que consiste en la remoción biológica de fenoles mediante el uso de peroxidasas y oxidasas. Sin embargo, se necesitan grandes cantidades de enzimas para lograr una eficiencia de descontaminación adecuada, lo que dificulta su aplicación a escala industrial.

Una estrategia para superar esta limitación es el uso de plantas enteras como “transformadoras” de fenoles.

Una posible herramienta para procesos de fitorremediación es el cultivo de raíces transformadas con *Agrobacterium rhizogenes* (“raíces en cabellera”). Las raíces de tomate tratadas con esta bacteria contienen altos niveles de peroxidadas, y en consecuencia son capaces de remover fenoles. En un trabajo realizado en el año 2005, en la Universidad de Río Cuarto (Córdoba, Argentina), se obtuvieron raíces en cabellera transgénicas de tomate (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Pera) que sobreexpresan el gen *tpx1* (Figura 5). Este gen codifica una peroxidasa básica que se localiza en la pared celular de las raíces de tomate. Se analizó la capacidad de dichas raíces para remover fenol utilizando como controles raíces en cabellera de plantas no transgénicas. Las raíces transgénicas fueron capaces de remover hasta un 85% del fenol adicionado, mientras que los controles no transgénicos sólo removieron un 15%. Estos resultados sugieren que las raíces en cabellera podrían resultar herramientas muy útiles para la limpieza de efluentes contaminados.

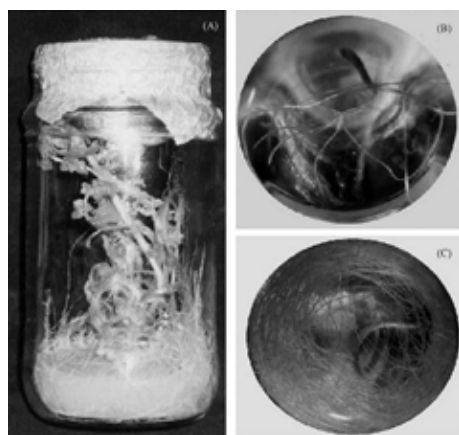


Figura 5. (A) Planta transgénica de tomate *in-vitro*. (B) Raíces en cabellera transgénicas luego de 1 semana en medio líquido. (C) Raíces en cabellera transgénicas después de 4 semanas en medio líquido. Tomado de Weaver Oller y col., 2005

Fitorremediación de arsénico: el arsénico (As) es un compuesto altamente tóxico, sus formas predominantes son el arsenato (As V)

y arsenito (As III). El primero interfiere con procesos celulares como la fosforilación oxidativa y la síntesis de ATP, mientras que el segundo se une a grupos sulfhidrilo en detrimento de la función proteica en general. La mayor fuente de contaminación del agua bebibible y de la cadena alimentaria son los cursos de agua, suelos y sedimentos contaminados con As. Esto ha causado envenenamientos masivos que, entre otros síntomas, generan lesiones y cánceres en la piel.

En la naturaleza, las actividades geoquímicas y microbianas contribuyen también a la movilización del As hacia el ambiente. Sin embargo, es la actividad humana la que más contribuye a este proceso, exacerbando así el problema. En India y Bangladesh, la contaminación de aguas con As pone en riesgo la alimentación basada en cultivos tales como el arroz y el maíz. Estas especies son capaces de acumular As en sus granos, lo que genera riesgos potenciales para los consumidores humanos. Los métodos físicos y químicos aplicados hasta hoy para disminuir las contaminaciones de As no han resultado exitosos. En este contexto, las algas y plantas acuáticas hiperacumuladoras de As se presentan como una opción prometedora.

En el año 2002 un grupo de investigadores diseñó un sistema de fitorremediación de As basado en plantas de *Arabidopsis thaliana* transgénicas, capaces de convertir el arsenato en arsenito, el cuál era luego secuestrado en las hojas en complejos de péptidos que contienen tioles. En primer lugar generaron plantas transgénicas que expresaban el gen bacteriano de la arsenato reductasa (*arsC*), bajo la dirección de un promotor de hoja inducible por luz. En consecuencia, la enzima transgénica sólo se expresa en las hojas y estas plantas son hipersensibles al arsenato. Por otra parte, se obtuvieron plantas transgénicas que expresaban el gen bacteriano γ -glutamylcisteina sintetasa (γ -ECS) bajo un promotor constitutivo. Estas plantas mostraron una moderada tolerancia al As en comparación con plantas no transgénicas. Finalmente, en aquellas plantas que expresan simultáneamente ambos transgenes (*arsC*/ γ -ECS), se observó un efecto potenciado de tolerancia al As. En medios con concentraciones elevadas de As, las plantas *arsC*/ γ -ECS crecen y son capaces de generar entre 4 y 17 veces más biomasa que las plantas no transgénicas o las transgénicas que expresan solo

una de las enzimas. Además, se observó que acumulaban entre 2 y 3 veces más arsénico por gramo de tejido que las plantas control.

Aplicaciones comerciales

Tratamiento de contaminaciones con metales pesados

La empresa norteamericana *Edenspace Systems Corporation* comercializa plantas con aplicaciones energéticas y ambientales. La compañía provee tecnologías fitoambientales basadas en plantas hiperacumuladoras de metales y brinda servicios para descontaminar arsénico, plomo, uranio y compuestos orgánicos de suelos y aguas. Además, provee prestaciones complementarias a la fitorremediación que incluyen análisis de factibilidad, biodisponibilidad, consultorías, etc. *Edenfern™* (Figura 6) es un sistema que se desarrolló en la Universidad de Florida y se licenció a Edenspace. Se basa en el uso de un helecho (*Pteris vittata*) capaz de absorber arsénico del suelo, lodo, o agua, con una eficiencia 200 veces mayor que cualquier otra planta. Luego de un cierto período, los helechos son removidos y descartados de manera segura, dejando el terreno libre de arsénico. Si se asume una concentración de arsénico en el suelo de 50 mg/kg, este procedimiento permite reducir los niveles de As hasta 10 mg/kg en 2 - 4 meses. Este sistema puede extraer arsénico del suelo en concentraciones que van desde menos de 1 mg/kg hasta 2.500 mg/kg. En 2007 este sistema fue aplicado con resultados promisorios en una pequeña propiedad residencial en Virginia (EEUU) cuyo suelo contenía altas concentraciones de arsénico

debido al uso de pesticidas. La misma técnica de remoción de As se ha utilizado para descontaminar agua utilizando un sistema de fitofiltración. *Pteris vittata* puede reducir la concentración de As presente en el agua desde concentraciones de 200 mg/L a menos de 50 mg/L en sólo 2 días, permitiendo la remoción completa al cabo de 3 días.

Tratamiento de aguas residuales urbanas

Los sauces pueden ser utilizados con fines de fitorremediación para el tratamiento de aguas residuales urbanas que contienen altas concentraciones de nitrógeno y fósforo. Estas sustancias forman una solución nutritiva que puede ser utilizada para el riego de dichos árboles, y así son “biotransformadas” en biomasa útil. En Enköping, una ciudad de Suecia con unos 20.000 habitantes, se utiliza un sistema de fitorremediación para tratar el agua residual rica en nitrógeno procedente del fango de alcantarillado (previamente tratada en una planta depuradora). El efluente se distribuye por una plantación de sauces de 75 hectáreas durante el período de crecimiento (Figura 7). Las aguas contaminadas contienen unos 800 mg/L de nitrógeno. El sistema trata unas 11 toneladas de nitrógeno y 0,2 toneladas de fósforo al año en un volumen de 200.000 m³ de aguas residuales. Los posibles riesgos medioambientales, como emisiones de óxido nitroso (N₂O) a la atmósfera, son analizados continuamente; los resultados obtenidos hasta el presente indican que los mismos son mínimos.



Figura 6. Edenfern™



Figura 7. Sistema de fitorremediación que utiliza una plantación de 75 hectáreas de sauces en Enköping, Suecia. Planta de tratamiento de aguas residuales (primer plano), piletas para almacenar las aguas en invierno (al fondo) y campos de sauces regados con efluentes de fangos. P. Aronsson

Lecturas recomendadas

Bennicelli R, Stepniewska Z, Banach A, Szajnocha K, Ostrowski J. 2004. The ability of *Azolla caroliniana* to remove heavy metals (Hg(II), Cr(III), Cr(VI)) from municipal waste water. *Chemosphere*, 55, 141-6.

Chappell J. 1998. Phytoremediation of TCE in groundwater using *Populus*. US Environmental Protection Agency. En <http://clu-in.org/products/intern/phytotce.htm>

Cherian S. And Oliveira M.M. 2005. Transgenic Plants in Phytoremediation: recent advances and new possibilities. *Environmental Science and Technology*, 39, 9377-9390.

Dhankher OP, Li Y, Rosen BP, Shi J, Salt D, Senecoff JF, Sashti NA, Meagher RB. 2002. Engineering tolerance and hyperaccumulation of arsenic in plants by combining arsenate reductase and gamma-glutamylcysteine synthetase expression. *Nature Biotechnology*, 20, 1140-5.

Doty S.L. 2008. Enhancing phytoremediation through the use of transgenics and endophytes. *New Phytologist*, 8, 179-188.

Kamal M, Ghaly AE, Mahmoud N, Côté R. 2004. Phytoaccumulation of heavy metals by aquatic plants. *Environ Int*, 29, 1029-39.

Meagher RB, Heaton AC. 2005. Strategies for the engineered phytoremediation of toxic element pollution: mercury and arsenic. *J Ind Microbiol Biotechnol*, 32, 502-513.

Dimitriou I. y Aronsson P. 2005. Sauces para energía y fitorremediación en Suecia. *Unasylva* 221, 56, 47-50.

Pilon-Smits E. 2007. Phytoremediation. *Ann Rev Plant Biology*, 56, 15-39.

Skinner K, Wright N, Porter-Goff E. 2007. Mercury uptake and accumulation by four species of aquatic plants. *Environmental Pollution*, 145, 234-237.

Van Aken B. 2008. Transgenic plants for phytoremediation: helping nature to clean up environmental pollution. *Trends in Biotechnology*, 26, 225-227.

Wevar Oller AL, Agostini E, Talano MA, Capozucca C, Milrad SR, Tigier HA, Medina MI. 2005. Overexpression of a basic peroxidase in transgenic tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill. cv. Pera) hairy roots increases phytoremediation of phenol. *Plant Science*, 169, 1102-1111.

EDENSPACE: <http://www.edenspace.com>

Video explicativo de la *Environmental Protection Agency* (EPA, USA), *Crozet Phytoremediation*: http://www.epa.gov/oerrpage/superfund/misc/crozet_phyto.htm

V . CAPÍTULO 16

Plantas como biorreactores

Fernando Almonacid Bravo; Sonia Wirth;
María Eugenia Segretin; Mauro Morgenfeld;
Ezequiel Matías Lentz

Introducción

En los últimos años, la demanda y el uso de péptidos y proteínas terapéuticos en la medicina humana y veterinaria han experimentado un marcado incremento. El mercado mundial de biofármacos para uso humano alcanza actualmente los 30.000 millones de dólares, y se estima que se duplicará para el año 2010. Más de 200 productos se encuentran en evaluación clínica, liderados por los anticuerpos monoclonales de los cuales unos 70 se estarían comercializando en los próximos años. Sólo cuatro moléculas comprenden el 75% de la producción actual y, si las predicciones son correctas, la demanda podría superar la capacidad de manufactura, a menos que se desarrollen nuevos sistemas de producción.

Actualmente, la producción de biofármacos se realiza utilizando básicamente dos sistemas: microorganismos y cultivo de células de mamífero.

Respecto al primer sistema, existe la dificultad asociada a la incapacidad que tienen las bacterias y hongos de producir en las proteínas animales ciertas modificaciones que en la mayoría de los casos son indispensables para su funcionalidad, como por ejemplo, el agregado de determinados azúcares (glicosilación). Además, el plegado incorrecto de la proteína y la formación de agregados insolubles (cuerpos de inclusión) limitan la obtención de productos biológicamente activos o cuyo costo de purificación sea económicamente sostenible.

Los cultivos de células de mamífero, en cambio, tienen la ventaja de que permiten la síntesis de proteínas animales muy similares a la original. Sin embargo, la obtención y mantenimiento de las líneas celulares es un proceso largo y costoso que implica grandes inversiones adicionales cuando se pretende incrementar la escala de producción.

Estos sistemas requieren de personal técnico especializado y conllevan grandes riesgos económicos en caso de que ocurran contaminaciones en la línea de producción, aunque el contaminante no sea patogénico para la salud humana.

En este entorno la agricultura molecular o *molecular pharming*, es decir, la utilización de animales o plantas como biorreactores para la producción de proteínas recombinantes, constituye una alternativa a los sistemas de producción basados en microorganismos y cultivos de células.

La producción de proteínas terapéuticas en animales transgénicos permite obtener productos muy similares a los sintetizados en el organismo animal original, pero requiere de un tiempo de desarrollo muy largo y costoso. El aumento en la escala de producción es lento y se limita a los ciclos naturales de crecimiento de la especie utilizada. Además, existe el riesgo de contaminación con virus animales y priones.

Todas las dificultades mencionadas han intensificado los esfuerzos para desarrollar nuevos sistemas de producción de moléculas recombinantes seguras y a bajo costo.

Es por ello que las ventajas asociadas a la producción de proteínas recombinantes en biorreactores vegetales han transformado a éstos en una opción altamente competitiva.

Ventajas de las plantas como biorreactores

La principal ventaja de las plantas como sistemas de producción es la disponibilidad prácticamente ilimitada de biomasa que puede obtenerse utilizando la infraestructura ya existente para la siembra, cosecha, almacenamiento y procesamiento de los cultivos. El capital de inversión inicial y el costo para el aumento en la escala de producción son relativamente bajos. Más aún, el volumen de producción es extremadamente flexible y puede adaptarse rápidamente a las demandas del mercado incrementando o disminuyendo la superficie sembrada. Por otra parte, una vez establecido el cultivo, no se requiere de personal especializado, no hay riesgos de contaminación con patógenos animales, endotoxinas bacterianas o secuencias de ADN oncogénicas y puede aprovechar-

se el conocimiento previo de los sistemas de molienda y extracción en las primeras etapas del proceso de purificación. Una ventaja adicional es que las plantas permiten el almacenamiento estable de la proteína recombinante en semillas y tubérculos, facilitando su conservación, transporte y distribución. Más aún, los mecanismos de síntesis y modificaciones posteriores son los propios de las células de mamíferos, permitiendo la producción y ensamblado de proteínas multiméricas, como los anticuerpos. Es importante recalcar que existen diferencias entre plantas y animales en la glicosilación de proteínas, estas diferencias pueden afectar la estabilidad, la actividad biológica y la antigenicidad; en resumen podrían afectar la autenticidad del producto final.

Cuando se comparan los costos de producción de proteínas recombinantes en distintos sistemas se demuestra que, a menos que los niveles de proteína recombinante alcanzados sean excesivamente bajos, los costos de producción en plantas son generalmente inferiores a los de otros sistemas.

Más del 85% del costo de producción de una proteína recombinante depende del proceso de purificación. Al respecto, las plantas poseen ventajas propias que permiten reducir estos valores, a través de la expresión directa en tejidos comestibles o la acumulación en tubérculos o semillas. Las perspectivas de aumentar aún más los niveles de expresión (que se fabrique una mayor cantidad de la proteína de interés en los tejidos vegetales) y el desarrollo de técnicas más económicas de purificación, permitirán producir proteínas recombinantes a costos entre 10 y 100 veces inferiores a los de los fermentadores bacterianos.

Resumiendo lo expuesto, para que la producción de proteínas recombinantes en plantas sea económicamente rentable es necesario cumplir con tres requisitos primordiales: a) alcanzar altos niveles de expresión, b) reducir los costos de purificación, y c) lograr un producto de características idénticas o similares al sintetizado en el sistema nativo (autenticidad).

Estrategias para la optimización de la producción

La optimización de los niveles de producción

de la proteína recombinante puede lograrse siguiendo diversas estrategias. La elección de la misma o combinación de ellas dependerá de las características de la proteína a sintetizar, de la especie vegetal utilizada y de las necesidades de producción. Generalmente, es difícil predecir cuál de estos aspectos tendrá mayor impacto para producir con éxito una proteína particular. Ello requiere, por lo tanto, ensayar múltiples variables para lograr niveles óptimos de producción. Los elementos a tener en cuenta son la elección del sistema de expresión y del germoplasma a transformar, y el uso de herramientas moleculares (secuencias reguladoras de la expresión) para el diseño de las construcciones genéticas que contengan las secuencias de las proteínas a expresar.

Elección del sistema de expresión

En cuanto a la elección del sistema de expresión, las opciones comprenden dos grandes grupos: sistemas integrativos y no integrativos. El primer grupo se refiere a aquellos sistemas que permiten la integración estable de la construcción genética en el genoma vegetal, tanto en el núcleo como en las organelas. El resultado es una transformación estable y heredable, requiere etapas de cultivo de tejidos y métodos de transformación eficientes, que por lo general insumen un tiempo considerable.

La transformación nuclear presenta la ventaja de contar con protocolos de transformación establecidos para muchas especies vegetales, la desventaja es que debido a efectos de posición y/o silenciamiento génico, muchas veces los niveles de expresión alcanzados no son lo suficientemente altos como para hacer viable la producción.

La transformación de cloroplastos (organela característica de las células vegetales que contiene su propio genoma) ha resultado ser una alternativa muy interesante para la expresión de proteínas por numerosas ventajas, entre ellas, el gran número de cloroplastos por célula y el gran número de copias de su material genético dentro de cada cloroplasto, lo que permitiría alcanzar altos niveles de expresión. La inserción al genoma ocurre mediante recombinación homóloga, permitiendo dirigir al transgén a un espacio intergénico y, hasta el

momento, no se han reportado en cloroplastos efecto de posición o silenciamiento génico. Más aún, al no transmitirse los cloroplastos al polen en la mayoría de las plantas, se dificulta el flujo horizontal a especies relacionadas. La desventaja que posee este sistema es las proteínas sintetizadas en estas organelas no pueden ser glicosiladas.

Los sistemas no integrativos, en cambio, no requieren de la integración del transgén, son más rápidos, pero no son heredables a la progenie. En este último grupo se encuentran la transformación transitoria con vectores virales y la agroinfiltración. Si bien no se presentan en estos sistemas los problemas de baja expresión asociados a la posición de integración, sí existen limitaciones de expresión debido a silenciamiento post-transcripcional.

Recientemente, mediante el uso de vectores virales de nueva generación, se han logrado niveles de expresión muy altos, en un sistema denominado “*magninfection*”.

Elección de la especie vegetal

En cuanto a la especie vegetal, existen distintas plantas que han sido utilizadas como plataforma en los biorreactores, entre las que se incluyen tabaco, papa, tomate, maíz etc. En principio no existe una regla que permita elegir la planta ideal para un determinado objetivo. Sin embargo, existen factores a tener en cuenta al momento de decidir cuál será el sistema elegido. Entre ellos podemos citar: disponibilidad de protocolos de transformación y sistemas de expresión transitorios, facilidad de cultivo a gran escala, rendimiento de biomasa, estabilidad de la proteína en los distintos tejidos de la planta, posibilidad de expresar la proteína en tejidos comestibles, facilidad de purificación, facilidad de contención del cultivo y otros aspectos relacionados con la seguridad alimentaria y medioambiental, entre otros. Así por ejemplo, la planta de tabaco presenta las siguientes ventajas: cuenta con diversos sistemas de transformación, permite alcanzar altos rendimientos (biomasa), existe infraestructura para el procesamiento a gran escala y permite flexibilidad en el cambio de escala de producción. Entre las desventajas podemos citar: el tejido (hojas) debe ser enfriado o deshidrata-

do, inmediatamente después de la cosecha, para ser transportado para su procesamiento evitando la degradación de las proteínas recombinantes. Al ser el tabaco una planta no comestible, presenta la ventaja de no ingresar a la cadena alimentaria (bioseguridad), pero es necesario purificar la proteína para eliminar compuestos tóxicos presentes en la planta de tabaco tales como alcaloides; no obstante, existen variedades de tabaco con bajo contenido de alcaloides.

El uso de cereales como el maíz, permite acumular la proteína recombinante en las semillas, lo que facilita su almacenaje y da flexibilidad al proceso de producción, ya que se puede almacenar el grano hasta el momento que sea necesario comenzar con el proceso de purificación. La desventaja es que al ser una planta comestible podría ingresar involuntariamente a la cadena alimentaria.

Los sistemas de expresión basados en frutas y hortalizas, permiten utilizar directamente el tejido vegetal sin la necesidad de purificar la proteína y realizando solamente una estandarización de los niveles de acumulación de la proteína recombinante en el tejido vegetal. Esto es de gran utilidad en la producción de vacunas orales, anticuerpos que serán utilizados en aplicaciones tópicas y cuando el tejido será utilizado como suplemento dietario. La desventaja de estos cultivos es similar a la mencionada para el maíz.

Otra plataforma de producción es la que utiliza a las lentejas de agua (*Lemna minor*). Estas son plantas acuáticas que se reproducen a un ritmo muy acelerado y se pueden cultivar en condiciones controladas usando medios cuya composición es sencilla y económica. Las proteínas recombinantes pueden ser secretadas al medio de cultivo o bien purificadas a partir de la biomasa vegetal.

Una alternativa al uso de plantas enteras como plataformas de expresión es la de utilizar cultivos de células vegetales. Estos sistemas permiten una producción en condiciones de esterilidad y es un sistema contenido. Las proteínas expresadas en suspensiones de células vegetales en cultivo pueden ser secretadas al medio de cultivo o retenidas en el interior de la célula.

La tabla 1 muestra algunos de los sistemas utilizados y sus principales características.

Optimización de los niveles de expresión

Existen muchas herramientas moleculares que permiten optimizar el sistema de expresión, e incluyen:

- la elección de elementos genéticos reguladores para expresar la proteína en tejidos vegetales específicos.
- la adaptación del uso de codones.
- la fusión a otras proteínas.
- la localización de la proteína en distintos compartimentos intracelulares para aumentar su estabilidad y/o facilitar su purificación.
- la co-expresión de supresores del silenciamiento virales para evitar el silenciamiento génico post-transcripcional.

Existen distintos tipos de promotores que han sido utilizados, entre ellos promotores constitutivos, promotores inducibles y promo-

tores específicos de un determinado órgano o tejido. La elección de los distintos tipos de promotores permitirá entonces expresar la proteína recombinante en todos los tejidos de la planta constitutivamente o sólo cuando uno lo determina, mediante la aplicación de un estímulo físico o químico externo, permitiendo producir proteínas que podrían ser deletéreas para la planta. Otra opción sería expresarlas en aquel ambiente donde la proteína sea más estable, mediante el uso de promotores tejido específicos.

Destino final de la proteína recombinante

Otros factores a tener en cuenta a la hora de decidir una estrategia para la producción de proteínas en plantas, además de la elección de la especie vegetal, es a qué compartimento de la célula vegetal (citoplasma, retículo endoplásmico, vacuola, cloroplasto) se dirige su acumulación. Si la proteína es inestable en el citosol, es posible agregar un péptido señal en

Figura 1. Rizosecreción en plantas transgénicas. Plantas transgénicas de tabaco que expresan hEGF, creciendo en medio MS sobre un disco de nitrocelulosa (izquierda), ensayo de *root blot* realizado sobre estas membranas y revelado con un anticuerpo anti-hEGF (derecha).

Tomate	Consumo crudo de los frutos. Disponibilidad de promotores específicos para la expresión en frutos. Cultivo en invernaderos a escala industrial bien establecido. Contenido proteico en frutos relativamente bajo.
Cereales	Tecnología de producción ampliamente establecida. Almacenamiento estable de la proteína recombinante en las semillas. Procesamiento industrial de las semillas bien establecido.
Alfalfa	Alto contenido proteico en hojas. Producción de biomasa abundante.
Lemna (lenteja de agua)	Alta eficiencia de proliferación clonal. Alta tasa de duplicación de la biomasa. Rizosecreción muy eficiente.
Physcomitrella (musgo)	Genoma completamente secuenciado. Transformación por recombinación homologa.

su extremo N-terminal para que sea transportada al retículo endoplasmático; de no contar con otra señal la proteína seguirá su camino y luego de pasar por el Golgi será enviada al espacio intercelular o espacio apoplástico. Si posee la señal de retención (H/KDEL), la proteína será entonces retenida en retículo y se evita así que se produzcan las glicosilaciones más complejas que ocurren en el Golgi. Alternativamente, se puede agregar además del péptido de envío a retículo, señales para que el destino final sean las vacuolas. Finalmente, se pueden expresar las proteínas en el cloroplasto (plantas transplastómicas) o dirigir las desde el citosol a los cloroplastos utilizando señales amino-terminales adecuadas como, por ejemplo, la de la subunidad pequeña de la ribulosa-1,5-bisfosfato carboxilasa oxigenasa (Rubisco). Existen publicaciones que muestran variaciones muy significativas en los niveles de expresión de una determinada proteína en diferentes compartimentos. De ellas se deduce la necesidad de enviar la proteína recombinante a aquel espacio intracelular donde alcance un correcto plegamiento y, en consecuencia, mejores niveles de expresión al evitar los mecanismos de proteólisis destinados a recuperar aminoácidos de proteínas mal plegadas.

Por ejemplo, la expresión de hEGF (factor de crecimiento epidérmico humano) en tabacos transgénicos es 10.000 veces mayor en apoplasto que en citoplasma. El aumento considerable de los niveles de expresión, al dirigir la expresión de hEGF al espacio intercelular (apoplasto), probablemente se deba a que al transitar a través del sistema de secreción pasando por retículo, pueden formarse correctamente los puentes disulfuro presentes en esta proteína que son necesarios para alcanzar su conformación más estable. Finalmente, la proteína es secretada al medio que rodea a las raíces (rizosecreción), hecho que permitiría purificar hEGF recombinante del medio de cultivo en el cuál se encuentran inmersas las raíces de plantas transgénicas creciendo en un sistema hidropónico (figura 1).

Por último, otro factor a tener en cuenta a la hora de plantear una estrategia de expresión de proteínas heterólogas en plantas, es el tejido u órgano de la planta en cuál ha de acumularse dicha proteína (hojas, tubérculos,

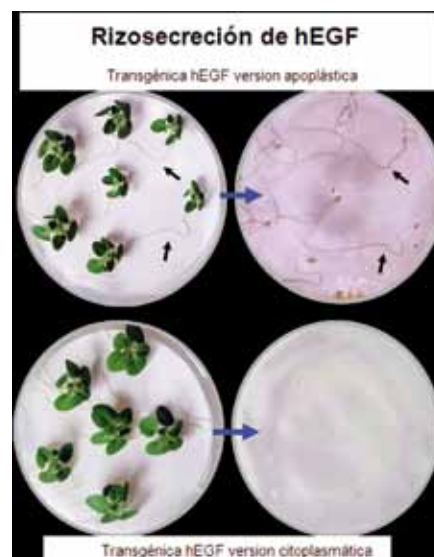


Figura 1. Rizosecreción en plantas transgénicas. Plantas transgénicas de tabaco que expresan hEGF, creciendo en medio MS sobre un disco de nitrocelulosa (izquierda), ensayo de *root blot* realizado sobre estas membranas y revelado con un anticuerpo anti-hEGF (derecha).

semillas, raíces, suspensiones celulares). La elección influirá en el mejoramiento de los niveles de expresión, ya sea permitiendo obtener una mayor estabilidad y/o mejores condiciones para su almacenamiento y así evitar su degradación.

De todo lo expuesto se desprende que las plantas pueden constituir un sistema con numerosas ventajas frente a otros sistemas disponibles para la producción de proteínas recombinantes de aplicación terapéutica o industrial. Aunque para cada proteína en particular se deban evaluar distintas alternativas hasta encontrar aquella en la que los niveles de expresión sean óptimos, es de esperar que a corto plazo la utilización de las plantas como biorreactores sea la opción más atractiva.

Estrategias para reducir los costos de purificación

Una estrategia comúnmente utilizada para reducir los costos de purificación consiste en acumular la proteína sintetizada en el espacio extracelular o apoplasto. El envío al espacio extracelular se logra fusionando el extremo correspondiente al amino terminal del gen de

interés a una secuencia señal que dirige el transporte de la proteína al retículo endoplasmático y de allí a la vía de secreción. Estos tipos de péptidos señal se hallan ampliamente conservados en su función y son procesados en forma co-traducciona por una peptidasa específica presente en el lumen del retículo endoplasmático. El apoplasto vegetal está en contacto directo con el medio externo, de manera tal que si la raíz está creciendo en un sistema hidropónico, la proteína recombinante se acumulará en el medio. Como el número de proteínas secretadas es generalmente bajo, esto facilita el proceso de purificación. Si la solución que circula en torno a la rizósfera se renueva constantemente, puede desarrollarse así un sistema de extracción continua de la proteína en cuestión.

Otra estrategia que permite reducir los costos de purificación se basa en la fusión de la proteína de interés a una oleosina. Las oleosinas son proteínas pequeñas que se encuentran insertadas en la monocapa de fosfolípidos de los cuerpos grasos. Estas proteínas se acumulan en las semillas de las plantas oleaginosas a niveles elevados. En colza, representan entre el 8 y el 20% del total de las proteínas de la semilla. Las construcciones incluyen una secuencia de reconocimiento específica para una proteasa. Una vez realizada la purificación, la proteína de interés se rescata de la fusión por tratamiento con la proteasa que reconoce esta secuencia peptídica.

La purificación de la proteína fusionada a oleosinas es sumamente sencilla y permite concentrar varias veces el producto de interés. Básicamente, consiste en el procesamiento y homogeneización del material vegetal (semillas de la planta oleaginosa) seguido de una centrifugación en la que se separan la fase acuosa de la lipídica. Esta última, que contiene los cuerpos grasos con la proteína de fusión es separada, resuspendida y tratada con la proteasa que reconoce la secuencia que permite liberar la proteína recombinante. La suspensión es luego centrifugada para separar nuevamente la fase acuosa de la lipídica. La proteína de interés se concentra así en la fase acuosa, la cual se utilizará para su purificación posterior.

Autenticidad del producto obtenido: glicosilación

Muchas proteínas terapéuticas son glicoproteínas, en las cuáles la glicosilación puede afectar características fundamentales, como su resistencia a la desnaturalización térmica, degradación proteolítica, solubilidad y actividad biológica.

Una de las diferencias más importantes en las modificaciones post-traduccionales entre plantas y animales es el patrón de N-glicosilación. Las proteínas recombinantes humanas sintetizadas en plantas contienen grupos carbohidratos del tipo β (1,2)-xilosa ausente en proteínas humanas, y contienen una molécula de fucosa unida por un enlace del tipo α (1,3) en lugar de α (1,6) como ocurre en humanos. Además, carecen de residuos terminales de galactosa y ácido siálico (ácido N-acetilneuramínico) encontrados en muchas proteínas nativas humanas.

Aunque algunos trabajos han demostrado que anticuerpos expresados en sistemas vegetales conteniendo glicanos específicos de plantas no son inmunogénicos en mamíferos, y que las proteínas recombinantes expresadas en otros sistemas animales (incluyendo células en cultivo de mamífero como las CHO) presentan diferencias en los patrones de glicosilación respecto del humano, el uso terapéutico seguro impone producir proteínas con las mismas características.

Por ello, se ha dedicado un gran esfuerzo en diseñar estrategias que permitan la "humanización" de la glicosilación de las proteínas sintetizadas en plantas. Estas estrategias incluyen: a) expresión de la β (1,4)-galactosiltransferasa humana en plantas transgénicas para la producción de anticuerpos recombinantes con glicanos extendidos en galactosa; b) retención de la proteína en el retículo endoplasmático (la diferenciación en los patrones de glicosilación entre plantas y mamíferos ocurren a nivel del aparato de Golgi, ver figura 2); c) inactivación de la α (1,3)-fucosiltransferasa y la β (1,2)-xilosiltransferasa de plantas. Esto último ha sido logrado recientemente en *Lemna minor* mediante silenciamiento post-transcripcional y en el musgo *Physcomitrella patens* mediante el apagado o *knock-out* del gen en cuestión. Al-

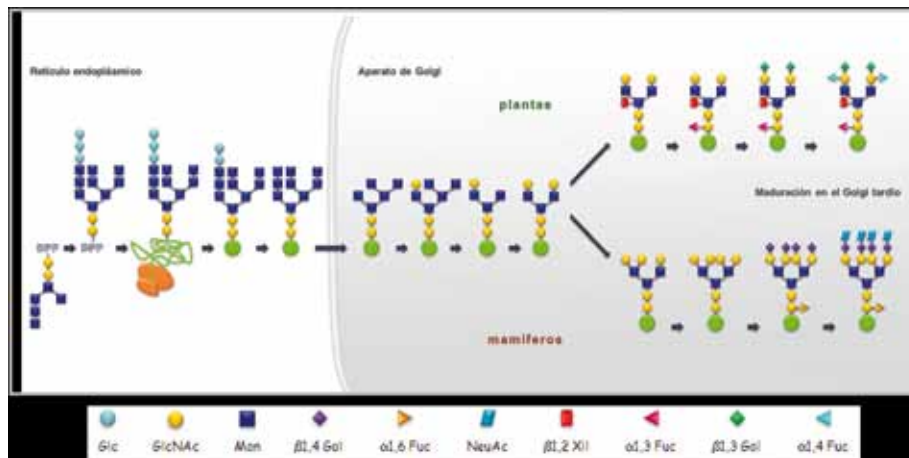


Figura 2. Adición y procesamiento de N-glicanos en el retículo endoplásmico (ER) y aparato de Golgi en células vegetales y de mamíferos. Un oligosacárido precursor ensamblado en un transportador de lípidos es transferido a residuos Asn específicos en el polipéptido en síntesis. Durante los eventos de maduración tardíos en el Golgi, se generan diferencias en el procesamiento de los N-glicanos complejos entre células animales y vegetales.

ternativamente, se puede d) prevenir completamente la glicosilación inactivando los sitios de glicosilación al mutar los residuos Asn y Ser/Thr. Esta estrategia fue utilizada en la producción de anticuerpos y se pudo comprobar que la ausencia de glicosilación no modificó sus características biológicas.

Proteínas expresadas en plantas: vacunas, anticuerpos y otros ejemplos

Una de las aplicaciones más prometedoras de las plantas como biorreactores es su potencial uso para la producción de antígenos en tejidos comestibles (vacunas comestibles). La producción de proteínas antigénicas en los tejidos vegetales permitiría protegerlas de la degradación en el tracto gastrointestinal, un factor crítico para desarrollar una vacuna oral exitosa. A su potencial bajo costo de producción, se suma la ventaja de su fácil distribución y administración. La expresión en tejidos de almacenamiento (tubérculos o semillas, por ejemplo) en los que las proteínas son estables a temperatura ambiente, permitiría obviar la necesidad de mantener una cadena de frío, requerimiento que constituye una de las limitaciones económicas más importantes para la distribución de

las vacunas en muchas regiones geográficas del mundo. Sin embargo, no se puede obviar el principal desafío en la producción de una vacuna que todo sistema de producción debe enfrentar; esto es, que el antígeno debe conservar su integridad estructural y actividad funcional para inducir una respuesta inmune protectora. Es importante mencionar que, dada la necesidad de aplicar dosis controladas de los compuestos farmacológicos, se plantea la producción de cápsulas con tejido vegetal procesado en lugar del consumo de material vegetal fresco sin procesar.

Hasta la actualidad, se han expresado en plantas un número considerable de antígenos, que incluyen potenciales vacunas contra los agentes causales de diarreas, como los rotavirus, cepas enteropatógenas de *Escherichia coli*, *Vibrio cholerae* y el virus Norwalk, así como contra las infecciones producidas por los virus de la hepatitis B y C, el virus de inmunodeficiencia humana (HIV), el virus del papiloma humano, el virus de la rabia y el virus de la fiebre aftosa. También se ha reportado la expresión de antígenos para vacunas contra agentes patógenos bacterianos como *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* y *Baci-*

llus anthracis y el parásito responsable de la malaria, *Plasmodium falciparum*, entre otros. Algunos de estos antígenos ya se evaluaron en ensayos clínicos en humanos, incluyendo la inmunización por ingestión de hojas de lechuga que contienen al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humana (HBsAg), tubérculos de papa que expresan la subunidad B de la toxina de *E. coli* enteropatógenas, o la cápside del virus Norwalk, y hojas de espinaca que protegen contra la rabia. En todos ellos se observó algún tipo de respuesta inmune, tanto sistémica como en mucosas, alentando la posibilidad de desarrollar vacunas orales contra éstos y otros patógenos humanos. Recientemente la empresa DowAgroScience obtuvo la aprobación, en los Estados Unidos de América, para comercializar una vacuna contra el virus de la enfermedad de Newcastle, producida en células de tabaco cultivadas *in-vitro*. Si bien esta vacuna no ha sido introducida al mercado, es considerado un paso importante que puede ser utilizado como referencia para futuras liberaciones comerciales.

Otros ejemplos de proteínas terapéuticas expresadas exitosamente en plantas incluyen los anticuerpos que reconocen al antígeno de superficie del virus de la hepatitis B humano (HBsAg), a la glicoproteína B del virus del herpes simple humano de tipo 2, HSV-2, anticuerpos anti-esperma para su utilización como anticonceptivos, anti-idiotipos del linfoma no Hodgkins y reactivos para diagnóstico del HIV. Dentro de esta clase de moléculas cabe destacar el caso de una IgA (inmunoglobulina A) secretoria expresada en tabaco que reconoce un antígeno de *Streptococcus mutans*, el principal agente causal de la caries dental. En ensayos clínicos llevados a cabo en humanos, en los que se aplicó este anticuerpo en forma tópica luego del tratamiento con un antiséptico, se verificó una protección efectiva y específica contra la recolonización por *S. mutans* durante al menos cuatro meses. Recientemente el Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología de La Habana, Cuba, ha logrado producir en plantas transgénicas de tabaco un anticuerpo monoclonal que está siendo utilizado para la purificación de un antígeno para la producción de vacuna contra la hepatitis B. En comparación

con la variante tradicional de producción a partir de líquido ascítico de ratón, la obtención del anticuerpo en plantas de tabaco transgénicas, que crecen en condiciones de invernadero, ofrece ventajas tales como un mayor nivel de seguridad y mejor escalado industrial.

