

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, nuliosómicos 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 disploides, 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 disploides. 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 disploidía 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 organizativa.

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).

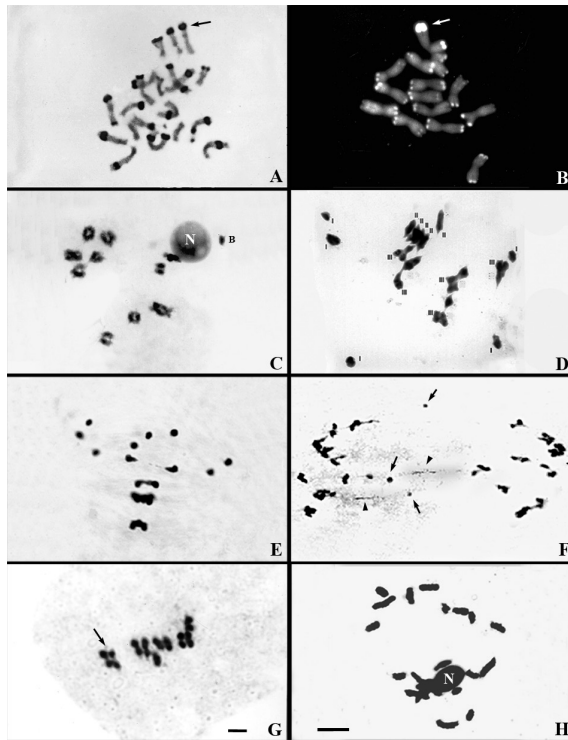


Figura 1: **A:** Bando C en Metafase mitótica de *Z. m. ssp. mexicana*. La flecha indica una banda C. **B:** Bando DAPI en centeno. La flecha muestra una banda de heterocromatina telomérica. **C:** Dos grupos de 5 bivalentes Diacinesis de maíz. **D:** Configuración meiótica en Diacinesis de maíz x *Z. perennis* (F1), se observan 5 I + 5 II + 5 III y agrupación espacial de los II. I: univalentes, II: bivalentes y III: trivalentes. **E:** Dos grupos asincrónicos de 5 II cada en Anafase I de maíz. **F:** Puentes y fragmentos en Anafase I de tricepiro. Las flechas muestran los fragmentos y las cabezas de flecha indican los puentes. **G:** Asociación secundaria de bivalentes en Metafase I de *Senecio madagascariensis*. La flecha muestra dos II agrupados. **H:** 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 poliploidía es un importante modo de especiación y muchas plantas consideradas diploides (maíz, *Arabidopsis*) han mostrado ser poliploides antiguos, los términos “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 funcio-

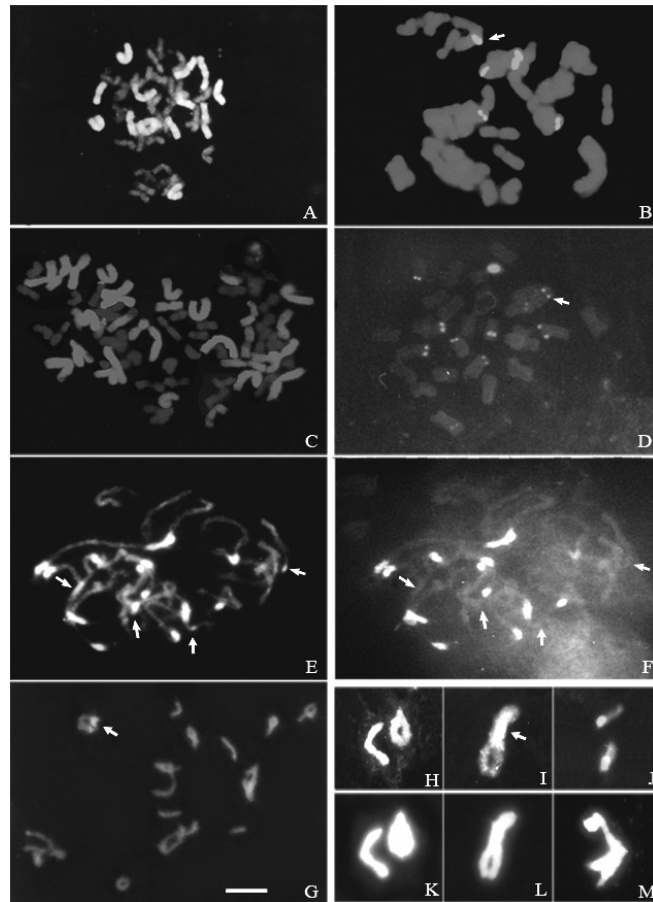


Figura 2: **A:** GISH hibridando ADN genómico de centeno sobre Metafase mitótica de tricepiro. La sonda de centeno marcada con digoxigenina y revelada con antidigoxigenina-FITC hibridó sobre 14 cromosomas de tricepiro (verde brillante). **B:** FISH hibridando la secuencia ribosomal 45s (pTa71) sobre Metafase mitótica de tricepiro. La pTa71 marcada con biotina y revelada con Cy3 hibridó sobre 5 cromosomas de tricepiro (señales naranja). El resto de los cromosomas fueron contrateñidos con yoduro de propidio (rojo). La flecha señala una de las regiones ribosomales hibridadas con pTa71. **C:** GISH hibridando ADN genómico de *Bromus setifolius* sobre Metafase mitótica de *B. pictus* ($2n=70$). La sonda genómica de *B. setifolius*, marcada con biotina y revelada con Cy3, hibridó sobre los 28 cromosomas más largos de *B. pictus* (rojo), mientras que los cromosomas restantes (azul) no hibridaron, a excepción de mínimas translocaciones. **D:** FISH hibridando la secuencia repetitiva pSc119.2, marcada con biotina y revelada con Cy3, sobre Metafase mitótica de *Elymus scabrifolius*. Se observa un patrón de bandeo FISH. La flecha indica una de las señales de hibridación. **E:** Bando DAPI que denota las regiones de heterocromáticas denominadas “knobs” (DAPI+) en cromosomas mitóticos de *Z. m. ssp. parviglumis*. **F:** FISH hibridando la secuencia repetitiva de 180pb-knob sobre la misma célula de *Z. m. ssp. parviglumis* de la figura E. La sonda fue marcada con digoxigenina y revelada con antidigoxigenina-FITC (señales verde brillante). Las señales de hibridación muestran a aquellos “knobs” constituidos por la secuencia de 180pb. En **E y F**, las flechas indican los “knobs” (DAPI+) que no fueron hibridados con la secuencia 180pb-knob. **G:** Diacinesis del híbrido F1 maíz x *Z. perennis* ($2n=30$). Con tinción DAPI se observa su configuración meiótica: 5 I + 5II + 5 III. El FISH hibridando la célula con la secuencia ribosomal 45s (pTa71), marcada con biotina y revelada con Cy3, muestra tres señales de hibridación (rojo) sobre un III (flecha). **H:** Detalle de I, II y III en Diacinesis del híbrido F1 maíz x *Z. perennis* ($2n=30$). **H-I:** GISH utilizando como sonda ADN genómico de maíz marcado con digoxigenina y revelado con antidigoxigenina-FITC. En **H** se observan un I con señal de hibridación (verde brillante) y un II sin señal de hibridación. En **I** la flecha muestra a un III con sólo un cromosoma hibridado (verde brillante). **J y M:** FISH utilizando la secuencia ribosomal 45s (pTa71), marcada con biotina y revelada con Cy3. En **J** se observan una señal de hibridación (rojo) sobre un I y dos señales sobre un II. En **M** se revelan tres señales de hibridación sobre un III. **J-L:** Contratinción DAPI. Barra: 10 μ m.

nales, 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, microsatélites, macrosatélites, 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-Metafase 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 aloisodético). 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 (asinaspsis, desinaspsis, 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 triticale ($2n=42$) 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, (anfiplastía). 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 tricepiro 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., Juvé, 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* spp. *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 Genetica, pp 176.
- Lacadena J.R. 1996. *Citogenetica*. 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*. Elseiver, 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

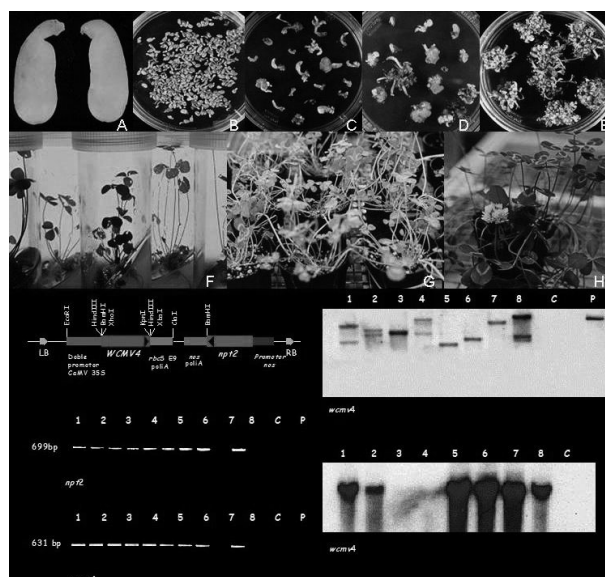


Figura 1. Transformación de trébol blanco para resistencia virus. A-H) Sistema prolífico de regeneración de plantas resistentes al virus del mosaico de la alfalfa (AMV) y al virus del mosaico del trébol blanco (WCMV) a partir de explantos cotiledonales. La transformación se llevó a cabo utilizando *Agrobacterium 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 a 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).

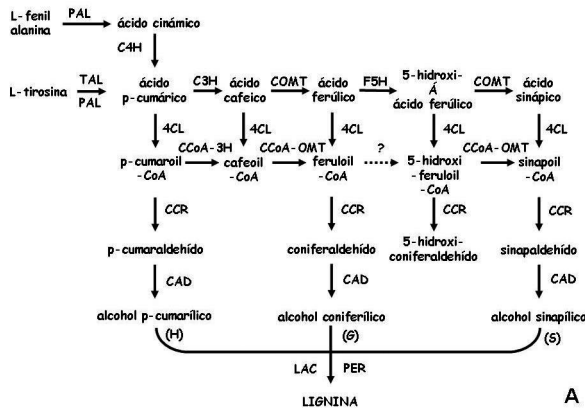


Figura 2. A) Vía biosintética de la lignina. PAL: fenilalanina amonio liasa; TAL: tirosina amonio liasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa; COMT: cafeato-O-metiltransferasa; F5H: ferulato-5-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato CoA ligasa; CCoA-3H: cumaroil CoA hidroxilasa; CCoA-OMT: 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*, *coaomt* 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.

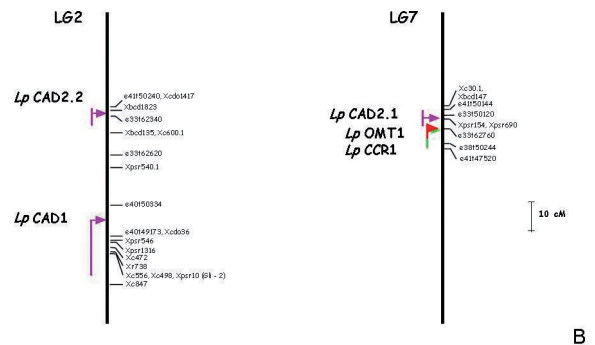


Figura 2. B) Mapeo de los genes correspondientes a la vía de biosíntesis de lignina, en los grupos de ligamento LG2 y LG7 de raigrás perenne.

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 polifruktosa 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 oligofruktanos 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 (AFP) 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*, *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 plantas 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 alergenios 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 alergenios 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 alergenios del mismo. Estudios realizados con las plantas transgénicas *Lolp1* y *Lolp2* revelaron una disminución en los niveles de expresión de los alergenios en el polen. Las plantas de raigrás transformadas con *Lolp1* evidenciaron un desarrollo reproductivo normal y polen viable. Estos estudios permitirán comprender aún más el rol funcional de estos alergenios en la planta y explorar el potencial para la obtención de cultivares de raigrás hipoalérgico.

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

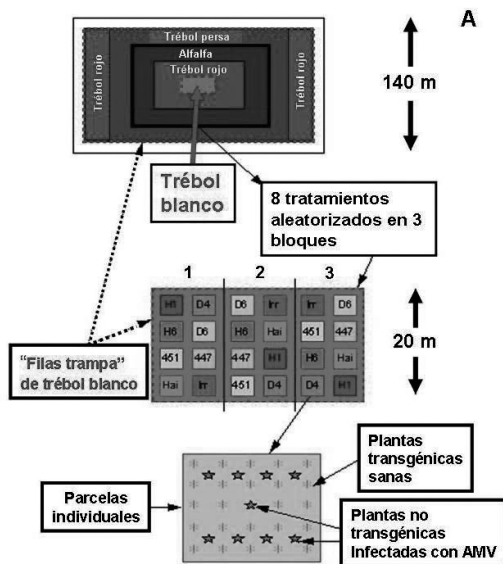


Figura 3. A) Esquema de la liberación a campo, a pequeña escala, de plantas transgénicas de trébol blanco inmunes a AMV.

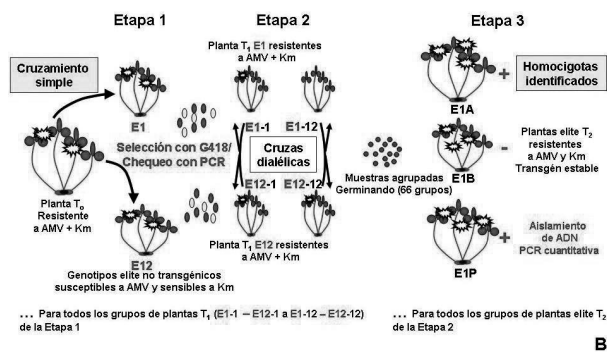


Figura. B) Estrategia para el desarrollo de germoplasma elite transgénico de trébol blanco inmune a AMV, basada en la utilización de PCR cuantitativa para detectar las plantas homocigotas para los transgenes (*npt2* y *AMV4*).

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 cruza 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 de 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

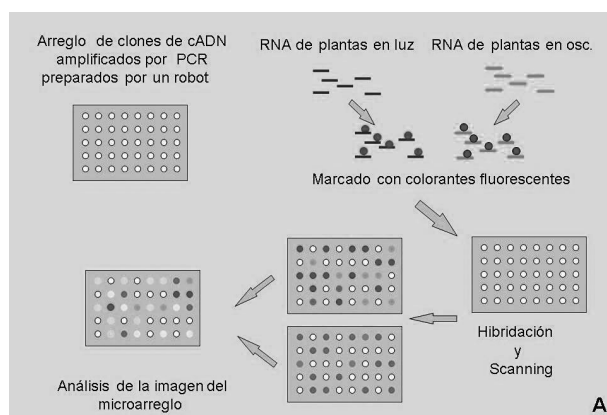


Figura 4. A) Perfiles de expresión a través de microarreglos de ADNc utilizando dos colorantes fluorescentes (Cy5 y Cy3) para marcar dos muestras de RNA total provenientes de distintas situaciones de crecimiento o desarrollo, por ejemplo plantas creciendo en luz (Cy3) y plantas creciendo en oscuridad (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.

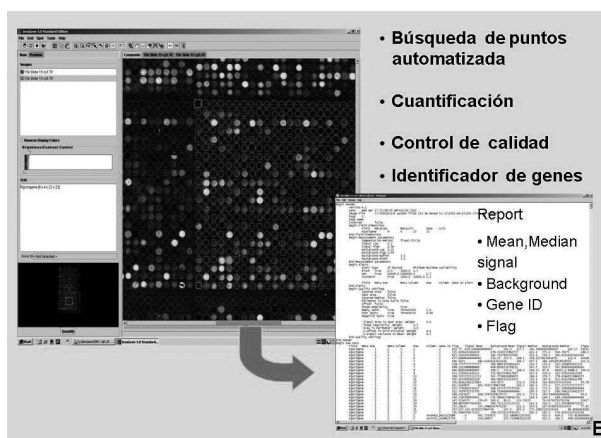


Figura 4. B) Análisis de la imagen de los microarreglos de etiquetas expresadas de ADN (ESTs) (Image-Gene Software).

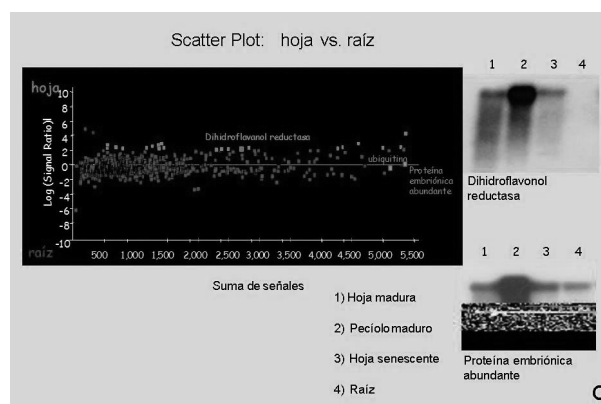


Figura 4. C) Microarreglos de ADNc de trébol blanco utilizando RNA de hojas y raíz. Confirmación por Northern de la expresión de los genes para la dihidroflavonol reductasa y una proteína embrionaria.

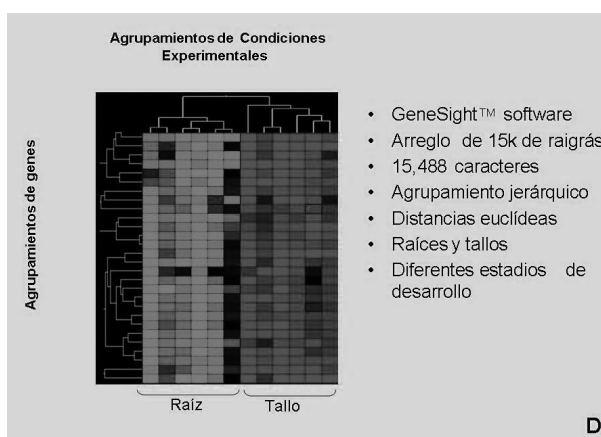


Figura 4. D) Perfiles de expresión de genes de raigrás, comparando genes que se expresan en tallo y raíz.

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 Kaepler 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 cruces 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 *agamospermia*) 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 gametofito 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 megagametofitos 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 megagametofito 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 megagametofitos con esta morfología se los conoce como sacos apospóricos de tipo *Panicum*.

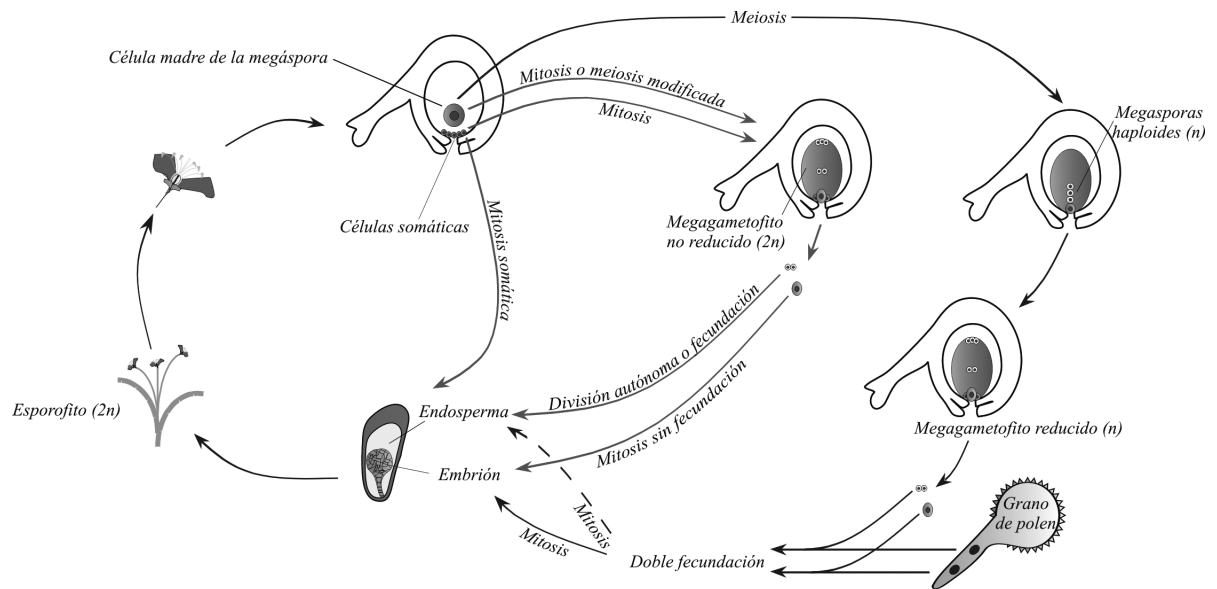


Figura 1: Rutas biológicas de reproducción sexual y apomítica. Durante la sexualidad una célula de la nucela del óvulo se diferencia como célula madre de la megáspora y luego de sufrir un proceso de meiosis da origen a cuatro megásporas haploides. Tres de estas megásporas degeneran y la cuarta da origen 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-

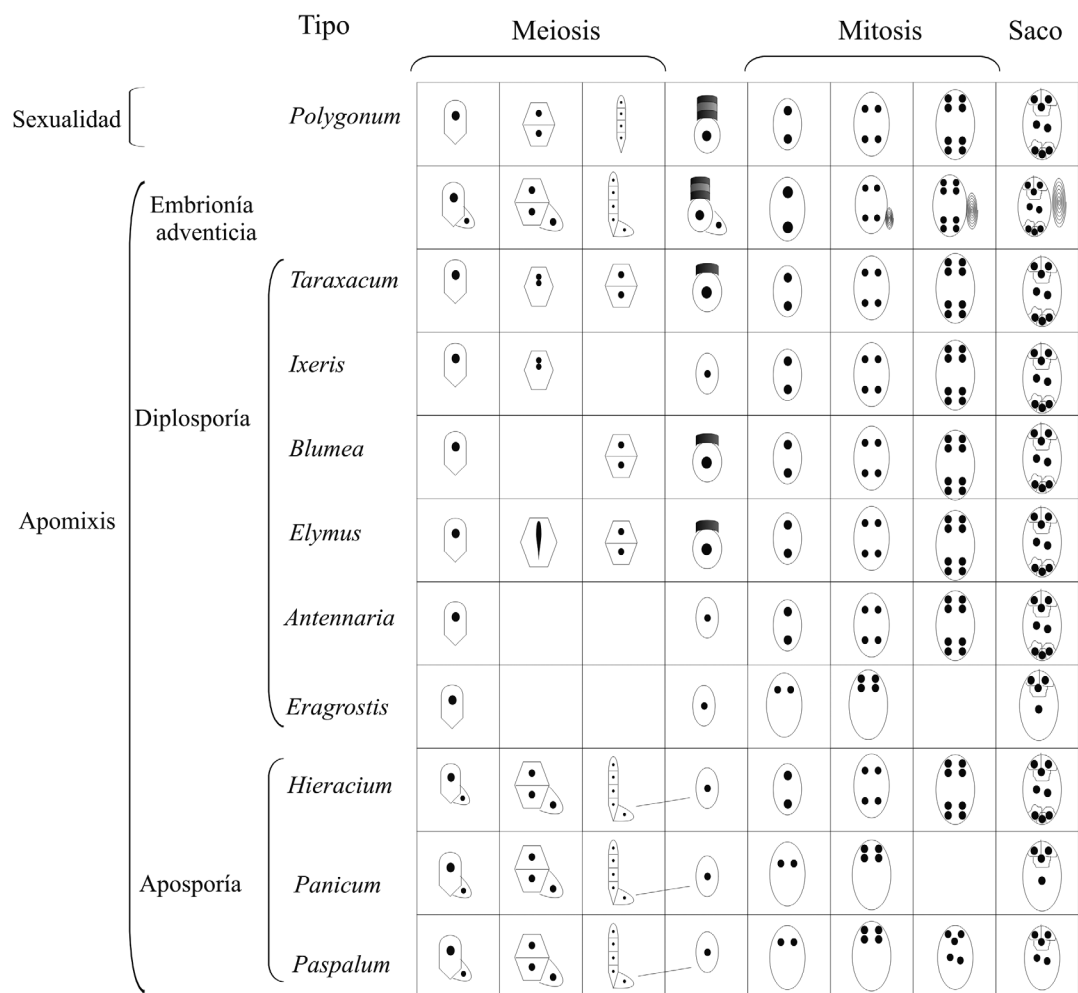


Figura 2: Distintos tipos de sacos embrionarios formados durante el proceso de apomixis. En la mayoría de las plantas angiospermas sexuales, la célula madre de la megáspora realiza un proceso de meiosis y genera cuatro megásporas haploides, tres de las cuales degeneran. La cuarta megáspora lleva a cabo 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