Además de los antígenos y anticuerpos, existen diversos ejemplos de proteínas de uso farmacológico e industrial expresadas en tejidos vegetales. La producción de somatotropina humana (hST) en semillas de tabaco, la seroalbúmina humana (HSA) en papas, la aprotinina bovina en semillas de maíz, y el factor estimulante de granulocitos y macrófagos (hGM-CSF) en semillas de tabaco son sólo algunos de ellos. También se puede destacar la expresión en tabaco de la lipasa gástrica canina, utilizada para el tratamiento de insuficiencias pancreáticas y fibrosis quística, que se encuentra en la etapa de ensayos clínicos. Un ejemplo de desarrollo local en nuestro laboratorio es la expresión del factor de crecimiento epidérmico humano (hEGF) en plantas de tabaco. El hEGF es un factor mitogénico que interviene en el desarrollo, diferenciación, reparación y protección de tejidos epiteliales. Se emplea para el tratamiento de heridas y quemaduras, como agente reparador en trasplantes de córnea y para el tratamiento de úlceras gástricas y otras afecciones gastrointestinales. También se están utilizando plantas como biorreactores para la producción de enzimas de uso industrial, como la avidina de pollo y la tripsina bovina producidas en semillas de maíz (ambas aprobadas para su comercialización), suplementos alimenticios como la fitasa del hongo *Aspergillus niger* en semillas de tabaco y colza, o polímeros como el colágeno, la seda de araña y plásticos biodegradables. Además de las empresas mencionadas, existen otras que están utilizando distintas plataformas y sistemas de expresión para producir proteínas recombinantes en plantas, como se muestra en la tabla 2.

Marco regulatorio

El uso de plantas como biorreactores enfrentará dos marcos regulatorios diferentes: uno relacionado con el de las plantas transgénicas, y el otro el que tiene que ver con el desarrollo

Tabla 2. Algunas compañías que utilizan plantas como sistema de expresión.

Compañía	Plataforma	Tecnología utilizada
SemBioSys Genetics	Cártamo	Transgénicas
Biolex Therapeutics	<i>Lemna</i>	Transgénicas
Meristem Therapeutics	Maíz	Transgénicas
Ventria Bioscience	Arroz	Transgénicas
Cobento	<i>Arabidopsis</i>	Transgénicas
Planet Biotechnology	Tabaco	Transgénicas
Down Agro Science	Células de Tabaco	Transgénicas
CIGB (Cuba)	Tabaco	Transgénicas
Chlorogen	Tabaco	Transplastómicas
Bayer (Icon Genetics)	Tabaco	Vectores Virales

de nuevos fármacos. El primero es más conocido y existen antecedentes en nuestro país, el último marco aún esta siendo desarrollado en varios países del mundo y no existen por el momento pautas definitivas dado el bajo número de productos derivados de plantas transgénicas que han pasado por todas las etapas hasta llegar a su comercialización.

Los primeros cultivos transgénicos tienen como objetivo el de mejorar características agronómicas tales como tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos, o mejorar las cualidades nutricionales; en ambos casos el destino de estos cultivos es la alimentación animal o humana. En cambio, las plantas que serán utilizadas como biorreactores para la producción de fármacos no deberían entrar a la cadena alimenticia y será necesario tomar las precauciones necesarias para que esto no ocurra. Ésta, junto con la posibilidad de transferencia horizontal de los transgenes, son las mayores preocupaciones en lo que hace al uso de las plantas como biorreactores.

En nuestro país, la Comisión Nacional de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA), el Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Alimentaria (SENASA) y la Administración Nacional de Medicamentos, Alimentos y Tecnología médica (ANMAT) serán los organismos que tendrán a su cargo la regulación de estos cultivos destinados a la producción de fármacos.

Lecturas recomendadas

- Bock, R. 2007. Plastid biotechnology: prospects for herbicide and insect resistance, metabolic engineering and molecular farming. *Curr Opin Biotechnol* 18:100-106.
- Chadd H. and Chamow S. 2001. Therapeutic antibody expression technology. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:188-194.
- Daniell H., Streatfield S. and Wycoff K. 2001. Medical molecular farming: production of antibodies, biopharmaceuticals and edible vaccines in plants. *Trends in Plant Science*, 6: 219-226.
- Daniell, H. 2006. Production of biopharmaceuticals and vaccines in plants via the chloroplast genome. *Biotechnol J* 1:1071-1079.
- Fischer R., Stoger E., Schillberg S., Christou P. and Twyman R. 2004. Plant-based production of biopharmaceuticals. *Current Opinion in Plant Biology*, 7:152-158.
- Floss D., Falkenburg D. and Conrad U. 2007. Production of vaccines and therapeutic antibodies for veterinary applications in transgenic plants: an overview. *Transgenic Res* 16:315-332.
- Giddings, G. 2001. Transgenic plants as protein factories. *Current Opinion in Biotechnology*, 12:450-454.
- Gomord V, Chamberlain P, Jefferis R and Faye L. 2005. Biopharmaceutical production in plants: problems, solutions and opportunities. *Trends Biotechnol*, 23:559-565.
- Gomord V. and Faye L. 2004. Posttranslational modification of therapeutic proteins in plants. *Curr Opin Plant Biol*, 7:171-181.

- Lienard D., Sourrouille C., Gomord V. and Faye L. 2007. Pharming and transgenic plants. *Biotechnology Annual Review*, 13:115-147.
- Ma J., Drake P., and Christou P., 2003. The production of recombinant pharmaceutical proteins in plants. *Nature Reviews Genetics*, 4: 794-805.
- Maliga P. 2004. Plastid transformation in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.*, 55:289-313.
- Marillonnet S., Thoeringer C., Kandzia R., Klimyuk V and Gleba Y. 2005. Systemic *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transfection of viral replicons for efficient transient expression in plants. *Nat Biotechnol*, 23:718-723.
- Plantas Biofactoria. Informe de vigilancia tecnológica. Genoma España. Sector Agroalimentario. http://www.gen-es.org/12_publ/docs/PLANTAS_BIOFACTORIA.pdf
- Rybicki E. 2009. Plant-produced vaccines: promise and reality. *Drug Discov Today* 14:16-24.
- Spok A., Twyman R., Fischer R., Ma J. and Sparrow P. 2008. Evolution of a regulatory Framework for pharmaceuticals derived from genetically modified plants. *Trends in Biotechnology* 26:506-517
- Twyman R., Stoger E., Schillberg S., Christou P. and Fischer R. 2003. Molecular farming in plants: host systems and expression technology. *Trends in Biotechnology*, 21: 570-578.
- Twyman R.M., Schillberg S., Fischer R. 2005. Transgenic plants in the biopharmaceutical market. *Expert Opin. Emerg. Drugs* 10, 185–218
- Walsh G and Jefferis R. 2006. Post-translational modifications in the context of therapeutic proteins. *Nat Biotechnol*, 24:1241–1252.
- Wirth S., Calamante G., Mentaberry A., Busmann L., Lattanzi M., Barañao L. and Bravo-Almonacid F. 2004. Expression of active epidermal growth factor (hEGF) in tobacco plants by integrative and non-integrative systems. *Mol. Breeding*, 13: 23-35.

PARTE VI
***Manejo responsable
de la tecnología***

VI. CAPÍTULO 1

Bioseguridad y Regulación de Organismos Vegetales Genéticamente Modificados (OVGM)

Clara Rubinstein

Criterios Científicos para la Evaluación de la Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados.

La plasticidad intrínseca de los genomas vegetales les confiere una alta adaptabilidad a las plantas, y es fuente de un alto potencial de variabilidad genética. Las tecnologías de mejoramiento de variedades tradicionalmente utilizadas trabajan sobre esta base, e introducen diferentes tipos de modificaciones genéticas, que actualmente están siendo identificadas y caracterizadas en detalle.

Las tecnologías de ADN recombinante se han sumado a las de mejoramiento convencional durante los últimos 30 años. Sin embargo, presentan características propias que se han considerado lo suficientemente novedosas a nivel de las organizaciones internacionales que han recomendado su regulación. Las características de un organismo vegetal genéticamente modificado (OVGM) son estudiadas y evaluadas desde las etapas más tempranas de su desarrollo desde el punto de vista de su bioseguridad. Para ello, se utiliza un Enfoque Comparativo, descrito por primera vez en el contexto de los OVGM, en un documento de la OECD (Organización para la Cooperación y el Desarrollo Económico) de 1993. Este enfoque, así como los criterios científicos utilizados para su implementación, son presentados en este capítulo, con énfasis en la inocuidad para el consumo

A lo largo de la historia, los mejoradores han apelado a todo tipo de tecnologías para generar diversidad genética, de la cual poder seleccionar aquellas características deseadas. En los capítulos y secciones anteriores se han des-

cripto las más recientes, que se suman a otras, utilizadas durante siglos con el mismo fin.

La aplicación de las técnicas de ADN recombinante al mejoramiento vegetal en la década de 1980, sin embargo, marcan un punto de inflexión, dada las preocupaciones que han generado en diferentes ámbitos y posteriormente, también debido a su impacto en la percepción pública, en especial en la Unión Europea.

El National Research Council de los EEUU, publicó en 1989 un informe en el cual analiza las diferencias entre el mejoramiento tradicional y las nuevas biotecnologías para la modificación genética de plantas y microorganismos. **En este informe, se incluye a las tecnologías de ADN recombinante como parte integrante de la secuencia de los avances del conocimiento y de la tecnología científica, a lo largo de 10.000 años de desarrollo humano.** (NRC, 1989, ver Fig 1). También concluyen en que *“Las mismas leyes físicas y biológicas gobiernan la respuesta de los organismos modificados por los modernos métodos moleculares y celulares y aquellos producidos por métodos clásicos”*

Al mismo tiempo, organismos internacionales como FAO y OMS (la Organización para la Alimentación y la Agricultura y la Organización Mundial de la Salud, respectivamente), se han ocupado de la bioseguridad de las nuevas tecnologías aplicadas a la producción de

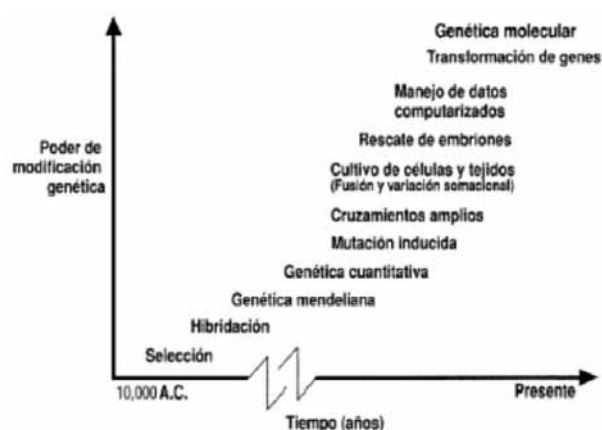


Figura 1. Aumento en la capacidad de modificación genética a través del tiempo

Fuente: Informe de Expertos del IFT (2000), adaptado de NRC, 1989

alimentos. Asimismo, el Codex Alimentarius (FAO-OMS) ha desarrollado recomendaciones generales para la evaluación de la inocuidad.

Como se mencionó anteriormente, todas las especies mejoradas por el hombre, son de un modo u otro, "genéticamente modificadas". A pesar de esto, la aplicación de las técnicas de ingeniería genética a la producción de alimentos ha sido considerada lo suficientemente nueva y diferente, como para justificar el control de su desarrollo e implementación.

Esto tiene sus antecedentes en las primeras etapas del desarrollo de la ingeniería genética, en los años 70. En 1974 y 1975, los Institutos Nacionales de Salud de los EEUU (NIH) convocan a las **Conferencias de Asilomar** (California); este fue el primer paso para la creación de políticas para el control de la seguridad de organismos recombinantes. Desde allí, y en todo el mundo, han evolucionado estas políticas y las regulaciones que controlan el desarrollo de nuevos organismos y sus productos mediante técnicas de ADN recombinante.

Estas regulaciones, se basan en criterios científicos y también empíricos, en particular, en lo que hace a la seguridad de los alimentos. Aunque los alimentos tradicionalmente disponibles en las diferentes culturas **se aceptan como seguros**, se sabe que algunos pueden ser tóxicos, según la parte de la planta que se consume (por ejemplo el tallo se puede consumir, pero no así las hojas o las raíces) o el estadio de su desarrollo (papas verdes). También hay alimentos de origen vegetal que deben ser cocinados para ser seguros (por ej. legumbres), así como sabemos que hay grupos de alimentos que pueden provocar alergias en individuos sensibles (maní, leche, nueces, huevo, soja).

En 1986 la OECD (Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica) convoca a reuniones de expertos que reúnen sus recomendaciones en el llamado "Blue Book". Más adelante, en 1993, OECD resumió estos conceptos: *"La seguridad de los alimentos para consumo humano se basa en que **debe existir una certeza razonable** de que no resultará daño alguno del uso debido bajo las condiciones de consumo anticipadas. Históricamente, los alimentos preparados y utilizados bajo las condiciones tradicionales han sido considera-*

dos seguros , por su historia de uso y experiencia, aún cuando pudieran contener tóxicos naturales o anti-nutrientes . En principio, los alimentos se han considerado seguros, a menos que un peligro significativo se haya podido identificar"

En este capítulo, se intentará dar un panorama de los criterios científicos que se utilizan internacionalmente para evaluar la seguridad de los cultivos transgénicos, también llamados genéricamente OGM (Organismos Genéticamente Modificados).

1. El análisis de riesgos y la identificación del peligro

Se ha establecido que el análisis de riesgos, consta de tres etapas fundamentales:

La identificación del peligro : es la identificación y cuantificación de un efecto adverso, en general a partir de ensayos experimentales, por ejemplo de tipo toxicológico, en modelos animales.

Valoración de la exposición: estimar cuánto, con qué frecuencia y durante cuánto tiempo se está expuesto a dicho peligro.

Caracterización del riesgo: es la estimación que surge de evaluar el peligro en función de la exposición y evaluar diferentes escenarios de exposición máxima, para establecer qué grado de exposición es aceptable en cuanto a la seguridad.

Este proceso se aplica a casos muy diferentes, y existe amplia experiencia en su aplicación a la evaluación de riesgos para aditivos alimentarios, agroquímicos y compuestos específicos en general. En esos casos, es relativamente simple someter cantidades exactas y conocidas de un compuesto a ensayos toxicológicos clásicos en modelos animales, o evaluaciones de residuos en alimentos, aguas, suelos, etc. De esta forma, se establecen parámetros como el **NOAEL** (por *No Adverse Effect Level*), que es **el nivel de exposición en el que no se observan efectos adversos**. Este da una medida de la peligrosidad del compuesto: **cuanto mayor el NOAEL, menor el potencial tóxico del compuesto**. Basándose en el NOAEL, es posible estimar un **nivel de exposición seguro**, que define el **ADI (dosis**

diaria aceptable, expresada por kg de peso corporal) y que dependiendo del tipo de sustancia y otras variables, suele estar unas 100 veces por encima del NOAEL. Este factor de multiplicación se conoce como **margen de seguridad para la exposición**.

Sin embargo, estos principios no son tan directamente aplicables al análisis de riesgos para OVGs o sus derivados de uso alimentario, ya que constituyen mezclas complejas, que contienen miles de compuestos, macro y micro nutrientes, tóxicos naturales (compuestos tóxicos que están naturalmente presentes en la especie), antinutrientes (compuestos que inhiben la absorción o biodisponibilidad de algunos nutrientes), metabolitos secundarios, etc.

Por lo tanto, la evaluación de estos cultivos es más una **evaluación de seguridad o inocuidad** más que un análisis de riesgos “clásico”, ya que hasta ahora no se han determinado peligros cuantificables en los OGMs estudiados. De hecho, en la práctica, en caso de identificarse efectos adversos, estos cultivos no se autorizarían para su salida al mercado.

Por todo lo anterior, se ha desarrollado para los OGMs un enfoque que ha sido utilizado para otros casos de alimentos y que se basa en la **comparación del nuevo alimento o cultivo con el tradicionalmente utilizado y considerado seguro**. Este enfoque se ha desarrollado consensuadamente con la colaboración de diferentes organismos internacionales (OECD, FAO, OMS, International Life Sciences Institute o ILSI) que periódicamente convocan a paneles de expertos que revisan y actualizan las recomendaciones de acuerdo a los avances tecnológicos y el estado del conocimiento.

2. El Enfoque Comparativo y la Equivalencia Sustancial

En 1993 la OECD formuló el concepto de **Equivalencia Sustancial**. Este concepto **no constituye en sí la evaluación de inocuidad, aunque es un elemento clave de referencia, y una conclusión posible a la que lleva el análisis comparativo**. Este enfoque no hace otra cosa que tomar como referencia los cultivos o alimentos conocidos y aceptados como seguros y compararlos con sus versiones mejoradas mediante ingeniería genética.

Es oportuno aclarar que estas técnicas no en todos los casos van a tener como resultado la expresión de un transgén, sino que hay otras estrategias experimentales - silenciamiento mediado por RNA de interferencia o anulación de la actividad de un gen por “knock out” - que si bien involucran manipulación in vitro y transformación, no resultan en la adición de un gen y/o una proteína nuevos.

La base de esta estrategia para establecer inocuidad de nuevos alimentos es la historia de uso seguro del cultivo parental (es decir aquel que es la base de la modificación) .

-Qué se compara y por qué

Es claro que toda modificación tiene un objetivo, ya sea obtener una mejora de tipo agronómica como resistencia a plagas o enfermedades, una mejora nutricional o de calidad o bien la síntesis de un producto en particular, desde un fármaco hasta biocombustibles, pasando por vacunas comestibles. Es decir, que la modificación tiene efectos **intencionales** medibles, que se traducen en una **característica fenotípica dada**.

Por otro lado, es posible que se produzcan efectos **no intencionales** de la modificación, que pueden o no tener un impacto negativo en la seguridad de la planta modificada, pero que es pertinente estimar. Y es aquí donde el análisis comparativo tiene un papel relevante.

Los impactos no deseados de la introducción de un gen o secuencia en el genoma de una planta, comprenden diferentes aspectos que son examinados durante el proceso de evaluación:

- Toxicidad o alergenicidad de la(s) proteínas expresadas
- Influencia de los productos de expresión sobre el metabolismo de la planta, que lleve a cambios en el valor nutricional o la concentración de tóxicos o alérgenos naturales.
- Inserción no intencional en otros genes (“knock out” no intencional) que sean esenciales o activación de otros, que no se expresen normalmente.
- Efectos pleiotrópicos de los genes insertados (efectos sobre la actividad de otros

genes o vías metabólicas, que se manifiestan a diferentes niveles en el fenotipo de la planta).

Es importante tener en cuenta que estos efectos también pueden producirse durante el mejoramiento convencional (definido como el que no utiliza ingeniería genética), si bien los cultivos mejorados mediante tecnologías no recombinantes no se someten por el momento, a este tipo de evaluación, con la excepción de Canadá, que sí regula algunos casos especiales. La normativa canadiense, evalúa aquellas variedades con rasgos suficientemente novedosos, independientemente del proceso utilizado para su obtención, si bien menciona particularmente ciertas metodologías de mejoramiento, como la mutagénesis acelerada (inducida por agentes químicos o irradiación) o la fusión celular.

Como veremos en detalle a continuación, **el proceso evaluativo recorre una serie de pasos que se basan en evidencia experimental**, y que van llevando a conclusiones que permiten tomar decisiones respecto de la inocuidad del OGM en cuestión (Ver Figura 3).

Las evaluaciones de seguridad, entonces, se concentran:

1. **en la característica introducida:** para ello, se caracteriza completamente el gen insertado en el cultivo GM y se evalúa la seguridad de la/s proteína/s resultantes. Si bien esta evaluación la deben realizar los obtentores previamente a la transformación, ya que no será aprobado un cultivo que pueda presentar algún problema toxicológico o de alergenicidad, las agencias regulatorias encargadas del control de estos productos efectúan un exhaustivo análisis de seguridad de los genes insertados y sus productos de expresión.
2. **en el cultivo o alimento como un todo:** sobre el cultivo GM, se analizan los rasgos fenotípicos / agronómicos y la composición y se los compara con los de sus contrapartes no-GM o convencionales. Las diferencias encontradas, ya sean intencionales o no, se convierten en el centro de ulteriores evaluaciones de seguridad. El objetivo de estas evaluacio-

nes es demostrar que el cultivo o alimento GM es **"tan seguro como"** el alimento tradicional conocido (Figura 2).

La evaluación de inocuidad de las proteínas de nueva expresión, así como del alimento completo, se fundamenta en lo que se denomina el **"Peso de la Evidencia"**. Este concepto se basa en el hecho de que no existe un solo estudio o ensayo que pueda establecer la inocuidad. Por ejemplo, en el caso del potencial alergénico de una proteína, no es posible hoy contar con modelos que predigan adecuadamente la alergenicidad en humanos. Dado que existe una serie de parámetros fisicoquímicos que son compartidos por los alérgenos proteicos conocidos (que son un grupo reducido de proteínas de origen animal y vegetal), éstos pueden ser utilizados para estimar la posible alergenicidad de la proteína introducida. Por ejemplo, **la resistencia a la digestión, la prevalencia en el alimento** (normalmente, los alérgenos proteicos son mayoritarios en la composición final) **y la similitud con otras proteínas alergénicas**, son algunos de estos parámetros. En efecto, se realizan **análisis bioinformáticos** que comparan la secuencia de los productos de expresión presentes en los OGMs, contra bases de datos de todos los alérgenos conocidos.

En el caso de cultivos con actividad alergénica conocida (como la soja) es posible comparar los patrones de proteínas del suero de pacientes sensibles, que se unen a inmutoglobulina E (la responsable de las reacciones alérgicas severas) en análisis de Western sobre geles bidimensionales, para determinar si hay nuevas proteínas o si el patrón endógeno se ha visto alterado por la modificación.

Como ya se dijo, aún no se cuenta con modelos animales que se encuentren lo suficientemente desarrollados para ser validados a nivel internacional en cuanto a su capacidad predictiva de alergenicidad, pero numerosos organismos e instituciones internacionales se encuentran trabajando en ello.

b) En base a los 50 años de experiencia ganada en mejoramiento tradicional (breeding), y evaluación de seguridad de otros productos como medicamentos, alimentos, y químicos,

las agencias internacionales recomiendan comparar los siguientes parámetros de los OGMs respecto de contrapartes convencionales, para poder contar con suficiente información que permita arribar a una **certeza razonable de inocuidad** :

-Parámetros fenotípicos: estos son más relevantes para la evaluación agronómica del nuevo cultivo. La caracterización fenotípica / agronómica del cultivo GM se hace tempranamente durante el proceso de selección. Los puntos evaluados (por ej. morfología, rendimiento) son muy sensibles a los cambios genéticos y a las perturbaciones desfavorables en el metabolismo, por lo tanto son buenos indicadores de equivalencias entre el cultivo modificado y su contraparte tradicional.

Se observan y miden cuidadosamente las características morfológicas, fisiológicas, y reproductivas, la resistencia o susceptibilidad a plagas y enfermedades, e incluso características como perfume o sabor de los frutos. Este proceso, que dirige la selección de aquellas plantas transformadas (o “eventos”) que tengan las características deseadas, es crítico para eliminar efectos no intencionales.

-Composición Química: esta es la evaluación en la que se fundamenta gran parte del análisis comparativo. Se realiza la determinación analítica de la composición en diferentes tejidos de la planta, sobre muestras de ensayos a campo controlados, realizados en ambientes representativos de aquellos donde ese cultivo va a ser sembrado, a lo largo de varias

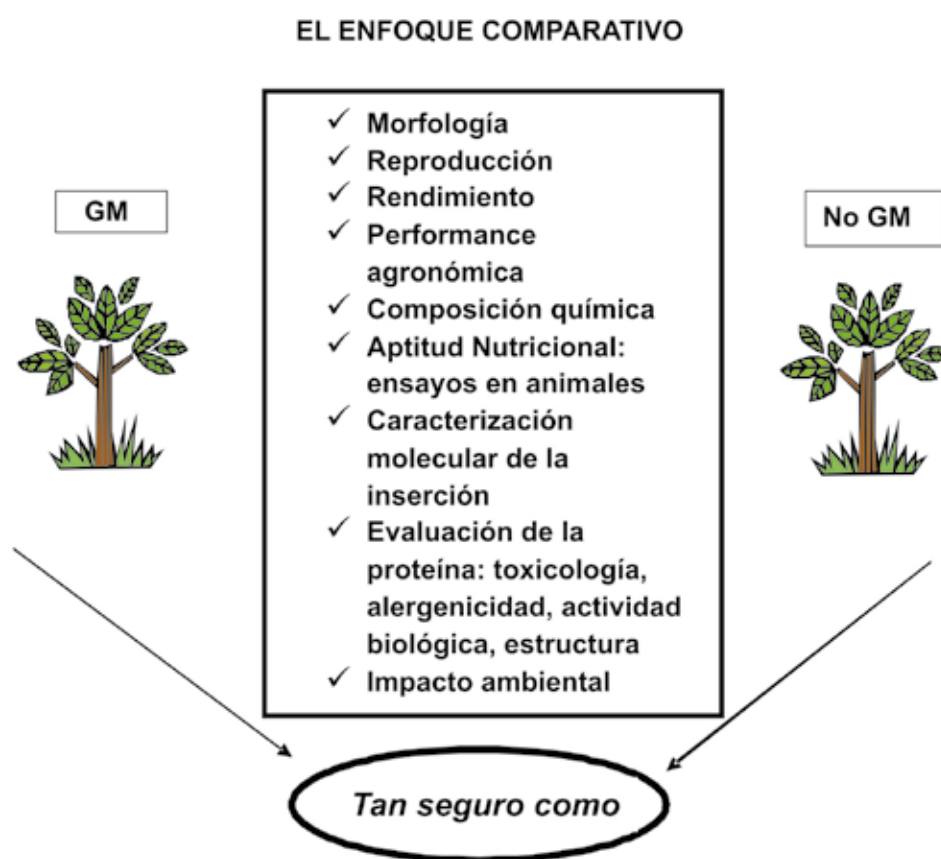


Figura 2. Esquema general del enfoque comparativo

Nuevo Alimento o Variedad

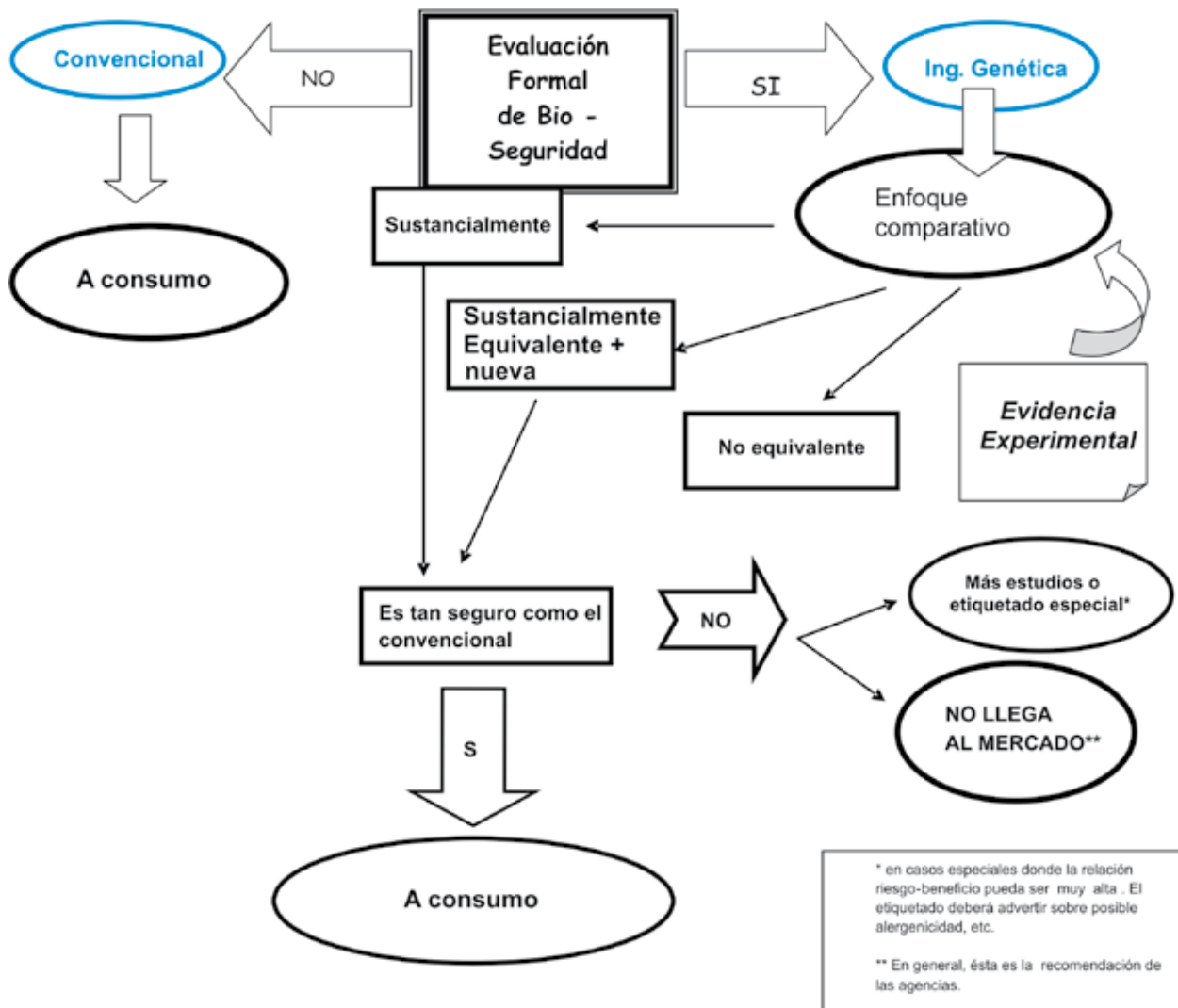


Figura 3. Diagrama para la estimación de seguridad de OGMs
Adaptado de Cockburn , 2002

campañas de producción (años). Se determina la composición de **macro y micronutrientes** (proteínas, grasas, hidratos de carbono, aminoácidos y ácidos grasos, vitaminas, etc), **minerales, tóxicos naturales y compuestos bioactivos y/o metabolitos secundarios**, dependiendo del cultivo. Por ejemplo, se miden niveles de fitoestrógenos y antinutrientes (inhibidores de tripsina, lectinas) en soja, glucosinolatos en colza, cumarinas en apio y solaninas en papa. También se pueden medir alérgenos en soja (glicinina), beta carotenos en zapallo, y gossypol en algodón. La OECD ha publicado recientemente recomendaciones que especifican qué componentes es más apropiado analizar para cada cultivo en particular.

A parte de la comparación en componentes específicos, se realizan generalmente, ensayos de aptitud nutricional en modelos animales. Estos, apuntan a detectar cualquier efecto no intencional de la modificación que pudiera haber afectado el **valor nutricional** del alimento o su inocuidad. Es común que se utilicen ensayos de alimentación de duración variable (entre 42 y 120 días) dependiendo del modelo elegido. Uno de los más utilizados y sensibles, es el de pollos parrilleros, ya que pasan de pesar 35 gramos a más de 2 kg en 42 días. Este crecimiento rápido, hace que se puedan detectar pequeñas deficiencias nutricionales del alimento.

Mientras que la evaluación de seguridad de las proteínas introducidas se lleva a cabo con la proteína (s) purificadas y generalmente sintetizadas en modelos bacterianos (por la cantidad que se necesita para los ensayos toxicológicos), los estudios de alimentación se realizan con el alimento completo, por ejemplo, grano o forraje en el caso de maíz, harinas de soja tostadas, o semilla de algodón como suplementación de la dieta. (Ver Tabla 2).

Según los resultados de todos los puntos analizados, es posible clasificar al cultivo o alimento GM en una de estas tres categorías posibles (FAO/OMS/OECD):

- El producto GM es **sustancialmente equivalente** a la contraparte tradicional, no existiendo diferencias significativas. Esta situación se da principalmente en

productos altamente refinados. El aceite o la fructosa derivados de maíz GM, son totalmente equivalentes a los derivados de maíz convencional.

- El cultivo o alimento GM es **sustancialmente equivalente** a su contraparte tradicional **con la excepción de diferencias claramente definidas** (presencia de la/s proteínas introducidas y/o diferencias bien caracterizadas en otros elementos individuales). **Dentro de esta categoría caen la mayoría de los cultivos que expresan un rasgo único, tal como la resistencia a herbicidas o la protección contra insectos, y algunos con mejoras nutricionales o de calidad.** Para demostrar que los cultivos o alimentos GM son "tan seguros como" su contraparte tradicional, se debe mostrar que cada diferencia encontrada no tiene consecuencias toxicológicas ni nutricionales. Esta evaluación se lleva a cabo **caso por caso**, y según se considere necesario, pueden conducirse ensayos de toxicidad o estudios de alimentación en animales grandes con el cultivo entero.
- El cultivo o alimento GM **no es sustancialmente equivalente** a su contraparte tradicional o no existe un cultivo equivalente con el cual compararlo. Ejemplo de esto serían **cultivos con ciertos rasgos combinados o cultivos con valor nutritivo aumentado que contienen nuevas vías metabólicas o modifican las endógenas.** La evaluación de seguridad se va a enfocar en las características de los nuevos productos expresados. En cada caso en particular se determinará el programa de estudios que corresponda.

Actualmente, todos los cultivos modificados y sus productos alimentarios derivados presentes en el mercado han sido analizados en profundidad para evaluar su seguridad, demostrándose que son sustancialmente equivalentes, con la excepción de la/s proteínas introducidas y son tan seguros como su contraparte tradicional.

En la Tabla 1, se resume como ejemplo, el tipo de componentes analizados en diferentes

Tabla 1. componentes analizados en semillas enteras de soja y en varias fracciones de soja procesada (Tomado del Cuadernillo Técnico No1, Seguridad de la Soja RR tolerante a Glifosato (Monsanto Agricultura España, 2001)

Soja entera	Análisis de macronutrientes Composición de aminoácidos Composición de ácidos grasos Inhibidor de tripsina Lectinas Fitoestrógenos Actividad ureasa Composición fosfolipídica
Harina tostada	Análisis de macronutrientes Inhibidor de tripsina Lectinas Fitoestrógenos Actividad ureasa Estaquiosa, rafinosa Fitato Solubilidad del nitrógeno
Harina desgrasada	Análisis de macronutrientes Inhibidor de tripsina Actividad ureasa
Aislado de proteínas	Análisis de macronutrientes
Concentrado de proteínas	Análisis de macronutrientes
Aceite refinado, blanqueado y desodorizado	Composición de ácidos grasos

fracciones, para la evaluación de seguridad alimentaria para el evento de soja GM 40-3-2, tolerante a glifosato (ver Parte VIII, capítulo 6). En la Tabla 2 se listan los diferentes modelos animales utilizados para la evaluación de aptitud nutricional de OGMs y los parámetros que se analizan en cada caso.

a: los cultivos GM estudiados presentan tolerancia a insectos (“Bt”) o a herbicidas (glifosato, glufosinato)

b: en la mayor parte de los ensayos también se efectuaron análisis de detección del ADN o de las proteínas introducidas, en leche, huevos, músculos, hígado, sangre o heces, con resultados negativos en todos ellos.

3. Evaluación de Impacto Ambiental

La evaluación del impacto ambiental de nuevos cultivos GM es una parte fundamental de

su proceso de aprobación y control. Esta evaluación debe basarse en hipótesis de riesgo, y considerar el contexto de las tecnologías que se utilizan con el mismo fin y de tecnologías alternativas, en caso de existir.

En los Capítulos 2 y 3 de esta sección, se desarrolla este aspecto en mayor detalle, por lo que se enunciarán los principales temas en los que se enfoca la evaluación que se realiza antes de la introducción de un OGM en los agroecosistemas:

Capacidad de convertirse en maleza: en caso de que la planta GM tuviera características que la hicieran más resistente a las condiciones ambientales, o tuviera mayor poder reproductivo que su contraparte convencional.

Posible impacto en especies benéficas o sobre la flora o fauna circundante: es evaluado

Tabla 2. Ensayos de alimentación con OGMs en modelos animales (adaptado de Kuiper et al, 2001, Faust and Glenn, 2002)

Cultivo GM ^a / fracción	Modelo Animal	Parámetros analizados ^b
Maiz/grano Soja/alimento tostado.	Pollos parrilleros Gallinas ponedoras	Ganancia de peso, observaciones clínicas, ingesta, calidad de carne, producción y calidad de huevos, digestibilidad
Maíz/ silaje/ forraje/ grano Soja/alimento tostado. Soja cruda	Vacas (ganado de carne)	Ganancia de peso, ingesta, observaciones clínicas, producción y calidad de carne, grasa abdominal.
Maiz/grano Soja/alimento tostado.	Cerdos	Ganancia de peso, ingesta, observaciones clínicas, calidad de carne, contenido graso.
Algodón/ semilla Maiz/grano Soja/alimento tostado.	Vacas lecheras	Ganancia de peso, ingesta, observaciones clínicas, pH ruminal, producción, calidad y composición de la leche, características para producción de queso.
Maiz/grano	Ovejas	Digestibilidad

el impacto que el cultivo podría tener en especies propias del agroecosistema. Por ejemplo, efectos sobre especies que no son el blanco de su actividad en el caso de cultivos GM protegidos de insectos .

Mayor capacidad de cruzarse con plantas de su entorno que la contraparte convencional. Incluso en caso de ser idéntica, se evalúa cuáles serían las consecuencias de dichos cruzamientos (debido al llamado **flujo génico mediado por polen**).

El flujo genético entre poblaciones es un fenómeno natural, responsable de una gran diversidad genética. **Para estimar qué peso puede tener un rasgo nuevo introducido por ingeniería genética en el flujo génico general, es importante tener en cuenta qué efecto en particular producirá ese gen si se establece en otra población.** Todo esto se examina en función de la existencia de parientes silvestres de ese cultivo en la zona donde se lo quiere introducir. Por ejemplo, en el caso de la soja o el maíz, no existen parientes silvestres en Argentina, pero sí en México (en el caso de maíz) y en China (en el caso de la soja).

Todos estos puntos son analizados, del mismo modo que la inocuidad alimentaria, **caso por caso**. También se estima el cambio que podría provocar en el manejo agronómico, la introducción de un dado cultivo GM .

El objetivo de las evaluaciones de riesgo ambiental, es identificar impactos en el ambiente (negativos o positivos), cuantificarlos y proporcionar elementos para aquellos que deben manejar y minimizar estos riesgos, siempre en el contexto de la práctica agronómica corriente y de las tecnologías alternativas disponibles (por ejemplo, cultivos “Bt”, evaluados en relación con las aplicaciones tradicionales de insecticidas químicos, y en el contexto del Manejo Integrado de Plagas, como una herramienta más de control biológico).