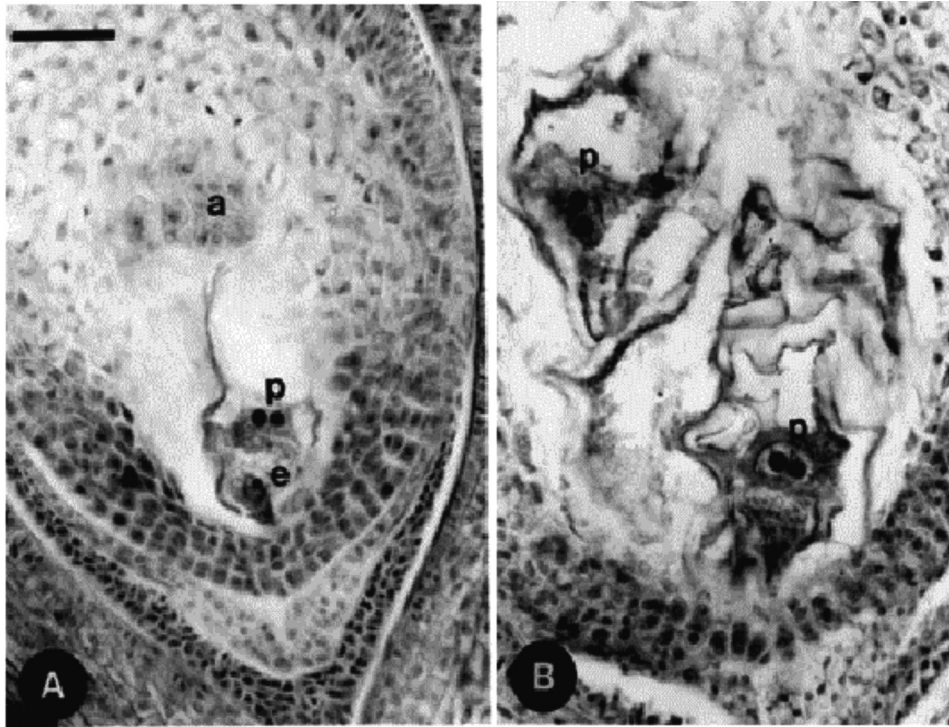


Figura 3: Microfotografías de secciones de óvulos de razas tetraploides de *Paspalum notatum*. A: óvulo conteniendo un saco embrionario meiótico (las dos sinérgidas y algunas de las antípodas no se observan porque están en una sección adyacente al corte del óvulo). B: óvulo conteniendo dos sacos embrionarios 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 nuliplejo (aaaa) mientras que los individuos apomícticos serían uniplejos (Aaaa), siendo A el alelo dominante determinante de la aposporía. 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 aposporía 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 aposporía, la prevención de la aposporía, 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 uniplejas (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 uniplejo 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 diplosporía, a diferencia de la aposporía, 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 cruces 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 diplosporía y la partenogénesis fue luego confirmada en otras cruces. 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 autoploidía. En gramíneas de la subfamilia Panicoideas (*Paspalum*, *Panicum*, *Tripsacum*, *Brachiaria*, *Melinis* y otras) es posible que el sistema apomictico difiera del que existe en Pooideas (*Poa*, *Elymus* y otras). Son necesarios conocimientos básicos más profundos de la embriología de especies silvestres con sistemas apomicticos, 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 apomicticas 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 aposporía (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 hemicingota 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 hemicingota 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 apomicticas, 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 transcriptos 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 transcriptos no presentaron homología con genes incluidos en los

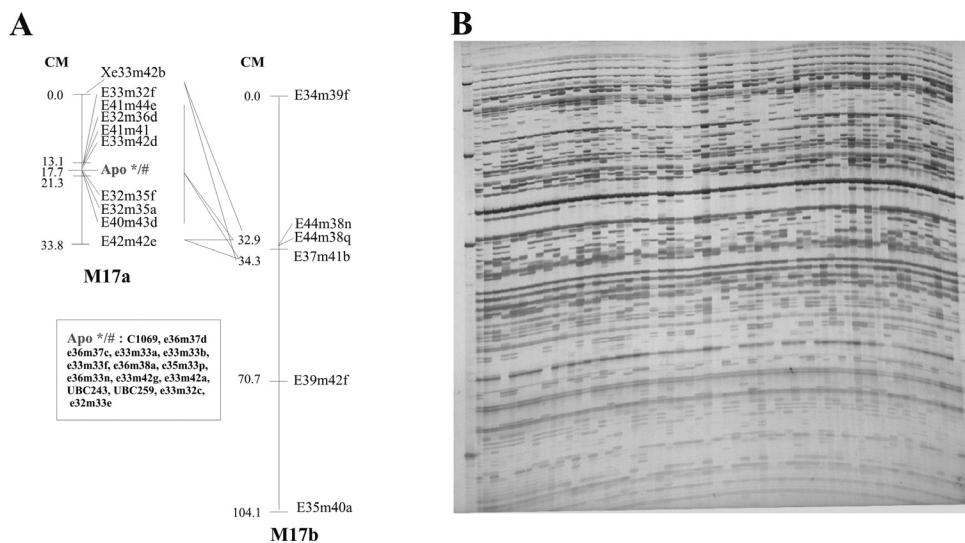


Figura 4: Localización de la región que controla la aposporia en *Paspalum notatum* por medio de marcadores moleculares. Panel A: grupo de ligamiento M17a del mapa genético de *Paspalum notatum*, que contiene a la región apo. El cuadro de abajo muestra un grupo de marcadores que están ligados 100% a 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 faba*), *plyg1* (un gen que codifica a un precursor de la cadena beta de poligalacturonasa de *Lycopersicon 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 quininas, 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

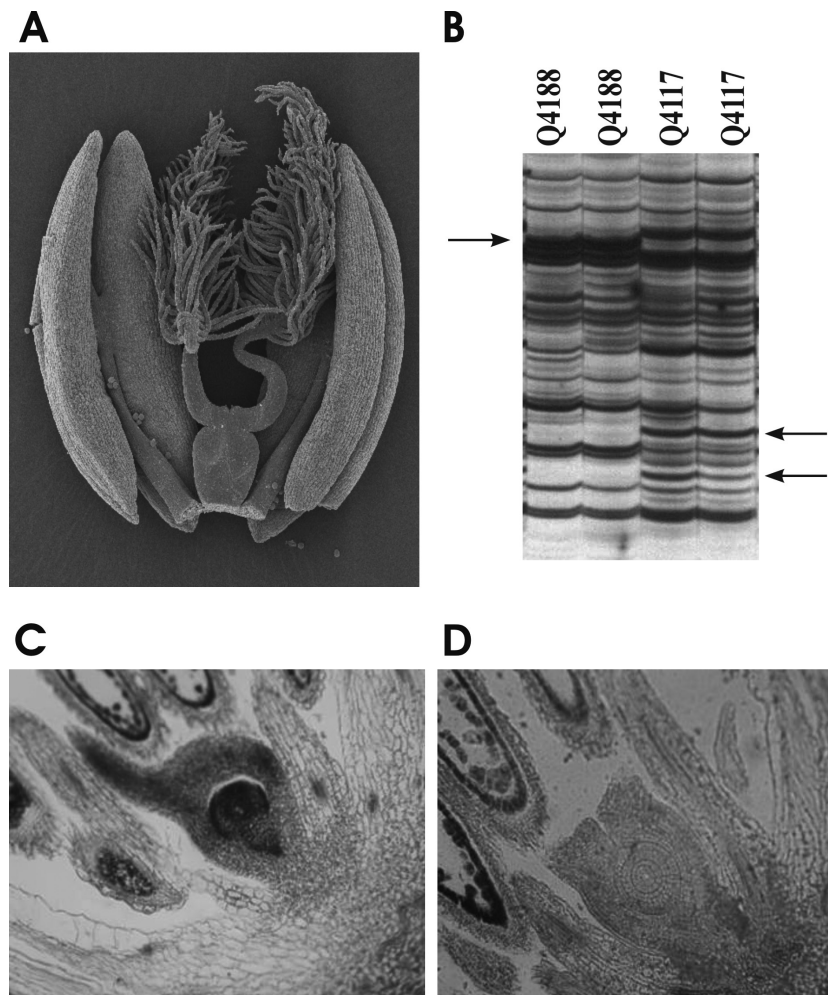


Figura 5: Análisis de expresión diferencial de genes en inflorescencias de plantas apomícticas y sexuales. Panel A. Imagen de los órganos reproductivos de *Paspalum notatum* captada por microscopía electrónica de barrido y coloreada artificialmente. En el centro se observa el ovario rodeado por las anteras 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 quinastas, fosfolipasa C, fosfatidilinositol quinastas, serin-treonin fosfatasas, serin-treonin quinastas, 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 aposporía 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 aposporía (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 *Boeche- ra* (Brassicaceae). En *Boeche- ra 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 aposporía 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: Savidan Y, 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. Parecería 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 | Explantos | 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: bulbillo; 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

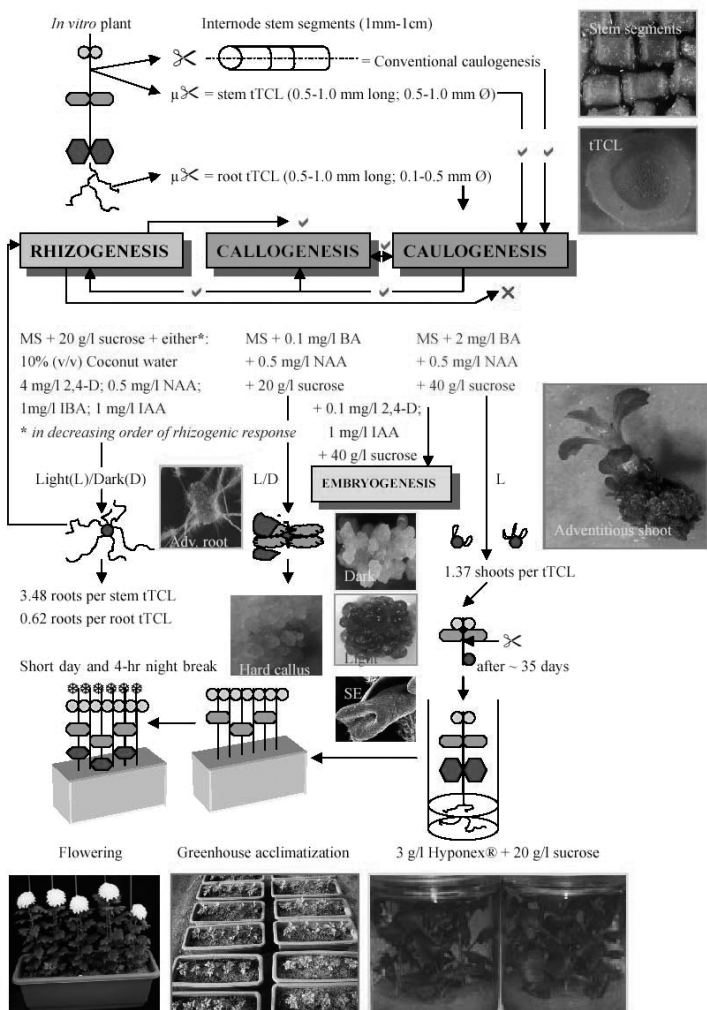


Figura 1. El diagrama indica el origen de las tTCLs y las diferentes condiciones de cultivo aplicadas para la obtención de plantines de crisantemo. (Gentileza de Jaime Teixeira da Silva)

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: *Réceptier 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.

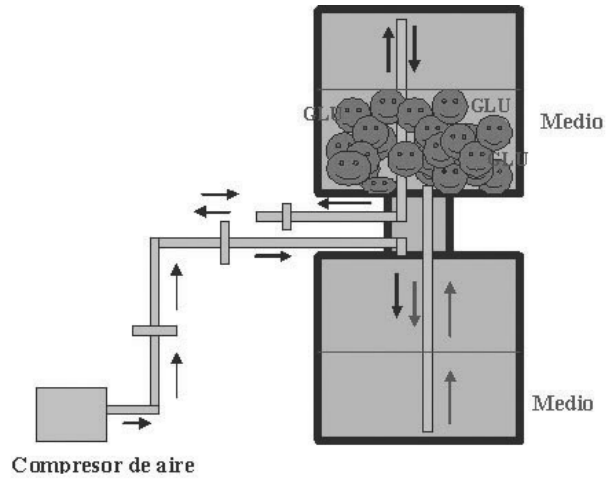


Figura 3. El principio de funcionamiento de los sistemas de inmersión temporaria se basa en que, por medio del trabajo de un compresor que insufla aire estéril al recipiente inferior, se produce el desplazamiento del medio líquido, que se encuentra depositado en su interior, al recipiente superior (las 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

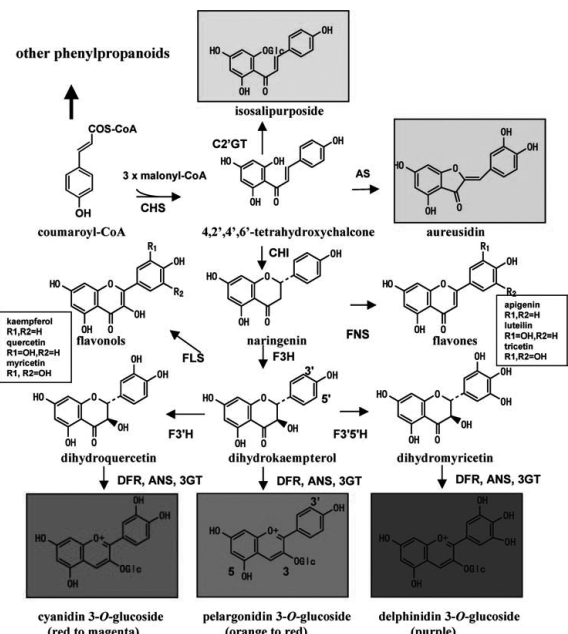


Figura 4. Vías metabólicas de las antocianinas.

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 (*Orchydea* 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'- hydroxilasa) y DFR (dihydroflavonol reductasa) utilizan este sustrato, sugiriendo que este punto es crítico en la biosíntesis de antocianinas y en la determinación del color floral (Figura 4).

Para la obtención de rosas azules, se incorporaron los genes de la vía de la delfidina, 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 (dihydroflavonol 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 *lilium*.

En crisantemo, utilizando la tecnología de ARN antisentido, se ha logrado la obtención de 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 *Ara-bidopsis* 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 5. 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.

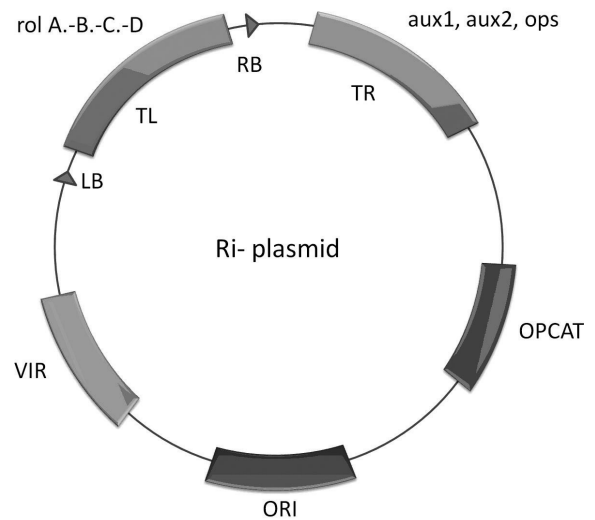


Figura 6. Plásmido Ri del tipo agropina, que se caracteriza por poseer el ADN-T dividido en dos TI y Tr. En la porción TI se encuentran las secuencias que codifican para los genes *rol* y en Tr los oncogenes *aux1* y *aux2* y de la síntesis de opinas. Ambas porciones de ADN T son transferidas en el proceso de transformación.

(*Eustoma grandiflorum*), rudbekia (*Rudbeckia hirta*), datura (*Datura arborea* y *D. sanguinea*), angelonia (*Angelonia salicariifolia*) y catarantus (*Catharanthus roseus*).

Los genes *rol* (ver Figura 6) también fueron utilizados en forma independiente del sistema de *A. rhizogenes* para la transformación gené-



Figura 7. 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 Chiba, Japón.

tica de plantas. 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 liliium, limonium y rosa.

4. Genómica en ornamentales

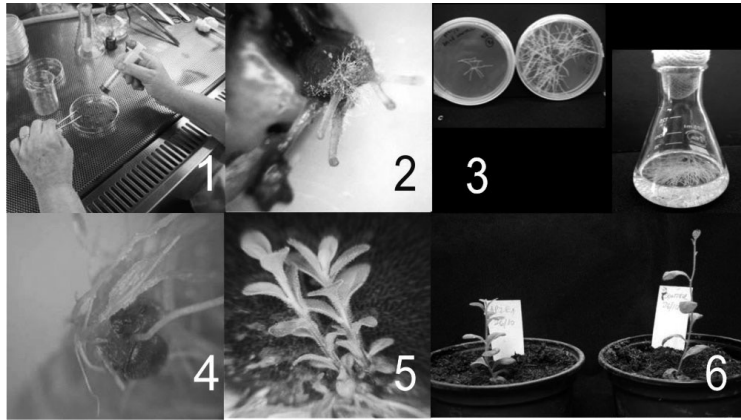
Existen cada vez más proyectos de investigación abocados al desarrollo de proyectos de bioinformática y genómica, que se estructuran como consorcios mundiales con el fin de aunar esfuerzos y recursos: En ornamentales están activos los consorcios de *Rosáceas* GDR (*Genome Database for Rosaceae*) y *Begonia*; 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*).

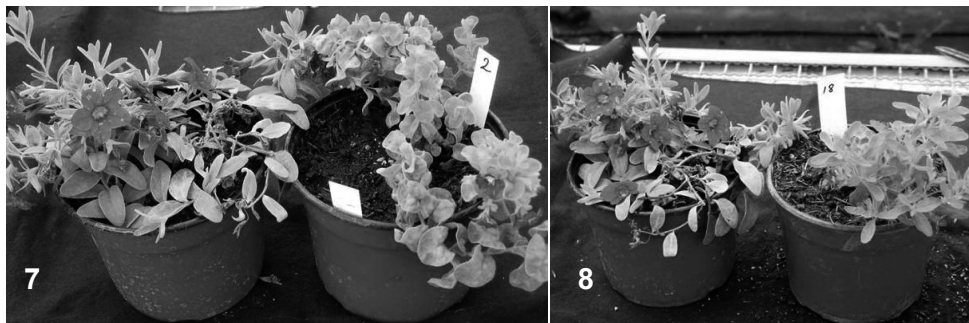
En rosa, por ejemplo, se ha creado un mapa genético de alta densidad para ser usado como herramienta de análisis de la variación genética y la detección genes de interés. Los mapas de ligamiento fueron construidos con marcadores moleculares (incluyendo AFLP, *Amplified Fragment Length Polymorphism*, 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 promisoriosa 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 8. 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 Liliium. 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 heigh 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.
- Srisikandarajah 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. Pags.: 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

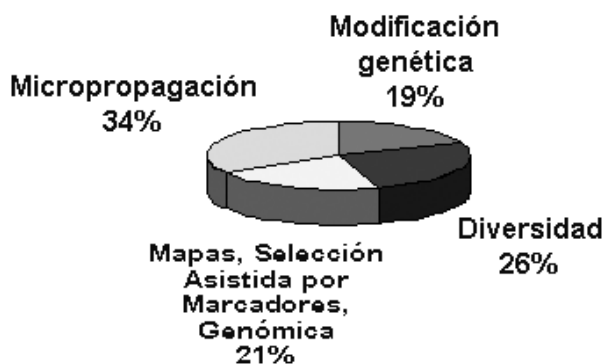


Figura A: Proporción de las actividades en biotecnología forestal agrupadas en grandes categorías, según el dominio público (Chaix and Monteuis, Apendice 2.1) FAO, 2004.

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-

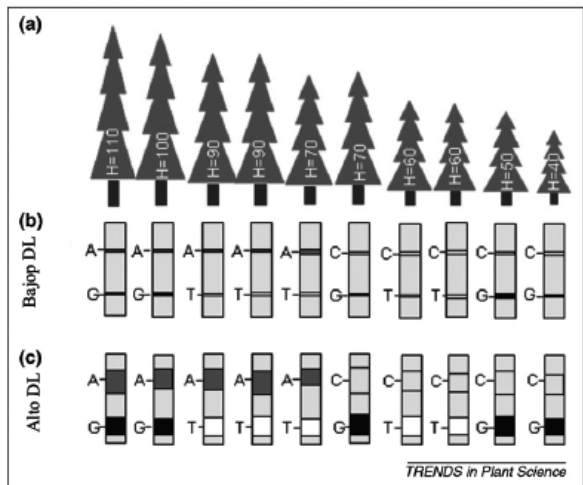


Figura B: Ilustración simplificada de un ensayo de asociación genética para la identificación de la variación alélica que influye un carácter fenotípico “altura”, en un escenario de bajo o alto desequilibrio de ligamiento. A) El carácter de interés se mide en árboles no relacionados tomados de una población. 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.

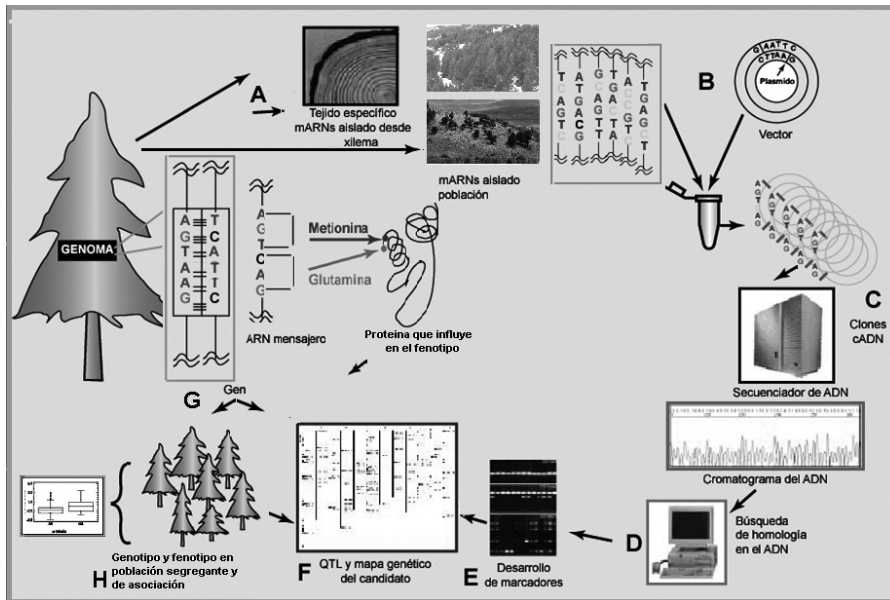


Figura C: Esquema de trabajo simplificado para detección y análisis de ESTs mediante genética directa. A partir del tejido donde se expresa el carácter o del tejido del árbol sometido a distintos estímulos (A) (ej, madera o tejidos sometidos a diversos factores de estrés), se extraen diferencialmente 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 *cuella 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 genéticos 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 genéticos 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 usan-

do sistemas de transformación basados en *Agrobacterium tumefaciens* en angiospermas y por bombardeo con micropartículas en gimnospermas (ver parte II capítulo 6). 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.

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 (glifosato) 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 para 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 brasi-

leños 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 tobaco-, 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 conferirían 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 más 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 descritos, 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 deleciones, 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 transcriptos 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 tabaccum* 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 chicharrita *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 |
|----------|---------------------------------------|----------------|-----------|---|
| Ciruella | 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 pimienta | 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) |
| Trigo | 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., Lomonosoff, 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.
- Tavladoraki, 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 dece-

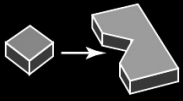
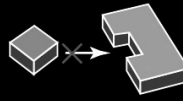
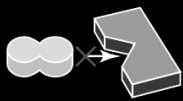
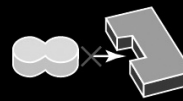
| Genotipo patógeno | Genotipo de la planta huésped | |
|-------------------|--|---|
| | R1 | r1 |
| Avr1 |  <p>Avr1 R1</p> <p>No hay enfermedad</p> <p>(Planta y patógeno son incompatibles)</p> |  <p>Avr1 r1</p> <p>Enfermedad</p> <p>(Planta y patógeno son compatibles)</p> |
| avr1 |  <p>avr1 R1</p> <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 patovariaciones 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 cancrrosis 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-

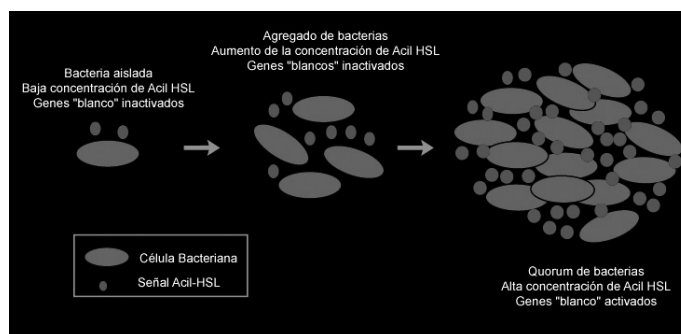


Figura 2. Quórum sensing. Modelo simplificado de la transducción de señales en quórum sensing, QS. Los microorganismos censan sus poblaciones a través de un sofisticado mecanismo de comunicación celular. Cuando la densidad celular alcanza un determinado umbral se dispara la expresión de determinados 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 *Delinea pulcra*, 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 *aiiA*, 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 *expl* de *E.*

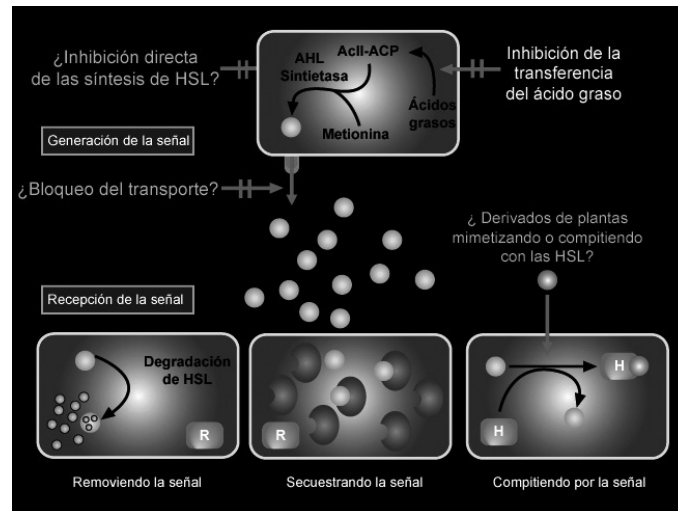


Figura 3. Quorum quenching. Diferentes estrategias pueden utilizarse para interferir la comunicación entre células bacterianas. Existen diferentes mecanismos que afectan la regulación por acil-HSL. Existen mecanismos bioquímicos que interfieren en la comunicación entre bacterias a nivel de la generación 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