4. Nuevas tecnologías potencialmente aplicables a la evaluación de la bioseguridad

Los avances en la tecnología científica de los últimos años han transformado profundamente la forma en la que se hace ciencia y se obtiene información de los sistemas biológicos. La

enorme capacidad de secuenciación en combinación con la bioinformática, han potenciado la identificación y caracterización de genes (Genómica) y el estudio de su función (Genómica Funcional).

Otras tecnologías derivadas de las primeras y en constante evolución, se ocupan del estudio del **Transcriptoma**, el **Proteoma**, el **Metaboloma**, que abarcan todos los transcritos, proteínas o metabolitos de una especie, respectivamente. Hoy se habla de las **tecnologías “ómicas”** en referencia global a este tipo de aproximación.

Paralelamente, estas tecnologías permiten el desarrollo de nuevos campos de la ciencia, como la Farmacogenómica, la Toxicogenómica y la Nutrigenómica, que son versiones “ómicas” de las especialidades tradicionales que abordan el mismo problema.

Estas tecnologías hoy se encuentran en una etapa inicial de generación de enormes cantidades de datos; sin embargo, el potencial que presentan a corto y mediano plazo para el descubrimiento y la comprensión de procesos biológicos, no tiene precedentes.

Sin embargo, en el campo del análisis de riesgo, especialmente en los aspectos toxicológico y nutricional, aunque sería valioso contar con tecnologías que permitan determinar los **perfiles bioquímicos de OGMs y sus contrapartes convencionales (profiling)**, por el momento no es posible establecer metodologías validadas que permitan aplicar esta información al análisis. El problema es que, al penetrar en niveles de resolución tan altos, se encuentran una serie de cambios que incluso son evidentes entre individuos del mismo grupo (por ejemplo, individuos de la misma variedad no GM) en niveles mayores a los que se encuentran entre un OGM y su control, debido a la variabilidad natural. Esta variabilidad, hace muy difícil poder interpretar de manera clara muchos de los resultados que se obtienen, y su significación biológica real, para poder sacar conclusiones en cuanto a su relevancia en la bioseguridad.

Sin embargo, a medida que se avanza en el conocimiento de los sistemas biológicos, será posible aplicar nuevas tecnologías a la evaluación de la seguridad alimentaria, no sólo de OGMs, sino de cualquier alimento.

Conclusión

El objetivo del análisis de riesgos para organismos y/o alimentos derivados del uso de la ingeniería genética (GM), es estimar el impacto que los efectos intencionales y los no intencionales de la modificación, pudieran tener sobre la inocuidad del alimento o del organismo GM, o sobre su impacto ambiental.

El enfoque utilizado para aplicar este proceso (el enfoque comparativo), ha sido consensuado a partir de consultas y discusiones a nivel internacional, y se basa en la comparación de parámetros como composición, tóxicos naturales o aptitud nutricional, con la contraparte convencional que tiene historia de uso seguro y es aceptado como alimento inocuo (OECD, 2000).

Lecturas y sitios sugeridos:

- Batista JC, Burachik M y Rubinstein C. 2007. Evaluación de inocuidad alimentaria de OGMs: Criterios y Recursos para su implementación. United Nations University - ILSI. http://www.ilsil.org.ar/contactos/docs_biotechnologia/Evaluacion_de_inocuidad.pdf
- Burks AW, Fuchs RL (1995) Assessment of the endogenous allergens in glyphosate tolerant and commercial soybean varieties. J Allergy Clin Immunol 96:1008-1010
- Carpenter J, Felsot A, Goode T., Hammig M, Onstad D, Sankula S. (2002). Comparative Environmental Impacts of Biotechnology-derived and Traditional Soybean, Corn, and Cotton Crops. Council for Agricultural Science and Technology CAST: I-189.
- Cockburn, Andrew (2002). Assuring the safety of Genetically Modified Foods: the importance of an holistic, integrative approach. Journal of Biotechnology, 98, 79-106.
- FAO/WHO (2000) Safety aspects of genetically modified foods of plant origin. Report of a Joint FAO/WHO Consultation. World Health Organization, Geneva WHO/SDE/PHE/FOS/00.6
- Faust, M y Glenn, B. (2002) Animal feeds from Crops Derived through Biotechnology: Farm Animal Performance and Safety. En: Biotechnology and Safety Assessment, 3ra edición, John Thomas y Roy Fuchs, Elsevier. Capítulo 6.
- Glare A, Travis R., Nap JP. 2003. The release of genetically modified crops into the environment. Part II. Overview of ecological risk

- assessment. *The Plant Journal* 33: 19-36.
- ILSI Allergy and Immunology Institute and International Food Biotechnology Council (1996) Allergenicity of food produced by genetic modification. *Crit Rev Food Sci Nutr*, vol 36 suppl, CRC Press, Boca Raton .
- ILSI : International Food Biotechnology Committee (IFBiC), 2003 : base de datos composicional de cultivos agroalimentarios : www.cropcomposition.com
- Pimentel DS, Raven PH (2000) Bt Corn Pollen impacts on nontarget Lepidoptera: Assessment of Effects in Nature. *Proceedings of The National Academy of Sciences* 97:8198-8199 <http://www.pnas.org/cgi/reprint/97/15/8198.pdf>
- Taylor NB, Fuchs RL, MacDonald J et al. (1999) Compositional analysis of glyphosate-tolerant soybeans treated with glyphosate. *J Agric Food Chem* 47:4469-4473
- WHO (1995) Application of the principles of substantial equivalence to the safety evaluation of foods or food components from plants derived by modern biotechnology. Report of a WHO workshop. World Health Organization, Geneva.
- WHO/FNU/FOS/95 Wolt J, Keese P, Raybould A, Fitzpatrick J, Burachik M, Gray A, Olin S, Schiemann J, Sears M and Wu F , 2009. Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants Transgenic Res DOI 10.1007/s11248-009-9321-9
- OECD: http://www.oecd.org/subject/biotech/report_taskforce.pdf
- Codex: www.codexalimentarius.org Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca: www.minagro.gob.ar (ir a SENASA, Resol. 412).

PARTE VI. CAPITULO 2

Bioseguridad

Moisés Burachik

Bioseguridad de Organismos Genéticamente Modificados - Marcos Regulatorios

Panorama Internacional

Desde 1986, algunos países como Japón, por ejemplo, se han ocupado de elaborar y desarrollar regulaciones para controlar la entrada en el mercado de productos derivados del uso de técnicas de ADN recombinante. En ese momento el foco estaba puesto en los **ingredientes o aditivos alimentarios producidos por microorganismos recombinantes**, pero a medida que la tecnología avanzaba y se aplicaba a otros organismos, estas reglamentaciones se vieron extendidas a plantas y animales modificados.

Numerosos países en los cinco continentes, tienen en este momento un **marco regulatorio** disponible para la evaluación y aprobación de OGMs antes de su entrada en el mercado.

Entre los primeros países que han desarrollado estos procesos, se encuentran los países europeos, siendo la Comisión Europea, el órgano de evaluación y control de la Unión Europea. En los Estados Unidos, diferentes agencias están involucradas en estas evaluaciones: la Agencia de Alimentos y Drogas (FDA), la Agencia para la Protección del Medio Ambiente (EPA) y el Departamento de Agricultura (USDA). Canadá y Australia-Nueva Zelanda, han establecido sus sistemas regulatorios más recientemente (a partir de 1993).

En cuanto a América Latina, Argentina fue el país pionero en esta materia, con la creación de **CONABIA** en 1991, en el ámbito de la Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentación. Otros países de la región han comenzado desde entonces a

establecer sistemas para la evaluación de la bioseguridad de OGMs. Colombia, Chile, Brasil, Uruguay, Paraguay y Perú, por ejemplo, poseen comisiones técnicas evaluadoras, y en algunos de estos países ya se han aprobado la comercialización y el cultivo de variedades GM. Estos sistemas están siendo establecidos en muchos otros países, especialmente apuntando a la implementación del **Protocolo de Bioseguridad**, también conocido como Protocolo de Cartagena, vigente desde Septiembre de 2003. Este protocolo, firmado en el año 2000 por más de 130 estados, regulará los **movimientos transfronterizos de OGMs vivos** o OVGMs, con el objeto de asegurar un nivel adecuado de bioseguridad en el comercio internacional y la conservación de la biodiversidad. Para una actualización sobre marcos regulatorios en América Latina, ver el listado de sitios recomendados.

Cuáles son los riesgos?

Uno de los problemas inherentes a la concepción de un marco regulatorio para los ensayos de campo de plantas GM es el de la identificación de los riesgos que deben considerarse. Esta identificación depende de las opciones que se acepten de un conjunto de posibilidades y de los **valores** a proteger. Estos valores deben ser establecidos por cada país, con el aporte de la Sociedad (científicos, funcionarios, políticos, empresarios, público en general). Esto es, deben **compatibilizarse criterios sobre lo que se consideran riesgos aceptables**, en un marco de intereses muy variados.

Por otra parte, si bien la identificación de los riesgos se basará en conocimiento científico disponible ahora, existirá siempre un componente de **extrapolación** (si bien plausible) cuando se estimen efectos adversos "potenciales", que es la materia misma y el objetivo del **análisis de riesgos**.

No obstante estas limitaciones, la evaluación de efectos potenciales de una entidad y sus implicaciones, para verificar y estimar la posibilidad de ocurrencia de un efecto adverso y caracterizar la naturaleza de tal efecto, es definible como una actividad científica,

como la ha declarado la Academia de Ciencias de los EEUU.

La Formulación del Problema

En la actualidad, se discute la aplicación de la denominada Formulación del Problema, a la evaluación de seguridad ambiental de OGMs. Este proceso, es el primer paso en la ERA (Evaluación de Riesgo Ambiental) y permite establecer un Marco Conceptual, en el que se consideran los objetivos, el alcance, los objetivos de estudio y las metodologías a aplicar, para llegar a plantear un problema explícitamente definido y la aproximación para su análisis.

La consistencia y la utilidad de la ERA para plantas GM puede ser mejorada mediante una rigurosa formulación del problema, produciendo un **plan de análisis** que describa escenarios de exposición relevantes y las consecuencias potenciales de estos escenarios. Una formulación del problema ejecutada adecuadamente, asegura que los resultados del ERA sean relevantes para la toma de decisiones.

Entre las características comúnmente consideradas cuando se plantean los potenciales riesgos de las liberaciones de plantas GM, se pueden mencionar los siguientes (muchos de estos puntos son también aplicables a nuevas variedades o híbridos desarrollados convencionalmente):

I Pérdida de Diversidad Biológica:

Aquí nos referimos a la pérdida debida a la presión del mercado y de los costos sobre los productores, induciendo cambios en las prácticas agronómicas (menor uso de herbicidas e insecticidas) por la utilización (ventajosa) de OGMs, en desmedro de razas locales adaptadas (*landraces*) empleadas en la actualidad.

Esto podría producirse si se cultivan OGMs en la vecindad de centros de origen o de diversidad de sus parientes silvestres o de especies sexualmente compatibles, por fenómenos de **introgresión génica** (este riesgo es relativamente más importante en el hemisferio Sur).

II Transferencia genética a especies silvestres o malezas sexualmente compatibles, con el resultado de la formación de híbridos viables con fenotipos no deseados (p.ej., to-

lerancia a herbicidas, resistencia a insectos u otras plagas).

III Incremento de la presión de selección, tal que favorezca un aumento de la tolerancia de plagas a insumos defensivos actualmente empleados. En el caso de insumos que por razones ambientales, económicas o de manejo agrícola, son apreciados por el productor y/o por la Sociedad (p.ej., herbicidas post-emergentes, productos biodegradables, insecticidas biológicos, productos de menor costo, o sin restricciones relacionadas con la propiedad intelectual, etc.), el aumento de la tolerancia de la plaga al producto es un efecto desfavorable, ya que puede convertir a dicho insumo en inútil en el futuro.

IV Modificación de las relaciones depredador-plaga entre insectos, en detrimento de los insectos benéficos. Aquí se incluyen los **efectos sobre organismos no-blanco** (caso de cultivos con incorporación de genes de resistencia a insectos). El conocimiento insuficiente sobre especies amenazadas de extinción (p.ej., insectos benéficos, sus plantas-refugios, etc.), también es un factor a tener en cuenta.

V Posibles cambios en los flujos comerciales.

Fundamentos de las normativas - Definiciones

La elaboración y evolución de un marco regulatorio para la bioseguridad de una tecnología novedosa como la biotecnología aplicada al mejoramiento vegetal, no está exenta de dificultades.

Por una parte está la **responsabilidad de asegurar la aplicación sustentable de la nueva tecnología**, y de preservar al hombre, la flora, la fauna y el medio ambiente de los potenciales efectos perjudiciales de las innovaciones, tanto en el presente como en el futuro. Por otra parte, hay razones para **no obstaculizar el desarrollo de las innovaciones biotecnológicas**, que ya han demostrado poseer un gran potencial para brindar beneficios a la Sociedad. Toda actividad humana (especialmente la innovación tecnológica) implica peligros (riesgos) y por lo tanto requiere la atención (gestión) de su seguridad.

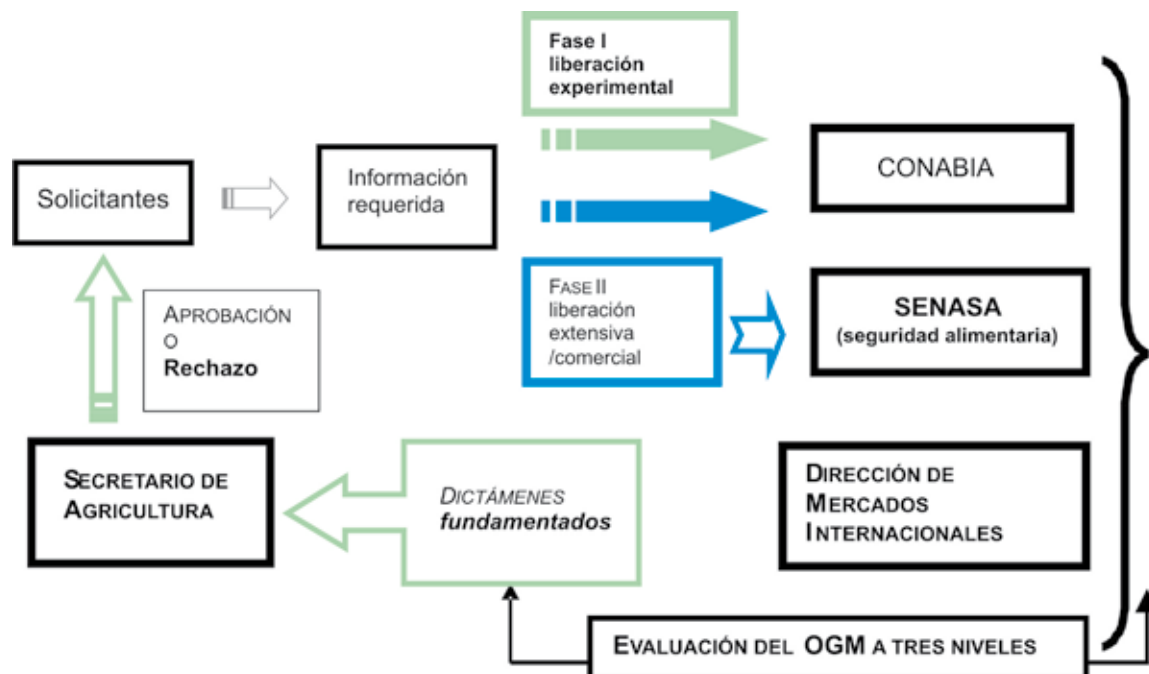


Figura 1. el sistema de regulación y aprobación de OGMs en Argentina

La seguridad se obtiene **definiendo, evaluando y gestionando los riesgos** asociados con la innovación.

Aplicando estos conceptos a la biotecnología, que implica el uso de organismos vivos, podemos enfocar **el análisis de los riesgos de los ensayos** hacia los siguientes aspectos generales:

- **Identificación de los todos organismos involucrados** (donantes, receptores, etc),
- **Características de los organismos involucrados en la obtención del OGM** (familiaridad, patogenicidad, etc)
- **Manera en que serán utilizados los OGMs** (escala, contención)

Características de las zonas y de los otros organismos (lugares, medio receptor potencial, incluyendo seres humanos)

La normativa argentina ha tomado en consideración estos aspectos, entre otros, para elaborar un marco regulatorio detallado para los **Ensayos a Campo de Plantas Transgénicas**, que se describe a continuación en sus rasgos principales.

Consideramos una definición aceptable de **bioseguridad**, como la **protección de la salud humana y del ambiente con respecto a los riesgos conocidos y/o percibidos de la técnica o proyecto en cuestión, de acuerdo al estado actual de nuestros conocimientos**. Está implícita en esta definición que una regulación para la bioseguridad, que significa *una regulación de los riesgos aceptables para la Sociedad*, conlleva una condición de flexibilidad y de adaptación permanentes.

Para la normativa argentina, un **OGM** es:

- un organismo (vegetal, animal, microorganismo o virus)
- en el cual se ha introducido información genética precisa y definida
- en forma deliberada y dirigida a obtener un determinado fenotipo
- siendo aquella introducción realizada de tal manera que dicha información genética no podría haber sido adquirida por ese organismo por la vía de mutaciones, recombinaciones u otras formas de transferencia genética reconocidas como mecanismos que operan en la Naturaleza sin intervención humana.

Esta definición hace referencia al **método de obtención del OGM**, con el propósito de establecer el campo de aplicación de la norma, excluyendo, por ejemplo, los cruzamientos tradicionales. Sin embargo, en el **análisis del riesgo** de la liberación de un OGM, la característica dominante, esto es, aquella que constituye el foco del análisis de la Comisión, es el **inserto**, esto es, **la porción de DNA efectivamente presente en el genoma transformado**, cuya naturaleza y consecuencias (geno- y fenotípicas) caracterizan al OGM como tal.

Al OGM o conjunto de OGMs con un dado inserto se los denomina colectivamente evento. Varios OGMs pueden contener el mismo evento, y por lo tanto sus análisis de riesgo serán equivalentes. Ocasionalmente, en etapas tempranas del desarrollo de un OGM, se admite que el evento puede no estar inequívocamente caracterizado, en el sentido de que no se ha definido el inserto con la debida precisión (por ejemplo, el inserto puede estar en diferentes posiciones en el genoma del vegetal). En estos casos, el análisis se enfoca en la **construcción genética** utilizada en la **transformación**.

Definimos como transformación, el método utilizado para introducir la nueva información genética, vehiculizada por el vector.

Si bien la normativa argentina atiende aspectos del proceso de obtención de un OGM en el análisis de riesgo, esa atención **sólo se enfoca en aquellas características que interesan en la evaluación del producto** (y no del proceso de su obtención), en el sentido de que esas características se encontrarán finalmente en el OGM obtenido.

Otra característica del marco regulatorio administrado por la CONABIA es que considera cada producto o liberación **caso por caso**. Si bien los antecedentes (si los hubiera) se tienen en cuenta, y los casos similares son identificados y considerados como objetos de información válida para la evaluación, **los datos no son transferibles**, y cada caso y/o solicitante deben ser coherentes y autosuficientes en cuanto a la información que provee a la Comisión. La definición de **caso** es entonces relevante. Un caso está definido por:

- **La empresa o ente solicitante.**
- **El evento de transformación** (es decir:

un inserto definido introducido en el genoma de la planta, admitiéndose un conjunto de eventos con un único vector en las etapas muy preliminares del desarrollo del OGM).

- **La escala de la liberación.**

Cualquiera de estas condiciones que no se conserve (p.ej., el mismo evento presentado por dos empresas o entes diferentes) representará un caso diferente.

La normativa puesta en práctica es **proactiva**, en el sentido de que requiere un análisis previo de todas las previsibles consecuencias de una liberación **antes** de que tal liberación sea autorizada.

Como mencionamos antes, Argentina dispone desde 1991 de un marco regulatorio para el Análisis y la Gestión de los Riesgos asociados con los Ensayos a Campo de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs). Esta normativa es administrada por la **Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria** (CONABIA), que opera en el ámbito del Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca. Esta Comisión es **multisectorial** (la forman representantes de los sectores público y privado), **multidisciplinaria**, y es la encargada de emitir las **recomendaciones con respecto a la autorización** para los ensayos solicitados (experimentación y/o liberaciones a campo). Estas recomendaciones son remitidas a la autoridad decisoria.

La consideración básica que guía el funcionamiento y los dictámenes de la CONABIA es la **Bioseguridad**, y su característica esencial es que funda sus procedimientos operativos en **consideraciones exclusivamente técnicas, fundadas en los conocimientos científicos disponibles**.

Los principales criterios aplicados en la normativa argentina son:

- **el criterio de bioseguridad:** la definición, evaluación y gestión de los riesgos, es la consideración primaria y su aplicación es **proactiva**, esto es, debe realizarse **antes de autorizarse la liberación**; los ensayos son evaluados **caso por caso**; el foco del interés está **en el producto**, pero aquellas características

del procedimiento de su obtención que terminan afectando o manifestándose en el producto final, son también analizadas

- **el enfoque precautorio:** el marco regulatorio **acompaña el desarrollo** del producto, y no se requiere la fundamentación científica **completa** para detener dicho desarrollo; basta que se presente alguna de las siguientes situaciones: i) no existe suficiente información sobre el sistema, ii) los riesgos no son aceptables en base a presunciones razonables, iii) la evaluación no sea concluyente, o iv) el sistema es demasiado complejo

La CONABIA no interviene en las etapas ulteriores (aprobación alimentaria, dictamen sobre el impacto en las exportaciones y registro, para la comercialización) del camino de una planta GM hacia el mercado (Ver Figura 1). Sin embargo, emite un **dictamen particular fundado** sobre la bioseguridad de la producción masiva a escala comercial del cultivo en cuestión. De este modo, la CONABIA dictamina sobre la historia de bioseguridad de la planta transgénica, para información de las agencias específicas del Estado encargadas de aquellos pasos.

En los documentos que presentan a la CONABIA, los solicitantes de autorizaciones de ensayos tienen la opción de hacer reserva de información que consideren confidencial. La información así considerada, será examinada por solamente uno de los miembros de la Comisión, quien deberá emitir un juicio fundado sobre la bioseguridad de la propuesta y exponer esta opinión (aunque no la información reservada) ante la Comisión.

Esta operatoria de CONABIA permite asegurar, tanto para la Sociedad como para los sectores empresariales, un balance correcto entre la protección de la salud, la preservación de la calidad ambiental y la sustentabilidad de los proyectos aprobados, con la implementación regulada, en tiempo y forma, de las innovaciones tecnológicas propuestas por los solicitantes.

La CONABIA realiza las evaluaciones de todas las Solicitudes de liberaciones de OVGM al ambiente, y recomienda al Ministro de Agricultura sobre la conveniencia o no de autorizar dichas liberaciones. Estas evaluaciones comprenden dos fases:

1. las evaluaciones de las **liberaciones experimentales** cuyo propósito es determinar que *la probabilidad de efectos sobre el ambiente es no significativa –primera fase de evaluación–*, y
2. las evaluaciones de las **liberaciones extensivas** cuyo propósito es determinar que dichas liberaciones del OVGM *no generarán un impacto sobre el ambiente que difiera significativamente del que produciría el organismo homólogo no GM –segunda fase de evaluación–*. (Ver Figura 1)

Primera Fase de Evaluación: Ensayos experimentales

Los solicitantes deben presentar un **legajo de información específica**, que consta de una

Información General sobre la liberación y sobre el OGM en cuestión y de un apartado sobre las **Condiciones de Bioseguridad** que se pondrán en práctica.

El campo del **análisis de los riesgos** abarcado por estas informaciones, que debe proveer el solicitante, es amplio, e incluye tanto las **características de la liberación como las del OGM**. Con respecto a las características de la liberación, la **Información General** sometida al análisis incluirá:

- Si el material es importado: status regulatorio en el país de origen.
- Propósito de la liberación (objetivo, cronograma, protocolos, antecedentes). Si es a escala de invernadero o a campo
- Operaciones de transporte de OGM (ingreso al país, transportes internos).
- Cantidad y tipo de material a liberar, antecedentes en otros países.
- Lugar de la liberación.
- Detalles operativos para auditar la liberación (fechas, instituciones, personas).

Con respecto a **las características del OVGM**, se analizará el **genotipo** del evento (es decir, **las nuevas características genéticas introducidas**), para lo cual el solicitante debe proveer información con respecto a:

- Descripción de la biología molecular del sistema donante-vector-receptor

- Método de transformación utilizado
- Genes principales (y sus organismos donantes). Genes auxiliares (marcadores de selección).
- Secuencias regulatorias (promotores, terminadores, enhancers, etc.). Otros elementos genéticos introducidos.
- Productos de expresión, tejidos de la planta en los que se expresan, niveles de expresión. Homologías de secuencia con proteínas tóxicas o alergénicas.
- Descripción fenotípica del organismo receptor, centros de origen o diversidad genética.
- Estabilidad fenotípica y número de generaciones en los que se verificó.

En cuanto a la sección sobre las **Condiciones de Bioseguridad**, la información solicitada depende de la escala de la liberación: desde laboratorio/invernadero hasta pruebas a campo. En el caso de eventos que aún no han obtenido la autorización de comercialización en el país, es decir, **eventos regulados**, que se siembran a gran escala para **producciones de semilla en contra-estación** para el hemisferio Norte, o con otros fines, existe un **protocolo específico que es necesario presentar para obtener la autorización**.

En todos los casos el solicitante debe proveer información relativa a varios aspectos básicos de los **Procedimientos de Bioseguridad**, a saber:

a) Durante la liberación: Descripción y ubicación del lugar o instalación donde se realizará la liberación. Localización precisa (mapas detallados): distancia a caminos, lugares transitados, límites del predio bajo control del solicitante. Características constructivas de bioseguridad (laboratorio o invernadero) y normas de acceso. Tamaño y número de parcelas, su diseño, plano de siembra y superficie a sembrar. Medidas de aislamiento

- En ensayos a campo: distancias, tiempos de floración, jaulas, cobertura para evitar la diseminación del polen, por viento o insectos, control de vectores potenciales de polen u otro material con capacidad de propagación, etc.
- En ensayos en laboratorio o invernade-

ro: métodos o estructuras de contención contra el ingreso de vectores potenciales de material genético.

b) En los movimientos de materiales: semillas, material vegetal acompañante, así como los lugares, normas e identificación del material que sea almacenado.

c) En lo relacionado con el destino del material cosechado: el solicitante deberá informar sobre su utilización, aclarando si será local o si será exportado o destruido, e identificando los lugares de su almacenaje final o transitorio.

d) En lo relacionado con la disposición final (OGM y materiales remanentes): En lo relacionado con la **disposición final** del OGM y de los materiales remanentes, se requiere información sobre el tratamiento del suelo post-cosecha, el uso futuro del terreno, los controles posteriores (detección de plantas voluntarias) y su duración.

e) En el caso de un eventual escape del OGM y/o de cualquier material asociado: El solicitante debe exponer con claridad los procedimientos que seguirá **en el caso de un eventual escape del OGM** y/o de cualquier material asociado. Normalmente, esto incluye métodos de identificación del OGM, procedimientos para limitar y controlar el escape, así como la obligación de notificar perentoriamente a la autoridad regulatoria.

f) Técnicas que se usarán para detectar la transferencia de genes desde el OGM al ambiente biótico.

g) Usos previstos del terreno con posterioridad a la liberación solicitada. Control posterior de la parcela, duración de los controles post-cosecha.

Una vez completados los ensayos, es requisito indispensable para poder acceder a nuevas autorizaciones, la entrega de un **Informe de Cierre de la Liberación**, que incluye observaciones relativas al comportamiento agronómico del OGM en cuanto a germinación, crecimiento vegetativo, floración, susceptibilidad a enfermedades y plagas, así como efectos sobre organismos no blanco y características de la cosecha, los tratamientos realizados y la disposición final.

Es importante notar que estas liberaciones son periódicamente inspeccionadas por agentes habilitados por la SAGPyA.

La normativa completa, así como los requerimientos de información detallados en los formularios que deben completarse para obtener una autorización de liberación, se encuentran a disposición para la consulta a través del sitio de CONABIA.

Segunda Fase de Evaluación: el camino hacia el mercado

Como ya se ha enfatizado antes, la incumbencia básica de la CONABIA está limitada a la gestión de los riesgos y la bioseguridad de los ensayos a campo de plantas GM a diferentes escalas.

Los pasos siguientes hacia el mercado, es decir la aprobación de su uso como materia prima alimentaria, la verificación de que su liberación comercial no afectará negativamente nuestro comercio internacional, el registro de la nueva variedad, y la autorización para la producción comercial, son resorte de otras agencias del Estado (Ver Figura 1). Esas dependencias basan su decisión en dos clases de información:

- La información requerida a los solicitantes que es específica a sus necesidades (la aptitud alimentaria, la estructura de nuestro mercado de exportación).
- La información suministrada por la CONABIA sobre el comportamiento del OGM en cuestión a lo largo de los ensayos autorizados que se han realizado.

Esta última información constituye una parte crucial del camino de la planta GM hacia el mercado, y es solicitada y analizada por la CONABIA. En la normativa argentina actual se la denomina **Segunda Fase de Evaluación**. La condición necesaria para dar una respuesta positiva a estas solicitudes en la práctica, es que la CONABIA considere que:

“no existen riesgos para la salud humana, para el agroecosistema, y para la flora y la fauna asociados, derivados del cultivo no confinado del OGM en consideración.”

Esta categorización requiere del solicitante la presentación de un breve **Resumen** (ca-

racterísticas del OGM; el evento, breve descripción molecular del inserto; usos del OGM, destacando los que difieran del organismo no transformado; condiciones especiales, si las hubiera, para el cultivo extendido en gran escala) y de una **Solicitud** que se compone de:

A) **Información General**, que se refiere a la información anterior, pero de manera más detallada. Deberá incluir, entre otras informaciones,

- **Caracterización del OVGM**, incluyendo proteínas y/o RNAs que expresa el OGM originados en el inserto y el fenotipo que resulta de esa expresión; las ventajas aportadas por la modificación genética; resultados de los ensayos de campo realizados, en el país y en el extranjero, en lo que respecta a la bioseguridad.
- **Una declaración de equivalencia, diferencia o no equivalencia del OVGM**. El solicitante declarará aquí si el OVGM es equivalente al organismo no GM de la misma especie, excepto por el fenotipo aportado por la modificación genética introducida. La declaración se referirá a todas aquellas características del OVGM que no fue intención modificar en el evento. Se deben citar los trabajos que sostienen esta declaración. La equivalencia se referirá al menos a: a) composición centesimal, procesamiento, productos y subproductos; y b) características y prácticas agronómicas, áreas geográficas, tipos de ambientes, precauciones específicas para el cultivo extensivo, si las hubiera, con relación a efectos ambientales. Asimismo, se declararán aquí las observaciones sobre cualquier diferencia no intencional o no esperada, observada en cualquier aspecto de la expresión fenotípica del OVGM en comparación con el organismo no GM de la misma especie. Se deberá incluir toda observación que haya surgido en el monitoreo post-comercialización de este evento (si éste ha sido liberado comercialmente en otros países), como así también las que resultaran de investigaciones realizadas con posterioridad a dichas liberaciones comerciales.

- En caso que corresponda, el solicitante declarará aquí si el tipo de modificación genética tiene el propósito de introducir diferencias que determinan que el OVGM no pueda considerarse sustancialmente equivalente al no OVGM, explicando sucintamente aquellas diferencias. (Ver también Capítulo1).
- Una historia de experimentaciones y ensayos previos, instrucciones sobre manejo (agronómico y del producto) y almacenaje (producto, subproductos y remanentes) si difieren del organismo no transgénico.
- Propuestas para el envasado, rotulado y procesamiento, si difieren del organismo no transgénico y *medidas que deben tomarse en caso de liberación accidental o mal empleo.*

B) Caracterización general del OVGM: esta información se concentra en la metodología y la construcción utilizada en la obtención del OGM y en la caracterización exhaustiva del mismo a nivel molecular y fenotípico. Se debe proporcionar información sobre:

- **La especie receptora** (características fenotípicas, centros de origen i diversidad, distribución geográfica en Argentina, estabilidad genética, potencial de transferencia y/o intercambio de genes con otros organismos, reproducción, supervivencia, diseminación, interacciones con otros organismos, características patogénicas, tóxicas, antinutricionales, alergénicas u otras, e historia de modificaciones genéticas previas).
- **La modificación genética:** método de transformación empleado, descripción detallada del vector (cada elemento genético componente, su origen, tamaño y función; mapa del vector; secuencias nucleotídicas o regiones de la construcción cuyos productos o funciones no sean conocidas; capacidad para transferir genes, o para ser movilizados por conjugación, recombinación o integración; regiones del vector que se incorporan al OGM, es decir constituyen el inserto).

- **Caracterización del inserto:** análisis molecular de la inserción en el genoma del OVGM (número de sitios de integración, número de copias de cada gen, incorporación de porciones de genes), origen y función de cada elemento insertado en el OVGM, información sobre si el inserto (esto es, alguno de sus elementos) confiere alguna función no requerida para la expresión del fenotipo esperado en el OVGM, transposiciones y/o rearrreglos dentro del inserto presente en la planta (con respecto a las posiciones que los elementos genéticos tenían en el vector) y/o de/con porciones del genoma de la planta dentro del inserto y en sus regiones flanqueantes; información detallada de las secuencias del genoma vegetal que flanquean del inserto y sobre la presencia/ausencia de fragmentos del inserto en regiones del genoma vegetal fuera del inserto funcional.
- **Los organismos donantes:** características patogénicas (con relación a las resultantes de la expresión de los elementos presentes en la construcción utilizada en la transformación). Características perjudiciales para la salud humana o animal (con la observación del punto anterior), potencial y/o antecedentes de transferencia natural (esto es, en hábitats y condiciones naturales) de los elementos que constituyen la construcción, desde los organismos donantes a otros organismos, su probabilidad o frecuencia, y fenotipos posibles u observados de los organismos receptores.
- **Caracterización del OVGM propiamente dicho:** características fenotípicas incorporadas, si alguna característica fenotípica del organismo receptor no GM no se expresa en el OVGM. Estabilidad genética, segregación y transferencia a la progenie. Análisis molecular (Southern blot, PCR). Características de la expresión del nuevo material genético. Productos expresados (debe incluir todos los elementos genéticos que se incorporan al OVGM, total o parcialmente), características de la expresión (p.ej.,

constitutiva, tejido-específica), tejidos del OVGM en que se expresan los genes introducidos y niveles de expresión y su evolución temporal, en relación con el ciclo de la planta. Actividad biológica de las secuencias expresadas, ARNs transcritos no traducidos, sus niveles, función y caracterización. Análisis detallado de las posibilidades de transcripción, que comience dentro del inserto y se extienda hacia el genoma de la planta ignorando señales de terminación, así como de transcripción y traducción de proteínas de fusión o de marcos de lectura nuevos, generados como consecuencia de la inserción. También, se deben detallar las técnicas de detección del OVGM en el ambiente: Métodos moleculares y Métodos biológicos:

- **Efectos sobre la salud humana:** efectos tóxicos o alergénicos del OVGM, sus materiales derivados, sus productos metabólicos, los productos resultantes del procesamiento industrial habitual (incluyendo pero no limitado a alimentos), o los resultantes de interacciones de estos productos con otros componentes normales de la dieta humana. Efecto de la modificación genética sobre aquellas características del organismo no GM que constituyan un peligro o riesgo para la salud (incluyendo, pero no limitados a, los niveles de antinutrientes).
- **Interacciones del OVGM con el ambiente:** supervivencia en el ambiente tasa de germinación y dormición, vigor vegetativo (calidad agronómica, susceptibilidad a patógenos, a insectos, a factores de estrés ambiental), ventajas adaptativas presentes o potenciales del OVGM frente al organismo no GM, en hábitats y condiciones naturales, y en condiciones de agroecosistemas para la misma especie y para otros cultivos geográficamente compatibles. Los modos y tasas de multiplicación y las formas naturales de propagación. Información cuantitativa sobre interacciones: susceptibilidad a patógenos, plagas e insectos, capacidad de supervivencia (plantas voluntarias) y rendimiento.
- **Impacto ambiental del OVGM en el agroecosistema:** efectos del OVGM sobre la flora, fauna y población microbiana, con énfasis en las especies benéficas. Efectos derivados de cambios en las prácticas agronómicas (si los hubiera). Conceptos para el manejo de los efectos mencionados en los puntos anteriores y condiciones específicas para el manejo de efectos ambientales debidos al OVGM. Estudios realizados sobre el escape de genes vía polen.
- **Comportamiento esperado en la producción del OVGM a escala comercial:** esta información se refiere específicamente al impacto ambiental, a información general sobre la inocuidad del OVGM o sus derivados alimentarios y a su perfil composicional.
- **Impacto Ambiental:** efectos sobre la flora y fauna, manejo de efectos no deseados potenciales (p.ej., desarrollo de resistencia a Bt en insectos previamente sensibles), programa de investigaciones de seguimiento propuesto, para monitorear posibles efectos sobre el ambiente en el largo plazo.
- **Efectos sobre la salud humana:** conceptos y programa de investigaciones que se realizaron para la evaluación de la inocuidad de las nuevas proteínas expresadas en el OVGM; evaluación de la toxicidad, digestión en jugo gástrico simulado, a diferentes pH: velocidad, caracterización de los fragmentos originados y su actividad biológica. Toxicidad aguda de las nuevas proteínas en animales de laboratorio; determinación del nivel de efecto adverso no observable (sigla del inglés NOAEL), si es posible. Cálculo de la ingesta diaria aceptable (IDA), y su comparación con la ingesta habitual para humanos en dietas normales. Evaluación del potencial alergénico, homologías de las secuencias de aminoácidos de las nuevas proteínas con otras proteínas relevantes (toxinas, alérgenos, etc.). Composición centesimal del OVGM, y comparación con el correspondiente organismo no GM, en

todos los tejidos de la planta; proteínas y composición en aminoácidos, lípidos y composición de ácidos grasos, carbohidratos y otros componentes (cenizas, fibra, materia seca, vitaminas, etc.).

Como se presenta en el esquema correspondiente, la evaluación completa y detallada de la inocuidad y aptitud alimentaria de los OVGMs es llevada a cabo por otra Comisión Evaluadora, que funciona en la órbita del SENASA (Servicio Nacional de Calidad y Sanidad Agroalimentaria). Las características de esta etapa de evaluación son similares a las que lleva adelante CONABIA, y basa sus conclusiones en toda la información presentada a CONABIA, más otra serie de datos, evidencias experimentales y estudios que deben ser presentados específicamente en relación con los **aspectos nutricionales y/o toxicológicos** del OVGM en cuestión, de acuerdo a los requisitos de la resolución oficial.

En ambas instancias de evaluación de bioseguridad se aplica el enfoque comparativo desarrollado en el Capítulo 1 y la conclusión a la que como mínimo, debe arribarse para poder recomendar la autorización comercial, es :

“El OGM es tan seguro como su contraparte no modificada, para el medio ambiente y la salud humana o animal y no menos nutritivo”.

Lecturas /sitios recomendados

- Wolt J, Keese P, Raybould A, Fitzpatrick J, Burachik M, Gray A, Olin S, Schieman J, Sears M y Wu F 2009. Problem formulation in the environmental risk assessment for genetically modified plants. Transgenic Res, DOI 10.1007/s11248-009-9321-9
- Burachik M y Traynor P. 2002. Análisis of a National Biosafety System: Regulatory Policies and Procedures in Argentina. ISNAR Country report 63. www.isnar.cgiar.org
- McLean, MA, Mackenzie, DJ and Cole, BA, 2001. Policy Choices in the Development of National Frameworks for Biosafety Regulation. Report for the International Service for National Agricultural Research (ISNAR), The Hague.

Raybould A, Cooper I (2005) Tiered tests to assess the environmental risk of fitness changes in hybrids between transgenic crops and wild relatives: the example of virus resistant Brassica napus. Environ Biosafety Res 4(3):127–140

USEPA (1998) Guidelines for ecological risk assessment, EPA/630/R-95-002F. Report nr EPA/630/R-95-002F

www.minagri.gob.ar (Biotecnología Agropecuaria): normativa detallada que puede consultarse libremente

www.senasa.gov.ar : resolución 412/2002

<http://www.cbd.int/biosafety/protocol.shtml>: Protocolo de Bioseguridad

www.ctnbio.gov.br: sitio de la Comisión de Bioseguridad de Brasil

www.oecd.org: Organización para el Desarrollo y la Cooperación Económica

www.fda.gov: Agencia de Drogas y Alimentos de los EEUU

www.fao.org: Agencia para la Agricultura y la Alimentación de la Naciones Unidas

www.redbio.org: ir a Marco Regulatorio, para información sobre bioseguridad en America Latina y el Caribe

<http://www.unep.ch/biosafety/>: Programa ambiental de las Naciones Unidas. Información sobre el Protocolo de Bioseguridad y marcos regulatorios internacionales

VI. CAPÍTULO 3

Flujo génico y su posible impacto ambiental

Mónica Poverene; Soledad Ureta;
Agustina Gutiérrez

Flujo génico y riesgo de escape de transgenes al ambiente

El flujo génico es el proceso de incorporación de genes de una población dentro de otra y ocurre entre individuos formalmente considerados una especie o entre especies relacionadas. El intercambio de genes entre plantas es un proceso bien conocido en todos los cultivos mejorados por técnicas tradicionales o mediante biotecnología y en las plantas silvestres emparentadas con ellos. La mayoría de los transgenes en cultivos comerciales genéticamente modificados (CGM) confieren tolerancia a herbicidas o resistencia a plagas, características ciertamente favorables en ecosistemas agrícolas. Se denomina escape a la diseminación no intencional de la construcción genética de un CGM hacia otras poblaciones, mediante mecanismos biológicos naturales como la reproducción sexual o la transferencia horizontal. La reproducción sexual implica la unión de gametos femeninos y masculinos, mientras que la transferencia génica horizontal o lateral consiste en el intercambio de material genético no sexual y ocurre generalmente en microorganismos. En el caso de las plantas, el escape génico a través del polen es el mecanismo natural. La pérdida de semillas durante el transporte y su establecimiento en banquinas y vías de comunicación es muy importante en la dispersión de plantas fuera del cultivo. La semilla puede trasladarse grandes distancias y sobrevive durante mucho más tiempo que el polen. En regiones donde crecen parientes silvestres, se espera que ocurra hibridación espontánea con el cultivo transgénico, a menos que las plantas GM estén especialmente diseñadas para limitar el flujo génico, reduciendo la dispersión de semillas o el movimiento de genes a través del polen. Para muchos CGM se asume que las plantas transgénicas se cruzarán abiertamente

y la evaluación del riesgo se centra en la consecuencia del flujo de transgenes resultante sobre el ambiente

En especies alógamas o parcialmente alógamas, la difusión del transgén dependerá de los mecanismos de polinización, generalmente por el viento (anemófila) o los insectos (entomófila). La mejor estrategia para prevenir la difusión de transgenes es el aislamiento por distancia entre poblaciones. En los cultivos, se conocen las distancias mínimas de aislamiento necesarias para prevenir la polinización cruzada entre variedades. Estas constituyen la base para determinar las medidas de bioseguridad que se exigirán en cada caso durante la fase de liberación experimental. Una vez aprobado el cultivo para su siembra a escala comercial, la aplicación de esas distancias en la práctica agronómica queda en manos de los agricultores y depende de los intereses económicos que para ellos represente la comercialización de un cultivo transgénico. Cuando coexisten con cultivos tradicionales u orgánicos se requieren medidas adecuadas durante el cultivo, cosecha, transporte y almacenamiento, a fin de evitar la mezcla accidental de materiales GM y no GM. Engels y col. (2006) citan ejemplos de contaminación de lotes de semilla y mezclas físicas en colza y tomate. Las recomendaciones tendientes a evitarla consisten en: a) medidas a tomar dentro del establecimiento, como respetar las distancias de aislamiento, colocar barreras a la dispersión del polen, o intercalar lotes con cultivo de una especie distinta. b) cooperación entre establecimientos vecinos sobre planes de siembra, o uso de variedades con tiempo de floración diferente. c) uso de servicios de extensión agrícola para informar a los productores, monitoreo, intercambio de información técnica y servicios de alarma.

Los transgenes que confieren tolerancia a herbicidas, resistencia a insectos o a patógenos podrían transmitir las mismas características a plantas silvestres relacionadas, determinando una mayor supervivencia bajo la presión de selección natural (insectos herbívoros o patógenos) o de prácticas agronómicas usuales para el control de malezas, plagas o enfermedades (uso de pesticidas, agentes de control biológico). En consecuencia, aumen-

taría el número o tamaño de las poblaciones silvestres. El potencial impacto ambiental depende tanto de la probabilidad de transferencia del transgén a la población silvestre como de sus consecuencias. Según la probabilidad de transferencia, los cultivos pueden clasificarse en tres grupos:

1. Mínima probabilidad de transferencia a especies silvestres, sea porque éstas no existen en el área o no hay compatibilidad sexual entre el cultivo y su pariente silvestre.
2. Cultivos con baja probabilidad de transferencia, cuando la compatibilidad sexual es limitada.
3. Cultivos con alta probabilidad de transferencia, cuando especies silvestres sexualmente compatibles crecen en la vecindad del área sembrada.

Las consecuencias de la transferencia dependen de la capacidad potencial del transgén para conferir ventajas adaptativas a la especie silvestre receptora. De acuerdo a este criterio, también se pueden agrupar los genes en diferentes clases. En la clase 1 se sitúan los transgenes que confieren pequeña o ninguna ventaja adaptativa, como los marcadores de selección, genes de androesterilidad o de madurez retrasada. La clase 2 comprende genes que pueden conferir alguna ventaja bajo la adecuada presión de selección, como los de tolerancia a herbicidas o de resistencia a insectos y enfermedades. En la clase 3 se sitúan genes para mejorar el crecimiento y la supervivencia, que conferirían ventajas adaptativas en cualquier ambiente. La tabla 1 presenta una clasificación de los cultivos GM autorizados o bajo ensayo en Argentina, según esos criterios.

La pérdida de biodiversidad consiste en la erosión o pérdida de variabilidad genética atribuida al monocultivo o al uso de unas pocas variedades que dominen el mercado de semillas. Esta situación no es privativa de los cultivos GM y puede prevenirse mediante una adecuada planificación de la agricultura regional. Algunas especies crecen en ambientes especializados o geográficamente limitados como raras especies silvestres o razas locales domesticadas (*landraces*) constituyendo reser-

vorios de diversidad genética de potencial uso en el mejoramiento genético. Cuando crecen en la vecindad de cultivos a gran escala, existe la posibilidad de cruzamientos naturales y flujo génico a través del polen del cultivo hacia la especie local. Esto puede resultar en una pérdida de vigor y fertilidad en los descendientes, llamada depresión por alogamia, o pérdida de identidad genética por sucesivos ciclos de cruzamiento con el cultivo, de manera que paulatinamente la especie local decae hasta su completa extinción. El proceso es dependiente de la frecuencia de cruzamiento, la cual a su vez depende de la cantidad relativa de individuos de cada especie. Esto también puede evitarse mediante adecuadas medidas de conservación y manejo del cultivo.

Se puede concluir que la posibilidad de escape de transgenes es de orden diferente según la población receptora. Una variedad no GM de la misma especie ciertamente adquirirá el transgén si es expuesta al flujo de polen del cultivo GM. Una rara variedad local domesticada perderá identidad por contacto genético con el cultivo. La situación no es tan simple si se trata de una población silvestre emparentada, ya que dependerá de las relaciones genéticas con el cultivo, que determinan la probabilidad de hibridación. Se requerirá de una evaluación de la probabilidad de escape y del impacto que el transgén podría ocasionar en la población silvestre.

Factores que determinan el escape de transgenes y su impacto ambiental

Los cultivos en su mayoría están emparentados con especies silvestres o malezas, con las que pueden hibridar y producir descendientes total o parcialmente fértiles. Esta hibridación ha sido documentada en 22 de los 25 cultivos más importantes y es muy probable que sus genes se encuentren introgresados dentro de las poblaciones silvestres. Trigo, arroz, avena, sorgo, cebada, maíz, soja, girasol, colza, maní, poroto, caña de azúcar, remolacha azucarera, algodón, papa, zapallo, frutilla, rábano, zanahoria, vid, tréboles son algunas de las especies cultivadas que se encuentran en experimentación biotecnológica. El intercambio genético de los cultivos con sus parientes silvestres es

Tabla 1. Clasificación de las especies GM en Argentina según la probabilidad de transferencia del transgén (Grupo) y las consecuencias biológicas de la modificación genética (Clase) de acuerdo a Ahl Goy y Due-sing (1996). Entre paréntesis se indica el número de autorizaciones entre 1997 y 2007.

Grupo	Cultivo	Clase 1	Clase 2	Clase 3
I	Algodón		Toler. herbicidas (47) Resist. insectos (46)	
	Maíz	Calidad alterada (68) Caracteres agronómicos (2) Androesterilidad (3)	Toler. herbicidas (463) Toler. estrés ambiental (20) Resist. insectos (564) Resist. enfermedades (12)	Alto rendimiento (4)
	Soja	Calidad alterada (64) Modif. calidad de semilla (1)	Toler. herbicidas (145) Tolerancia estrés ambiental (1) Resist. insectos (53)	Alto rendimiento (97)
	Tabaco	Calidad alterada (3)	Toler. herbicidas (20) Resist. enfermedades (1) Toler. estrés ambiental (4)	
	Trigo	Calidad alterada (5) Calidad de marcadores visuales (1)	Toler. herbicidas (6) Resist. enfermedades (7) Toler. estrés ambiental (1)	
	Caña de azúcar		Toler. herbicidas (11) Resist. enfermedades (2)	
	Papa		Toler. herbicidas (56) Resist. enfermedades (205) Resist.insectos (2)	
III	Alfalfa	Calidad alterada (2) Propiedades nutraceuticas (31)	Toler. herbicidas (6) Resist. insectos (2)	
	Arroz	Calidad alterada (3)	Toler. herbicidas (2) Tolerancia estrés ambiental (4)	Alto rendimiento (27) Alteración en la fertilidad (2)
	Cártamo	Calidad alterada (3)		
	Colza	Calidad alterada (1)	Toler. herbicidas (7) Resist. insectos (1)	
	Frutilla		Resist. enfermedades (1)	
	Girasol		Toler. herbicidas (3) Resist. enfermedades (49) Resist. insectos (31)	Fijación de nitrógeno (1)
	Naranja		Resist. enfermedades (3)	
	Remolacha, Acelga		Toler. herbicidas (3)	
	Tomate		Resist. enfermedades (1)	
	Trébol blanco			Retraso de la senescencia (1)

uno de los mecanismos de origen de las malezas. Los cruzamientos ocurren naturalmente en regiones donde las especies conviven. Aproximadamente la mitad de los caracteres que determinan invasividad están controlados por genes únicos, de modo que existe la posibilidad de que los transgenes persistan y modifiquen poblaciones silvestres. Podría resultar que éstas se vuelvan más abundantes en su hábitat o invadan nuevos hábitats. El concepto de “supermaleza” ha surgido como consecuencia de reconocer la dificultad que implicaría el control de esas poblaciones. También podrían tener efectos adicionales sobre poblaciones de insectos o patógenos.

No obstante, la probabilidad de introgresión de elementos transgénicos dentro de otras variedades o germoplasmas dependerá de la biología de reproducción, fertilidad de los híbridos, dispersión de semilla y presión de selección. Para que ocurra introgresión de genes, cultivos sexualmente compatibles o parientes silvestres deben estar presentes y cercanos al “cultivo fuente”, el entrecruzamiento debe ser posible y los resultantes híbridos y sus respectivas retrocruzas tienen que ser fértiles. La introgresión de genes es mayor en especies alógamas, como maíz y es menor en autógamias, como soja y arroz, siendo mínima en especies de propagación vegetativa, como papa. Aún en estos casos los transgenes pueden ser introducidos sin intención mediados por mezclas físicas de semillas o propágulos.

La evaluación del riesgo de escape de transgenes comprende tres etapas:

a) Investigación de barreras genéticas o geográficas para el escape del transgén desde el cultivo hacia las poblaciones silvestres.

b) Investigación del efecto del transgén sobre la aptitud biológica de las plantas silvestres.

c) Investigación de las consecuencias ecológicas de la difusión del transgén en la población silvestre.

a. Barreras geográficas y genéticas entre el cultivo y especies silvestres

Para evaluar el riesgo de escape de genes desde los cultivos a las poblaciones silvestres emparentadas, se plantean dos preguntas: ¿La planta cultivada transgénica convive con la

especie silvestre emparentada? ¿Esa variedad es sexualmente compatible con sus parientes silvestres? Todas las especies utilizadas para cultivo son derivadas de una o más especies silvestres. Estos cultivos son sembrados en su mayoría lindantes con sus parientes silvestres compatibles. Para reducir el riesgo de hibridación cultivo-silvestre se debería restringir el cultivo transgénico a determinadas áreas donde no se encuentren los parientes silvestres. Por ejemplo, las poblaciones silvestres de maíz y soja no son nativas ni se encuentran en Argentina, por lo tanto los transgenes provenientes de estos cultivos no pueden transferirse a poblaciones silvestres. En cambio, colza, arroz y girasol conviven con sus parientes silvestres y pueden cruzarse con ellos. El primer paso consiste en el estudio sistemático de la flora local. De todos modos, restringir los cultivos transgénicos a determinadas áreas fuera del rango de ocurrencia de sus parientes silvestres sólo demorará el movimiento de transgenes.

La hibridación del cultivo con especies silvestres emparentadas dependerá de la afinidad genética que tengan entre ellos, la cual determinará desde fertilidad completa o parcial hasta imposibilidad de cruzamiento. Para que la cruce tenga lugar, ambos *taxa* deben florecer al mismo tiempo y el polen debe ser capaz de germinar y efectuar la fecundación. La descendencia suele tener una fertilidad menor que las especies parentales, pero raramente es por completo estéril. La fertilidad parcial de los híbridos permite la introgresión, la incorporación estable de genes de una especie en otra mediante sucesivas retrocruzas de sus descendientes con una o ambas especies parentales. La fertilidad de los híbridos cultivo-silvestre varía drásticamente, aunque suele ser restaurada en las siguientes generaciones. Caracteres morfológicos y fenológicos intermedios entre la especie cultivada y la silvestre constituyen un buen diagnóstico de hibridación e introgresión, pero el estudio de marcadores moleculares resulta invaluable. Este ha demostrado que la mayor parte de los cultivos hibrida con sus parientes y que los alelos de las especies domesticadas persisten durante generaciones en las poblaciones silvestres, aún cuando no se adviertan cambios morfológicos. Este es el caso

del girasol cultivado con *Helianthus annuus* silvestre y *H. petiolaris* en América del Norte. En Argentina, donde ambas especies silvestres se han naturalizado, hemos encontrado numerosas evidencias de hibridación e introgresión con el cultivo en la región central del país, tanto por caracteres morfológicos y fenológicos como por marcadores moleculares, constatando además la fertilidad parcial de los híbridos mediante estudios del polen y de la producción de semillas. El flujo génico a través del polen es una poderosa fuerza evolutiva y el impacto sobre las poblaciones silvestres depende de su magnitud, así como del efecto de los alelos transmitidos sobre la población recipiente.

La magnitud del flujo mediado por polen puede medirse a través de la frecuencia de marcadores moleculares característicos del cultivo presentes en una población silvestre o sus descendientes. Estos han demostrado que la ubicación de un gen en el genoma tiene una importancia crucial para su difusión mediante hibridación. En colza, un alopoloide (AACC), la introgresión de tolerancia a herbicidas y androesterilidad hacia la especie diploide *Brassica rapa* (AA) sería menos probable si los transgenes que codifican esos rasgos estuvieran en el genoma C, porque implicaría una recombinación intergenómica. En girasol, *Helianthus annuus* donde ha ocurrido una extensa remodelación cromosómica mediante inversiones y translocaciones, la transferencia de un transgén hacia la especie silvestre *H. petiolaris* es improbable si éste no está situado en las porciones colineares entre ambos genomas.

Se están evaluando métodos para reducir la probabilidad de introgresión, como por ejemplo, ubicar los transgenes dentro de cromosomas o segmentos cromosómicos que tengan menor probabilidad de ser transferidos a las poblaciones silvestres. Otra alternativa es colocar el transgén muy cercano a algún "gen de domesticación" que confiera una menor aptitud en las poblaciones silvestres y el uso de tecnologías de restricción para controlar la viabilidad o fertilidad de la progenie híbrida.

La cuantificación de la tasa de hibridación e introgresión entre el cultivo y la especie silvestre mediante experimentos adecuados es previa a la investigación de las consecuencias génicas y ecológicas del escape del transgén,

ya que si la tasa de hibridación fuera despreciable, no cabría preocuparse por las consecuencias.

b. Efecto del transgén sobre la aptitud biológica de las plantas silvestres

Una vez comprobada la posibilidad de hibridación y la presencia de un transgén en plantas silvestres, surge la pregunta: ¿Se espera que el transgén incremente su frecuencia en las poblaciones silvestres? El destino de un alelo en una población dependerá de su efecto sobre la aptitud biológica de los individuos que lo adquieren. La aptitud biológica o valor adaptativo es una medida relativa de la eficacia reproductiva de un genotipo cuando se lo compara con otro genotipo. Sus componentes son la supervivencia y la fecundidad, que pueden resultar afectados en distintas fases del ciclo vital: germinación, establecimiento de plántula, floración, formación de polen y semilla.

Si el alelo no tiene efecto alguno en el ambiente ecológico, se trata de un alelo neutro y su destino dependerá del azar, o sea que su frecuencia en la población estará sujeta a la deriva génica y persistirá o eventualmente se perderá. Si el alelo es beneficioso, el flujo génico acelerará su diseminación en la población silvestre y la frecuencia alélica aumentará rápidamente, en forma proporcional al movimiento de polen desde el cultivo a la población silvestre. Si su efecto es deletéreo conducirá a una depresión alogámica, con disminución de la viabilidad y fertilidad de los híbridos. El efecto nuevamente dependerá de la magnitud del flujo génico y cuanto mayor sea, mayor será el riesgo de extinción de la población silvestre.

La diseminación de un transgén en la población silvestre requiere que los híbridos cultivo-silvestre se reproduzcan en condiciones naturales. Estudios previos de hibridación entre cultivos no transgénicos de colza, sorgo, girasol, rábano, poroto y trigo y sus parientes silvestres han demostrado que no sólo lo hacen, sino que su aptitud biológica puede ser incluso mayor que la de sus progenitores silvestres. En uno de los primeros estudios de transmisión de un transgén a poblaciones silvestres, se encontró una baja frecuencia de plantas híbridas de *Brassica rapa* portadoras de un transgén de

colza considerado neutral y se concluyó que el riesgo de transmisión era bajo. Diez años después se confirmó la persistencia de transgenes de resistencia a herbicida en poblaciones de *B. rapa* durante seis años consecutivos. Los híbridos entre calabaza GM y zapallo silvestre resultaron lo suficientemente vigorosos como para permitir la rápida introgresión de transgenes neutrales y beneficiosos en las poblaciones silvestres. En girasol, un transgén que confiere resistencia a lepidópteros mediante la producción de la proteína Bt Cry1Ac, aumentó considerablemente la fecundidad de las plantas silvestres recipientes, aunque este efecto varió entre localidades y años. De acuerdo a estas observaciones, podría esperarse que el gen Bt aumente la aptitud biológica de girasoles silvestres e incremente rápidamente su frecuencia en las poblaciones naturales, debido a que reduce el daño producido por varias especies de insectos herbívoros. Sin embargo, el transgén OxOx, que confiere resistencia al hongo *Sclerotinia*, no aumentó significativamente la fecundidad de plantas de girasol silvestre, sugiriendo que su diseminación sería prácticamente neutral luego de un escape hacia poblaciones naturales. En *Brassica rapa* un transgén Bt adquirido por cruzamiento con colza transgénica disminuyó su agresividad como maleza en un 20% comparado con *B. rapa* no GM. Estos son ejemplos contrastantes de los efectos de transgenes sobre la aptitud y comportamiento ecológico de poblaciones silvestres.

¿Cómo estimar los costos y beneficios de un transgén para la aptitud biológica de una especie silvestre? En este caso, los genotipos a comparar son el que ha adquirido el transgén por hibridación con el cultivo y el que no lo ha adquirido, o sea el genotipo silvestre de la población en ausencia de flujo génico del cultivo. En general, las poblaciones silvestres son menos susceptibles a patógenos y plagas que sus parientes cultivados. Mayor diversidad genotípica, menor densidad de plantas y ausencia de laboreo son algunas de las causas de esa diferencia. Por ello, un transgén que confiere resistencia a una plaga o patógeno puede no representar para la especie silvestre una ventaja tan grande como para el cultivo. Por el contrario, puede significar un costo para la

planta que lo adquiera debido a efectos pleiotrópicos sobre otros caracteres fenotípicos que a su vez afecten la aptitud. El beneficio de un transgén asociado a la resistencia a determinada plaga debe ser evaluado comparando la aptitud biológica de plantas con y sin el transgén que hayan sido expuestas a esa plaga. Por el contrario, el costo de adquirir el transgén debe ser medido comparando la aptitud biológica de plantas que lo llevan o no, en ausencia de la plaga. Híbridos transgénicos entre *B. rapa* y *B. napus* que contienen el transgén Bt han demostrado una mayor aptitud en presencia de herbívoros, mientras que su aptitud disminuía en ausencia de los mismos comparado con *B. rapa*, demostrando un costo fisiológico del transgén. Además, los caracteres que determinan supervivencia y fecundidad pueden ser afectados por las condiciones ambientales, por lo que es necesario estimarlos en distintos ambientes y a lo largo de varias estaciones de crecimiento.

Es el equilibrio de los costos y beneficios el que determina el impacto total de un transgén en términos de aptitud. En el caso de resistencia a herbicidas, el valor positivo del rasgo será restringido a los hábitats en el agroecosistema en donde se aplica el herbicida. Esto demuestra la importancia de conducir estudios de riesgo en híbridos transgénicos bajo condiciones realistas de agricultura y ecología ya que cualquier costo de llevar transgenes puede ser evidente solamente bajo ciertas condiciones.

c. Consecuencias ecológicas de la difusión del transgén en la población silvestre

Finalmente, si el transgén aumenta la aptitud de las poblaciones silvestres se espera que aumente su frecuencia por selección natural. La siguiente pregunta es: ¿Cuáles son las consecuencias ecológicas del escape del transgén en una población silvestre? El impacto ambiental dependerá no sólo de la frecuencia, sino del cambio en las interacciones bióticas y abióticas de ese genotipo silvestre en su ambiente. La predicción de las consecuencias de un escape de transgenes requiere del estudio de la alteración de las interacciones ecológicas existentes entre las especies. Un gen de resistencia a in-

sectos o a enfermedades modificará la herbivoría o la relación huésped-patógeno entre la especie silvestre y otras especies de su hábitat, así como un transgén que favorezca el crecimiento modificará las relaciones de competencia intra e interespecíficas. Cuanto más se conozca acerca de la dinámica poblacional de una especie, más fácilmente se podrá evaluar el impacto ambiental. En *Cucurbita pepo*, híbridos entre un cultivar GM y plantas silvestres mostraron amplias variaciones en fecundidad entre años y localidades que fueron atribuidas a condiciones de suelo y clima, densidad de herbívoros, competencia con malezas, enfermedades y otros factores ambientales. El crecimiento poblacional a través de la producción de semilla es una limitante para especies anuales, por ello caracteres que aumenten la producción o germinación de semilla tienen un gran efecto ecológico. Resultados preliminares en poblaciones experimentales de girasol silvestre sometidas a flujo génico de un cultivo GM (Bt) indicaron que el aumento de la producción de semilla determinó mayor número de plántulas, mayor supervivencia hasta la edad reproductiva, mayor número de inflorescencias con semilla y mayor área total de capítulo al año siguiente. El incremento en tamaño y número de las poblaciones silvestres de una especie afectará a otras especies vegetales del hábitat, cuya frecuencia relativa podría disminuir.

Uno de los riesgos asociados al escape de un transgén Bt de resistencia a insectos en una población silvestre es el potencial efecto adverso sobre especies no-blanco (aquellas que no reducen la producción del cultivo) algunas de las cuales pueden ser especialistas, alimentándose con exclusividad de la especie silvestre receptora. Como ejemplo, se pueden citar especies de artrópodos que cumplen importantes funciones como controladores biológicos, polinizadores y descomponedores. Las toxinas Bt son altamente específicas para determinados tipos de herbívoros (lepidópteros, coleópteros, dípteros) y la disminución de uno de ellos puede alterar las relaciones de competencia con los demás. Las relaciones ecológicas entre herbívoros suelen implicar un delicado equilibrio demográfico cuyo colapso podría contribuir a mayores niveles de infestación y daño.

El uso comercial de cultivos Bt ejerce una presión selectiva que podría favorecer la selección de insectos resistentes a las toxinas. La descendencia podría heredar los genes de resistencia y en unos pocos años, la biotecnología desarrollada para el control de insectos se volvería inefectiva. Para evitar esta situación se ha ideado la estrategia del cultivo refugio, que consiste en sembrar una franja de variedad no transgénica junto a la variedad Bt. Los insectos se reproducen libremente en esa franja, de modo que los raros portadores de resistencia se mantendrán en una frecuencia relativamente baja en la población total de insectos. Esta estrategia se detalla en el capítulo 5. En cultivos de algodón y maíz el sistema de refugios es efectivo y ayuda a retrasar la resistencia en insectos. La pérdida de la eficacia Bt es actualmente uno de los mayores riesgos ambientales derivados del uso de biotecnología agrícola. El primer caso de insectos Bt-resistentes seleccionado en laboratorio se encontró en una población de *Plodia interpunctella*. Sin embargo, la situación en el campo es muy diferente. Hasta la fecha, las únicas poblaciones naturales que han desarrollado resistencia a Bt han sido poblaciones de *Plutella xylostella* (L.) en plantas de berro en Hawai.

La transgénesis también puede tener efectos inesperados en los cultivos. El contenido de lignina del maíz Bt es perceptiblemente más alto que el de maíz no-Bt. Un cambio en el contenido de lignina puede afectar la acción de herbívoros y tener consecuencias ecológicas.

Conclusiones

El estudio de impacto ambiental precede a la liberación de cualquier nuevo evento de transformación en plantas para tener resultados confiables en el ambiente de la liberación. La mayor parte de los efectos no deseados del escape de un transgén pueden evitarse mediante acciones planificadas anticipadamente: manejo del cultivo, bancos de germoplasma, cultivos refugio, etc. Sin embargo, la difusión de un transgén hacia poblaciones silvestres emparentadas es difícil de evitar debido a que el polen de los cultivos puede alcanzar grandes distancias. Los cultivos GM ya se utilizan en gran escala, por lo que es necesario evaluar

cuidadosamente el riesgo de escape de transgenes para cada uno de ellos. Esa evaluación, realizada por equipos multidisciplinares, debería considerar los siguientes aspectos: a) Presencia de especies silvestres sexualmente compatibles con el cultivo y la probabilidad de que el transgén difunda en ellas. b) Cambios en las características de poblaciones de patógenos, insectos y malezas relacionadas con el cultivo GM y medidas para evitar o retardar la aparición de biotipos resistentes. c) Cambios en la dinámica de poblaciones de otras especies vegetales y animales que comparten el hábitat (polinizadores, parásitos y predadores, microflora y fauna del suelo).

Lecturas recomendadas

- Adam, D. 2003. Transgenic crop trial's gene flow turns weeds into wimps. *Nature* 421:462.
- Ahl Goy P, Duesing JH. 1996. Assessing the environmental impact of gene transfer to wild relatives. *Biotechnology* 14: 39-40.
- Burke JM, Rieseberg LH. 2003. Fitness effects of transgenic disease resistance in sunflowers. *Science* 300: 1250.
- Clark A. 2006. Environmental risks of genetic engineering. *Euphytica* 148: 47-60
- Craig W, Tepfer M, Degrassi G, Ripandelli D. 2008. An overview of general features of risk assessments of genetically modified crops. *Euphytica* DOI 10.1007/s10681-007-9643-8.
- Ellstrand NC. 2003. *Dangerous Liasons? When cultivated plants mate with their wild relatives.* The Johns Hopkins University Press, Baltimore and London.
- Engels JMM, Ebert AW, Thormann I, de Vicente MC. 2006. Centres of crop diversity and/or origin, genetically modified crops and implications for plant genetic resources conservation. *Genetic Resources and Crop Evolution* 53:1675-1688.
- Hails RS, Morley K. 2005. Genes invading new populations: a risk assessment perspective. *Trends in Ecology and Evolution* 20: 245-252.
- Hills MJ, Hall L, Arnison PG, Good AG. 2007. Genetic use restriction technologies (GURTs): strategies to impede transgene movement. *Trends in Plant Science* 12: 177-183.
- McGaughey WH. 1985. Insect resistance to the biological insecticide *Bacillus thuringiensis*. - *Science* 229: 193-195.
- Pilson D, Prendeville HR. 2004. Ecological effects of transgenic crops and the escape of transgenes into wild populations. *Annu Rev Ecol Evol Syst* 35:149-174.
- Sanchis V, Bourguet D. 2008. *Bacillus thuringiensis*: applications in agriculture and insect resistance management. A review. *Agron Sustain Dev* 28: 11-20.
- Scott SE, Wilkinson MJ (1998) Transgene risk is low. *Nature* 393: 320
- Snow AA, Pilson D, Rieseberg LH, Paulsen MJ, Pleskac N, Reagon MR, Wolf DE, Selbo SM (2003) A Bt transgene reduces herbivory and enhances fecundity in wild sunflowers. *Ecological Applications* 13: 279-286
- Spencer LJ, Snow AA (2001) Fecundity of transgenic wild-crop hybrids of *Cucurbita pepo* (Cucurbitaceae): implications for crop-to-wild gene flow. *Heredity* 86: 694-702
- Vacher C, Weis AE, Hermann D, Kossler T, Young C, Hochberg ME (2004) Impact of ecological factors on the initial invasion of Bt transgenes into wild populations of birdseed rape (*Brassica rapa*). *Theor Appl Genet* 109: 806-814
- Warwick SI, Légère A, Simard MJ, James T (2008) Do escaped transgenes persist in nature? The case of an herbicide resistance transgene in a weedy *Brassica rapa* population. *Molecular Ecology* 17: 1387-1395.

VI. CAPÍTULO 4

Detección de OGM en la Cadena Agroalimentaria

Florencia Longo; Ana Vicario

Introducción

En el año 1996 se aprobó para su comercialización en Argentina la primera variedad vegetal mejorada que llevaba una característica transgénica. Se trató de una variedad de soja con tolerancia a un herbicida. A partir de ese momento y hasta la actualidad Argentina ha aprobado 10 eventos transgénicos más: 9 en maíz y 2 en algodón.

A grandes rasgos, una planta genéticamente modificada es aquella a cuyo genoma se han incorporado uno o más transgenes mediante alguna de las técnicas de ingeniería genética. Estos transgenes poseen una secuencia nucleotídica específica y algunos de ellos se expresan generando una proteína nueva en el organismo, lo cual le va a conferir un nuevo fenotipo, o característica especial a la planta.

Según la definición de la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA), un organismo genéticamente modificado (OGM), “es un organismo al cual se le ha introducido, en forma deliberada y controlada, alguna modificación en su material genético haciendo uso de las técnicas modernas de biología molecular. Esta modificación consiste en incorporar información para conseguir que el organismo adquiera una determinada característica que antes no poseía”. Se denomina entonces “evento transgénico” a un OGM caracterizado por un segmento específico de ADN nuevo que se ha insertado de manera definida y controlada en el genoma original”.

Mundialmente existen otros eventos aprobados por distintos países, en otras especies como colza, alfalfa, papaya y tomate, entre otros (www.ISAAA.org). Según datos de la International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications (ISAAA), en el año 2007 existían 23 países que cultivan semillas transgénicas, siendo los ocho principales Estados

Unidos, Argentina, Brasil, Canadá, India, China, Paraguay y Sudáfrica. Dentro de los países de la Unión Europea se encuentran Francia, España y Polonia quienes cultivan semillas con algunos de los eventos existentes. En total suman 114,3 millones de hectáreas OGMs para sembradas con la campaña 2007/2008.

La aplicación de la biotecnología moderna en la cadena de producción de los alimentos ha generado grandes controversias en todo el mundo. Esto ha provocado que muchos países, especialmente los de la Unión Europea, impongan restricciones al ingreso de productos que contengan organismos modificados genéticamente. Así se han generado normativas que regulan las transacciones internacionales de estos productos, como el Protocolo de Cartagena sobre Seguridad de la Biotecnología del Convenio sobre la Diversidad Biológica. Este protocolo establece un sistema regulatorio para el intercambio y manejo de los organismos vivos genéticamente modificados, con especial énfasis en su movimiento transfronterizo. Esto requiere de entrenamiento especializado tanto en técnicas de laboratorio como de gestión de la producción y de la armonización internacional de estos métodos.

Aunque las normas de etiquetado y comercialización de granos genéticamente modificados (GM) y sus derivados difieren de un país a otro, en todos los casos se requiere de metodologías capaces de detectar niveles muy bajos de proteínas, ácido desoxirribonucleico (ADN), semillas o granos GM, éstos últimos, con distinto grado de procesamiento industrial, y para los cuales se puede solicitar determinar tanto la presencia de estructuras comunes a cualquier evento (lo que se denomina “screening”) como la de eventos particulares y su cuantificación.

Como se mencionó anteriormente, la secuencia que se introduce en un OGM puede dar origen a una proteína y ésta, a su vez, a un determinado fenotipo. Es por eso, que para determinar la presencia de organismos transgénicos en una muestra o lote de un determinado producto, se podrá verificar la presencia de determinadas secuencias de ADN, de proteínas o de características fisiológicas de las plantas. Estas determinaciones podrán ser de tipo cualitativa o cuantitativas, dependiendo del método analítico se que utilice.

A continuación se detallan los métodos y enfoques de análisis más utilizados. Asimismo, se enuncian algunas consideraciones generales al momento de llevar adelante los ensayos y la estructura física que se recomienda que dispongan los laboratorios que realizan este tipo de ensayos. Finalmente se hace una revisión de las normas internacionales que existen en la materia.

Estrategias de análisis

Ensayos cualitativos

Los ensayos cualitativos se refieren a aquellos que dan una respuesta positiva o negativa respecto de la presencia de un analito. Es decir, en el caso de los transgénicos, aquellos que determinan presencia o ausencia de una secuencia de ADN, de proteína o fenotipo debido al transgén. Un ensayo típicamente cualitativo es el bioensayo, pero también lo es una PCR (*Polymerase Chain Reaction*) en tiempo final, un análisis de proteínas utilizando tiras reactivas o un ensayo ELISA (*Enzyme-Linked ImmunoSorbent Assay*) cualitativo.

Ensayos semi-cuantitativos: sub-muestreo

Estos ensayos implican el análisis de una determinada cantidad de sub-muestras de análisis (grupos o “*pooles*”). Para cada sub-muestra, la presencia o ausencia de un determinado analito, se determina de manera cualitativa. La estrategia radica en el análisis de una determinada cantidad de grupos (N) de tamaño conocido de semillas o granos (m) y la estimación estadística (siguiendo una distribución binomial o de poisson) del porcentaje de analito presente en la muestra. Existen planillas de cálculo con ayuda de las cuales se puede decidir sobre el número de semillas o granos a utilizar y el tamaño y cantidad de grupos, según un porcentaje de confianza establecido para la prueba y un límite máximo de OGM aceptado para la muestra o lote en estudio (Programa estadístico SeedCalc v8).

Esta estrategia puede llevarse a cabo utilizando tanto una PCR en tiempo final como ensayos para determinación de proteínas (ensayo inmunológico del tipo ELISA en placa o tiras

reactivas), teniendo en cuenta que el tamaño de los grupos de análisis no debe ser mayor a la sensibilidad del método utilizado (es decir, si el método es capaz de detectar una semilla transgénica en 500 semillas, los grupos de análisis no deben ser mayores a 500 semillas).

Ensayos cuantitativos

Los ensayos cuantitativos se refieren a la determinación del porcentaje de OGM en una muestra o lote. Esta cuantificación es posible debido a la metodología empleada y no debido a una estimación estadística, como en el caso del sub-muestreo. La técnica cuantitativa por excelencia, ampliamente utilizada en las transacciones comerciales, es la PCR en tiempo real o PCR cuantitativa.

Métodos de Detección

Bioensayos

Este método cualitativo consiste en la evaluación de la respuesta fisiológica de manera de determinar la presencia del transgén buscado, como por ejemplo la tolerancia a un herbicida. En el caso de plantas tolerantes a un herbicida, el ensayo consiste en poner a germinar las semillas y evaluar la emergencia de plántulas normales bajo el efecto del herbicida. El porcentaje de plántulas tolerantes se determina contando a aquellas normales sobre las semillas totales. Paralelamente a este ensayo debe realizarse el ensayo control, que consiste en la prueba de germinación sin el herbicida, de manera de determinar el poder germinativo de la muestra.