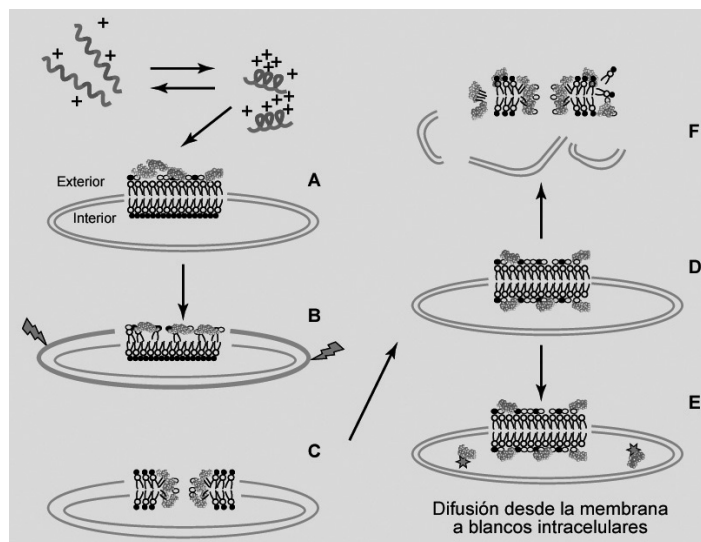


Figura 4. Modelo de Shai-Matsuzaki-Huang. Se representa un péptido con su estructura en α -hélice. A: reconocimiento de la membrana bacteriana por parte de los péptidos. B: inserción del péptido a la membrana mediada por la atracción electrostática de cargas; adelgazamiento de la capa externa de la membrana; 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 disminuída.

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

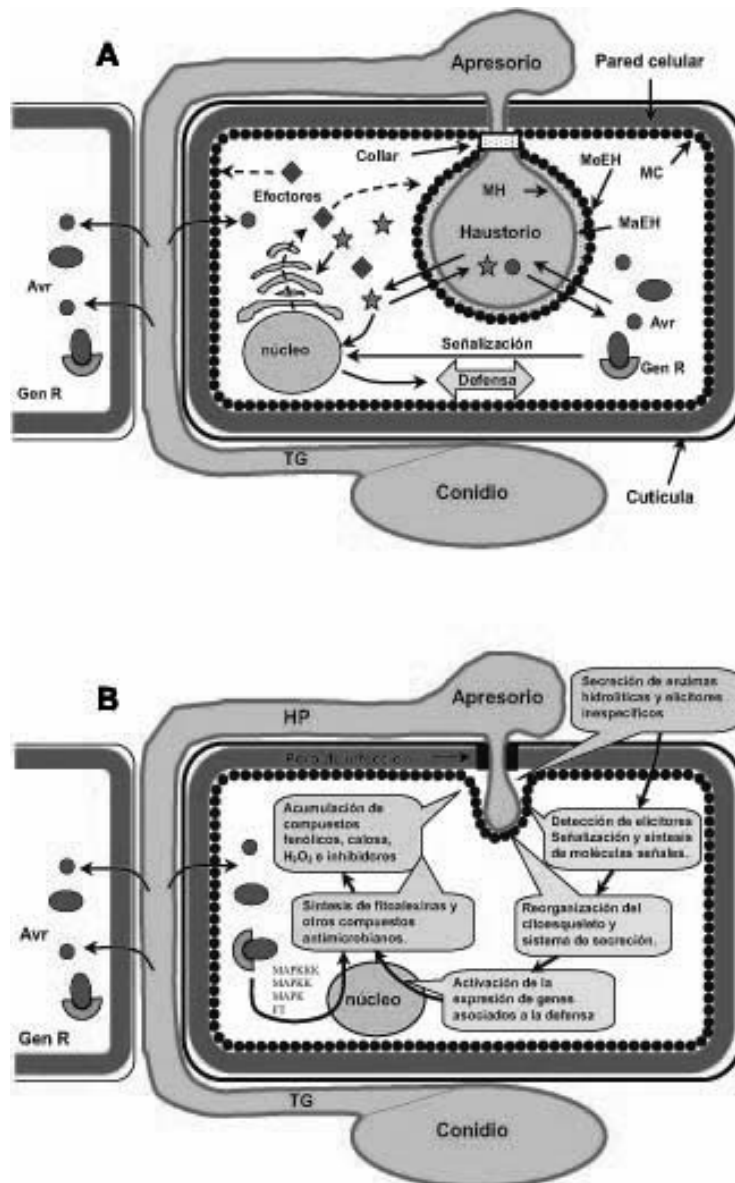


Figura 1: Esquema simplificado de las estructuras infectivas típicas de un hongo patógeno biotrófico obligado (A), hemibiotrófico en la fase biotrófica (B) y algunas de las vías de señalización activadas. Después de la adhesión del conidio a la superficie del tejido vegetal, este emite un tubo germinativo (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 necrotrofica secundaria", de menor diámetro que puede atravesar la membrana plasmática, ramificarse dentro de la célula y destruir posteriormente al hospedero.

Patógenos necrotrofos 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-

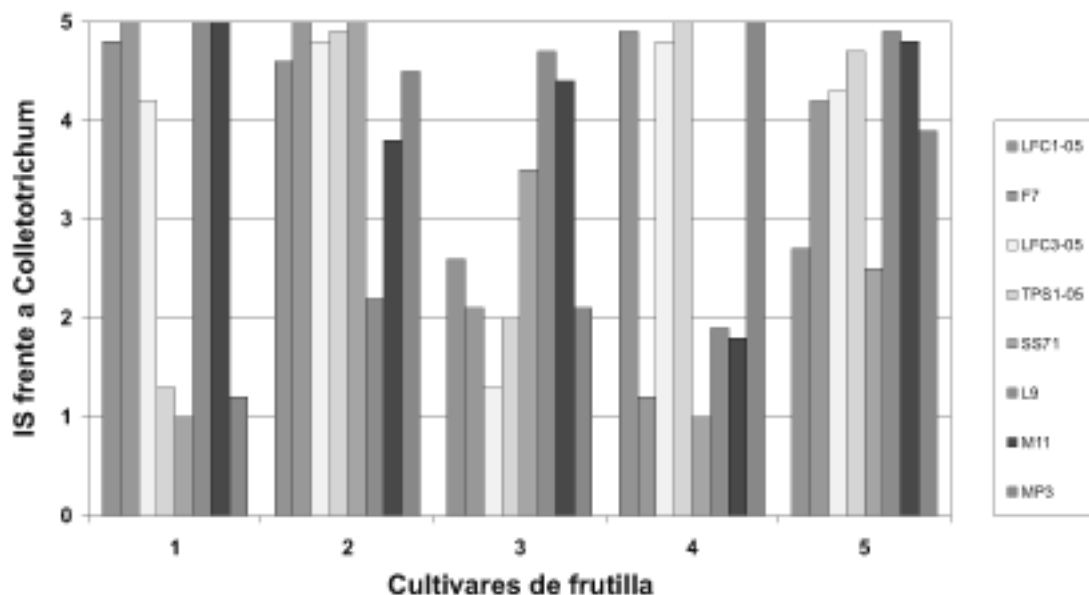


Figura 2: Susceptibilidad de cinco cultivares de frutilla a ocho aislados diferentes de *Colletotrichum* sp. La susceptibilidad es evaluada por el Índice de Severidad (IS) utilizando una escala de 1 a 5, siendo 1 muy resistente y 5 muy susceptible.

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-

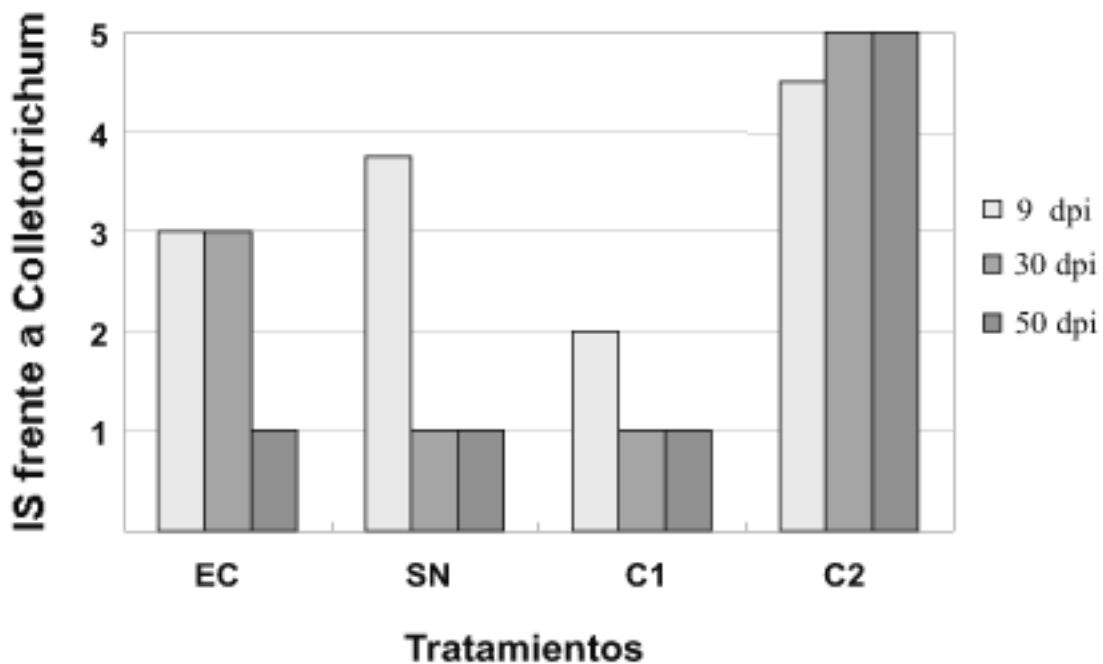


Figura 3: Evolución de la enfermedad evaluada como IS (índice de severidad) a los 9, 30 y 50 dpi (días posteriores a la infección con un aislado virulento de *C. acutatum*) de plantas de frutilla del cultivar Pájaro pretratadas con: EC, extracto estéril de conidios del aislado avirulento M23 de *Colletotrichum* 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,

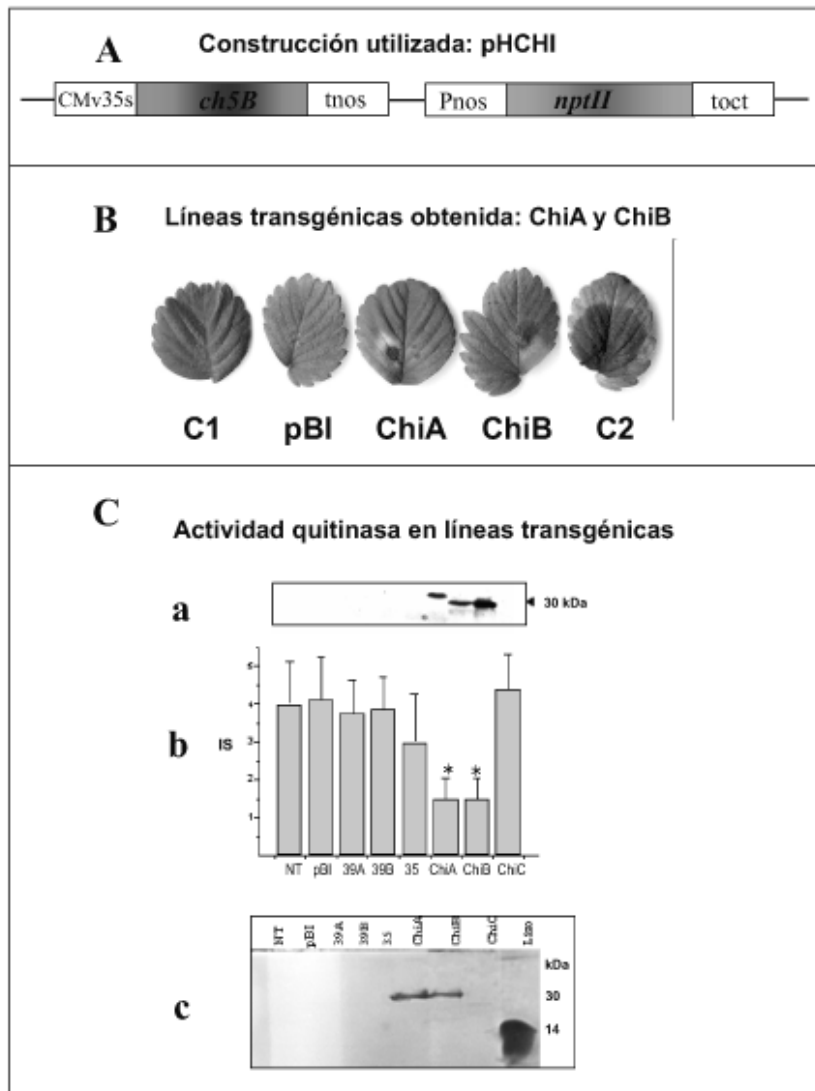


Figura 4: Aumento de la resistencia inducida por la expresión heteróloga de un gen de quitinasa (*ch5B*) proveniente de *Phaseolus vulgaris*. A) pHCHI, constructo utilizado para la expresión del gen de quitinasa en plantas de frutilla (cultivar Pájaro). CMv35s, promotor constitutivo proveniente del virus 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. lipooxigenasas, 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; Martínez 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 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 isoflavonas, 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, Muñóz 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, Diaz 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.; Díaz 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 $\mu\text{m/h}$ 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 auto-perpetuación 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. clevelandii*, *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 trasplante 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 trasplante, ya que éstos pueden ser cosechados del tubo de ensayo y sembrados directamente en tierra sin mayores dificultades.