La evaluación de la resistencia a insectos se realiza mediante ensayos biológicos complejos y de larga duración, y es por eso que los bioensayos no son una alternativa práctica para dicha característica.

El bioensayo para tolerancia a herbicida requiere aproximadamente una semana para completarse, o el tiempo que tome lograr obtener una plántula para la especie en estudio. La cantidad de semillas a evaluar se determina según el porcentaje de confianza con el que se desee realizar la prueba y en función del límite máximo de OGM aceptado para la muestra o lote (www.seedtest.org).

Determinación de proteínas

Las proteínas producto de la expresión de un transgén pueden determinarse utilizando una reacción inmunológica de tipo proteína GM-anticuerpo que es posible realizar tanto en placa (ELISA), como sobre un soporte de nitrocelulosa (tiras reactivas o *immunostrips*). Básicamente estos ensayos consisten en la detección de la sustancia de interés (la proteína) mediante la formación de un complejo antígeno-anticuerpo que luego es detectado mediante un complejo enzimático que se une específicamente al complejo anterior permitiendo su visualización. Es aconsejable que se realicen sobre semillas/grano u otro material vegetal “joven”, ya que las proteínas se degradan con facilidad, y es por eso también que no se recomienda su uso para casos de alimentos procesados.

El nivel de expresión de las proteínas varía según el tejido del que se trate, desde niveles muy altos hasta trazas casi imperceptibles. Es por eso que se recomienda, además de seguir -en el caso de utilizar los “kits” comerciales-, las instrucciones del fabricante, contar con los correspondientes controles de los ensayos. Utilizando esta metodología se pueden obtener resultados en unas pocas horas. Según el evento transgénico del que se trate, los niveles de proteínas varían en los distintos tejidos de la planta. Pueden ser mucho más altos en hojas o raíces y prácticamente nulos en granos y por lo tanto es bueno considerarlo antes de tomar decisiones sobre los ensayos a realizar. Para obtener más información sobre tejidos de expresión de proteínas transgénicas se puede consultar el sitio AGBIOS (<http://www.agbios.com>).

Asimismo, hay que considerar que distintos eventos transgénicos han incorporado las mismas proteínas por lo que no es posible, en estos casos, determinar de qué evento se trata si el resultado es positivo.

Este tipo de análisis solo tiene utilidad cuando se lo realiza sobre muestras o tejidos que expresan la proteína GM y en productos sin procesamiento como hojas, granos y los primeros productos de la molienda, pero no en alimentos donde las proteínas se desnaturalizan por completo y pierden sus propiedades inmunológicas. Por otra parte, la detección de

la proteína GM depende de que ésta se exprese en el tejido de análisis. Puede ocurrir que no sea posible generar un anticuerpo para detectar la proteína introducida debido a que es muy similar a proteínas propias de la planta original y por lo tanto no se pudo obtener un anticuerpo que detecte a la proteína introducida sin detectar también la ya presente en la planta, lo que se denomina reacción cruzada.

La determinación de proteínas es un ensayo de tipo cualitativo, aunque en el caso de ELISA en placa, es posible ajustarlo de manera tal de poder realizar una determinación cuantitativa. En el caso que se realicen ensayos utilizando una estrategia de sub-muestreo, debe tenerse en cuenta el nivel de sensibilidad del ensayo (tanto en ELISA como en tiras reactivas). La cantidad de semillas o granos a evaluar así como la cantidad de grupos y su tamaño, se determina según el porcentaje de confianza con el que se desee realizar la prueba y en función del límite máximo de OGM aceptado para la muestra o lote (www.seedtest.org).

Este tipo de determinación es sencilla de realizar y no necesita alta capacitación del personal ni materiales o equipos sofisticados. Entre los inconvenientes que presenta se encuentran que no permite la identificación entre cultivos distintos que presentan la misma proteína GM (ya sea en cuanto a especie o con relación a la construcción introducida). Sumado a ello, es preciso aclarar que su utilización para la cuantificación puede conducir a errores debido a las diferencias en los niveles de expresión de la proteína GM por el origen del tejido, su variación con la edad de la planta o por el efecto de las condiciones ambientales en las cuales se desarrolla.

Existe una gran diversidad de anticuerpos para distintas proteínas provenientes de un transgén. Se puede obtener más información visitando las páginas web de distintos proveedores.

Determinación de secuencias transgénicas

La determinación de secuencias de ADN, molécula que lleva la información genética de un organismo, es uno de los ensayos más utilizados para estudiar la presencia de un tran-

gén. Este análisis se lleva a cabo mediante la Reacción en Cadena de la Polimerasa, o PCR en sus siglas en inglés.

Esta reacción imita lo que ocurre naturalmente al momento de duplicarse la carga genética de una célula (duplicación del ADN), sólo que en este caso se copia un solo y relativamente pequeño fragmento de ADN de manera tal de generar miles de copias. La PCR es una reacción química exponencial, es decir, a partir de un fragmento de ADN, se obtienen dos, y de esos dos, cuatro y luego ocho, etc. Esto hace que luego de 30 ciclos de amplificación, se obtengan miles y miles de fragmentos iguales, permitiendo así la visualización de los mismos. Esta visualización puede hacerse mediante distintos procedimientos. Los más frecuentes son en geles de agarosa, geles de poliacrilamida o sistemas cuantitativos de detección como en el caso de la PCR en tiempo real.

La PCR es un proceso altamente específico que permite determinar el evento transgénico que contiene una muestra, algo que no se puede lograr de manera fehaciente con los otros métodos, como los que nos permiten evaluar una respuesta fisiológica o la presencia de determinadas proteínas. Esta especificidad está dada por los “*primers*” o cebadores que son pequeños fragmentos de ADN que reconocen la secuencia a amplificar y se adhieren a ella (lo que se conoce como “*annealing*”) permitiendo iniciar la reacción de amplificación. Distintos “*primers*” son capaces de pegarse en diferentes zonas del fragmento de ADN introducido. Estas zonas son cuatro: *secuencias promotoras o terminadores* que suelen ser comunes a varios eventos; el *gen* que confiere el carácter específico; una región denominada “*construcción específica*” que es aquella que vincula distintos elementos del fragmento de ADN introducido, por ejemplo la región promotora y el gen; y lo que se denomina “*evento específico*” que es una región que vincula el fragmento introducido con el genoma original de la planta.

El ensayo de PCR puede ser de tipo cualitativo, lo que se conoce como PCR convencional o en tiempo final, o cuantitativo, refiriéndose a la PCR en tiempo real. En el primer caso, se puede estimar el porcentaje de un OGM en una muestra o lote siguiendo una estrategia

de sub-muestreo, como se explicó más arriba, siempre contando con los controles adecuados para el ensayo.

En el caso de la PCR en tiempo real, se obtienen resultados cuantitativos, debido a que se realiza una reacción con características especiales. La técnica de PCR en tiempo Real resulta ser una alternativa a la PCR convencional con la que se obtienen resultados cuantitativos muy precisos del número de copias o la actividad transcripcional de un gen particular en un menor tiempo. La denominación de “tiempo real” se debe a que el ADN amplificado puede ser detectado en línea durante el proceso de PCR y no al final del mismo, como sucede con la PCR convencional. La lectura de los resultados se realiza durante la fase exponencial de la reacción, garantizando así una cuantificación más adecuada y precisa del producto amplificado.

La PCR en tiempo real permite obtener una mayor sensibilidad y especificidad y reduce la posibilidad de contaminación por presencia de productos de PCR ya que no es necesario, una vez terminada la reacción, manipular los productos de amplificación (ver más adelante las consideraciones generales para los ensayos). Entre las desventajas que presenta frente a la PCR convencional se puede señalar su mayor costo, tanto en el equipo como en los reactivos utilizados y la complejidad del diseño de los cebadores y sondas, que en muchos casos resulta más exigente.

La PCR en tiempo real combina el uso de un termociclador, un fluorímetro y un ordenador. El termociclador efectúa la PCR en condiciones donde un fluorocromo excitado por un láser va emitiendo una señal de manera proporcional a la cantidad de ADN que se va generando durante los sucesivos pasos de la reacción. La emisión de la señal fluorescente es enviada al lector de fluorescencia que cuantifica la señal emitida. El ordenador procesa la información y despliega, durante cada ciclo de amplificación, la fluorescencia leída en cada muestra. La señal aparecerá claramente a partir de un número determinado de ciclos, dependiendo de la concentración de partida de la secuencia de interés, es decir, la señal es apreciable por el equipo una vez que sobrepasa el límite infe-

rior de detección. A partir de ése momento, la cinética de la reacción debe permitir la acumulación de la señal de manera exponencial en el tiempo. La señal de fluorescencia generada es directamente proporcional a la cantidad de producto de PCR amplificado. Existen actualmente distintas metodologías para la detección del producto de amplificación utilizando la PCR en tiempo real. Ellas son las sondas fluorescentes y los agente intercalantes de ADN. Desde hace algunos años, esta metodología ha sido adoptada para realizar los análisis de validez comercial.

Nuevas metodologías

Cada vez son más los eventos transgénicos aprobados para su comercialización. Anteriormente, utilizando “*primers*” para la amplificación de la secuencia promotora denominada 35S, o el terminador NOS, comunes a la mayoría de los eventos, era posible determinar la presencia de ADN transgénico en una muestra. Si no se detectaba la presencia de alguna de esas secuencias en la muestra, se podía inferir que ésta no contenía el 90% de los eventos comerciales. Se prevé que en el futuro, existirán gran diversidad de secuencias a determinar (debido a nuevos genes introducidos) y que, si las exigencias comerciales de etiquetado continúan, se requerirá de sistemas más sofisticados que permitan detectar varias secuencias a la vez y de manera rápida.

Existe una tecnología, relativamente nueva, denominada de microchips o microarrays o micromatrices, que podría permitir detectar y cuantificar en un solo ensayo la presencia de cientos o miles de secuencias. A grandes rasgos, una micromatriz es un pequeño soporte sólido del tamaño de un cubre objetos de los utilizados en microscopía óptica, en el cual se han fijado puntos ordenados y microscópicos de secuencias de ADN de simple cadena conocidas. Estas secuencias tienen la capacidad de pegarse (hibridar) con un ADN que le sea complementario, y que estará marcado con una molécula fluorescente. Si existen secuencias complementarias, ocurrirá la hibridación y el punto de la micromatriz quedará marcado. Para poder realizar la observación de este pequeño punto, un aparato de barrido especial

realizará la lectura, identificando los puntos marcados y por lo tanto las secuencias que estén presentes en la muestra bajo análisis.

La ventaja que presentan las micromatrices es que posibilita la detección simultánea de decenas de miles de secuencias de ADN distintas. Entre los inconvenientes que se presentan se puede señalar los costos elevados, la falta de referencias adecuadas para la validación del método, la complejidad sobre los criterios a utilizar para la interpretación estadística de los datos obtenidos así como las dificultades para obtener resultados cuantitativos sensibles y reproducibles para los niveles exigidos en la actualidad para la detección de OGMs.

Actualmente se encuentra en el mercado un sistema para detección simultánea de eventos transgénicos que se basa en una PCR en tiempo final. Es el denominado GMO Dualchip que contiene 14 genes y 20 controles en triplicado. Para más información se puede consultar www.coextra.eu/researchlive/reportage_1120.html.

Valoración comparativa de los distintos métodos de análisis

Ver Tabla comparativa (tabla 1).

Consideraciones generales sobre los ensayos

Falsos Negativos

Se define como “falsos negativos” a aquellas reacciones para las que NO se detecta proteína o secuencia de ADN, cuando en realidad sí la contienen. Estos resultados pueden darse por diversas razones: la presencia de sustancias inhibidoras de la reacción que se está llevando a cabo; ADN o proteínas degradados por diversos motivos (por ejemplo, tratamientos y tiempos excesivos previo al envío de la muestra al laboratorio, por tratamientos de preparación de la muestra en el laboratorio); tamaño de la muestra inferior al requerido para el análisis; incorrecta elección del método o de la estrategia de análisis, presencia del analito a detectar por debajo del límite de detección del método. Para la detección de los falsos negativos se utilizan de manera rutinaria distintos controles

Tabla1.

Bioensayo			Determinación de proteínas		PCR tiempo final		PCR tiempo real
Objetivo del ensayo	Detección de características biológicas o de una respuesta fisiológica	Determinación de proteínas.		Detección de secuencias de ADN	Detección de secuencias de ADN		Detección de secuencias de ADN
Tipo de resultado	Cualitativo	Cualitativo		Semi-cuantitativo (utilizando la estrategia de sub-muestreo) ELISA en placa puede ser cuantitativo	Cualitativo		Cuantitativo
		Semillas, granos, plántulas	Semillas, granos, material verde joven, raíces, alimentos sin procesamiento		Semillas, granos, tejidos, alimentos con y sin procesamiento	Semillas, granos, tejidos, alimentos con y sin procesamiento	
Matriz sobre la que se puede realizar							
Ventajas	Para tolerancia a herbicidas (TH). Método sencillo, preciso y económico	Método sencillo y fácil de llevar a cabo. Permite la detección "in situ". No necesita material ni instalaciones sofisticadas. Preciso, exacto y rápido.					
Desventajas	Demora para la lectura de los resultados (al menos una semana para TH). Para resistencia a insectos: Método costoso y de difícil realización	Necesita una buena expresión de la proteína en la matriz de análisis. Debe conservarse intacta la estructura proteica a detectar. No permite la identificación entre eventos GM distintos que expresen la misma proteína. Problemas para la cuantificación directa (ELISA en placa). No permite la identificación de proteínas similares entre la proteína GM y la convencional					
Preparación de la muestra	Preparación sencilla	Requiere de pasos previos para la extracción de proteínas. En general son procedimientos sencillos					
Tiempo promedio para obtención de los resultados	Dependiendo del cultivo, entre 7 y 10 días	Horas					Días (1 a 2 días)
Nivel de preparación personal	Requiere manejo mínimo de la técnica.	Requiere mayor capacitación en el caso de ELISA en placa.					Capacitación en técnicas de biología molecular
Exigencia para instalaciones	Instalaciones básicas	Laboratorio con instalaciones básicas. Puede realizarse <i>in situ</i> (tiras reactivas) y laboratorios básicos de inmunología (ELISA en placa)					Laboratorio de Biología Molecular
Aplicación del método	En general para determinación de pureza del carácter por organismos de control o la industria semillera.	Determinación de pureza del carácter y presencia adventicia por parte de organismos de control y/o la industria semillera.					Por tratarse de determinaciones cuantitativas, es el método de elección para transacciones comerciales.
Uso habitual	En semillas (para TH). No se aplica hasta el momento para la caracterización de resistencia a insectos	Método de screening rápido en semillas, tejidos varios y alimentos sin procesamiento					Transacciones comerciales en todo tipo de matriz donde exigen resultados cuantitativos
Material de referencia a utilizar	Semillas o granos GM y no GM	Material GM y no GM (Granos, semillas y/o tejidos). Disponibles comercialmente para algunas especies y eventos.					Harinas GM, ADN y plásmidos. Disponibles comercialmente para algunas especies y eventos.

durante el análisis. Entre estos controles, se encuentran las muestras positivas para la característica a detectar y controles específicos para la detección de sustancias inhibitoras del análisis.

Falsos positivos

Se define como “falsos positivos” a aquellas reacciones para las que se detecta proteína o secuencia de ADN, cuando en realidad NO la contienen. Gran parte de este tipo de resultados no provienen de la muestra original, sino que se deben a la contaminación de la misma por errores de manipuleo. La contaminación puede darse a lo largo de todo el proceso de análisis. Esta puede ser previa al envío de la misma al laboratorio así como dentro del laboratorio, ya sea durante la preparación de la misma para el análisis como en el momento de su detección específica. La técnica de PCR es muy sensible, por lo tanto niveles ínfimos de contaminación con ADN en una muestra pueden generar un resultado positivo falso. La amplificación repetida del mismo fragmento de ADN (amplicón) va generando cientos de miles de millones de copias dentro del mismo laboratorio y estas copias pueden contaminar las nuevas muestras y los reactivos si no se tienen cuidados especiales. Además, restos de mollienda de semillas o granos u otros tejidos vegetales de muestras previas, pueden llevar la contaminación a nuevas muestras. Asimismo, en el caso de la PCR pueden informarse falsos positivos por elección de una estrategia de detección inadecuada. Los casos más comunes se dan cuando se realiza la detección del Promotor 35S en crucíferas o en alimentos que las contengan (por infección con el virus del Mosaico del Coliflor) y en el caso de *Agrobacterium* con la detección del Terminador NOS.

Para la detección de los falsos positivos se utilizan de manera rutinaria controles negativos. Estos controles consisten en muestras que no contienen la característica especial que cada método permite detectar (secuencia de ADN, proteína o directamente la matriz a analizar).

Límite de Detección y Límite de Cuantificación

Se considera como límite de detección a la mínima concentración del analito de interés

presente en la muestra, que puede ser detectado. Este límite varía de acuerdo al método de elección y dentro de cada método, de acuerdo al tipo de muestra analizada.

El límite de cuantificación es la menor concentración del analito de interés presente en la muestra de estudio que puede ser cuantificado con un aceptable nivel de exactitud y precisión.

En ambos casos, dependerá de la matriz sobre la que se realiza el análisis y del método en sí mismo. Es de suma importancia conocer estos límites de manera de aplicar adecuadamente los métodos. El laboratorio deberá entonces validar sus metodologías mediante ensayos de validación y en lo posible mediante pruebas de interlaboratorio.

Los materiales de referencia

Los materiales de referencia son una herramienta fundamental para cualquier análisis. Por un lado, permiten conocer como se comporta el método con una muestra positiva y con una negativa para la característica a detectar, y por otro son fundamentales para la validación del mismo y su comparación con otros laboratorios. Comercialmente se encuentran materiales de referencia disponibles y confiables para distintos eventos y concentraciones. Los más utilizados y difundidos son las harinas o granos GM, las secuencias de ADN y los plásmidos.

En la actualidad no existe un único material de referencia que pueda aplicarse para la detección y/o cuantificación de todos los productos a ser analizados. Ello conduce a que, cuando estén disponibles, éstos deben ser elegidos y utilizados de acuerdo al tipo de matriz que se quiere analizar. No siempre es sencillo establecer cuál es el mejor material de referencia a ser utilizado como control positivo, sobre todo para efectos de cuantificación, ya que el número de copias por genoma haploide varía para cada evento, además de la existencia de variables propias para las matrices de cada muestra. En relación a los controles negativos, se debe asegurar la ausencia de la característica GM por debajo de cierto umbral y con un rango de tolerancia.

La temática de los materiales de referencia presenta una serie de consideraciones, complejidades, problemáticas y usos que exceden

los límites de este capítulo. Es por ello que sólo se hace esta mención a los mismos.

Redacción del informe de resultados

Los resultados de cada ensayo efectuado por el laboratorio, deben ser informados en forma exacta, clara, no ambigua y objetiva. Es necesario que se especifiquen los datos del laboratorio que realizó el ensayo y los datos del cliente, así como también la descripción del método utilizado con sus respectivos límites de detección y cuantificación, cuando corresponda. Además, deben indicarse las condiciones y cantidad de muestra recibida en el laboratorio así como la cantidad utilizada para hacer el análisis, los materiales de referencia utilizados y su resultado (que deben ser según lo esperado), el nivel de confianza de la prueba y cualquier observación o interpretación que se considere necesaria.

La forma correcta de presentar los resultados para análisis de tipo cualitativo debe contener: *"No se detectó"* o en el caso de dar positivo *"Se detectó la presencia de material GM o de la secuencia XX o proteína XX en la muestra al límite de detección de la técnica"*. Cuando corresponda, se puede informar el lote a partir del cual se tomó la muestra analizada.

En el caso de resultados para análisis cuantitativos, se informará como *"Menor al límite de detección de la técnica"* (para aquellos resultados donde no se detecte el analito en estudio) y en valor numérico (porcentaje) cuando el resultado sea positivo y no supere el rango de linealidad del método de laboratorio. Siempre deben quedar indicadas en el informe las unidades en las que se expresan los resultados así como los límites de detección, de cuantificación y la incertidumbre para la matriz en estudio.

En el caso de análisis por PCR todavía no existe una única forma de expresar los resultados. Es por ello muy importante para la comprensión de los resultados que cada laboratorio indique claramente las unidades en que informan los mismos. Algunas de estas expresiones refieren a "masa GM/masa total de la matriz", "secuencias de ADN GM /ADN total en la matriz por especie". Para el caso de semillas, ISTA se ha manifestado al respecto (consultar www.seedtest.org).

Existen además múltiples consideraciones, ya sean biológicas, de muestreo o del método analítico a tener en cuenta cuando se realiza la cuantificación. Entre ellas señalamos el estado de ploidía de la matriz bajo análisis, el estado de cigosis, el método de detección elegido, el muestreo utilizado y la cantidad de muestra para la realización del análisis así como los materiales de referencia utilizados y la presencia de eventos apilados en la matriz bajo estudio.

Consideraciones generales para la infraestructura básica de los laboratorios

El laboratorio donde se realizan los análisis debe ser un ámbito de trabajo que permita la adecuada realización de los mismos. Para ello se requiere contar con instalaciones y condiciones ambientales que cumplan con los requisitos de confort y con los recursos necesarios para no poner en riesgo al personal que trabaja en el mismo ni la calidad de los análisis realizados. El grado de complejidad de esta infraestructura depende del tipo de análisis en cuestión. Los laboratorios con mayor grado de sofisticación en su infraestructura y condiciones de trabajo son aquellos que utilizan la técnica de PCR.

Debido a la contaminación cruzada que se puede originar, especialmente cuando se realizan ensayos por PCR, es fundamental tener máximos cuidados en el manipuleo de las muestras y de todos los materiales e instrumentos utilizados para realizar los ensayos. En este tipo de laboratorios se requiere de un ámbito de trabajo especialmente diseñado con cuatro áreas separadas para las distintas etapas del análisis y con un flujo unidireccional de la muestra desde el ingreso (zona limpia, donde no hay productos de amplificación) hasta la zona donde se leerá el resultado (zona "sucia").

En el primer cuarto se realiza la preparación -y en aquellos caso que se requiera- molien- da de la muestra, en el segundo se realiza la extracción y purificación el ADN, en un tercero se prepara la reacción de PCR y en el último se produce la amplificación (y observación del resultado en el caso de la PCR cuantitativa) y luego la electroforesis. En este último paso, para el método de PCR en tiempo final, se abre

el tubo de reacción y es donde existe mayor posibilidad de “escape” de los productos de amplificación, por lo tanto es el punto de mayor posibilidad de contaminación. Es conveniente que el primer y último cuarto tengan presión negativa (de manera de sacar al exterior la posible fuente de contaminación), mientras que en el de purificación y PCR la presión debe ser positiva (permitiendo el ingreso de aire limpio).

Cada cuarto debe ser limpiado regularmente con hipoclorito de sodio, en lo posible poseer un sistema de luz ultra violeta (UV) para la destrucción del ADN y contar con sus propios elementos de seguridad para el trabajo (guardapolvos, guantes, anteojos protectores), instrumentos y materiales (equipos en general, pipetas, tips). Se recomienda que sólo personal autorizado para el trabajo dentro de cada área ingrese a los laboratorios para minimizar el transporte de productos de amplificación de un cuarto a otro.

Los organismos internacionales y la determinación de OGM

Normas ISO

La Internacional Standarization Organization (ISO en sus siglas en inglés), a través del Working Group 7 (WG 7) se ha ocupado en los últimos 8 años de la redacción de normas específicas en el tema. Estas se han desarrollado bajo el Acuerdo de Viena donde la Comisión Europea de Normas (CEN) es quien lidera el desarrollo normativo. En la actualidad 5 normas han sido publicadas bajo el Acuerdo y una Especificación Técnica (TS) que sólo fue publicada por ISO. Estas normas son:

Protein Based Methods (ISO 21572 - Publicada en 2004; Modificada en el año 2005 donde el anexo pasó a ser informativo).

Nucleic Acid Extraction (ISO 21571 – Publicada en febrero 2005).

Qualitative Nucleic Acid Based Methods (ISO 21569 - Publicada en julio 2005).

Quantitative Nucleic Acid Based Methods (ISO 21570 - Publicada en noviembre 2005).

General Requirements and Definitions (ISO 24276 - Publicada en febrero 2006).

Acceptability Criteria for Methods (TS – ISO 21098 - Publicada en febrero 2006).

La norma que discute el tema de toma de

muestras propuesta por la CEN, fue rechazada por ISO, dado que manifestó que ya contaba con normas específicas para la toma de muestra para el caso de cereales y oleaginosas. Este documento sólo continuó su estudio dentro de la normativa CEN.

Reglas ISTA

La Asociación Internacional de Análisis en Semillas (ISTA en sus siglas en inglés) publicó en el año 2006 su estrategia para la determinación de semillas GM. Específicamente manifiesta que, debido a que las técnicas para determinación de transgénicos son tan diversas, y que se espera que continuamente se incorporen nuevos ensayos debido a la aparición de nuevos eventos, no es posible fijar metodologías. Es por ello, que elabora una estrategia de acreditación de laboratorios para la detección de características específicas. La misma se basa en el cumplimiento de una serie de requisitos técnicos, de capacitación, de desempeño y de la gestión por parte de los laboratorios. Más detalles sobre los documentos referidos a este tema se pueden encontrar en www.seedtest.org.

Consideraciones finales

El desarrollo y aprobación para la comercialización de los distintos cultivos genéticamente modificados en el mundo ha generado diversas y variadas acciones y reacciones. En el ámbito del comercio mundial se han puesto en marcha distintos procedimientos, legislaciones y protocolos tendientes a conocer y regular su producción y comercialización.

La necesidad de monitorear, identificar y en algunos casos cuantificar la presencia o no de OGMs y sus derivados ha generado el desarrollo y la implementación de distintas herramientas analíticas que permiten la detección de los diferentes cultivos GM y sus derivados. Asimismo, los laboratorios han debido desarrollar, adaptar y validar métodos para poder detectar este tipo de eventos.

Distintos organismos internacionales dedicados a la elaboración de normas se han ocupado del desarrollo de diversos procedimientos con la intención de unificar criterios para la determinación de OGMs. Este desarrollo normativo se

encuentra todavía en discusión, principalmente para el caso de granos y alimentos. Los principales puntos de conflicto se refieren a la toma de muestra y a la expresión de los resultados para las PCR cuantitativas.

La constante aprobación de nuevos eventos en los distintos países plantea el desafío de la continua actualización y el desarrollo de nuevos métodos y sistemas para la determinación de OGMs en semillas granos y alimentos que se dirigen a países con sistemas de control de OGMs

Es de esperar que en el futuro las decisiones que involucren la implementación de sistemas de control de OGMs tengan en cuenta las distintas y múltiples voces y situaciones, aun aquellas que parecen antagónicas. Para ello, será fundamental que las decisiones políticas y los fundamentos científicos trabajen de manera conjunta y coordinada.

Lecturas recomendadas

CONABIA. Definición de eventos.

<http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/biotecnologia/respuestas.php>

CONABIA. Eventos aprobados comerciales.

http://www.sagpya.mecon.gov.ar/new/0-0/programas/conabia/bioseguridad_agropecuaria2.php#eventos

ISAAA. [www.ISAAA.org](http://www.isaaa.org).

<http://www.isaaa.org/resources/publications/briefs/37/executivesummary/default.html>

ISTA www.seedtest.org. Herramientas estadísticas para el análisis de semillas.

<http://www.seedtest.org/en/content---1--1143.html>

ISTA www.seedtest.org. Información referida a análisis de OGM.

http://www.seedtest.org/en/info_platform_for_gm_seed_content---1--1195.html.

ISTA www.seedtest.org. Acreditación de Laboratorios que realizan ensayos de determinación de OGM.

http://www.seedtest.org/en/for_specified_traits_content---1--1184.html

ISTA www.seedtest.org. Posición respecto de las unidades de medida.

http://www.seedtest.org/en/clarification_document+_units+_content---1--1273.html

Longo, F, y Castro, IG. 2006. Métodos de Detección de Organismos Genéticamente Modificados (OGMs) en la Cadena Alimentaria. Conceptos básicos para su implementación. Buenos Aires. Editor: Juan Dellacha. 64 páginas.

Tozzini, Alejandro. 2004. Detección de OGM en la cadena agroalimentaria. Parte IX, Capítulo 4. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Editores Viviana Echenique, Clara Rubinstein, Luis Mroginski, Buenos Aires. Ediciones INTA.

VI. CAPÍTULO 5

Manejo integrado de plagas – Programa de Refugios

Viviana Confalonieri; Cecilia Roca

La bioseguridad es uno de los puntos clave que debe ser abordado cuando se introducen organismos genéticamente modificados (OGM) en un ecosistema, así como la perduración en el tiempo del efecto benéfico de estos OGM, particularmente en aquellos casos en los que se han introducido genes de tipo insecticida.

Los cultivos GM con propiedades insecticidas que se encuentran actualmente en el mercado, producen una proteína cristalina (Cry) que proviene de la bacteria *Bacillus thuringiensis* (Bt). Estas proteínas son letales para los insectos susceptibles ya que al ser ingeridas degradan las paredes de su tubo digestivo. Este efecto constituye la base de la defensa contra insectos plaga de todos de los OGM comerciales que se cultivan de la actualidad, reduciendo de este modo el uso de insecticidas químicos, lo que se traduce en beneficios tanto económicos como para la salud y el medio ambiente.

Los organismos Bt fueron cultivados por primera vez a gran escala en 1996, gracias al aval de la “Environmental Protection Agency” (EPA) que permitió su uso comercial. En el año 2007, casi 42 millones de hectáreas en todo el mundo presentaban estos cultivos, con una cantidad acumulativa de más de 200 millones desde 1996. Aunque en la actualidad existe una gran diversidad de toxinas Bt, durante la primera década se cultivaron casi exclusivamente algodón y maíces transgénicos para las toxinas Cry1Ac y Cry1Ab, respectivamente. Estas toxinas matan alguna de las más importantes plagas de lepidópteros.

El aval dado por la EPA en 1996 fue considerado por muchos científicos y ambientalistas como muy prematuro. La mayor preocupación era que se carecía de información sobre la forma de evitar que las especies blanco generaran resistencia al carácter introducido, ya que existían evidencias de que éste fenómeno podía ocurrir en el laboratorio. Esto implicaba

no sólo un riesgo en cuanto a la efectividad de los cultivos Bt, sino que también en cuanto a la pérdida de uno de los más exitosos insecticidas microbianos con los que se contaba hasta ese momento. Se consideró necesario entonces crear un programa de “manejo integrado de plagas” específicamente diseñado para el sector agropecuario, que prevenga justamente el aumento de la resistencia en las poblaciones de insectos que se quería atacar.

El programa de manejo mas conocido que se aplica en la actualidad es el de “alta dosis + refugio” a través del cual altos niveles de expresión de la toxina en las plantas Bt se asocian a “refugios” o extensiones de campo cultivados con plantas libres de Bt. Este programa se viene aplicando hasta ahora con relativo éxito en plantas transgénicas para una única toxina y se cree que será necesario de aplicar también para los cultivos “dobles Bt”.

La función de los refugios es la de mantener alelos susceptibles en las poblaciones de insectos. Los insectos susceptibles que se desarrollan en gran número sobre plantas no transgénicas se cruzarán con los potenciales insectos resistentes que puedan sobrevivir en las plantas transgénicas. La progenie heterocigota que resulte de estos cruzamientos será eliminada por las altas dosis de proteína insecticida presente en las plantas transgénicas (figura 1). En este sentido, juega un papel importante la dosis de la toxina en las plantas Bt, ya que la dominancia funcional de los resistentes disminuye a medida que aumenta la concentración de la toxina. Si los heterocigotos mueren en las plantas Bt, condición que se cumple a medida que el alelo resistente se hace mas recesivo, la resistencia tardará muchas mas generaciones en fijarse.

La teoría que subyace a los programas de manejo integrado se basa fundamentalmente en modelos genético-poblacionales. Los modelos son conjuntos de hipótesis sobre como se relacionan determinados parámetros en un sistema, y permiten simplificar una realidad en la que interactúan diversos factores de manera compleja. Los parámetros que se incorporan en este caso son poblacionales, tales como las frecuencias iniciales de los alelos de resistencia y los coeficientes de selección asociados a

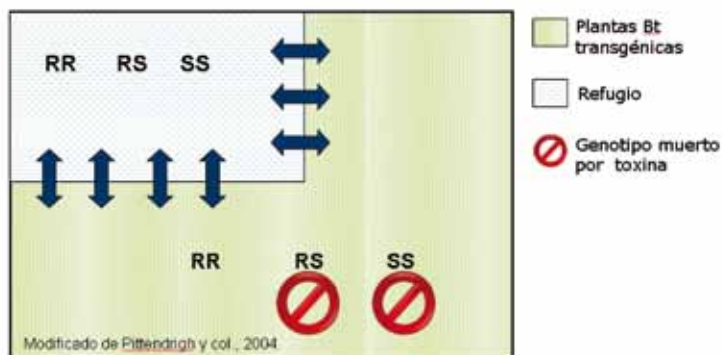


Figura 1. RR, RS y SS genotipos homocigotos resistentes, heterocigotos y homocigotos sensibles a la toxina Bt, respectivamente. Las flechas indican que los insectos pueden circular libremente entre las regiones con plantas transgénicas Bt y con plantas libres de Bt, o refugios.

los distintos fenotipos sensibles y resistentes. De este modo, es posible predecir bajo distintas condiciones ambientales, como será la evolución del carácter en cuestión y estimar valores de fundamental importancia para el sector agropecuario, como lo es el porcentaje mínimo de superficie libre de Bt que se requiere cultivar para evitar que el alelo de resistencia se fije.

El propósito de este capítulo es explicar desde una perspectiva genético-poblacional los fundamentos de estos modelos teóricos y su valor como herramienta predictiva en programas de manejo integrado de plagas. Asimismo, otro objetivo es el de describir los elementos típicos que componen un plan de manejo de resistencia de insectos y por último, presentar un panorama sobre la manera en que estos planes se aplican en Argentina.

Modelos poblacionales y la evolución del gen de resistencia

Como se mencionó previamente, los modelos son simplificaciones de una realidad que es de por sí compleja. Estas simplificaciones implican supuestos que se deben cumplir si se quiere que el modelo efectivamente refleje esa realidad. En el caso particular que se trata en este capítulo se trabajará con una población de insectos que presenta variabilidad para el carácter "resistencia a la toxina Bt", y se analizará, mediante modelos matemáticos, como evolucionaría ese carácter a través de las ge-

neraciones. El carácter se supone que presenta cierto valor selectivo, el cual varía de acuerdo al microambiente disponible: zona con plantas Bt y zona libre de plantas Bt (refugio). Asimismo, existirían sólo dos alelos para ese carácter, S o alelo de sensibilidad y R, o alelo de resistencia. Se definirá "p" como la frecuencia poblacional del alelo "R" y "q" como la frecuencia del alelo "S".

Otros supuestos serán que:

- las generaciones de insectos no se superponen.
- las poblaciones son de tamaño infinito.
- el apareamiento es al azar.
- no existe migración.
- no existe mutación.
- los coeficientes de selección son similares en ambos sexos.

A continuación se deducirá el cambio en la frecuencia del alelo R luego de una generación de selección, siguiendo el modelo clásico descrito en Hartl y Clark (1989) (tabla 1). En la generación "t" se parte de gametas portadoras del alelo de resistencia R y gametas portadoras del alelo de sensibilidad S, en frecuencias p y q respectivamente. Debido a que existe apareamiento aleatorio, las frecuencias de los zigotos que se formen responderán a las frecuencias del equilibrio de Hardy Weinberg: p^2 , $2pq$ y q^2 . Sin embargo, sobre esos zigotos actuará la selección natural (ejercida en este caso particular por los efectos de la toxina Bt) modificando la contribución de adultos a esa generación t + 1 de los genotipos RR, SR y SS en un factor que dependerá del valor adaptativo (W) de cada uno de ellos (W_{RR} , W_{SR} y W_{SS} respectivamente) (tabla 1). Las frecuencias genotípicas relativas se calculan dividiendo por el valor adaptativo medio de la población (W_M) que es igual a:

$$W_M = p^2 W_{RR} + 2pq W_{SR} + q^2 W_{SS} = p (p W_{RR} + q W_{SR}) + q (q W_{SS} + p W_{SR})$$

Las frecuencias de las gametas de cada tipo (p y q) en la generación t + 1 se calculan mediante la fórmula:

Tabla 1. Cambio en las frecuencias genotípicas relativas luego de una generación de selección.

Generación	Estadio del ciclo de vida	Frecuencias		
t	Gametas	R		S
	Frecuencia de las gametas	p		q
t + 1	Genotipos	RR	SR	SS
	Frecuencia de los genotipos (zigotos)	p ²	2pq	q ²
	Fitness (viabilidad)	W _{RR}	W _{SR}	W _{SS}
	Contribución ponderada (adultos)	p ² W _{RR}	2pq W _{SR}	q ² W _{SS}
	Frecuencia relativa de cada genotipo luego de una generación de selección	p ² W _{RR} / W _M	2pq W _{SR} / W _M	q ² W _{SS} / W _M

p = frecuencia relativa de homocigotos RR + ½ de la frecuencia relativa de het. SR

q = frecuencia relativa de homocigotos SS + ½ de la frecuencia relativa de het. SR

Reemplazando de acuerdo a la tabla 1, se obtiene:

$$p_{t+1} = (p^2 W_{RR} + \frac{1}{2} 2pq W_{SR}) / W_M = (p (p W_{RR} + q W_{SR})) / W_M$$

$$q_{t+1} = (q^2 W_{SS} + \frac{1}{2} 2pq W_{SR}) / W_M = (q (q W_{SS} + p W_{SR})) / W_M$$

El cambio en la frecuencia génica luego de una generación de selección para el alelo R, Δp, será entonces:

$$\Delta p = p_{t+1} - p_t = ((p (p W_{RR} + q W_{SR})) / W_M) - p$$

que es lo mismo que,

$$\Delta p = (p q (p (W_{RR} - W_{SR}) + q (W_{SR} - W_{SS}))) / W_M \quad \text{ec.1}$$

De este modo se llega a un modelo poblacional que permitirá estimar cómo será el cambio en la frecuencia del gen de resistencia, el cual dependerá de su frecuencia inicial y de los valores adaptativos de los tres genotipos.