Trasplante. En el momento del trasplante, 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, Virazole™ 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 utilizado 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 cítricos, 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).

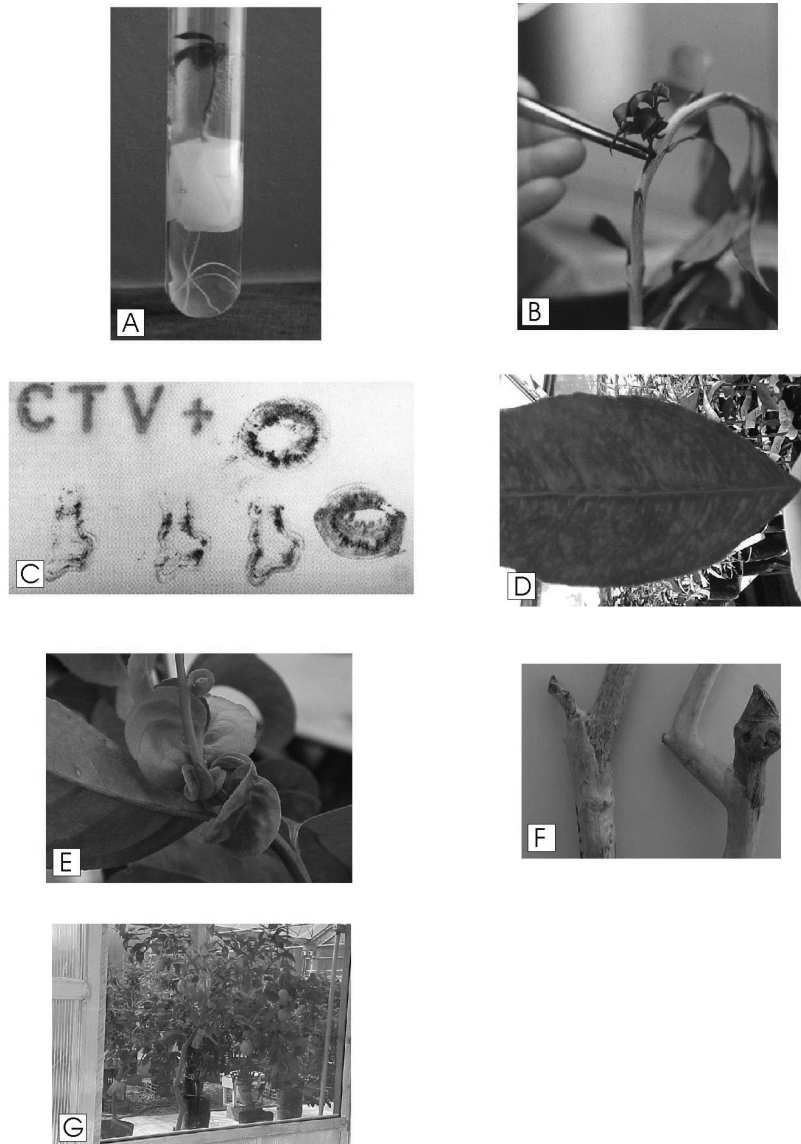


Figura 2. Obtención de plantas cítricas libres de enfermedades. A: planta obtenida por microinjerto de ápices caulinares *in vitro*. B: injerto sobre un plantín vigoroso. C: membrana de inmunopresión-ELISA con huellas de tallos de plantas infectadas con tristeza. D: moteado causado por psorosis. E: epinastia 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 cultivares 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 cestos. 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.

Fracchioli 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 progenes 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 huertas orgánicas. Los cristales individuales suelen ser una mezcla de toxinas, cada una de las cuales posee especificidad sobre un tipo de insectos. Respecto a su utilización en biotecnología, una de las ventajas que poseen las toxinas derivadas de Bt en el contexto de los eventos transgénicos, es la especificidad con la que actúan. Por tratarse de eventos que contienen un gen codificante para un tipo de toxina, se observa que la actividad insecticida es específica hacia los insectos plaga que se quiere controlar en cultivos que expresan estas proteínas. Esto constituye una ventaja sobre otros sistemas 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 diferentes (para mayor detalle: http://www.lifesci.sussex.ac.uk/home/Neil_Crickmore/Bt/). Inicialmente se las clasificó según la especificidad biológica (*cry I* para Lepidópteros, *cry II* para Lepidópteros y Dípteros, *cry III* para Coleópteros, 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 denomina Cry3A).

Los primeros intentos para expresar las toxinas Bt en plantas fueron algo infructuosos debido al origen bacteriano de los genes, especialmente por el alto contenido en nucleótidos AT (adenina y timina), que produce bajos niveles de expresión. Para solucionar estos inconvenientes se han mejorado las secuencias eliminando algunos sitios de poliadenilación, mejorando la codificación para los codones e incrementando el contenido de GC. Estos cambios 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. Actualmente ya se han podido expresar los ge-

nes de proteínas *Cry* mediante transgénesis en numerosas especies vegetales: forestales (álamo, eucalipto, alerce), cereales (maíz, trigo), leguminosas (garbanzo, soja, maní), hortícolas (papa, tomate, repollo, brócoli, batata), y frutales (manzano, frutilla). Todos los cultivos comerciales aprobados con resistencia a insectos 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 expresión de genes derivados de Bt pueda perpetuarse en el tiempo se debe considerar el uso de refugios. La posibilidad potencial de desarrollo 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 manejo de la resistencia de insectos es de suma importancia. De las estrategias consideradas, la más efectiva es la alta expresión de las proteínas entomotóxicas en las plantas junto a la siembra de refugios de plantas no Bt. Por otro lado, la segunda generación de plantas de algodón Bt, combina dos tipos de proteínas insecticidas 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 insectos.

ii) Genes de origen vegetal

Inhibidores de proteasas: el desarrollo potencial de resistencia a las toxinas derivadas de genes Bt en lepidópteros ha disparado diversas 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, dípteros 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 |
| Sudáfrica | algodón | 1997 |
| | maíz | 1997 |
| EE UU | algodón | 1995 |
| | 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 quimo-tripsina. 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*, *Guenee*. 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

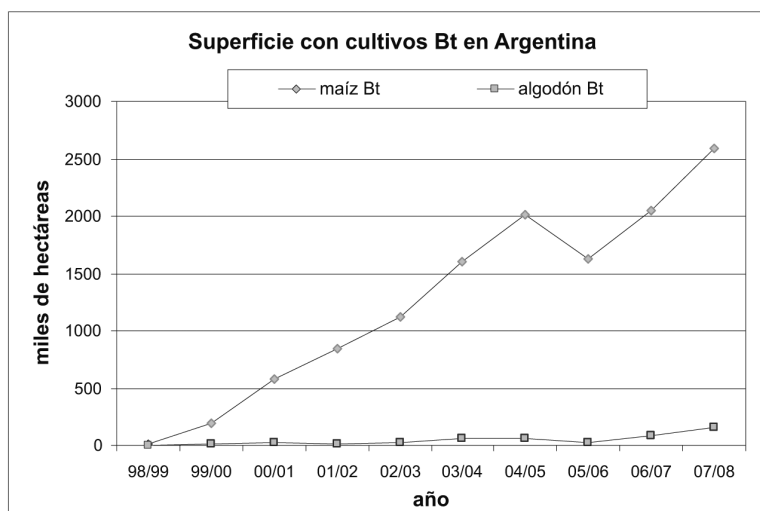


Figura 1. Superficie con cultivos Bt en Argentina. Fuente: Argenbio 2008.

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, Munyikwa 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) | <u>SAGPyA N°428</u> | 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. | <u>SAGPyA N° 429</u> | 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> | <u>SAGPyA N° 392</u> | 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 pat de <i>Streptomyces viridochromogenes</i> | <u>SAGPyA N° 143</u> | 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 | <u>SAGPyA N° 78</u> | UE, Japón, Corea, Méjico, Filipina, Sudáfrica |
| 1507 x NK603 | Dow AgroSciences y Pioneer Argentina | 28/05/2008 | Evento aplado derivado del cruzamiento de las líneas 1507 y NK603 con tolerancia a herbicida y resistencia a lepidópteros. | <u>SAGPyA N° 434</u> | 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 sulfonilureas, 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 triptofano). 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 (*epsps**) tiene una menor afinidad por el glifosato y es catalíticamente activa en presencia del herbicida (Figura 1).

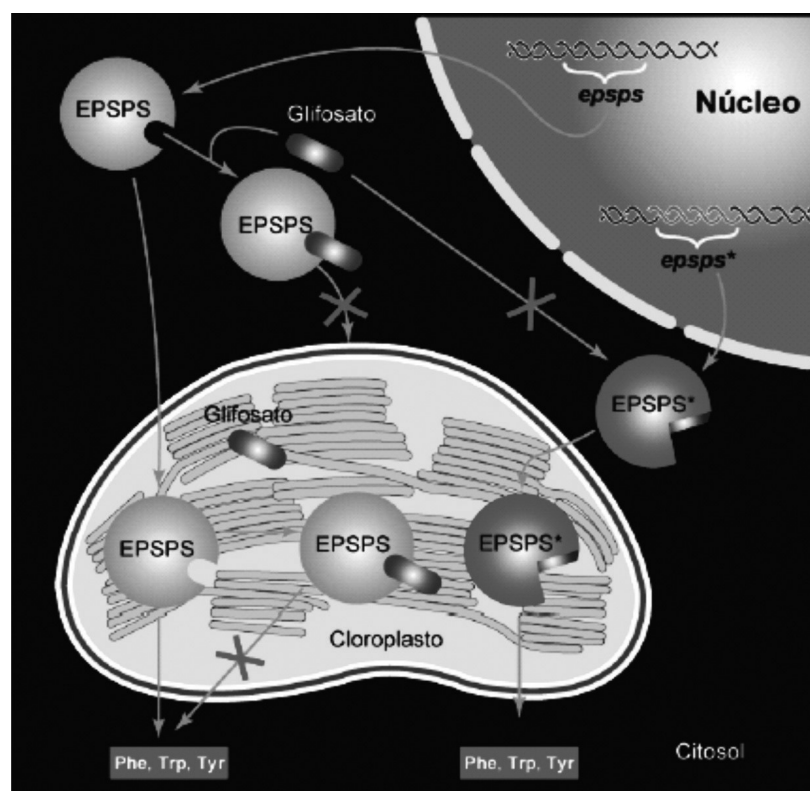


Figura 1. Esquema de la inhibición por el ácido n-fosfonometil glicina (glifosato) sobre la enzima EPSPS susceptible y la incompatibilidad del sitio de acción al mismo herbicida en la enzima EPSPS* mutante. Fuente: Mentaberry, A. 2007

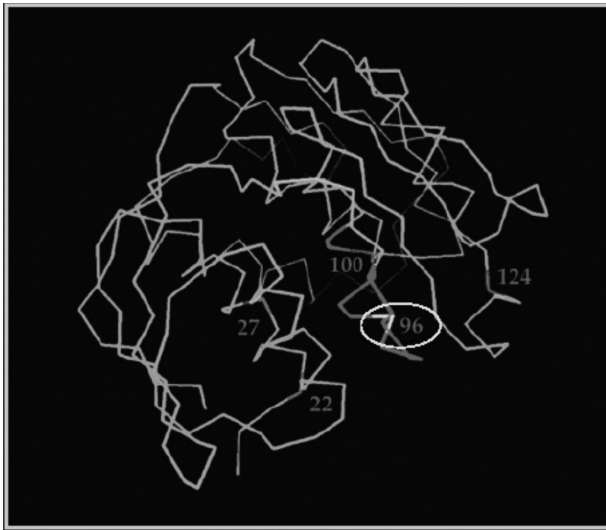


Figura 2. Estructura de la EPSP sintetasa de *E. coli*. Los residuos del sitio activo están marcados en azul. La región en rojo es una región altamente conservada. La conversión de la *Gly 96* a *Ala* transforma a la enzima en resistente a glifosato. Mentaberry, A. 2007