Estimación de los valores adaptativos

Los valores adaptativos de los homocigotos susceptibles y resistentes serán distintos dependiendo del origen de dichos individuos. El valor adaptativo medio de estos dos genotipos deberá tener en cuenta entonces el porcentaje relativo de refugio y plantas Bt cultivado, como sigue:

$$W_{RR} = \text{ref}(W_{RR/\text{ref}}) + Bt(W_{RR/Bt}) \quad \text{ec.2}$$

$$W_{SS} = \text{ref}(W_{SS/\text{ref}}) + Bt(W_{SS/Bt}) \quad \text{ec.3}$$

donde *ref* y *Bt* (= 1 - *ref*) son las proporciones de hectáreas cultivadas de refugio y plantas Bt, respectivamente; W_{RR/ref} y W_{RR/Bt} son los valores adaptativos de los individuos RR en el refugio y en los campos con plantas Bt, respectivamente; y W_{SS/ref} y W_{SS/Bt} son los valores adaptativos de los individuos SS en el refugio y en los campos con plantas Bt, respectivamente.

Si bien existen distintos valores de dominancias funcionales para el alelo resistente, se considerará para todos los cálculos que la resistencia es recesiva. De hecho, las altas

dosis de toxina Bt tienen por objeto llevar a la dominancia funcional del resistente a cero, lo que favorece el retraso en el aumento de la frecuencia de este alelo en las poblaciones. Por lo tanto, se considerará que $W_{SS} = W_{RS}$. En Tabashnik y col. (2005) se describe detalladamente cómo calcular empíricamente los costos selectivos, lo cual se lleva a cabo, en términos generales, analizando la supervivencia relativa de las larvas de líneas sensibles y resistentes sobre plantas Bt y libres de Bt, tanto en el campo como en estaciones experimentales.

Estimación del porcentaje de refugio en condiciones de equilibrio

En genética de poblaciones se denomina “condición de equilibrio” aquella en la que no existe un cambio neto en las frecuencias alélicas de un determinado carácter a través de las generaciones. En el caso particular de los cultivos transgénicos Bt, el objetivo que se quiere lograr es el de llegar a ese equilibrio, manteniendo estable la frecuencia del alelo de resistencia en las poblaciones de insectos, con el fin de que no se diluya el efecto insecticida del Bt. El “programa de refugios”, que implica cultivar zonas con plantas libres de Bt junto a los campos con plantas Bt, persigue justamente ese objetivo: el de generar un microambiente en donde los valores selectivos de los individuos sensibles a la toxina Bt sea máximo, asegurando de este modo que el alelo S nunca se pierda. El problema que surge entonces para el productor agrícola es cuál será el porcentaje mínimo que se debe cultivar con plantas libres de Bt para que el programa funcione, ya que es obvio que el rendimiento económico de estas plantas susceptibles de ser atacadas por los lepidópteros será menor.

El porcentaje de refugio necesario para que se alcance la condición de equilibrio se puede deducir de la ecuación 1 (ec.1) como sigue:

$$\Delta p = (p \cdot q \cdot (p \cdot (W_{RR} - W_{SR}) + q \cdot (W_{SR} - W_{SS}))) / W_M = 0$$

por lo tanto en el equilibrio

$$p \cdot (W_{RR} - W_{SR}) + q \cdot (W_{SR} - W_{SS}) = 0 \quad \text{ec.4}$$

Si se supone que el alelo de resistencia es completamente recesivo, entonces $W_{SS} = W_{SR}$ por lo tanto el segundo término de la ecuación 4 se anula, y al reemplazar W_{SR} por W_{SS} en el primer término, esta ecuación se reduce a:

$$p \cdot (W_{RR} - W_{SS}) = 0 \quad \text{ec.5}$$

Sustituyendo W_{RR} y W_{SS} según las ecuaciones 2 y 3 del apartado anterior, se obtiene:

$$p \cdot ((ref(W_{RR/ref}) + Bt(W_{RR/Bt})) - (ref(W_{SS/ref}) + Bt(W_{SS/Bt}))) = 0$$

Teniendo en cuenta que $p > 0$, y que el valor selectivo de los individuos homocigotas susceptibles en los campos Bt ($W_{SS/Bt}$) es 0, entonces,

$$\begin{aligned} &ref(W_{RR/ref}) + Bt(W_{RR/Bt}) - ref(W_{SS/ref}) = 0 \\ &\text{es decir,} \\ &Bt(W_{RR/Bt}) - ref(W_{SS/ref} - W_{RR/ref}) = 0 \end{aligned} \quad \text{ec.6}$$

La resistencia se mantendrá estable, entonces, cuando el efecto neto de la selección para resistencia que favorece a los RR en los campos Bt sea igual al efecto neto de los costos de selección en contra de ese mismo genotipo en los refugios. La frecuencia de la resistencia disminuirá si aumenta el porcentaje de refugio, disminuye el valor selectivo de los resistentes en campos libres de Bt, y aumenta la desventaja de los resistentes en los campos Bt en relación a los campos libres de Bt.

Por lo tanto, el porcentaje de refugio adecuado para que el alelo de resistencia se mantenga estable se puede estimar mediante la ecuación 6 siempre y cuando se conozcan los distintos valores selectivos. Por ejemplo, en un estudio realizado en campos de algodón de Arizona entre los años 1997 y 2004, Tabashnik y col. (2005) estimaron que, de acuerdo a valores selectivos empíricos medios de los RR en los refugios, y en los campos Bt de esa región, la frecuencia del alelo de resistencia se

mantendrá estable con valores de porcentaje de refugios que rondan el 23%. Sin embargo, este valor obtenido de tamaño de refugio para el equilibrio, que como veremos mas adelante es un valor relativamente bajo en comparación a los que se consideran en la práctica valores efectivos de tamaños de refugios, se basó en estimas de valores selectivos de los individuos resistentes en los campos Bt ($W_{RR/Bt}$) que también fueron bajos.

Modelos teóricos vs. datos reales: ¿funcionan los refugios?

Un estudio recientemente publicado que recavó información de monitoreo de la evolución de la resistencia en distintos países de todo el mundo, demostró que la estrategia de los refugios es en general efectiva y que los modelos teóricos son herramienta útiles para predecir dicha evolución bajo distintos escenarios. El estudio se basó en resultados previos de análisis de la resistencia a Bt en campos de Australia, China, Japón, España y Estados Unidos, de seis de las principales plagas de insectos: *Helicoverpa armigera*, *H. zea*, *Heliothis virescens*, *Ostrina nubilalis*, *Pectinophora gossypiella* y *Sesamia nonagrioides*. Sólo en *Helicoverpa zea* se observó evolución para la resistencia, medida mediante bioensayos, los que demostraron un aumento en la concentración media letal (LC_{50}) de toxina Bt Cry 1Ac para poblaciones coleccionadas en campos cultivados con plantas Bt, en comparación con cepas específicas de laboratorio que nunca habían sido expuestas a una dieta Bt. Cuando se incorporaron los parámetros reales iniciales del monitoreo (frecuencias iniciales, porcentaje de refugio, valores selectivos) a los modelos teóricos, se obtuvieron resultados similares en el cambio esperado teórico en dichas frecuencias que las obtenidas al cabo de unos años de observación, demostrando la efectividad de los modelos para la predicción futura en programas de manejo integrado de plagas.

Los modelos teóricos predicen que *H. zea* evolucionará mas rápido para resistencia que las otras plagas antes mencionadas. De hecho, el aumento en la frecuencia del alelo de resistencia en esta especie fue mayor en Arkansas y Misisipi que en Carolina del Norte, siendo

el porcentaje de refugio para las dos primeras regiones de 39%, y para Carolina del Norte del 82%. Con estos tamaños, *H. zea* fijaría la resistencia en 9 años en Arkansas y Misisipi, y en mucho mas de 20 años en Carolina del Norte. Es evidente entonces que el porcentaje más alto de refugio, está impidiendo que la resistencia evolucione más rápidamente en poblaciones de *H. zea* de Carolina del Norte. Altos porcentajes de refugios también retardaron la evolución de la resistencia de *H. armigera* a Cry1Ac en Australia y China, de *P. gossypiella* en Arizona, y de *S. nonagrioides* en España. En Australia, el tamaño del refugio fue del 70%, en China del 87-95%, en Arizona, del 50% y en España fue de alrededor del 95%. Sin embargo, en estas especies una ventaja adicional con respecto a *H. zea* fue la dominancia funcional (h) del gen de resistencia, que en la mayoría de ellas es completamente recesivo (h=0) y en *H. zea* tiene un valor alto (h=0,826) favoreciendo la fijación rápida de la resistencia.

Por último, cabe destacar que un estudio reciente de simulación que aplica modelos genético poblacionales como los expuestos aquí, pero que contemplan un mayor número de parámetros en el cálculo de los valores adaptativos (por ejemplo la reducción en la tasa de mortalidad de los genotipos sensibles a medida que aumenta la edad de la planta y disminuye la expresión de la toxina, o la mortalidad inducida por insecticidas químicos fumigados en la zona de refugios) demuestra de manera teórica que los refugios siguen siendo esenciales incluso en el caso de cultivos de algodón que expresan dos toxinas. Estos cultivos “dobles Bt” se comenzaron a comercializar hace relativamente poco tiempo, por lo que faltan algunos años para poner a prueba mediante datos de monitoreo a campo estas simulaciones teóricas y demostrar, una vez mas la efectividad real de los refugios.

Elementos típicos de un plan de manejo de resistencia

El desarrollo de resistencia en las poblaciones de insectos, consecuencia del proceso natural de evolución, surge como adaptación a las prácticas de manejo y por ende no se limita a un sistema particular de cultivo. Los insectos

pueden adaptarse a cualquier práctica de manejo dependiendo de la presión de selección ejercida sobre ellos. Hay numerosos ejemplos de este fenómeno en insectos que han desarrollado mecanismos de defensa fisiológicos, de comportamiento y metabólicos frente a insecticidas químicos, agentes de control biológico y controles culturales.

En el caso particular de la tecnología Bt la presencia de la proteína durante todo el período de crecimiento del cultivo, aumenta la presión de selección y hace necesaria la incorporación de refugios para el manejo de resistencia de insectos (IRM) y como parte integrada del método de manejo de plagas. En todos los países donde esta tecnología se encuentra disponible se han desarrollado programas de manejo de resistencia de insectos. Estos programas son desarrollados en forma local y en colaboración entre los sectores académicos y de investigación, los gobiernos y la industria, sobre bases científicas y analizando la situación local en cuanto a plagas presentes y el ambiente agroecológico.

Los elementos típicos de un plan de manejo de resistencia incluyen:

1) Investigación. Las características de los refugios están dadas por su tamaño (porcentaje sobre el total del área sembrada con maíz), distancia entre ellos y forma. Si bien generalmente en todos los países se utilizan recomendaciones similares que garantizan ampliamente un correcto manejo de resistencia de insectos, las características de los refugios estarán dadas entre otras cosas por las plagas objetivo presentes, por lo tanto los programas se sustentan sobre ensayos que permiten ampliar las herramientas disponibles para evaluar las recomendaciones de IRM dadas al productor.

2) Comunicación. Debido al papel clave del conocimiento del productor en el logro de un manejo exitoso y responsable de los maíces Bt, la comunicación es uno de los pilares de los programas de IRM. Los materiales educativos, la difusión en los medios especializados y la capacitación directa a los productores son algunas de las herramientas más utilizadas para lograrlo. Por otra parte es importante el

diagnóstico de la situación con respecto a la adopción de los refugios, no sólo para medir la aplicación real de la práctica, sino también como herramienta para ajustar la estrategia de comunicación dirigida al productor. Las encuestas periódicas son una herramienta utilizada en muchos países para estas mediciones.

3) Monitoreo. El objetivo del monitoreo es detectar y confirmar cualquier posible desarrollo de resistencia con la suficiente antelación como para implementar medidas de remediación que permitan retrasar o prevenir la difusión de la resistencia y evitar que se pierda la capacidad de control de los maíces Bt. La herramienta apropiada para monitorear la resistencia a campo depende del patrón de evolución de la resistencia. El patrón espacial de evolución de la resistencia en el campo puede surgir en un foco localizado que evoluciona rápidamente y se expande, o a partir de una población donde la resistencia está dispersa y evoluciona lentamente con un incremento más gradual en la frecuencia de alelos resistentes. Es improbable que el muestreo al azar de la población permita detectar resistencia localizada, a menos que se lleve a cabo a una escala impracticable. En estos casos es mejor utilizar como herramienta de monitoreo la identificación de lotes del cultivo con daños no esperados en las plantas. Para esto es fundamental que los productores estén capacitados para informar a la empresa proveedora de semilla la presencia de plantas del lote con daños de larvas. Una vez detectado e informado el daño no esperado, se deberá confirmar que la planta es una planta Bt, que se esté expresando en sus tejidos el nivel de proteína esperado y que el daño no haya sido producido por otra especie no susceptible al maíz Bt o por cuestiones climáticas. Por otra parte, si la resistencia evoluciona lentamente a partir de áreas dispersas, los daños no esperados sólo podrán ser detectados cuando una gran proporción de la población se haya vuelto resistente. En este caso, la herramienta de monitoreo apropiada es el muestreo al azar de la población y el análisis en laboratorio para detectar frecuencias relativamente bajas de alelos de resistencia.

4) Remediación. En caso de confirmarse la aparición de resistencia, deberá aplicarse un plan de remediación que permita reducir la fre-

cuencia de insectos resistentes. Cuando la resistencia se detecta a través de la aparición de plantas con daños no esperados en el cultivo, es esperable que la proporción de resistencia en la población de insectos sea significativa. En este caso las acciones a tomar podrán incluir la aplicación de insecticidas químicos para reducir la frecuencia de insectos resistentes e incluso la suspensión de la aplicación de cultivos Bt en la zona afectada. Por el contrario, si a través de un programa de monitoreo al azar y del análisis en laboratorio se detectara la presencia de alelos de resistencia en una población de insectos, pero la resistencia no se hubiera manifestado aún a campo, se podrían tomar otras medidas para caracterizar la resistencia y, de ser necesario, disminuir su dispersión. Estas medidas podrían incluir la confirmación de la heredabilidad de la resistencia, determinar si la resistencia es recesiva o dominante, su frecuencia, etc.

El manejo de la resistencia a insectos en Argentina

En Argentina, el Programa de Manejo de Resistencia de Insectos (MRI) en maíz Bt aprobado por la Comisión Nacional Asesora de Biotecnología Agropecuaria (CONABIA) en 1999, es llevado a cabo por la Asociación de Semilleros Argentinos (ASA) entidad que nuclea a todas las empresas que comercializan maíz Bt en el país. El objetivo del programa es promover un uso responsable de la tecnología,

que permita retrasar cualquier potencial desarrollo de resistencia y detectar inmediatamente cualquier cambio en la susceptibilidad de la población de insectos.

Para cumplir con el objetivo propuesto, ASA financia estudios locales realizados por del INTA, la Estación Agro Industrial Obispo Colombres, y profesionales de laboratorios privados, que permiten ampliar la comprensión de la bioecología de las plagas objetivo y contar con herramientas para monitorear su susceptibilidad a las proteínas Bt actualmente en el mercado.

Con respecto a la comunicación hacia el productor y a la difusión del manejo adecuado de la tecnología Bt, ASA hace especial hincapié en la difusión de un mensaje unificado entre todas las empresas quienes se encuentran activamente comprometidas con el programa, como sigue:

Los refugios deben sembrarse con un maíz no Bt de ciclo similar en la misma fecha de siembra que el lote Bt.

El refugio debe ser el 10% de la superficie del lote. Por ejemplo, cada 9 hectáreas sembradas con maíz Bt, debemos sembrar 1 hectárea con maíz no Bt.

Los refugios deben sembrarse en bloque en uno de los bordes del lote. Si el lote mide más de 1500 m de lado, el bloque de refugio deberá sembrarse en el centro del mismo, para asegurar que los insectos del refugio puedan volar y cruzarse con cualquier potencial sobreviviente del maíz Bt. (figura 2).

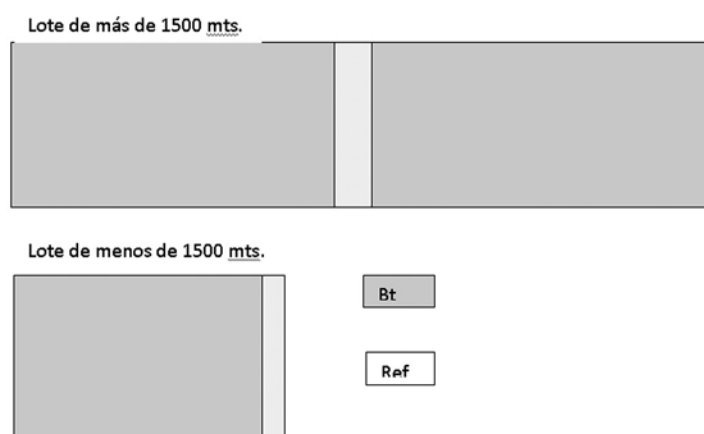


Figura 2: Distribución del refugio en el lote de acuerdo a las dimensiones del mismo. Bt= zona sembrada con maíz Bt. Ref.= zona de refugio.

Tratamientos químicos: a) No deben realizarse aplicaciones de insecticidas para el control del barrenador del tallo (*Diatraea saccharalis*) en los refugios. b) En caso de detectarse ataque de gusano cogollero (*Spodoptera frugiperda*) por encima del umbral de acción, pueden aplicarse insecticidas. El mejor control del gusano cogollero se obtiene con aplicación de insecticidas en los primeros estadios del cultivo. De esta forma, además de facilitarse el trabajo, se disminuye la presión de la plaga en estadios más avanzados, preservando la función del refugio.

Lecturas recomendadas

- ABSTC 2003. Industry Advisory Panel to Agricultural Biotechnology Stewardship Technical Committee (ABSTC) on Monitoring for Insect Resistance to Bt corn report.
- ASA. Programa de Manejo de Resistencia de Insectos. www.asa.org.ar
- Carrière, Y., Ellers-Kirk, C., Biggs, R., Degain, B., Holley, D., Yafuso, C., Evans, P., Dennehy, T.J. and Tabashnik, B.E. 2005. Effects of cotton cultivar on fitness costs associated with resistance of pink bollworm (Lepidoptera, Gelechiidae) to Bt cotton. *Journal of Economic Entomology*, 98, 947-954.
- Carrière, Y., Ellers-Kirk, C., Sisterson, M., Antilla, L., Whitlow, M., Dennehy, T.J. and Tabashnik, B.E. 2003. Long-term regional suppression of pink bollworm by *Bacillus thuringiensis* cotton. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 100, 1519-1523.
- Cattaneo M., Yafuso, C., Schmidt, C., Huang, C., Rahman, M., Olson, C., Ellers-Kirk, C., Orr, B.J., Marsh, S.E., Antilla, L., Dutilleul, P. and Carrière, Y. 2006. Farm-scale evaluation of transgenic cotton impacts on biodiversity, pesticide use, and yield. *Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A.*, 103, 7571-7576.
- Downes S., Mahon R. and Olsen K. 2007. Monitoring and adaptive resistance management in Australia for *Bt*-cotton: current status and future challenges. *J. Invertebr. Pathol.*, 95, 208-213.
- Farinós, G.P., de la Poza, M., Hernández-Crespo, P., Ortego, F. and Castañera, P. 2004. Resistance monitoring of field populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* and *Ostrinia nubilalis* after 5 years of Bt maize cultivation in Spain. *Entomologia Experimentata et Applicata*, 110, 23-30.
- Gould, F., 1998. Sustainability of transgenic insecticidal cultivars: integrating pest genetics and ecology. *Annu. Rev. Entomol.*, 43, 701-726.
- Gustafson, D.I., Head, G.P. and Caprio, M.A. 2006. Modeling the impact of alternative hosts on *Helicoverpa zea* adaptation to Bollgard cotton. *J. Econ. Entomol.* 99, 2116-2024.
- Hartl, D. L. & Clark, A. G. 1989. *Principles of Population Genetics*. Sinauer, Sunderland, MA, 2nd ed.
- James, C. 2007. Global status of commercialized biotech/GM Crops: 2007. *ISAAA Briefs* No. 37. Ithaca, NY, International Service for the Acquisition of Agri-biotech Applications.
- Meredia K. M. 1994. "Sustaining Host Plant Resistance Derived Through Conventional and Biotechnological Means" *Insect Resistant Maize. Proceedings of an International Symposium held at CIMMYT*.
- Nibouche S., Guérard N., Martin P., Vaissayre M. 2007. Modelling the role of refuges for sustainable management of dual-gene Bt in West African smallholder farming systems. *Crop Protection*, 26, 828-836.
- Pittendrigh B.R., Gaffney P.J., Huesing J.E., Onstad D.W., Roush R.T., Murdock L.L. 2004. "Active" refuges can inhibit the evolution of resistance in insects towards transgenic insect-resistant plants. *Journal of Theoretical Biology*, 231, 461-474.
- Roush R.T. 1997. Managing resistance to transgenic crops. In: N. Carozzi and M. Koziel (ed.) *Advances in Insect Control: The Role of Transgenic Plants*. Taylor and Francis, London. pp. 271-274.
- Schnepf, E., Crickmore, N., van Rie, J., Lereclus, D., Baum, J., Feitelson, J., Zeigler, D.R. and Dean, D.H. 1998. *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiology and Molecular Biology Review*, 62, 775-806.
- Shelton, A.M., Zhao, J.-Z. and Roush, R.T. 2002. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants. *Annual Review of Entomology*, 47, 845-881.
- Tabashnik B.E. and Carriere, Y. 2008. Insect resistance to genetically modified crops. In: A.M.R. Gatehouse and N. Ferry (ed.) *Environmental Impact of Genetically Modified Crops*. CABI, Wallingford, UK.
- Tabashnik B.E., Dennehy, T.J. and Carriere, Y. 2005. Delayed resistance to transgenic cotton in pink bollworm. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 102, 15389-15393.
- Tabashnik B.E., Gassmann A.J., Crowder D.W. and Carriere, Y. 2008. Insect resistance to *Bt* crops: evidence versus theory. *Nature Technology*, 26, 199-202.
- Tabashnik B.E., Gould, F., Carriere, Y., 2004. Delaying evolution of insect resistance to transgenic crops by decreasing dominance and heritability. *J. Evol. Biol.*, 17, 904-912.
- Tabashnik BE. 1994. Evolution of resistance to *Bacillus thuringiensis*. *Annual Review of Entomology*, 39, 47-79.

VI. CAPÍTULO 6

Resistencia de malezas a herbicidas: evolución y estrategias de manejo

Danie I Tuesca; Luisa Nisensohn;
Mario R Sabbatini; Guillermo Chantre

Introducción

En los agroecosistemas la presencia de malezas interfiere dificultando las tareas de siembra y cosecha y generando pérdidas de rendimiento por competencia con los cultivos. La magnitud de estas pérdidas varía en función de la interacción de numerosos factores tales como la composición de la comunidad de malezas, la abundancia relativa de cada una de las especies que la integran, las condiciones ambientales, la modalidad de conducción del cultivo, entre otros. Los niveles de pérdida causados por las malezas pueden oscilar entre 0 y 30% para especies poco agresivas con bajos niveles de infestación hasta un 80% para malezas más competitivas, en densidades muy altas y frecuentemente coexistiendo con el cultivo durante todo su ciclo.

La reducción del grado de abundancia de las poblaciones de malezas que acompañan los cultivos puede efectuarse mediante el control mecánico, empleando diversas herramientas de labranza; el control biológico, que utiliza agentes biocontroladores (fundamentalmente insectos y hongos) que afectan malezas específicas; el control cultural, donde se aprovechan las características propias de los cultivos que integran la secuencia, y el control químico, que involucra el empleo de herbicidas. Actualmente, el control mecánico tiene una utilidad limitada debido a la adopción masiva de sistemas con labranza mínima o directamente sin labranza (siembra directa). El control biológico, si bien es una metodología de manejo de plagas altamente recomendado por su bajo impacto ambiental, se encuentra limitado a aquellas especies de malezas de las cuales se han aislado y autorizado el uso de agentes biocontroladores. El control cultural, utilizado por los agricultores desde el inicio mismo de la agricultura, ha recibido en los últimos años una

especial atención, por constituir una alternativa ante el uso excesivo de herbicidas. Una de las opciones más conocidas y aplicadas es la rotación de cultivos con diferente ciclo y hábito de crecimiento, la elección de cultivares competitivos, la modificación de la fecha de siembra y el acortamiento de la distancia entre surcos a los fines de aumentar la habilidad competitiva de los cultivos frente a las malezas.

En las últimas décadas el enfoque alternativo más utilizado para solucionar el problema de las malezas consistió en el control químico utilizando herbicidas. Una de las razones de este predominio radica en la relativa simplicidad de la tecnología, que permite su empleo aún con conocimientos escasos de los fundamentos en que se sustenta. La elección de estrategias de reducción o de erradicación de malezas en reemplazo de estrategias de prevención y contención se vio favorecida no sólo por factores tecnológicos, como la eficacia de los principios activos y la tecnología de aplicación, sino también por factores económicos y socio-culturales como la disminución de los costos relativos, el aumento de la escala productiva y las características de los actores involucrados en el proceso de producción. A pesar de la continua generación y sustitución de diversos herbicidas en las últimas dos décadas no fue posible erradicar a las malezas sino que por el contrario se seleccionaron biotipos tolerantes y/o resistentes a algunos principios activos. La resistencia de diferentes biotipos de insectos a diversos plaguicidas es el mayor desafío del control de plagas desde hace medio siglo en todo el mundo. En los últimos años, este mismo desafío se ha trasladado al control de malezas, fundamentalmente en aquellos cultivos en los que se aplican intensamente herbicidas.

En el manejo de malezas en cultivos se han diferenciado dos conceptos que se relacionan con la capacidad que tienen algunas plantas de sobrevivir a los tratamientos con herbicidas. Así, el término tolerancia se emplea para definir la capacidad natural heredable de una especie para sobrevivir y reproducirse luego de un tratamiento herbicida, mientras que la resistencia a herbicidas se define como la capacidad heredable de una población o biotipo para sobrevivir y reproducirse después de la aplicación

de una dosis de herbicida que era letal para la población original. Desde la aparición de los primeros herbicidas selectivos en el mercado argentino en los años 60', los agricultores han lidiado con el problema de la tolerancia. Así por ejemplo, varias especies de malezas son tolerantes al 2,4-D y a la atrazina, dos herbicidas selectivos ampliamente utilizados desde hace muchos años en los cultivos de trigo y maíz, respectivamente. Para controlar esas malezas tolerantes se utilizan otros herbicidas o se emplean diferentes métodos de control. En cambio, la resistencia es un fenómeno relativamente nuevo, y si bien en nuestro país se ha manifestado en unas pocas especies, está generando una creciente preocupación en los agricultores.

Desarrollo de resistencia en poblaciones de malezas

El primer registro de resistencia a herbicidas se reportó en 1970 en Estados Unidos, en una población de *Senecio vulgaris* (senecio) que mostró resistencia a simazina y atrazina luego de un período de diez años en el que estos principios activos se aplicaban una o dos veces por año. A nivel mundial, la tasa de aparición de biotipos resistentes se ha incrementado notablemente. En 1983 se habían detectado 60 casos de resistencia y en la actualidad se registran 321 biotipos resistentes que corresponden a 185 especies, de las cuales 111 son dicotiledóneas y 74 son gramíneas. Si bien se ha documentado resistencia a la mayoría de los grupos químicos, un alto porcentaje de los casos corresponden a inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS), de los fotosistemas I y II, de la síntesis de ácidos grasos y de las auxinas sintéticas (figura 1).

En las poblaciones de malezas, el desarrollo de resistencia es un proceso evolutivo en respuesta a la presión de selección ejercida por el uso repetido de herbicidas con el mismo sitio de acción. Los biotipos susceptibles mueren, mientras que los resistentes sobreviven y producen semillas. Si continúa la aplicación de herbicidas que actúan sobre el mismo sitio de acción, la proporción del biotipo resistente se incrementa en relación al biotipo susceptible (figura 2).

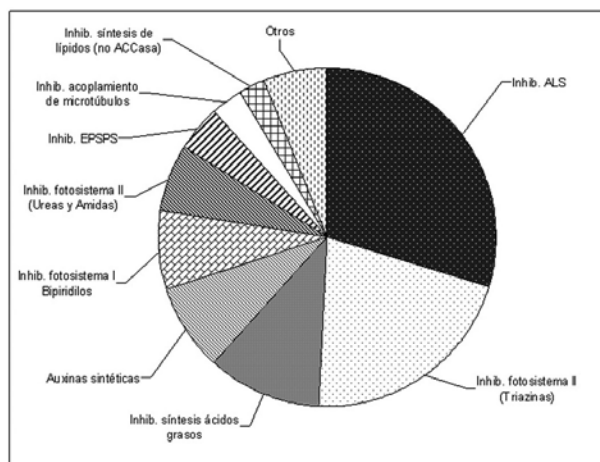


Figura 1. Distribución de los casos registrados de resistencia en función de los distintos grupos de herbicidas.

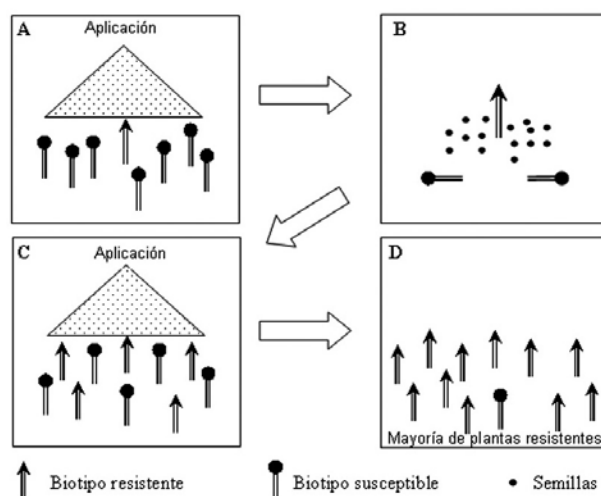


Figura 2. Evolución de la resistencia. (A) una población de malezas que presenta mayoría de plantas susceptibles es pulverizada con un herbicida. Como el biotipo resistente al herbicida se encuentra en una frecuencia muy baja, la población en general es eficientemente controlada. (B) Con la aplicación recurrente del mismo herbicida (u otros herbicidas que actúan en el mismo sitio de acción) las plantas susceptibles son eliminadas antes de formar semillas que garantizan su supervivencia. Contrariamente, la frecuencia del biotipo resistente se incrementa ya que dispersan sus semillas normalmente. (C) Al persistir la aplicación de estos herbicidas, la densidad del biotipo resistente se incrementa significativamente. (D) Luego de algunos años la mayoría de los individuos de la población es resistente y el herbicida ya no resulta una herramienta eficiente para el control de la maleza.

La detección de biotipos resistentes no es inmediata; este proceso sólo comienza a percibirse cuando los individuos resistentes representan aproximadamente el 30% de la población. Uno de los requisitos para la evolución de resistencia en las poblaciones de malezas es la presencia de variación genética heredable para la resistencia. Así, en poblaciones no seleccionadas se pueden distinguir dos situaciones:

la población no posee alelos que confieren resistencia al herbicida cuando se inicia el proceso de selección. En este caso la probabilidad de que la población adquiera resistencia a través de mutación, dependerá de i) la frecuencia de mutación, ii) las desventajas selectivas de los alelos o genes que confieren resistencia en un ambiente sin selección y iii) el tamaño de la población.

preexistencia de genes resistentes. En este caso los alelos que confieren resistencia están presentes en la población antes de aplicarse el herbicida, aunque en una frecuencia muy baja para ser detectados. En esta situación, la evolución de la resistencia será más rápida que en 1.

Mecanismos de resistencia

Existen tres mecanismos por los cuales se anula la actividad fitotóxica del herbicida dentro de la planta y se genera resistencia:

Modificación del sitio de acción. Se producen cambios estructurales en la molécula que constituye el sitio de acción del herbicida. De esta manera, el herbicida no puede unirse a dicha molécula y se inhibe el efecto fitotóxico (ej.: resistencia a las triazinas o a los inhibidores de ALS).

Detoxificación por metabolización. Se producen cambios en la tasa de detoxificación del herbicida. En una planta resistente, el herbicida se degrada a metabolitos no fitotóxicos en forma más rápida que en una planta susceptible (ej.: algunos casos de resistencia a los inhibidores de la síntesis de ácidos grasos).

Reducida absorción, transporte o secuestro. El secuestro o aislamiento implica que el herbicida sea apartado de las regiones metabólicamente activas de la célula vegetal, y trasladado a sitios menos activos (por ejemplo, una vacuola) donde es inocuo para el cre-

cimiento vegetal. Este paso frecuentemente es precedido por una desactivación por conjugación con otra molécula (por ejemplo, un azúcar). Se produce de este modo una reducción de la concentración del herbicida en el sitio de acción. Este mecanismo ha sido sugerido en algunos casos de resistencia a los inhibidores de la síntesis de ácidos grasos y del fotosistema I.

Factores que modifican la tasa de evolución de la resistencia

En las poblaciones de malezas existen diferentes factores que influyen en los procesos evolutivos y que interactúan para determinar tanto la probabilidad como la velocidad a la que puede ocurrir la resistencia. Estos factores están relacionados con características de las poblaciones de malezas, de los herbicidas y de los sistemas de manejo del agroecosistema.

1 Factores relacionados con la biología y genética de las poblaciones de malezas:

1.a. Frecuencia de alelos resistentes. A medida que dicha frecuencia aumenta en una población, la tasa de evolución de la resistencia será mayor.

1.b. El modo de herencia de la resistencia. Si la resistencia es conferida por alelos dominantes la evolución será más rápida, debido a que tanto los individuos homocigotas como heterocigotas resultarán resistentes.

1.c. Número de genes que confieren resistencia. La herencia de la resistencia es comúnmente monogénica, es decir que está controlada por un solo gen, dando lugar a tasas de evolución relativamente elevadas. Por el contrario, cuando la resistencia es poligénica y está asociada con varios genes, la evolución es más lenta, ya que se requieren recombinaciones genéticas durante varias generaciones para reunir un número suficiente de alelos que den lugar a un genotipo resistente.

1.d. Características reproductivas de la especie. En las especies alógamas, los alelos de resistencia pueden dispersarse no sólo a través de las semillas, sino también mediante el polen transportado por el viento o por insectos. En las especies autógamas el flujo génico es sumamente reducido entre individuos, y en

este caso la dispersión de alelos resistentes se produce casi exclusivamente a través de semillas.

1.e. Capacidad reproductiva de la maleza. La producción de un elevado número de semillas favorece la dispersión de la resistencia.

1.f. Tamaño de la población de malezas. En poblaciones de malezas con densidades elevadas, la probabilidad de que algunos individuos resistentes estén presentes será mayor.

1.g. Longevidad de las semillas en el suelo. En las especies que poseen un banco de semillas persistente, sólo una fracción de éste estará expuesto a la selección por el herbicida en cada estación de crecimiento. Así, en años sucesivos las poblaciones de plántulas reclutadas a partir del banco incluirán una proporción de individuos susceptibles. Esto resultará en una disminución de la frecuencia de alelos resistentes y hará más lenta la evolución de la resistencia.

1.h. Mecanismos de dispersión de semillas. En el caso de especies anemófilas, el viento puede dispersar semillas de genotipos resistentes a áreas no infestadas. La dispersión por efecto antrópico también debe tenerse en cuenta, ya que la maquinaria es una vía de transporte de estos genotipos hacia áreas libres de individuos resistentes.

1.i. Período de emergencia. En la medida en que las poblaciones de malezas tengan períodos prolongados de germinación, la probabilidad de que el herbicida afecte sólo a una parte de dicha población se incrementa. Los individuos susceptibles que emerjan con posterioridad a la aplicación contribuirán a disminuir la frecuencia de alelos resistentes y la evolución de la resistencia será más lenta.

1.j. El valor adaptativo (*fitness*) relativo de los genotipos resistentes y susceptibles. El valor adaptativo de un genotipo se mide a través del éxito reproductivo, es decir la cantidad de descendientes que están presentes en la siguiente generación. En poblaciones que se aparean al azar casi todos los alelos de la población van a estar en forma heterocigota durante los primeros estadios de la evolución de la resistencia. En el caso que frente a las aplicaciones de herbicidas, los individuos heterocigotas (RS) tengan más *fitness* que los homocigotas suscep-

tibles (SS), la evolución de la resistencia será rápida. Si en cambio, los heterocigotas poseen un *fitness* similar al de los susceptibles, la resistencia evolucionará más lentamente. En algunos casos, el genotipo resistente tiene un valor adaptativo menor que el susceptible, y en esta situación si se reduce la presión de selección. Por ejemplo, utilizando herbicidas con distinto sitio de acción, la frecuencia del genotipo resistente disminuye rápidamente en la población.

2 Factores relacionados con el herbicida

2.a. Dosis empleadas. Cuando la resistencia es monogénica, el empleo de dosis elevadas aumenta la presión de selección y favorece la evolución de la resistencia. Por el contrario, la utilización de sub-dosis, al disminuir la presión de selección, puede atrasar la aparición de la resistencia. En esta situación, las semillas provenientes de plantas susceptibles sobrevivientes al herbicida, contribuirán a que en la siguiente generación disminuya la frecuencia de alelos resistentes en la población total. **Si la resistencia es poligénica es necesario que se produzcan recombinaciones entre individuos durante varias generaciones para alcanzar un número suficiente de alelos que generen un genotipo resistente. En este caso, la utilización de sub-dosis de herbicidas permitirá que aquellos individuos que expresan mecanismos de resistencia relativamente débiles por no poseer la cantidad de alelos suficientes sobrevivan y contribuyan al *pool* de genes de resistencia.** En cambio, al aplicar dosis altas se elimina la mayoría de la población disminuyendo así la frecuencia de alelos resistentes en la población total.

2.b. Eficacia. La eficacia de un herbicida está relacionada con la mortalidad que causa en una población de malezas. Como se indicó en el punto anterior, en caso que la resistencia sea monogénica, los herbicidas más eficaces eliminarán una mayor proporción de individuos susceptibles y de este modo facilitarán la evolución de la resistencia. En cambio, si la resistencia es poligénica, una menor eficacia de los herbicidas podría beneficiar la sobrevivencia de algunos alelos que, por acumulación, incrementarán el *pool* de genes resistentes. Así, tanto los herbicidas eficaces como ineficaces

contribuyen a aumentar, mediante diferentes mecanismos, el desarrollo de la resistencia. La evolución de la resistencia por ello puede demorarse, pero es un proceso inevitable mientras se usen herbicidas como única herramienta del manejo de malezas.

2.c. Especificidad del sitio de acción. En el caso de herbicidas que interfieren con un solo sitio de acción, el cambio en un solo gen puede ser suficiente para afectar la unión de la molécula herbicida al sitio de acción. El uso de herbicidas con múltiples sitios de acción tendrá menor probabilidad de generar biotipos resistentes.

2.d. Residualidad. Los herbicidas no residuales sólo actúan sobre los individuos de la población ya emergidos. Los herbicidas residuales afectan además a las cohortes que emergerán posteriormente a la aplicación, eliminando así una mayor proporción de individuos susceptibles de la población y favoreciendo la evolución de la resistencia.

2e. Patrones de uso. El empleo repetido, dentro de la misma campaña agrícola o en campañas sucesivas del mismo herbicida o de herbicidas con igual sitio de acción favorecerá la evolución de poblaciones resistentes.

Clasificación de la resistencia

La clasificación de la resistencia se asocia con los mecanismos de resistencia involucrados. Así pueden distinguirse dos tipos de resistencia: cruzada y múltiple.

Resistencia cruzada: se refiere a la resistencia a dos o más herbicidas del mismo o de diferentes grupos químicos provocada por un único mecanismo. Dentro de este tipo se pueden definir dos categorías:

1. Resistencia cruzada asociada con la modificación del sitio de acción. Es el tipo más frecuente de resistencia cruzada y ocurre cuando un cambio en el sitio de acción de un herbicida confiere resistencia a herbicidas que inhiben el mismo sitio de acción. Esta modificación no necesariamente resulta en resistencia a todos los grupos de herbicidas con similar sitio de acción ni a todos los herbicidas dentro de un mismo grupo químico. Es el caso de biotipos de *Amaranthus quitensis* resistentes a sulfonilureas, imidazolinonas

y triazolopirimidinas, debido a una alteración de la ALS.

2. Resistencia cruzada no asociada con la modificación del sitio de acción. En este caso, la resistencia a dos o más herbicidas es debida a un mecanismo de resistencia diferente a la modificación del sitio de acción. Los mecanismos potenciales incluyen: reducida absorción y transporte, secuestro y detoxificación del herbicida. Biotipos de *Lolium rigidum* presentan resistencia cruzada a herbicidas del grupo de las triazinas y de las ureas debida a un aumento en la tasa de detoxificación de esos herbicidas.

Resistencia múltiple: comprende la resistencia a uno o más herbicidas del mismo o de diferentes grupos químicos debida a dos o más mecanismos. Los casos más simples de resistencia múltiple son aquellos donde un individuo o población posee dos o más mecanismos que le confieren resistencia a un herbicida o grupo de herbicidas. Una situación más compleja es aquella donde la resistencia es a diferentes grupos químicos. Tal es el caso de un biotipo de *Lolium rigidum* en Australia que presenta resistencia a nueve grupos de herbicidas conferida por distintos mecanismos.

Diagnóstico de malezas resistentes a herbicidas

La detección temprana de la resistencia permite maximizar la efectividad de los programas de manejo y prevenir su dispersión a campos vecinos. Las fallas en el control de malezas no siempre están asociadas con la presencia de biotipos resistentes sino que pueden relacionarse con empleo de dosis de herbicidas inadecuadas, deficiente incorporación del herbicida, incorrecto uso de coadyuvantes y surfactantes, condiciones ambientales desfavorables para la actividad del herbicida, momento inadecuado de aplicación o flujos de emergencia posteriores a la aplicación en el caso de herbicidas poco residuales.

Una vez que estas causas han sido descartadas deben considerarse los siguientes aspectos que caracterizan lotes con poblaciones de malezas que han desarrollado resistencia:

- La especie sospechosa está inicialmente confinada en pequeños manchones.
- Todas las especies susceptibles al herbicida son bien controladas, excepto la especie sospechosa.
- Se detectan individuos de la especie sospechosa sin síntomas y dispersos entre plantas de la misma especie que han sido controladas.
- La especie sospechosa normalmente es muy susceptible al herbicida empleado.
- Se ha utilizado el mismo herbicida en forma repetida sin emplear otros métodos de control (mecánico o cultural).
- La historia del lote indica un uso extensivo e intensivo a lo largo del tiempo del herbicida aplicado o de herbicidas con el mismo sitio de acción.

Cuantificación de la resistencia

La resistencia puede ser cuantificada comparando valores experimentales derivados de biotipos resistentes y susceptibles. Por ejemplo, se puede comparar la dosis de herbicida requerida para controlar el 50 % de la población de malezas (DL_{50}), la dosis que causa un 50% de reducción en la biomasa (GR_{50}) o la dosis que disminuye en un 50% la actividad de una enzima específica (I_{50}). La metodología empleada para la estimación de estos valores se basa en la construcción de *curvas de dosis-respuesta*. Los valores de estos índices serán menores en biotipos susceptibles y aumentarán a medida que los biotipos presenten mayor grado de resistencia (figura 3).

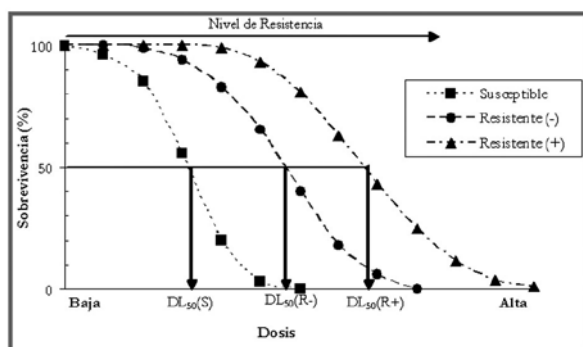


Figura 3. Curvas dosis-respuesta para biotipos con distinto grado de resistencia.

Otro indicador utilizado para comparar los diferentes grados de resistencia entre biotipos es el *factor de resistencia* que indica el número de veces que es necesario aumentar la dosis de un herbicida en un biotipo resistente para alcanzar un control similar al obtenido en el biotipo susceptible. Este factor resulta del cociente entre valores de DL_{50} , GR_{50} o I_{50} del biotipo resistente y los valores de estos mismos índices del biotipo susceptible.

Casos de resistencia en Argentina

Hasta el año 2005, el único caso de resistencia documentado en Argentina correspondía a *Amaranthus quitensis* (yuyo colorado) resistente a herbicidas inhibidores de la enzima acetolactato sintasa (ALS) como por ejemplo, imazetapir, clorimurón etil y flumetsulam.

El empleo generalizado de siembra directa y la introducción de cultivares de soja resistentes a glifosato a partir de 1997 produjo importantes modificaciones en las comunidades de malezas. Asociado con algunas características específicas del glifosato, se estimaba una baja probabilidad de que las malezas desarrollaran resistencia a este principio activo; no obstante hasta la fecha se han detectado 15 casos de resistencia a glifosato en distintas especies de malezas a nivel mundial.

El primer caso de resistencia a glifosato en Argentina se confirmó en el año 2005 en biotipos de sorgo de Alepo (*Sorghum halepense*). Las primeras deficiencias en el control con este herbicida se observaron en las provincias de Salta y Tucumán, en el año 2003 y experimentos realizados posteriormente corroboraron la resistencia a ese principio activo. Investigaciones recientes permiten asegurar que el número de biotipos de sorgo de Alepo resistente a glifosato está aumentando, y el área de distribución de los mismos incluye la región sojera núcleo. En ensayos realizados comparando estos biotipos con otros susceptibles, se determinó un grado relativamente alto de resistencia a glifosato. Resta evaluar si estos biotipos resistentes se han generado en forma independiente o guardan alguna relación con los casos encontrados en el noroeste argentino.

Estudios realizados en el sudoeste de la Provincia de Buenos Aires indican la existencia

de poblaciones de raigrás (*Lolium multiflorum*) con una menor sensibilidad al glifosato, lo cual sugeriría el desarrollo de biotipos resistentes. En poblaciones con un historial de alta frecuencia de aplicación de glifosato se detectaron valores de GR_{50} entre 3,6 y 4 veces superiores al de poblaciones sin registro de uso de este herbicida. Además, se observaron valores de hasta 20% de supervivencia en individuos de poblaciones tolerantes a dosis de 1440 gr e.a.ha⁻¹, mientras que la supervivencia fue nula para los individuos de poblaciones sensibles a una dosis de 360 gr e.a.ha⁻¹. Experiencias recientes indicaron valores de supervivencia de hasta 40% a una dosis de 1680 gr e.a.ha⁻¹ en plántulas obtenidas a partir de semillas cosechadas de una población que sobrevivió a una aplicación comercial de glifosato. Existen casos confirmados de biotipos de raigrás resistentes a glifosato en Chile y Brasil.

El contexto favorable para el mercado internacional de *commodities*, el precio relativamente bajo del glifosato respecto a otros herbicidas y su probada eficacia en un amplio espectro de malezas, redundarán en un creciente aumento del área sembrada con cultivos resistentes a este herbicida. Es necesario implementar medidas de manejo integrado para prevenir el incremento en las poblaciones de malezas tolerantes y resistentes a glifosato.

Manejo integrado para prevenir la evolución de la resistencia

Existen dos estrategias principales para demorar la manifestación de la resistencia utilizando herbicidas:

1. Rotar herbicidas con distintos sitios de acción y no realizar más de dos aplicaciones consecutivas de herbicidas con el mismo sitio de acción en el mismo lote a menos que se incluyan otras prácticas de control efectivas en el manejo del sistema.
2. Emplear mezclas de herbicidas con distintos sitios de acción o aplicar en forma secuencial herbicidas con distintos sitios de acción pero similar espectro de acción sobre las malezas a controlar.

Como ya se indicó anteriormente, el uso del control químico como única medida de manejo

de las malezas puede demorar la aparición de resistencia, pero no erradicarla. Las prácticas conducentes a la erradicación de la resistencia son las del control integrado, que resulta de combinar el control químico con el control mecánico, cultural y/o biológico. Así, resulta aconsejable sumar al uso de herbicidas, algunas de las siguientes prácticas:

- Realizar rotaciones de cultivos con diferentes ciclos de crecimiento. Esta práctica presenta varias ventajas: permitir el uso de herbicidas con diferentes sitios de acción; y permite utilizar diferentes fechas de siembra en los distintos cultivos, formas de preparación del suelo y otros métodos culturales para controlar un problema particular de malezas.
- Laboreo antes de la siembra para controlar las plantas nacidas y enterrar semillas no germinadas.
- Retraso de la siembra de manera de controlar los primeros flujos de emergencia de malezas con control mecánico o herbicidas no selectivos.
- Evitar la dispersión de semillas de malezas resistentes. Para ello utilizar herbicidas no selectivos en precosecha de los cultivos antes de la madurez de las semillas de las malezas y limpiar los equipos de labranza y cosecha antes de transportarlos a otros lotes.
- Releva los campos regularmente, identificando las malezas presentes de manera de responder rápidamente a cambios en las poblaciones de malezas para restringir la dispersión de biotipos resistentes que puedan haber sido seleccionados.
- Iniciar programas de control biológico a los fines de identificar biocontroladores que disminuyan los perjuicios ocasionados por las especies de malezas más importantes de la región.

Si bien la combinación de diferentes métodos de control es la estrategia más recomendada para demorar o evitar la evolución de resistencia, un enfoque interdisciplinario de esta problemática surge como esencial para una solución de largo plazo. Un programa de **Manejo Integrado de Malezas** es un sistema de manejo que enfoca el problema de forma compatible con la preservación de la calidad

del ambiente, utilizando diferentes tácticas y estrategias de control con el objeto de reducir la población de malezas a niveles tales que los perjuicios económicos producidos resulten inferiores a un umbral económico aceptable para el sistema general de producción. Este programa puede involucrar, además de los métodos de control ya señalados, estudios básicos de la bioecología de las malezas, medidas preventivas, entrenamiento de personal calificado, extensión a agricultores, entre otros. Un manejo integrado de malezas, en el que múltiples estrategias son implementadas de una manera racional, es la única solución en el marco de un manejo sustentable del sistema productivo.

Lecturas recomendadas

- Bradshaw L. D., S. R. Padgett S. L. Kimball, and Wells B. H. 1997. Perspectives on glyphosate resistance. *Weed Technology*, 11:189–198.
- Christoffoleti, P.J. 2008. Aspectos de resistência de plantas daninhas a herbicidas. 3ª Edição, Associação Brasileira de Ação à Resistência de Plantas Daninhas aos Herbicidas (HRAC-BR). Piracicaba, Brasil.
- De Prado, R.; Cubero, S. y Osuna, M.D. 2001. Biotipos resistentes a herbicidas. Distribución mundial. En: *Uso de herbicidas en la agricultura del siglo XXI*. Capítulo 22: 279-291. De Prado, R. y Jarrín, J. (Eds). Servicio de Publicaciones, Universidad de Córdoba. Córdoba, España.
- Devine, M.D.; Duke, O. y Fedtke, C. 1993. *Physiology of herbicide action*. P.R.T. Prentice Hall. Englewood Cliffs, New Jersey.
- García Torres, L. y Fernández Quintanilla, C. 1991. *Fundamentos sobre malas hierbas y herbicidas*. Ministerio de Agricultura, Pesca y Alimentación, Madrid - Mundi-Prensa, Madrid.
- Hall, L. Beckie, H. y Wolf, T.M. 1999. *How herbicides work. Biology to application*. Alberta Agriculture, Food and Rural Development Publishing Branch. Edmonton, Alberta. Canada.
- Jasieniuk, M., 1995. Constraints on the evolution of glyphosate resistance in weeds. *Resistant Pest Management*, 7: 31-32.
- Kogan, M. y Pérez, A. 2003. *Herbicidas. Fundamentos fisiológicos y bioquímicos del modo de acción*. Ediciones Universidad Católica de Chile. Santiago, Chile.
- Michitte, P., De Prado, R., Espinoza, N., Ruiz-Santaella, P. and Gauvrit, C. 2007. Mechanisms of resistance to glyphosate in a Ryegrass (*Lolium multiflorum*) biotype from Chile. *Weed Science* 55:435-440.
- Powles S.B. y Preston C. 2006. Evolved Glyphosate Resistance in Plants: Biochemical and Genetic Basis of Resistance. *Weed Technology*, 20:282–289.
- Powles, S.B. y Holtum, J.M. 1994. *Herbicide resistance in plants: Biology and biochemistry*. Lewis Publishers, Boca Raton, Florida.
- Puricelli, E. y Tiesca, D. 2005. Weed density and diversity under glyphosate-resistant crop sequences. *Crop Protection*, 24: 533-542.
- Sabbatini, M.R., Irigoyen, J.H. y Vernavá, M.N. 2004. Capítulo 11: Estrategias Para el Manejo Integrado de Malezas: Problemática, Resistencia a Herbicidas y Aportes de la Biotecnología, En: *Biotecnología y mejoramiento Vegetal*, Eds: V. Echenique, C. Rubinstein y L. Mroginski. Editorial INTA, 343-354.
- Tiesca, D. y Nisensohn, L. 2001. Resistencia de *Amaranthus quitensis* H.B.K. a imazetapir y clorimurón-etil. *Pesquisa Agropecuaria Brasileira*, 36: 601-606.
- Tiesca, D. y Puricelli, E. 2007. Effect of tillage systems and herbicide treatments on weed abundance and diversity in a glyphosate resistant crop rotation. *Crop Protection*, 26:1765-1770.
- Tiesca, D.; Nisensohn, L y Papa, J.C. 2008. Resistencia a glifosato en biotipos de sorgo de Alepo (*Sorghum halepense* (L.) Pers.) de la región sojera núcleo de Argentina. XXVI Congresso Brasileiro da Ciência das Plantas Daninhas, XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas, Ouro Preto, Brasil.
- Vigna, M.R., López, R.L., Gigón, R. y Mendoza, J. 2008. Estudios de Curvas Dosis-respuesta de Poblaciones de *Lolium multiflorum* a Glifosato en el SO de Buenos Aires, Argentina. XVIII Congreso de la Asociación Latinoamericana de Malezas, Ouro Preto, Brasil, 4 al 8 de mayo de 2008. 13 pp.
- Vila-Aiub, M.; Balbi, M.; Gundel, P.; Ghersa, C. y Powles, S., 2007. Evolution of Glyphosate-Resistant Johnsongrass (*Sorghum halepense*) in Glyphosate-Resistant Soybean. *Weed Science*, 55:566-571.
- Vila-Aiub, M.M.; Vidal, R.A.; Balbi, M.C.; Gundel, P.E.; Trucco, F. y Ghersa C.M., 2008. Glyphosate-resistant weeds of South American cropping systems: an overview. *Pest Management Science*, 64:366–371.
- Vitta, J.; Faccini, D.; Nisensohn, L.; Puricelli, E.; Tiesca, D. y Leguizamón, E. 1999. Las malezas en la región sojera núcleo argentina: Situación actual y perspectivas. Cátedra de Malezas, Facultad de Ciencias Agrarias, U.N.R. Editada por DowAgro Sciences. Argentina S.A.
- Vitta, J.; Tiesca, D. y Puricelli, E. 2004. Widespread use of glyphosate tolerant soybean and weed community richness in Argentina. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 103: 621-624.
- Weed Science. International Survey of Herbicide Resistant Weeds. 2008. <http://www.weedscience.org/in.asp>

PARTE VII

Biotecnología y Sociedad

VII. CAPÍTULO 1

La transformación tecnológica y los nuevos desafíos

Carmen Vicién

Durante los últimos 20 años, los sistemas productivos agropecuarios sufrieron una transformación sustancial, lo cual dio por resultado no sólo una sucesión de niveles record de producción y productividad, sino también una redefinición de la composición de la oferta granaria.

La expansión de la frontera agrícola argentina generó cambios en el uso de la tierra en varias regiones del país. La mayor parte del crecimiento productivo se concentró en la región pampeana, pero la transformación alcanzó, en mayor o menor medida, a casi todas las áreas del país con aptitud agrícola. La disponibilidad tecnológica, las características de los suelos, la capacitación de la mano de obra local, las tendencias climáticas, la relación de los precios de los productos y los insumos influyeron en la tasa de difusión de los cultivos en las diferentes regiones.

En definitiva, el eje central de este desarrollo agropecuario consistió en la difusión de un paquete tecnológico que combinaba innovaciones genéticas, fundamentalmente derivadas de la biotecnología moderna, insumos y equipos, prácticas agronómicas y nuevos, o en algunos casos, remozados agentes especializados, que llevaron a la creación de redes de articulación mucho más complejas.

Esto fue acompañado por un proceso de especialización, tanto en lo productivo como en las exportaciones, basado en la trama oleaginosa, fundamentalmente del cultivo de soja.

Los potenciales efectos ambientales negativos fueron mitigados por el uso de tecnologías, como la siembra directa, la rotación de cultivos, la mayor aplicación de fertilizantes y herbicidas, y la agricultura de precisión.

Primeramente haremos un breve repaso de algunos de los aspectos más destacados de esta transformación, para luego plantear algunos desafíos pendientes.

La maquinaria y los sistemas de labranza

La renovación del parque de tractores se dio en forma paralela a un cambio de gran significación: la modernización de la maquinaria de arrastre y autopropulsada. En el caso de sembradoras, pulverizadoras y herramientas para la aplicación de fertilizante, se desarrollaron sistemas de precisión, que permitieron el logro de mayor uniformidad de siembra, y eficiencia en la aplicación.

Los sistemas de labranza tradicionales fueron reemplazados gradualmente por otros que implicaban menor remoción del perfil. La siembra directa, de escasa difusión a comienzos de la década del 90, abarca hoy más del 50 % del área bajo cultivo. La introducción y rápida expansión de la siembra directa, que redujo la erosión del suelo y produjo modificaciones importantes en la organización del ecosistema agrario, probablemente sea el cambio de alcances ambientales más significativo generado por las innovaciones tecnológicas de la agricultura argentina en las dos últimas décadas. El incremento en la superficie implantada con siembra directa fue acompañado de una mayor utilización de herbicidas asociados a esta técnica y un crecimiento en la venta de sembradoras específicas.

La cosecha y el almacenaje

La tecnología de cosecha progresó en forma considerable, mejorando la calidad de trilla, lo cual permitió reducir las pérdidas. Los navegadores satelitales constituyeron otra nueva herramienta a emplear. La confección de mapas de rinde, al posibilitar mejorar el conocimiento del terreno, ayuda a lograr un uso más eficiente del recurso edáfico.

Simultáneamente, el manejo de los volúmenes cosechados presenta aspectos importantes por resolver, como la falta de un sistema de almacenamiento adecuado en origen, la dificultad en instrumentar un almacenamiento diferencial por calidad o las deficiencias en infraestructura para el manejo de la producción y su traslado.

Los productos fitosanitarios

En cuanto a la evolución del mercado de productos fitosanitarios, en la década del noventa

se observa que hasta 1999 hubo un aumento en el consumo, en especial de herbicidas. Durante el período 2000 a 2002, descendió el total de ventas, debido a la recesión de casi cuatro años que vivió el país a partir de fines del 2001. En el año 2003 hubo una marcada recuperación, equivalente a un crecimiento del 32 % en la cantidad total comercializada y del 9 %, en el valor monetario del mercado. A pesar de esta caída, se triplicó la cantidad física comercializada, con un notable aumento para los insumos empleados en los sistemas de siembra directa, en especial el glifosato.

Los fertilizantes y el uso del suelo

El de los fertilizantes constituye una incorporación tecnológica destacada de comienzos de los años noventa. Si se toma como base el año 1991, en cuatro años se cuadruplicó el consumo aparente de fertilizantes. En el año 2007, el consumo de nutrientes ($N+P_2O_5+K_2O+S$) puede ser estimado en 1,75 millones de t, con una tasa de incremento de 98700 t por año en el período 1993-2007. Este crecimiento en el consumo de fertilizante fue ocasionado por aumentos en las superficies cultivadas y mejoras en la tecnología aplicada a los principales cultivos.

Al respecto cabe mencionar que, en años recientes, se registra una marcada disminución en el uso de fertilizantes (el año 2008 concluyó con un consumo 30% inferior al de 2007). Los números de la campaña 2008/2009 son aún más bajos, donde si bien la cosecha y la extracción de nutrientes fue menor, la reposición de nutrientes fue muy baja.

La trascendencia del uso de fertilizantes en Argentina no pasó inadvertida y, en consecuencia, las empresas distribuidoras comenzaron a realizar una importante inversión en logística portuaria y de distribución, con el propósito de adaptarse a los cambios ocurridos.

Varias empresas comercializadoras de fertilizantes han instalado centros de distribución y aplicación de fertilizante en el interior del país. Las mezclas de fertilizante a granel han aparecido en el mercado como una nueva forma de diferenciación de producto, destinadas a cubrir carencias específicas de los cultivos. Sin embargo, la utilización de mezclas específicas

resulta de utilidad cuando se conocen las carencias de macro y micro nutrientes del suelo, los requerimientos del cultivo y las recomendaciones de aplicación. En este sentido, subsisten aún deficiencias en cuanto al conocimiento de los requerimientos de los cultivos y los aportes necesarios. Existe además necesidad de contar con la posibilidad de realizar análisis de suelos con mayor grado de confiabilidad.

Los balances de nutrientes continúan siendo negativos para los suelos. La necesidad de sostener los niveles de producción no se logra solamente con el aporte de nutrientes a través de una fertilización balanceada, sino también con prácticas de manejo tales como rotación de cultivos, siembra directa, incorporación de cultivos de cobertura y manejo integrado de plagas y enfermedades, de manera de contribuir a preservar y mejorar la sustentabilidad y calidad del recurso suelo.

Se destaca además la gran reducción de la superficie ocupada por pasturas permanentes en las regiones más productivas. Esto supone el riesgo que disminuya la incorporación de carbono originado en materia orgánica, el cual es crucial para el mantenimiento de las propiedades físicas, químicas y biológicas de los suelos.

Por otra parte, en muchas regiones no se dispone de información con cierto nivel de detalle sobre cómo los cambios en el uso del suelo pueden afectar los servicios que brindan los agro-ecosistemas (regulación, hídrica, control de la erosión, conservación de la biodiversidad).

Las semillas y la biotecnología

En casi todos los cultivos se ha observado una mejora en la calidad de la semilla utilizada, mayor adaptación de los híbridos y de las variedades a los ecosistemas presentes en el país y mejor implementación de las prácticas de manejo de los cultivos.

Es conocido y significativo el hecho que desde hace unos nueve años Argentina presenta el segundo lugar en el mundo, en cuanto a superficie cultivada con materiales genéticamente modificados (GM). Al presente, más del 99% de la soja, el 80% del maíz y el 90% del algodón son sembrados con esos materiales. En el

mercado existen once eventos de transformación, que corresponden a dos características funcionales relacionadas con aspectos de la producción agrícola (tolerancia a herbicidas y resistencia a insectos), en tres especies (soja, maíz y algodón).

En el caso particular de la soja, la rápida adopción de los materiales GM coincidió con el proceso de expansión del área dedicada al cultivo. La difusión de la soja GM tolerante a glifosato es uno de los casos de mayor dinamismo en el ámbito internacional en cuanto a la incorporación a gran escala de una innovación tecnológica, desde su aprobación para ser comercializada en el año 1996. Otro aspecto a puntualizar es el hecho que la introducción de este material se produjo prácticamente en el mismo momento en que estas tecnologías estuvieron disponibles en el mundo.

Entre los factores que motivaron semejante incorporación y expansión se encuentra la excelente asociación de la soja genéticamente modificada con el sistema de siembra directa. A ello se unen las mejoras introducidas en el manejo y laboreo del cultivo que redundaron en un sistema productivo más simple que el empleado anteriormente.

Sin embargo, es obvio que una de las razones principales para la rápida adopción de los cultivos genéticamente modificados se basó en el beneficio obtenido por los productores agropecuarios. Los resultados económico-financieros de la soja obtenidos en las explotaciones agropecuarias muestran la estabilidad que este cultivo da a los sistemas productivos, pues su predominancia se conserva aún ante profundos cambios en los precios de los insumos y de los productos.

Los servicios para el agro

En forma paralela a la intensificación en el uso de tecnología crecieron las empresas de servicios para el agro, fundamentalmente en el caso de aplicación de productos fitosanitarios, abonos químicos, confección de reservas forrajeras y cosecha.

El acceso a la información ha sido otro factor de progreso; los sistemas de comunicación han mejorado en el interior del país. A ello se suma la proliferación de muestras agropecuarias y reuniones técnicas en el interior del país.

Las formas de administración de las empresas

La profesionalización de la administración de las empresas agropecuarias constituye otro importante factor de cambio tecnológico. Los productores comprenden cada vez mejor que la adquisición de insumos y la comercialización de los productos son componentes fundamentales de su actividad. Cuando el tamaño de la explotación constituye una limitante, estos productores recurren a diferentes formas de asociación con el propósito de incrementar el resultado final de su actividad, mejorando la logística de compra o la colocación de sus productos.

La integración con las cadenas comerciales e industriales ha sido otro recurso que ha cobrado auge en los últimos tiempos. Las diferentes formas de integración han creado un amplio espectro de modalidades, donde el factor común suele ser la contribución de los agentes más avanzados de la cadena en la incorporación y difusión de tecnología en el agro.

Algo similar ha ocurrido en la etapa de comercialización de productos. Abundan los ejemplos de asociación entre productores para comercializar productos específicos, tanto en el mercado interno como en el mercado internacional. La adaptación a nuevas modalidades de comercialización no ha sido tarea sencilla para muchos productores agropecuarios.

Los actores sociales

La innovación tecnológica se convirtió en el factor central de la rentabilidad de las explotaciones agrarias, pero fue más fácilmente incorporada por las grandes que por las pequeñas, porque una parte importante del nuevo patrón tecnológico estaba asociado con bienes permanentes de capital, como maquinaria para siembra directa, o con capital de trabajo, como productos fitosanitarios.

Este contexto económico y tecnológico favoreció la figura del contratista con capacidad para endeudarse y hacer uso eficiente del capital. La situación dio también lugar a la aparición de nuevas formas de organización, además del mencionado contratista, y contribuyó a establecer un mercado especial de capitales urbanos interesados en la agricultura. Se trata de gestores

del negocio agropecuario que combinan la posesión de la tierra, obtenida a través de distintas formas de arrendamiento o aparcería, con el capital de terceros, aportando la tecnología y la capacidad de gerenciamiento. En el conjunto de nuevas y remozadas formas de organización de la producción se encuentra una gran diversidad.

Como contrapartida, se incrementó la cantidad de medianos y pequeños propietarios rurales que se convirtieron en rentistas. Durante la última parte de la década del 90 las condiciones de precios relativos de la producción agropecuaria con relación a los bienes no transables, que inciden considerablemente en el costo de vida, hicieron inviables a las explotaciones de menor tamaño, que por muchos años habían sido viables. Esto generó un proceso de desmantelamiento de explotaciones familiares de menor tamaño, la emigración de sus propietarios a zonas urbanas, especialmente rurales, y el arrendamiento de sus parcelas a vecinos u otras empresas de mayor tamaño. También hubo situaciones de pérdida de las propiedades.

La caída en el número de productores, vinculada con procesos de concentración del capital, no es asimilable estrictamente a la disminución del número de personas que trabajan en el ámbito rural. Una gran cantidad de oferentes de servicios agropecuarios, especialmente de tareas mecánicas, y los familiares y asalariados que los acompañan, viven generalmente en los pueblos y ciudades intermedias. Además de los proveedores de servicios para tareas realizadas en el campo, existe una gama de actividades como la venta de insumos, talleres de reparación de vehículos y maquinaria, el transporte y el comercio, que ocupan a importantes núcleos de población. Los casos más visibles son los de las poblaciones donde funcionan fábricas de maquinaria e implementos agrícolas.

Hacia el futuro

Las modificaciones mencionadas son relevantes, tanto por el nivel de hectáreas consideradas, como por el hecho que los procesos no se restringieron a un grupo limitado de productores de avanzada. Los cambios experimentados en la agricultura argentina han permitido alcanzar

un nuevo piso de producción, pero aún queda mucho por hacer, más allá de las pequeñas menciones efectuadas anteriormente, que no pretenden ser exhaustivas.

En el caso particular de la biotecnología, sobre la base de los materiales GM en evaluación en Argentina y en el mundo, los desarrollos que se avizoran en el mediano y corto plazo incluyen una amplia gama de caracteres agronómicos. Así se cuenta con tolerancia a diferentes herbicidas, resistencia a insectos Lepidópteros y Coleópteros, y resistencia a virus; resistencia a stress (hídrico, salinidad y restricción de nutrientes en el suelo) y mejora en el valor nutritivo de los cultivos alimenticios (modificación en la composición de aceites; mejoras proteicas, modificación enzimática para uso en procesos industriales; modificación en el contenido de carbohidratos en el grano).

Sin embargo, cabe reflexionar que la oferta de tecnología en Argentina, salvo la incorporación al paquete de alternativas productivas de la soja y en menor medida el maíz, muestra escasa diversificación. Esta especialización productiva es, en gran medida, inconsistente con la amplitud agro-ecológica de los recursos del país que puede ser empleada para obtener una cartera de productos mucho más amplia. Los actores sociales que han sido parte de la transformación tecnológica de los últimos años tienen que avanzar, enfrentando nuevos desafíos.

Lecturas recomendadas

- Barsky O. 2003. Censo del campo: una foto nítida. Clarín Rural. 9 de abril de 2003.
- Bertolasi, R. 2004. Formas de organización de la producción. www.bancomundial.org.ar
- Bisang, R. y Gutman, G. 2003. Dinámicas recientes en la producción agroalimentaria Argentina. Revista Encrucijadas N° 21. Febrero 2003
- Della Valle, C. y García, M. 2003. El cultivo de maíz en alerta amarillo. Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. Subsecretaría de Economía Agropecuaria. Dirección de Agricultura. 47 p.
- Ghersa, C. y Martínez-Ghersa, M. A. Consecuencias de los recientes cambios agrícolas. **Ciencia Hoy. Volumen 15 N° 87. Junio/Julio 2005.37- 45 p.**
- Huerga, M. y San Juan, S. 2004. El control de plagas

en la agricultura argentina. www.bancomundial.org.ar

Paruelo J., Guerschman, J. y Verón, S. 2005. Expansión agrícola y cambios en el uso del suelo. Ciencia Hoy. Volumen 15 N° 87. Junio/Julio 2005. 14- 23 p.

Peretti, M. 1999. Competitividad de la empresa agropecuaria argentina en la década de los 90. Revista Argentina de Economía Agraria. Volumen II. Número I p. 27-37.

Piñeiro, M. y Villarreal, F. 2005. Modernización agrícola y nuevos actores sociales. **Ciencia Hoy. Volumen 15 N° 87. Junio/Julio 2005. 24- 31 p.**

Satorre, E. 2005. *Cambios tecnológicos en la agricultura argentina actual.* **Ciencia Hoy. Volumen 15 N° 87. Junio/Julio 2005. 24- 31 p.**

Vicién, C., Pena de Ladaga, S. y Di Paola, M. M. 2008. Tecnología, riesgo y devaluación: una reflexión sobre la evolución de las explotaciones agrícolas en Argentina. p 173-193. En: Modelización Económica en el Sector Agropecuario II. Carmen Vicién, Susana Pena de Ladaga y Gerardo Petri (Eds). Orientación Gráfica Editora. Buenos Aires. Septiembre de 2008. 193 p. ISBN 978-987-9260-62-3.

VII. CAPÍTULO 2

Adopción de los cultivos genéticamente modificados en Argentina y en el mundo

Gabriela Levitus

Los primeros cultivos genéticamente modificados (GM) o transgénicos se sembraron comercialmente en 1996 y desde ese entonces su adopción global ha aumentado en forma consistente y con tasas sin precedentes en la historia de la agricultura.

Esta rápida adopción, que creció de 1,7 a 125 millones de hectáreas en trece años, refleja la satisfacción del agricultor con los productos de la tecnología, que ofrecen varios beneficios, como la reducción de los costos de producción, mayor flexibilidad en el manejo de los cultivos, disminución en el empleo de insecticidas, mayor rendimiento y mejor calidad.

Distribución por país

Según el Servicio para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA), en 2008 13,3 millones de agricultores de 25 países sembraron 125 millones de hectáreas con cultivos transgénicos. Catorce lo hicieron en 100.000 hectáreas o más, aunque el 98% del área global se concentró sólo en ocho: Estados Unidos, Argentina, Brasil, India, Canadá, China, Paraguay y Sudáfrica (Fig. 1 y Tabla 1).

Distribución por cultivo y característica

En 2008, el 52,6% de las hectáreas sembradas con cultivos GM correspondieron a soja, el 29,8% a maíz, el 12,4% a algodón y el 4,7% a canola. Estas superficies significaron el 70%, 24%, 46% y 20% de las áreas totales de cada uno de esos cultivos, respectivamente. También se sembraron, aunque en áreas muy pequeñas, variedades transgénicas de alfalfa, papaya, zapallo, álamo, clavel y remolacha azucarera.

Con respecto a las características introducidas, el 63% de la superficie total de cultivos GM se sembró con cultivos tolerantes a herbicida

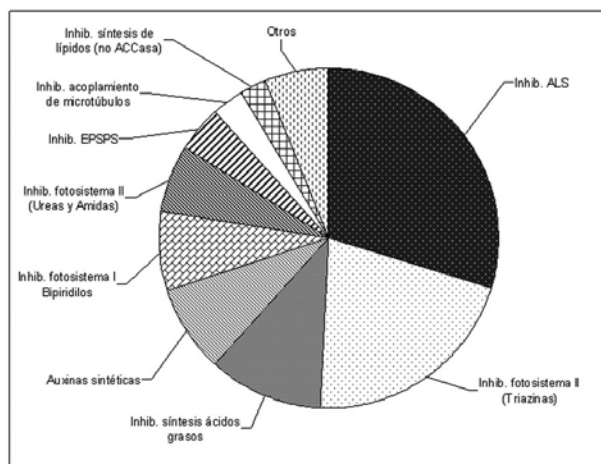


Figura. 1. Área cultivada con cultivos GM en 2008, por país, sobre 125 millones de hectáreas. Otros: Uruguay, Bolivia, Filipinas, Australia, México, España, Chile, Colombia, Honduras, Burkina Faso, República Checa, Rumania, Portugal, Alemania, Polonia, Eslovaquia, Egipto. Fuente: ISAAA.

(soja, maíz, algodón, canola y alfalfa), el 15% con cultivos resistentes a insectos-Bt (maíz y algodón), y el 22% con cultivos que contenían ambas características acumuladas por cruzamiento convencional (maíz y algodón). También se sembraron cultivos resistentes a virus (papaya y zapallo), aunque en superficies mucho menores.

Los cultivos transgénicos en Argentina

En 2008 Argentina se mantuvo en el segundo lugar en la lista de países productores de transgénicos, sembrando en la campaña 2008/2009 una proporción mayor de variedades transgénicas que en la campaña anterior (Fig. 1). Efectivamente, casi el 100% de la superficie de soja fue sembrada con soja tolerante al herbicida glifosato, mientras que el maíz transgénico ocupó el 83% del área destinada a maíz (comparado con el 74% en 2007/08) y el algodón genéticamente modificado ocupó el 94% del área total del cultivo (comparado con el 90% en 2007/08) (Fig. 2).

Cultivos tolerantes a glifosato

El crecimiento de las malezas disminuye drásticamente el rendimiento y la calidad de

Tabla 1: Adopción de cultivos transgénicos en 2008, por país. Fuente: ISAAA.

* Sólo para producción de semillas

País	Cultivos GM
EEUU	Soja, algodón, maíz, canola, alfalfa, papaya, zapallo, remolacha azucarera
Argentina	Soja, algodón, maíz
Brasil	Soja, algodón, maíz
Canadá	Maíz, soja, canola, remolacha azucarera
India	Algodón (Bt)
China	Algodón, tomate, papaya, álamo, petunia, pimienta
Paraguay	Soja
Sudáfrica	Algodón, maíz, soja
Uruguay	Maíz, soja
Bolivia	Soja
Filipinas	Maíz
Australia	Algodón, canola, clavel
España	Maíz
México	Algodón, soja
Colombia	Algodón, clavel
Chile*	Maíz, soja, canola
Honduras	Maíz
Rep. Checa	Maíz
Portugal	Maíz
Alemania	Maíz
Eslovaquia	Maíz
Rumania	Maíz
Polonia	Maíz
Burkina Faso	Algodón
Egipto	Maíz

los cultivos. Muchos herbicidas sirven para un determinado tipo de malezas y suelen dejar residuos que permanecen en el suelo por años. El empleo de cultivos tolerantes a herbicidas resuelve estos problemas, ya que estos cultivos son tolerantes a los herbicidas glifosato o glufosinato, ambos de amplio espectro (es decir, eliminan a casi todas las plantas, excepto aquellas tolerantes a dichos herbicidas) y de menor efecto residual que los herbicidas tradicionales. Además, el productor se beneficia en gran medida porque puede usar métodos de labranza más conservacionistas, como la siembra directa, que ayuda a conservar el suelo y la humedad, simplifica el manejo y reduce los costos de producción.