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

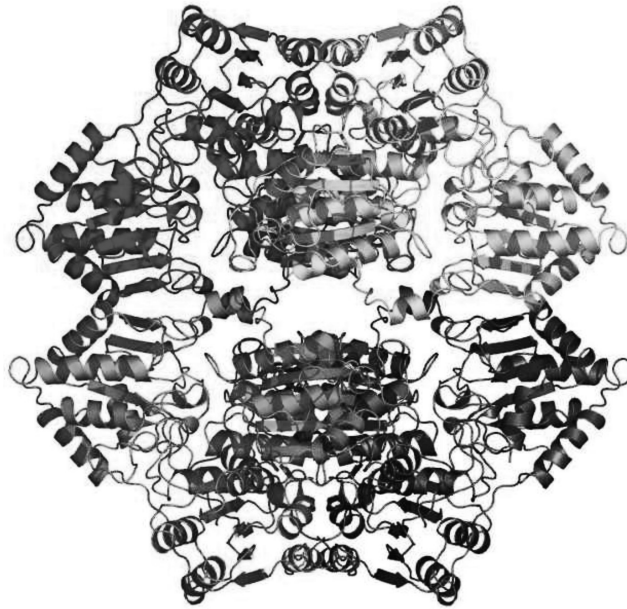


Figura 3. Representación de la enzima AHAS de *Arabidopsis thaliana* mostrando sus 4 sub-unidades idénticas. Fuente: Dr. Ronald G. Duggleby

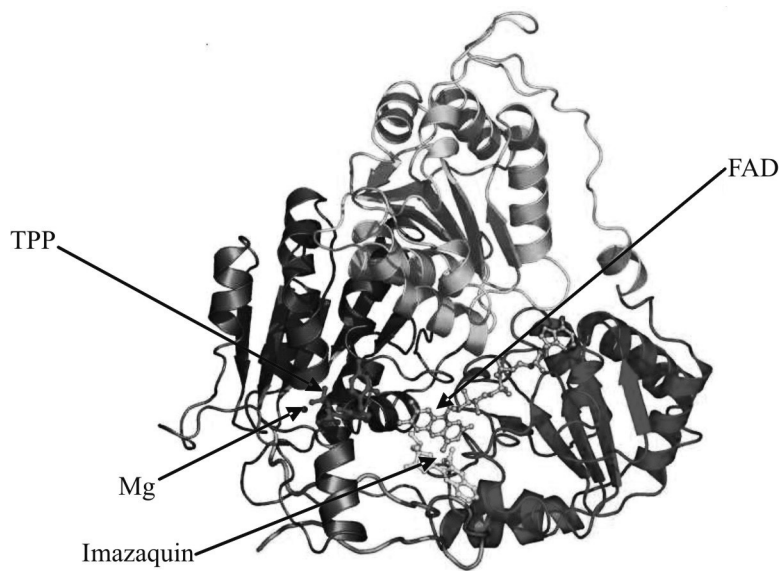


Figura 4. Sub-unidad de AHAS mostrando sus tres sectores junto con la Tiamina piro fosfato (TPP) en color rojo y los cofactores Mg^{2+} , y flavin dinucleotido (FAD). En amarillo puede verse el sitio de acción ocupado por el herbicida imazaquin. Fuente: Dr. Ronald G. Duggleby

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

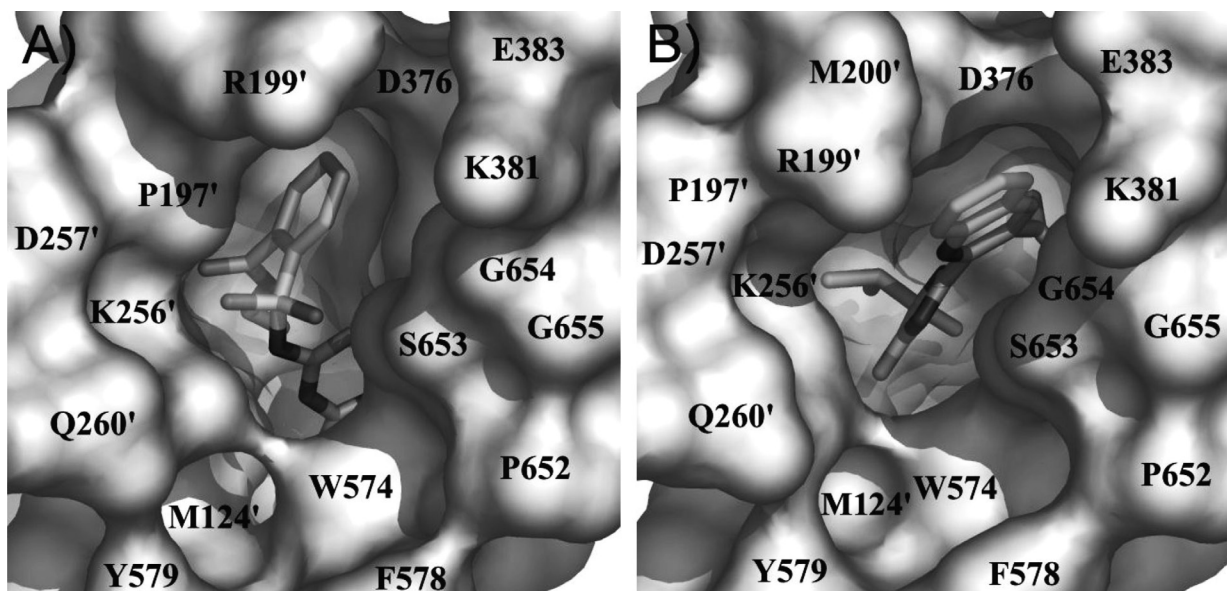


Figura 5. A) Clorimuron-etil posicionado en el sitio activo de la AHAS de *Arabidopsis*. La molécula es inclinada en torno al grupo sulfonil los anillos aromáticos obstruyen el canal de acceso al sitio activo de la enzima mientras que el resto de la molécula se mete en éste. B) Imazaquin bloqueando el 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

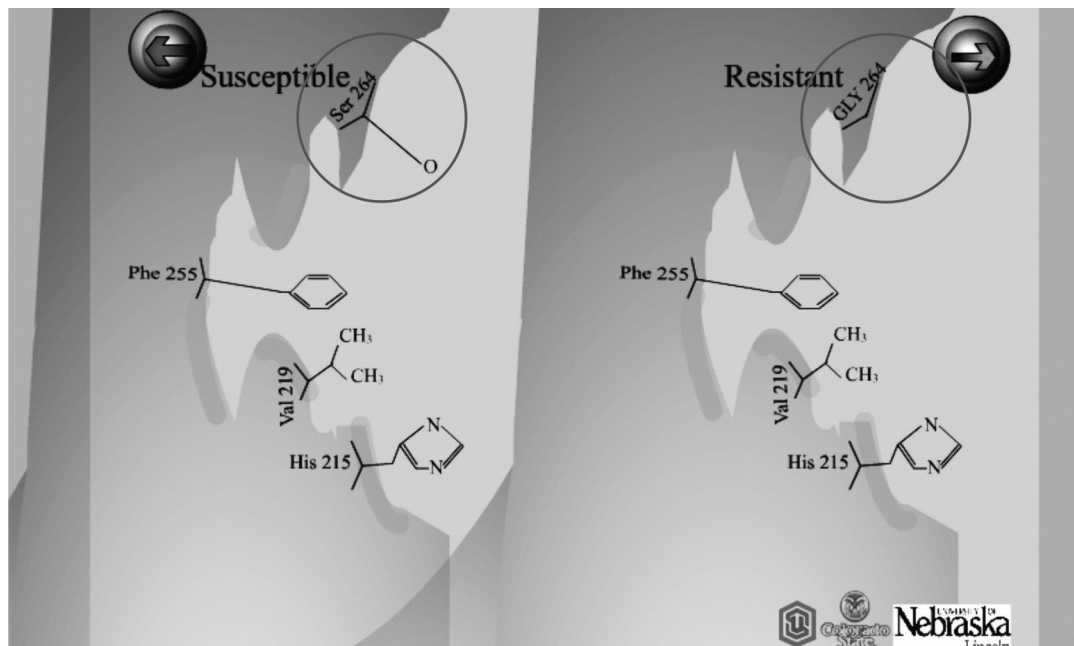


Figura 6. Fragmento de la proteína D1 que es punto de unión de la plastoquinona y sitio de acción de las triazinas, mostrando la sustitución de *serina* de la forma susceptible por *glicina* en la forma resistente a atrazina, en el codón 264. Fuente: Mallory-Smith, 2006.

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 benzotriazol, 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 remarcar 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.
- Beverdors, 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; Sturner, 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).

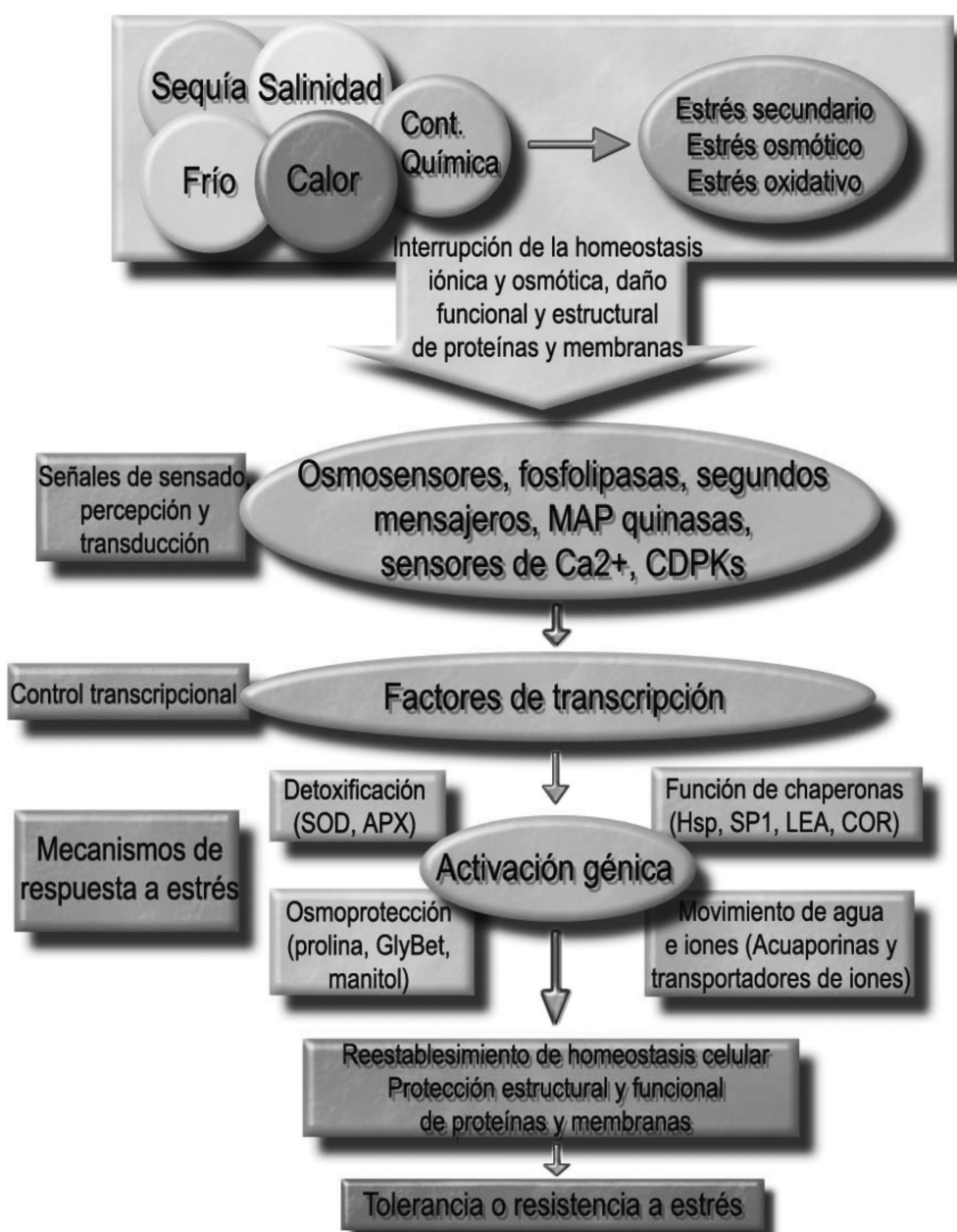
Obtención de plantas transgénicas con tolerancia mejorada a distintos tipos de estrés de origen abiótico

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 | DREB1A/CBF3 | Arabidopsis | Arabidopsis | CaMV35SP | Supervivencia | 1998 | | |
| | DREB1/CBF | DREB1A/CBF3 | Arabidopsis | Arabidopsis | Arabidopsis RD29AP | Supervivencia | 1999 | | |
| | DREB1/CBF | DREB1B/CBF1 | Tomate | Arabidopsis | CaMV35SP | Retención de agua | Crecimiento y desarrollo | 2002 | |
| | DREB1/CBF | CBF4 | Arabidopsis | Arabidopsis | CaMV35SP | Retención de agua | Supervivencia | 2002 | |
| | DREB1/CBF | ZmDREB1A | Arabidopsis | Maíz | CaMV35SP | Disecación | Electrolitos | 2004 | |
| | DREB1/CBF | DREB1C/CBF2 | Arabidopsis | Arabidopsis | Knock out | Disecación | Supervivencia | 2004 | |
| | AP2/ERF | SHN1/WIN1 | Arabidopsis | Arabidopsis | CaMV35SP | Retención de agua | Desarrollo | 2004 | |
| | DREB1/CBF | DREB1A/CBF3 | Trigo | Arabidopsis | Arabidopsis RD29AP | Retención de agua | Supervivencia | 2004 | |
| | DREB1/CBF | DREB1A/CBF3 | Tabaco | Arabidopsis | Arabidopsis RD29AP | Retención de agua | Supervivencia y fotosíntesis | 2004 | |
| | DREB1/CBF | DREB1A/CBF3 | Arroz | Arabidopsis | MaizUbi-1P | Retención de agua | | 2005 | |
| | AP2/ERF | WXP1 | Alfalfa | M. truncatula | CaMV35SP | Retención de agua | Supervivencia | 2005 | |
| | DREB2 | DREB2A (forma active con delección interna) | Arabidopsis | 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 | | 2002 | |
| | | bZIP | AREB1/ABF2 | Arabidopsis | Arabidopsis | CaMV35SP | Retención de agua | Crecimiento y supervivencia | 2004 |
| | | bZIP | ABF3 | Arroz | Arabidopsis | Maiz Ubi-1P | Retención de agua | Supervivencia | 2005 |
| bZIP | | AREB1/ABF2 (forma active con una delección interna) | Arabidopsis | Arabidopsis | CaMV35SP | Retención de agua, deshidratación | Fotosíntesis y supervivencia | 2005 | |
| bZIP | | AREB1/ABF2 (forma active fosforilada) | Arabidopsis | Arabidopsis | CaMV35SP | deshidratación | Supervivencia | 2005 | |
| MYB/MYC | | AtMYC2, AtMYB2 | Arabidopsis | Arabidopsis | CaMV35SP | Tratamiento con manitol | | 2002 | |
| | MYB, MYC | CpMYB10 | Arabidopsis | CaMV35SP | Retención de agua | Electrolyte leakage | 2004 | | |
| | MYB | AtMYB60 | Arabidopsis | 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 | | 2003 | | |
| | Cys2His2-type | CAZFP1 | Arabidopsis | CaMV35SP | Retención de agua | Supervivencia | 2004 | | |
| | Cys2His2-type | STZ | Arabidopsis | CaMV35SP | Retención de agua | Supervivencia, contenido de clorofila | 2004 | | |
| | Cys2His2-type | 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 | | 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 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 H₂O₂. 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 peroxidasa y dismutasa ofrece otra oportunidad para prevenir los daños oxidativos ocasionados por el desafío ambiental. Por desgracia, la aplicación de esta estrategia está lejos de

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 | AtGSK1 | Arabidopsis | Arabidopsis | CaMV35SP | Retención de agua | Supervivencia | 2001 |
| MAPKKK | NPK1 | Maíz | Tabaco | CaMV35SP | Estrés hídrico | Número de hojas, tamaño de fruto | 2004 |
| SnRK2 | SRK2C | 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 | GF14I | 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 campo | 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. Crosstalk 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 tejida 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

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 ralentiza 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 blakesleeianus*) 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 (*crtl*) 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

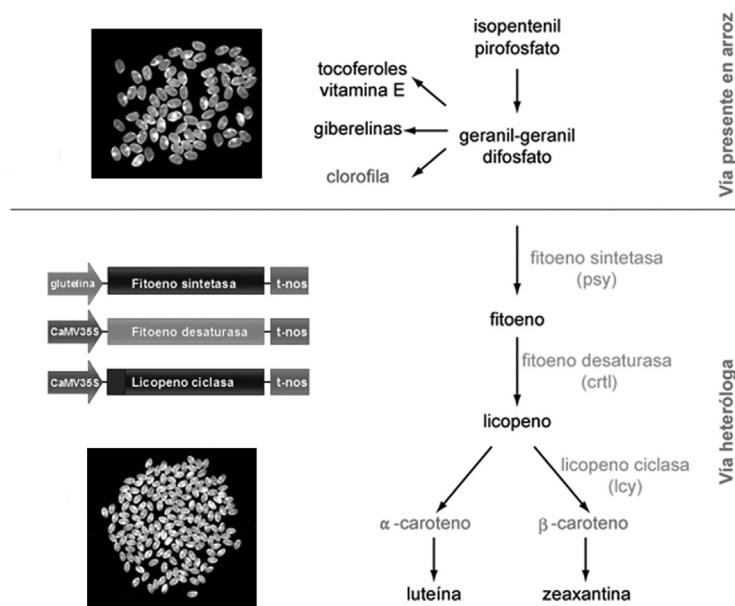


Figura 2. Manipulación del metabolismo de los terpenoides en plantas de arroz. Arroz dorado. Se presenta la vía de síntesis del geranyl-geranyl difosfato en arroz y la obtención de carotenos por sobreexpresión en arroz de las enzimas heterólogas fitoeno sintetasa, fitoeno desaturasa y licopeno sintetasa.

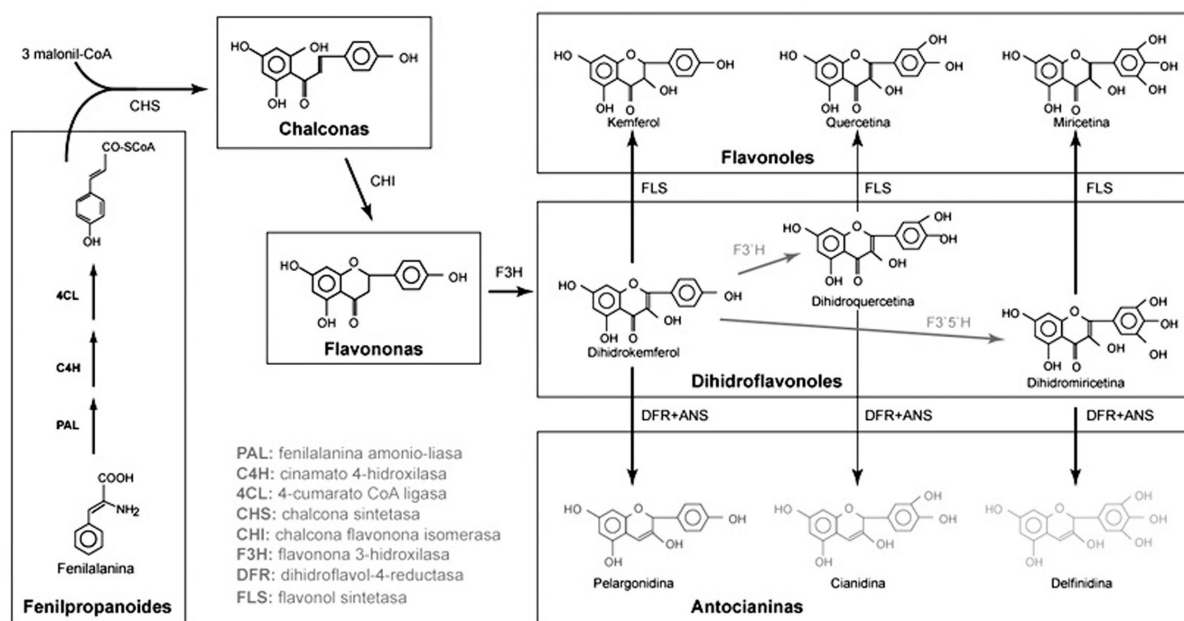


Figura 3. Vías de síntesis de los flavonoides. Los flavonoides se clasifican según su estructura central aglicona en 5 grupos: chalconas, flavononas, flavonoides, dihidroflavonoides y antocianinas.

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 delphinidina, 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

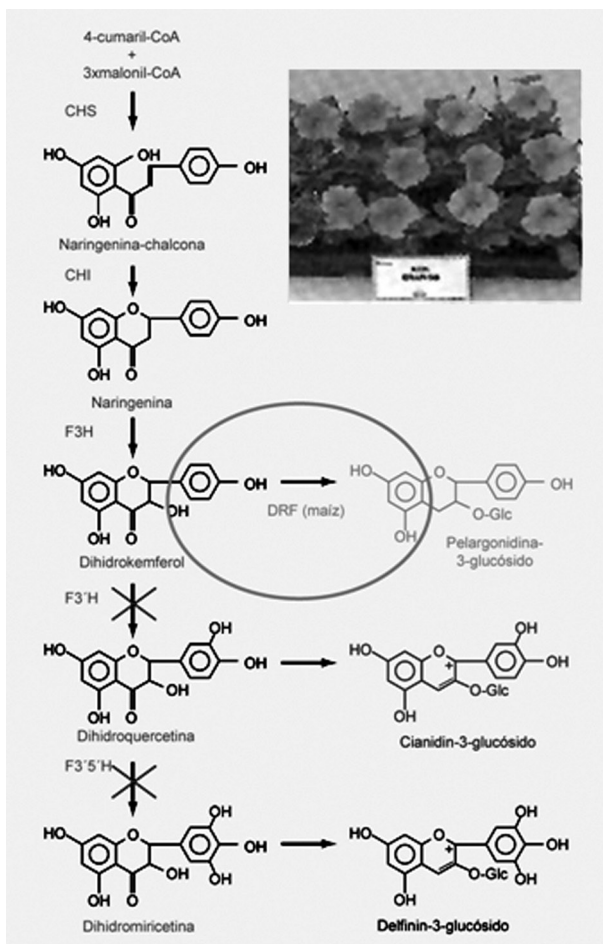


Figura 4. Manipulación del metabolismo de las antocianinas en *Petunia hybrida*. La expresión del gen *dfr* de maíz en una línea de petunia que acumula dihidroquemferol debido a dos mutaciones en los genes *f3'h* y *f3'5'* induce la síntesis del pigmento pelargonidina (pelargonidina-3-glucósido), de 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 sinteteta), 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 Copenhague 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-

sión (unas 20 veces más), y que permitiría que con 1/3 de taza (70 gramos) se provean 2/3 de la ingesta diaria recomendada de vitamina A para niños en edad preescolar.

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).

CHAPTER 5 FIGURES AND FIGURE LEGENDS



Figure 5-1—DNA Construct Present in Golden Rice 2 (Paine and others 2005)

Key to source of DNA elements:
Glu: rice glutelin *Glu01* (*Glu*) promoter (nucleotides 1568–2406)
SSUcrf1: functional fusion of the pea RUI5CO small subunit plastid transit peptide with *Erwinia uredovora crtI* (D90087, Misawa, 1993)
Terminator regions of *A. tumefaciens nos* (nucleotides 1848–2100, V000087).
Zea mays phytoene synthase (*psy*)
Zea mays polyubiquitin *Ubi-1* promoter with intron
E. coli phospho-mannose isomerase (*PMI*) selectable marker

Figura 1. Inserto presente en el Golden Rice 2

Se utilizó la transformación mediada por *Agrobacterium tumefaciens* para introducir la construcción en arroz (*Oryza sativa*). El sistema de selección utilizado fue el método de la fosfomanosa isomerasa de *E. coli* (PMI), un sistema alternativo al uso de genes de resistencia a antibióticos. Este sistema permite a los tejidos vegetales en cultivo utilizar manosa como fuente principal de carbono, no disponible para las plantas porque carecen de la enzima PMI.

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.

Ningún cultivar de arroz produce carotenoides en el endosperma, si bien pueden producir el precursor geranil-geranil difosfato. La fitoeno sintetasa convierte este compuesto a fitoeno, el precursor inmediato del beta-caroteno en plantas.

Para poder ser utilizada como vitamina A, el beta-caroteno debe ser absorbido y convertido

a retinol. Esta bio-conversión es variable, de acuerdo a factores que dependen del tipo de carotenoide, la matriz en la cual es incorporado, el estado nutricional del consumidor, etc.

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 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 fitoendodesaturasa 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 espe-

cies, 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

Las técnicas biotecnológicas se están utilizando ampliamente para obtener mejores



Figura 3: Tomates violeta con alto contenido de antocianinas y tomates rojos sin modificar. Foto del Centro John Innes Centre

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,R amos ML, Hajduch 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.ilsi.org www.ilsi.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 inversa 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 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 biodisponibilidad 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.