En las plantas, la enzima 3-enolpiruvil-shiquimato-5-fosfato sintasa (EPSPS) es clave en las rutas metabólicas que llevan a la producción de los aminoácidos aromáticos (fenilalanina, tirosina y triptófano). Esta enzima sólo está presente en plantas y microorganismos, tales como bacterias y hongos, y ausente en animales y humanos. En la década de 1970 se descubrió que el glifosato inhibía a la enzima EPSPS, impidiendo la producción de aminoácidos aromáticos. Los aminoácidos son esenciales para la síntesis proteica y las proteínas son necesarias para el crecimiento y las funciones vitales, por lo tanto, la aplicación del glifosato lleva a la muerte de la planta. Las plantas tolerantes a glifosato tienen el gen *epsps* de

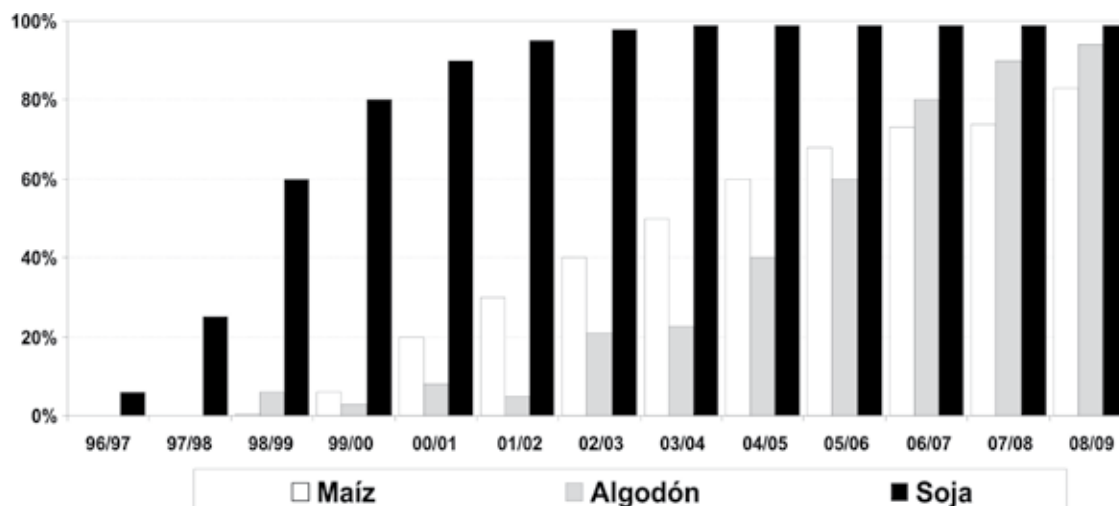


Fig. 2: Evolución de la superficie sembrada con cultivos GM en Argentina.

la cepa CP4 de la bacteria del suelo **Agrobacterium tumefaciens**. Como la enzima EPSPS producida en esta cepa bacteriana no es afectada por el glifosato, su introducción en el genoma de las plantas las vuelve tolerantes al herbicida. Uno de los nombres comerciales del glifosato es “Roundup”, por eso, quienes desarrollaron esta tecnología denominaron a los cultivos tolerantes al glifosato con el nombre de “Roundup Ready”, o RR.

Como método alternativo, también se obtuvo maíz tolerante a glifosato por introducción del gen de la EPSPS del maíz, pero con modificaciones en su secuencia para que la enzima resulte resistente al herbicida.

En Argentina se cultivan soja, maíz y algodón tolerantes a glifosato. La soja fue el primer cultivo en el mercado argentino en incorporar una característica a través de transgénesis. En 1996 fueron inscriptas en el Registro Nacional de Propiedad de Cultivares las primeras variedades de soja tolerante a glifosato de la empresa Nidera y ya en la campaña 97/98 se sembraron 1.750.000 de hectáreas. Hoy hay varias empresas semilleras que ofrecen al mercado un gran número de variedades de soja con esta característica, encontrándose variedades de los grupos III a VIII, adaptadas a una amplia gama de regiones y necesidades. En 2008/09, la superficie de soja transgénica ascendió a 17 millones de hectáreas.

El maíz tolerante a glifosato se aprobó para su siembra comercial en 2004, y desde ese entonces su adopción creció en forma sostenida, alcanzando en la campaña 2008/09 las 320 mil hectáreas (el 10% del maíz transgénico total). También se han cultivado híbridos de maíz que contienen dos características acumuladas: la resistencia a insectos y la tolerancia a glifosato (800 mil hectáreas). La adopción del algodón tolerante a glifosato también se incrementó en gran medida en los últimos años, alcanzando en la campaña 2008/09 las 210 mil hectáreas (el 70% del algodón sembrado en Argentina).

Cultivos resistentes a insectos

El barrenador del tallo (**Diatraea saccharalis**) es un insecto lepidóptero que constituye la principal plaga de los cultivos de maíz en nuestro país. Sus larvas se alimentan de los tallos y las hojas, dejando galerías que dañan la planta, la quiebran, impiden el transporte de nutrientes y sustancias y son vía de entrada para hongos, cuyas toxinas (micotoxinas) son muy peligrosas para nuestra salud.

La denominación Bt deriva de **Bacillus thuringiensis**, una bacteria que normalmente habita el suelo y cuyas esporas contienen proteínas tóxicas para ciertos insectos. Estas proteínas, denominadas Cry, se activan en el sistema digestivo del insecto y se adhieren a su epitelio intestinal, alterando el equilibrio os-

mótico del intestino. Esto provoca la parálisis del sistema digestivo del insecto el cual deja de alimentarse y muere a los pocos días. Las toxinas Cry son consideradas inocuas para mamíferos, pájaros e insectos “no-blanco”. Hay varias proteínas Cry (y por lo tanto diferentes genes cry) y cada una es específica para un tipo o grupo de insectos.

El maíz Bt es un maíz transgénico o genéticamente modificado que produce en sus tejidos proteínas Cry. Así, cuando las larvas del barrenador del tallo intentan alimentarse de la hoja o del tallo del maíz Bt, mueren. Actualmente, el 48% del maíz cultivado en Argentina es Bt. Cabe mencionar que también se han cultivado en la campaña 2008/09 híbridos de maíz que contienen dos características acumuladas: la resistencia a insectos y la tolerancia a glifosato (800 mil hectáreas).

Los beneficios que presenta el maíz Bt se centran en la posibilidad que tiene el agricultor de controlar las plagas sin emplear insecticidas, lo que constituye, además, un beneficio directo para el medio ambiente. En particular, el control eficiente de las plagas permite una máxima expresión del potencial de rendimiento, un manejo más flexible de las fechas de siembra y cosecha, y una mejor calidad del grano. Por su parte, la reducción en el nivel de micotoxinas es un beneficio para la salud humana y animal. De la misma manera que el maíz Bt, el algodón Bt resulta de la incorporación de los genes Cry al genoma del algodón. Así, el algodón Bt que se cultiva en la Argentina también es resistente a insectos lepidópteros y en particular, a la oruga del capullo, la oruga de la hoja del algodónero y la lagarta rosada.

En 1998 se comercializó la primera variedad de algodón Bt en el país. Los principales beneficios del uso de algodón Bt son el aumento en los rendimientos debido al control de insectos y la disminución de costos y del impacto ambiental y para la salud debido al menor número de aplicaciones de insecticidas. En la campaña 2008/09 se sembraron unas 72.000 hectáreas de algodón Bt en Argentina.

Lecturas y sitios recomendados:

- James, C. 2008. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2008. ISAAA Brief N° 38. Servicio para la Adquisición de Aplicaciones Agrobiotecnológicas (ISAAA) www.isaaa.org
- Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología, ArgenBio, www.argenbio.org
- Trigo E, Cap, E. 2006. Diez años de cultivos genéticamente modificados en la Agricultura Argentina. ArgenBio.

VII. CAPÍTULO 3

Biotecnología en la mira: el problema de la percepción

Durand, Valeria

¿Qué es la percepción?

Según el Diccionario de la Real Academia Española y la psicología la percepción es un proceso cognoscitivo, a través del cual los sujetos captan información del medio, la elaboran e interpretan y forman con estos datos una representación de la realidad de su entorno y/o de un tema en particular dentro de dicho entorno. Esta “representación” es lo que en el lenguaje cotidiano se conoce como opinión o creencias que las personas tienen sobre determinados aspectos, hechos o temas de su realidad.

Si se traslada esta definición que brinda la psicología al terreno de la sociología surgen los términos “percepción pública” y “opinión pública”. Si la psicología explica este proceso cognoscitivo desde lo individual, la sociología lo explica y estudia desde lo grupal. De esta manera, se llama percepción pública al proceso por el cual un grupo de personas interpreta y ve la realidad de su entorno, y en base a esta interpretación forma determinadas creencias sobre los hechos y temas de su medio. El conjunto de estas percepciones dan origen a la opinión pública, entendida como las creencias y puntos de vista sostenidos por un público en cierto momento y sobre un tema en particular, que no necesariamente concuerdan entre sí.

Si bien existe un paralelo entre lo que la psicología y la sociología entienden por percepción y opinión, la naturaleza de “lo grupal” hace que estos términos tengan determinadas particularidades que serán detalladas a continuación.

Haciendo historia

Antes del advenimiento de la Revolución Industrial, las comunicaciones y la tecnología, la sociedad estaba conformada por comunidades pequeñas y aisladas. Los intereses de los integrantes de estas comunidades se limitaban a su pequeña ciudad o vecindario y a temas que

los involucraban a todos: los impuestos, las tierras, los códigos de convivencia. En este contexto, las personas se reunían en asambleas donde trataban los temas de interés común o controversiales, había personas destacadas que cumplían el papel de líderes (la persona de mayor de mayor edad, el patriarca) quienes dirigían el debate y luego se llegaba a un acuerdo.

La sociedad moderna, por el contrario, es globalizada, es una sociedad de masas y no de pequeñas comunidades, está hiper-comunicada, los intereses comunes son amplios, dada la diversidad cultural e ideológica de los miembros que la integran y los problemas son no sólo locales sino globales. Esto define a la sociedad moderna como compleja, móvil y cambiante. Han aparecido nuevos factores y dificultades en el proceso de elaboración de opiniones y acuerdos sobre temas en común. Por un lado, dada la diversidad cultural, cabe preguntarse ¿qué se puede considerar “de interés común”? Existen temas que sin duda son importantes para todos, como la salud y la seguridad; pero ¿qué grado de importancia le da cada individuo o cuán relevante es realmente un tema para “todos”? Lo que puede ser de sumo interés para un grupo, puede no serlo tanto para otro. Por otro lado, el individuo ya no puede cubrir el área total de los intereses de la sociedad. Son demasiados los temas “en el tapete” y además, no siempre son los mismos temas los que están en el foco de la escena. Esto es clave para comprender que, dada esta imposibilidad de abarcar y conocer el área total de los intereses, el individuo y los grupos que integran la sociedad moderna recurren a diversas fuentes de información y de interpretación para crear una representación de la realidad y formar una opinión. Es decir, los individuos delegan en otros la tarea de elaborar e interpretar la realidad de una determinada forma y, lo que es más importante, dejan que esos otros hablen por ellos. Las instituciones y organizaciones en las cuales el hombre moderno ha depositado estas funciones son principalmente: los medios de comunicación, los líderes de opinión (periodistas, celebridades) y las organizaciones sin fines de lucro (grupos activistas, organizaciones no gubernamentales - ONGs, asociacio-

nes de defensa del consumidor). La sociedad ha depositado su confianza en ellos, a quienes en este capítulo llamaremos “influenciadores” por considerarlos creíbles. Asimismo, estas personas e instituciones, concientes de este voto de confianza, se han apropiado de este rol y se autodefinen como los voceros de la opinión pública, los que representan y defienden los intereses comunes de la sociedad.

Zonas grises

No todo es blanco y negro en el mundo de la percepción y la opinión pública. La primer zona gris que podemos identificar está relacionada con el hecho de que el hombre no es sólo un ser racional y objetivo sino también emocional. Por lo tanto, la opinión pública no se forma exclusivamente en base a juicios objetivos ni análisis fríos y desinteresados de un tema. Por el contrario, en la formación de opinión también intervienen una serie de factores de índole emocional de gran importancia: deseos, miedos, creencias religiosas, mitos, leyendas, costumbres, entre otros. Los influenciadores saben esto muy bien y lo utilizan de manera apropiada para lograr adhesión a sus causas. (Se mencionarán ejemplos más adelante en este capítulo).

La segunda zona gris tiene que ver con una característica mencionada en párrafos anteriores de la sociedad moderna: Es una sociedad de masas. Por lo tanto, su comportamiento es más similar al comportamiento de las masas que al del individuo. La “masa” es irracional, difusa, son “todos y a su vez nadie”, es cambiante y está dispersa.

La tercer y última zona gris está relacionada con los métodos de medición de la percepción pública, los cuales pueden arrojar resultados poco precisos que brindan una interpretación errónea de lo que el público cree o siente en relación a un tema.

Tener en cuenta estas “zonas grises” es clave para comprender determinadas manifestaciones de la percepción pública: cómo reacciona una sociedad ante cierto problema o tema de controversia.

Cómo se mide la percepción pública

Antes de pasar al tema central de este capí-

tulo: la percepción pública de la biotecnología, brevemente se hará referencia a los métodos utilizados para medir la percepción. Existen diversas metodologías, entre las cuales se destacan tres:

- *Focus groups.*
- Observaciones de campo.
- Sondeos o encuestas de opinión.
- Tomaremos el sondeo o encuesta de opinión, por ser uno de los métodos más utilizados, de tipo cuantitativo y, cuando bien diseñado e implementado, con menor margen de error.
- La encuesta o sondeo de opinión consiste en tomar una muestra representativa de cierto segmento de la sociedad y, en forma periódica o en un momento determinado, se le hacen una serie de preguntas en relación con el tema en cuestión. Dichas preguntas son de tipo cerradas. La periodicidad de este método permite predecir la dirección o tendencia hacia donde va un determinado punto de vista o, cuál es dicha tendencia en un momento y circunstancias determinadas.
- Incluir o definir a las encuestas de opinión como una “zona gris” significa que dicho método, mal empleado, es imperfecto y puede llevar a conceptos erróneos básicamente porque:
- Los resultados se pueden ver afectados por la forma como es formulada la pregunta.
- La toma de la muestra puede ser incorrecta o no representativa.
- Las preguntas abiertas y subjetivas, si se incluyen, se prestan a interpretaciones y confusiones.

Ejemplos:

Se presentan a continuación dos preguntas extraídas de dos sondeos de opinión realizados en los años 2003 y 2005.

a) “¿Está interesado en informarse acerca del consumo de alimentos transgénicos?” (Consulta sobre Biotecnología en Argentina – SAGPyA -2003).

b) “¿El consumidor tiene derecho a decidir y saber si consume o no transgénicos? (Greenpeace México - Septiembre, 2005).

Ambas preguntas apuntan a recavar datos acerca del derecho a la información y el interés del consumidor por estar informado. La respuesta a la pregunta “a” marcaría una tendencia hacia el querer recibir información o bien mostraría una tendencia hacia el desinterés por el tema, si la mayoría de las respuestas fuesen negativas. Por otra parte, la respuesta a la pregunta “b” no daría como resultado una tendencia sino una creencia o punto de vista subjetivo de quien responde.

En relación al derecho a la información y yendo al análisis de las dos preguntas más en profundidad, en primer lugar nadie pone en duda que todo individuo en una sociedad democrática tiene derecho a estar informado, por lo cual la respuesta a “b” sería obvia. Extrañamente alguien respondería de manera negativa, fuese cual fuese el tema en cuestión. Por otro lado, en ciertos aspectos pueden aparecer paradojas. El IFIC (Consejo Internacional para la Información sobre Alimentos de los Estados Unidos), presentó en 2008 en Argentina los resultados de una encuesta de percepción cuantitativa realizada en 2007 en Estados Unidos con el fin de seguir la tendencia de las actitudes de los consumidores hacia la biotecnología en alimentos. Sorprendentemente, ante la pregunta “¿Qué información desea Ud. que brinden las etiquetas de los alimentos?”, 84% respondió que no sabía y sólo un 1% respondió que deseaba información sobre biotecnología. El 15% restante de los encuestados que nombraron qué información deseaban obtener de las etiquetas, paradójicamente pidieron información que ya aparece en las mismas.

De lo expuesto es posible sacar algunas conclusiones a modo de ejemplo:

- La pregunta apropiada tal vez no sería “¿Desearía información sobre...?” ya que todos, si nos preguntan si deseamos contar con información para nuestra salud y alimentación tenderíamos a responder que sí. La pregunta más apropiada podría ser “¿Qué información desea saber?” e incluir opciones para que el entrevistado elija.
- La incongruencia entre decir “Sí, deseo información” pero luego no saber responder qué información se desea o pedir

información que ya se brinda, demuestra que: algunos consumidores dicen querer información pero no tienen el hábito de leer las etiquetas de los alimentos, y que la opinión pública es irracional y a veces no sigue el sentido común.

En conclusión, el sondeo de opinión es importante y sus resultados válidos y útiles en muchos casos. De todos modos, es una herramienta que debe ser utilizada y diseñada por profesionales expertos y sus resultados interpretados bajo el contexto y momento en que se llevó adelante la investigación.

La percepción pública: el caso de la biotecnología

Hecha la breve introducción a la definición de la percepción pública y cómo se conoce y estudia, se procederá a continuación a analizar el caso en particular de la percepción pública de la biotecnología, con especial foco en la situación en Argentina.

En ciertos sectores de la sociedad, existe una percepción negativa, o al menos una mirada desconfiada hacia los productos de la biotecnología, especialmente los cultivos transgénicos. Ante dicha situación, surge la pregunta ¿Cuáles son los factores que dieron origen a esta percepción negativa?

- Los mismos pueden resumirse en tres puntos:
- Factores psicológicos inherentes al ser humano.
- La acción de los influenciadores.
- Tendencias en la sociedad moderna.

El hombre: ser racional y emocional

Como ya se mencionó en la primera parte, el hombre no actúa sólo en base a lo que le dicta la razón, sino también “el corazón”. A lo largo de la historia, el advenimiento de nuevas tecnologías trajo consigo muchos beneficios pero también supuestos riesgos e inconvenientes, y despertó temores y desconfianza. Klaus Ammann, profesor emérito de la Universidad de Berna (Suiza) y experto en biotecnología, en una visita a Argentina en diciembre de 2007 planteó que el camino que usualmente recorre toda nueva tecnología ni bien es conocida por la sociedad es:

1. Sospecha/desconfianza.
2. Rechazo absoluto y “combate”.
3. La tecnología sigue su curso y se demuestran sus beneficios y/o inocuidad.
4. Neutralidad/precaución.
5. Aceptación, incorporación y uso.

Después de todo, es lógico desconfiar de lo nuevo, de lo que no se conoce. Por ejemplo, el rechazo de muchos en el siglo XIX a las vacunas, aceptadas hoy en día y utilizadas por todos, pone de manifiesto que la llegada de una nueva tecnología no siempre es bien recibida y que se desconfía de sus supuestos beneficios. Cuenta la historia que los experimentos de Luis Pasteur conmocionaron en su época a la comunidad científica, que veía con horror la introducción deliberada de un microorganismo mortal en el cuerpo humano. Algunos seguidores de Pasteur se escandalizaron de su proceder y hasta abandonaron su laboratorio como protesta.

Si pensamos en el caso de la biotecnología, quizás podríamos decir que nos encontramos entre los puntos 3 y 4 del “camino” que marca Klauss Ammann. Quedaron atrás las épocas de rechazo absoluto, motivadas por fuertes campañas de ciertas organizaciones activistas. La tecnología ha seguido su curso, ciertos sectores, como la agricultura, la industria farmacéutica y la alimenticia, la han aceptado y la están utilizando, pero aún queda un largo camino por recorrer en el terreno de lo que percibe y sabe el consumidor.

Continuando con los factores de tipo psicológicos que afectan la percepción de la biotecnología, además del miedo a lo nuevo, las recientes teorías de comunicación del riesgo ponen de manifiesto que los riesgos asociados con una percepción errónea de la realidad son más preocupantes y nocivos que los reales riesgos que estas nuevas tecnologías puedan implicar. Asimismo, está comprobado que ante la ecuación riesgo/beneficio, si el hombre percibe que el beneficio es mayor o sumamente relevante, asume los riesgos implicados. De lo contrario, si no percibe beneficios claros o inmediatos, da prioridad o mayor importancia al supuesto riesgo. El ejemplo más claro de esto es el consumo de medicamentos. Si leemos un prospecto,

conocemos los riesgos o posibles contraindicaciones; sin embargo, consideramos el beneficio de curarnos del dolor específico como prioritario y consumimos el medicamento de todos modos. Yendo a un ejemplo más cotidiano, conocemos los riesgos de manejar un auto, sin embargo, lo hacemos porque damos prioridad a las ventajas de comodidad, rapidez, entre otras. En el caso de la biotecnología, algunos sectores sintieron claramente los beneficios de la biotecnología, como el caso de los productores, sin embargo, el consumidor común no logra ver aún los beneficios directos de esta tecnología, por lo tanto, aún desconfía. Asimismo, es más fácil comprender por qué la biotecnología aplicada al desarrollo de productos farmacéuticos goza de “mejor prensa” que la biotecnología aplicada al desarrollo de cultivos transgénicos.

Por último, se enumerarán algunos factores que sirven para comprender un poco más por qué el hombre tiende a rechazar una nueva tecnología:

- La inmediatez y disponibilidad de gran flujo de información que hoy hay disponible. La sobredosis de información puede generar confusión e incertidumbre.
- El “historial” del uso no ético o incorrecto de ciertas tecnologías y avances científicos.
- La propia “naturaleza humana” que responde no sólo a fundamentos racionales sino que también se mueve por emociones.
- La desconfianza de la sociedad en sus organismos reguladores y controladores.
- Los cambios sociales y económicos, directos e indirectos, generados por toda nueva tecnología que se perciben como buenos para algunos sectores y neutros o perjudiciales para otros.
- El devenir de la ciencia (el “estado del arte”). Por ejemplo, algunos consumidores dicen “Recién ahora se conoce que las grasas *trans* son nocivas. ¿Qué más se descubrirá en unos años? ¿Y si estamos comiendo hoy algo que se cree inocuo y años más tarde se descubre que no lo es?”

El trabajo de los influenciadores

La teoría de las comunicaciones presenta el concepto de “influenciador”. El influenciador es toda persona o institución referente en una industria o especialidad, que es considerada fuente experta autorizada en dicha especialidad, referente de la misma, confiable y veraz. Las creencias o afirmaciones de un influenciador por lo general no son puestas en tela de juicio y tienen un efecto multiplicador en el sentido que otros las copian, adoptan o toman como modelo. El influenciador suele ser una persona con amplias habilidades comunicativas, con un alto poder de convencimiento y argumentación.

En el ámbito de la biotecnología, hay diversos influenciadores que envían información al consumidor e intervienen en el proceso de percepción de la biotecnología. No actúan en forma aislada, sino que conforman una red donde interactúan entre sí e intercambian información. En la figura 1 se muestra cuáles son estos influenciadores.

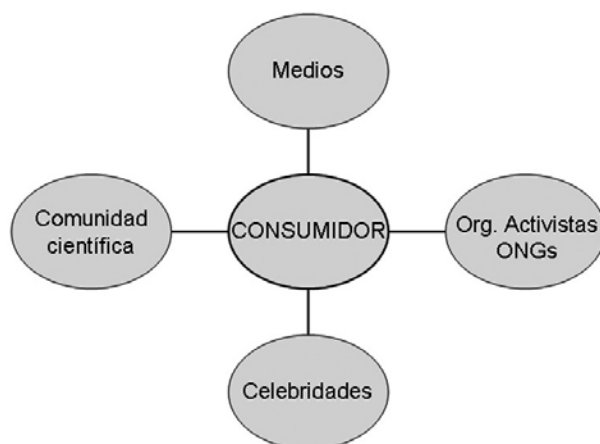


Figura 1.

Bajo el término “comunidad científica” se incluyen: los equipos de trabajo de centros de investigación públicos, las universidades, los médicos, asociaciones médicas, y demás asociaciones profesionales.

El consumidor recibe información de muchos otros sectores: las empresas o la industria, a través de la publicidad; el poder político, a través de sus campañas; los educadores. Sin embargo, los verdaderos influenciadores son los que aparecen en la figura porque:

- Son grupos con alta credibilidad, la sociedad confía en ellos y simpatiza con

ellos. Además, como se vio en la primera parte, ellos se autodefinen como los “voceros” de la opinión pública, los que reflejan “lo que la gente quiere”.

- Elaboran sus mensajes de manera inteligente, apelando a lo emocional y al alto impacto.
- Son, en general, proactivos para comunicar.
- Trabajan en conjunto: las ONGs utilizan a los medios para transmitir sus mensajes montando campañas mediáticas y tienen como voceros a diversas celebridades. Ejemplo: La participación de actores, cantantes y famosos en campañas de ONGs.
- Si bien, todos estos grupos tienen poder para que el público se adhiera o no a una causa, no todos tienen el mismo nivel de llegada o actúan de la misma forma. Por tal motivo, su grado de influencia varía. A continuación se mencionarán brevemente algunas características de estos influenciadores y en algunos casos, ciertas problemáticas que afectan su grado o nivel de influencia.
- La **comunidad científica** maneja gran cantidad de información, pero suele “encerrarse” en sí misma y ser poco proactiva con respecto a las actividades de divulgación. Si bien en los últimos años aparecieron muchos proyectos de comunicación (a través del Canal Encuentro, por ejemplo, la Agencia de Noticias Científicas - Cyta - del Instituto Leloir, entre otros), los científicos “están para trabajar en la mesada”. Es necesario traducir sus mensajes a un lenguaje accesible y comprensible para que las personas no expertas comprendan el tema en cuestión. Además, el científico habla con un lenguaje objetivo y basado en evidencia científica, no apela a lo emocional, no busca adeptos a una causa.
- Por el contrario, las **organizaciones activistas y ONGs** tienen una fuerte relación con los medios de comunicación, a quienes llegan con mensajes de alto impacto emocional (demostraciones, piquetes, etc.) que los medios encuentran

atractivos o “prensables”. Asimismo, a través de artículos, campañas publicitarias, propagandas con líderes de opinión y personajes famosos, los consumidores reciben de estos grupos diversos mensajes. Además, a través de actividades de lobby y recursos legales tales como juntar firmas, petitorios, cadenas de correo electrónico, etc., los grupos opositores se relacionan con el poder político e intentan influir sobre las políticas científicas y tecnológicas.

- Las **celebridades o personajes famosos**, se suman a causas relacionadas con el medio ambiente, la educación y otros temas sociales. Al consumidor poco le importa que dicho personaje conozca o no el tema sobre el cual predica. Aquí entra en juego lo emocional, pesa más la simpatía por el personaje y su imagen, que su formación o conocimiento académico.
- En cuanto a los **periodistas**, reciben información de todos estos influenciadores y divulgan o no sus mensajes según los ven prensables o no. Todo tema de controversia genera interés en la prensa, todo lo que diga un famoso, también. De este modo, los medios eligen los hechos que consideran noticia y los difunden. Usualmente, las demostraciones de alto impacto que realizan grupos activistas suelen tener cabida en la prensa y estos grupos mantienen una fluida relación con los medios. Un hecho importante a destacar es que en ciertos temas que despiertan controversia, los medios escuchados bajo el lema de “mostrar las dos caras” presentan con igual importancia a un experto que a un no experto. Ejemplo: En un programa de TV emitido en 2007 por América, se presentaron expertos en minería de una empresa del rubro y una joven actriz, quien representaba a una ONG, para debatir sobre la minería química a cielo abierto. Sin duda, la presencia de la actriz, su imagen positiva y habilidades comunicacionales frente a cámara opacaron e hicieron poco efectivos los argumentos de los desconocidos expertos.

Afortunadamente en nuestro país, cada vez son más los periodistas científicos y los departamentos de prensa de institutos científicos y universidades, con lo cual las actividades de divulgación científica han crecido y existe aún mucho por hacer en este terreno.

El nivel de impacto de los mensajes de los influenciadores

Se entiende por nivel de impacto la fuerza con que el mensaje llega al público. ¿Es registrado con inmediatez? ¿La comunidad habla y comenta este mensaje, o pasa desapercibido? ¿Provoca alguna reacción en el público (manifestación de rechazo, apoyo, acuerdo, desacuerdo o indiferencia)? Se entiende por grado de influencia el poder del mensaje para modificar hábitos y / o costumbres del público que lo recibe.

Es posible representar estos parámetros (impacto e influencia) en relación con los influenciadores y otros comunicadores mediante un gráfico donde el eje vertical simboliza el grado de influencia e impacto y el eje horizontal la proactividad del influenciador o comunicador, es decir, su iniciativa para salir a “contar su historia” o transmitir su mensaje (figura 2). El cuadrante del ángulo izquierdo inferior está vacío, lo cual indica que ninguno de los grupos mencionados es 100% inactivo, ni emite mensajes carentes de impacto. Se observa que la comunidad científica es un grupo de gran credibilidad e influencia (cuadrante izquierdo superior), es decir, sus mensajes son altamente escuchados y tenidos en cuenta. La sociedad cree en



Figura 2.

los científicos argentinos y los valora y admira. De todos modos, las estrategias de comunicación que emplean son escasas y de ningún tipo de impacto emocional. Son divulgadores pero no buscan adeptos, no son activistas. Por otra parte, el público escucha con atención los mensajes de los activistas y la prensa, a quienes perciben como confiables, denunciantes y defensores de los derechos de los consumidores y del medio ambiente, por ello es que sus mensajes tienen un alto impacto en la sociedad (cuadrante derecho superior). Por último, el grupo comprendido por las empresas, el sector agrícola incluyendo la prensa especializada, el poder político y los organismos reguladores pueden ser proactivos en cuanto a sus estrategias de comunicación y se acercan al público de interés que quieren contactar utilizando diferentes medios: conferencias y comunicados de prensa, publicidad, propaganda, campañas de comunicación, entre otros. Asimismo, sus mensajes pueden pasar desapercibidos o no producir impacto alguno, dado que el índice de credibilidad de alguno de estos grupos es bajo o porque el público al que se dirigen es reducido o con intereses específicos y no apuntan al público en general, como es el caso de la prensa rural. Cabe mencionar que la imagen o credibilidad de los organismos regulatorios es variable en los diferentes países. Por ejemplo, los norteamericanos confían en sus sistemas de regulación y control, pero los europeos, debido a casos históricos, como el del Mal de la Vaca Loca, confían menos. En los países en desarrollo la gente no confía en general en las instituciones políticas y de control, y ante estas circunstancias, los mensajes de estos organismos pierden fuerza.

De lo expuesto anteriormente sobre el accionar de los influenciadores, es simple deducir que la mala imagen de la biotecnología, especialmente de la biotecnología agrícola, surge de:

- El éxito de las campañas de las organizaciones activistas.
- Los mensajes de tipo emocionales que ellos han sabido transmitir.
- El accionar de la prensa que ha dado es-

pacio a que “todos opinen”.

- Las pocas actividades de divulgación científica de la biotecnología.

El impacto

En base a lo expuesto en los párrafos anteriores, reflexionemos acerca del tema de la percepción de la biotecnología a través del análisis de algunos ejemplos concretos.

El folleto siguiente (Folleto informativo del Consejo para la Información de la Biotecnología en Brasil www.cbi.org.br) y el panfleto de la derecha (figura 3), ambos bregan por el dere-



Figura 3.

cho a la información. ¿Cuál cree el lector que tiene mayor impacto en el público? ¿Qué mensajes transmiten?

Tendencias en la sociedad moderna: otros factores que influyen en la percepción de la biotecnología

Hay otros factores que también influyen en la aceptación o rechazo de ciertas tecnologías, alimentos o avances científicos, y la biotecnología también se ve influenciada por ellos. Se denominará este último grupo de factores bajo el nombre de “tendencias o modas”, es decir, usos, gustos, costumbres que se imponen en un determinado momento, logran muchos adeptos y con el correr del tiempo pueden perdurar, desaparecer o perder fuerza.

Estas tendencias son las siguientes:

- La moda, la industria de la belleza y las celebridades promueven el cuidado del

medioambiente.

- La tendencia de “volver a las raíces o lo natural” es pregonada por ciertos grupos y asociaciones.
- La belleza y “lo natural” van de la mano.
- Las empresas deben ser socialmente responsables.

Existe una tendencia actual a que muchas de las empresas y marcas del mundo de la moda y los cosméticos traten de asociar su imagen al concepto del cuidado del medio ambiente y la solidaridad. De esta forma, transmiten mensajes tales como “no al uso de productos químicos en las fibras”, “no a la manipulación”, “no a la explotación de campesinos para sembrar algodón”, “no a la matanza de animales para hacer carteras, etc.”. La palabra de moda es “sustentable”.

Con mensajes como éstos, las empresas desarrollan “Campañas de Responsabilidad Social Corporativa o Empresaria” que consisten en realizar actividades al servicio de la comunidad relacionadas con la industria en que la empresa se desempeña. Usualmente estas campañas tienen que ver con la educación, el medioambiente y la salud.

Por último, existe una tendencia que en este capítulo denominamos “vuelta a las raíces o vuelta a lo natural”. Existen grupos y asociaciones que pregonan el rechazo a las tecnologías, al confort de la sociedad moderna, y al consumo; y bregan por volver “a las raíces”. Son ejemplos de esto, el movimiento llamado Permacultura, definido según su página web de la siguiente forma: “Permacultura es producir alimentos sin trabajar la tierra, no comprar electricidad, agua, gas, no generar basura, soluciones regionales, la armonía en el plano material”. Este modo de vida que sus seguidores definen como saludable, pleno y armonioso con el planeta se desarrolla en las llamadas “eco villas” situadas en diferentes puntos del mundo, inclusive en Argentina. Principalmente, rechazan la agricultura convencional.

Algunas celebridades y marcas también bregan por la vuelta a lo natural. Es común escuchar hoy que actrices y modelos son, por ejemplo, vegetarianas, lo cual inmediatamente asocia en el imaginario del consumidor los con-

ceptos “vegetariano – natural = belleza perfecta”. Veamos a continuación un ejemplo de la industria de la cosmética (figura 4), se notarán en él los conceptos de “natural, sustentable y de vuelta a las raíces”. En base a estos ejemplos, se aprecia cómo se interrelacionan los conceptos de “natural, sustentable, belleza, espíritu, salud” como opuesto a “tecnología, consumo, negocio, capitalismo, manipulación y maltrato del medioambiente”.

A estos factores se debe sumar un concepto que especialmente afecta a la percepción de



Figura 4.

la biotecnología y es el hecho de entender a la biotecnología como un negocio. Las organizaciones activistas han hecho importantes campañas y de hecho éste es el argumento que continúan esgrimiendo, denunciando que la manipulación genética no tiene otro fin más que generar ganancias para la empresa que desarrolla el transgénico. La sociedad parece simpatizar con esta idea, sin embargo, castiga a la agrobiotecnología como negocio pero no a la biotecnología aplicada al desarrollo de medicamentos, que también es un negocio para la industria farmacéutica. Asimismo, en la pelea público – privado, el científico que trabaja para el sector público es un héroe para los argentinos, mientras que el científico que trabaja para la industria goza de menor prestigio. Nuevamente se percibe ante esto la irracionalidad de la opinión pública y la conjugación de diversos intereses que van más allá de lo científico.

La siguiente ilustración y la caricatura (figura 5) que fueron publicadas en el Diario La Nación en noviembre de 2005 para ilustrar una nota sobre ingeniería genética, muestran el concepto “La biotecnología es un negocio”.

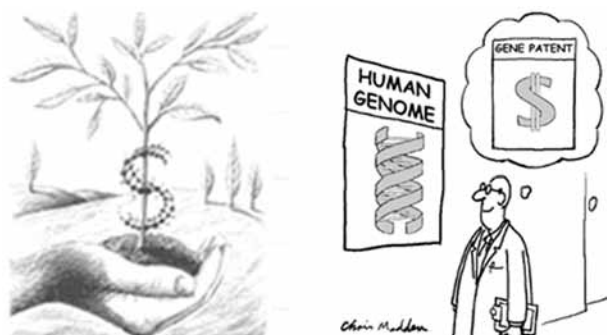


Figura 5.

Conclusiones

La aceptación o rechazo de una tecnología por parte de la sociedad puede determinar su éxito o su fracaso, la introducción de algo nuevo siempre genera debate y las campañas de información son fundamentales. La divulgación científica objetiva, seria y sin tinte emocional, es una herramienta muy útil para desenterrar mitos e interrogantes. La sociedad necesita información veraz y de base científica: la información y la educación son la clave.

Lecturas recomendadas

- Einsele, Arthur. 2007. *The Gap between Science and Perception: The Case of Plant Biotechnology in Europe*. Adv. Springer, Verlag, Berlin.
- International Food Information Council, www.ific.org.
- McHughen, Alan. 2007. *Public Perceptions of biotechnology*. University of California, Riverside, CA, USA.
- Ridner, Edgardo; Gamberale, María Cristina; Burachik, Moisés; Lema, Martín; Rubinstein, Clara; Levitus, Gabriela. 2008. *Alimentos transgénicos: mitos y realidades*. 1º edición. Buenos Aires: Nutrición y Salud.
- SAGPyA, www.sagpya.mecon.gov.ar.
- Young, K y otros. 1986. *La opinión pública y la propaganda*. Paidós Studio. Méjico.

Auspicios

ArgenBio es el Consejo Argentino para la Información y Desarrollo de la Biotecnología. Es una organización sin fines de lucro que tiene como misión divulgar información sobre la biotecnología, contribuyendo a su comprensión a través de la educación y estimulando su desarrollo.

Consideramos prioritario el apoyo a iniciativas relacionadas con la biotecnología y dirigidas a la comunidad educativa de todos los niveles. En este sentido, este libro cubre una necesidad importante ya que aporta información completa y actualizada sobre las tecnologías de laboratorio que se aplican al mejoramiento vegetal, escrita por especialistas y en idioma español.

Confiamos en que tanto estudiantes con profesionales encontrarán en este libro una excelente fuente de información.

Para conocer más sobre ArgenBio, visitar www.argenbio.org



Ministerio de
Agricultura, Ganadería y Pesca
Presidencia de la Nación

INSTITUTO NACIONAL DE TECNOLOGÍA AGROPECUARIA
ARGENBIO - Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología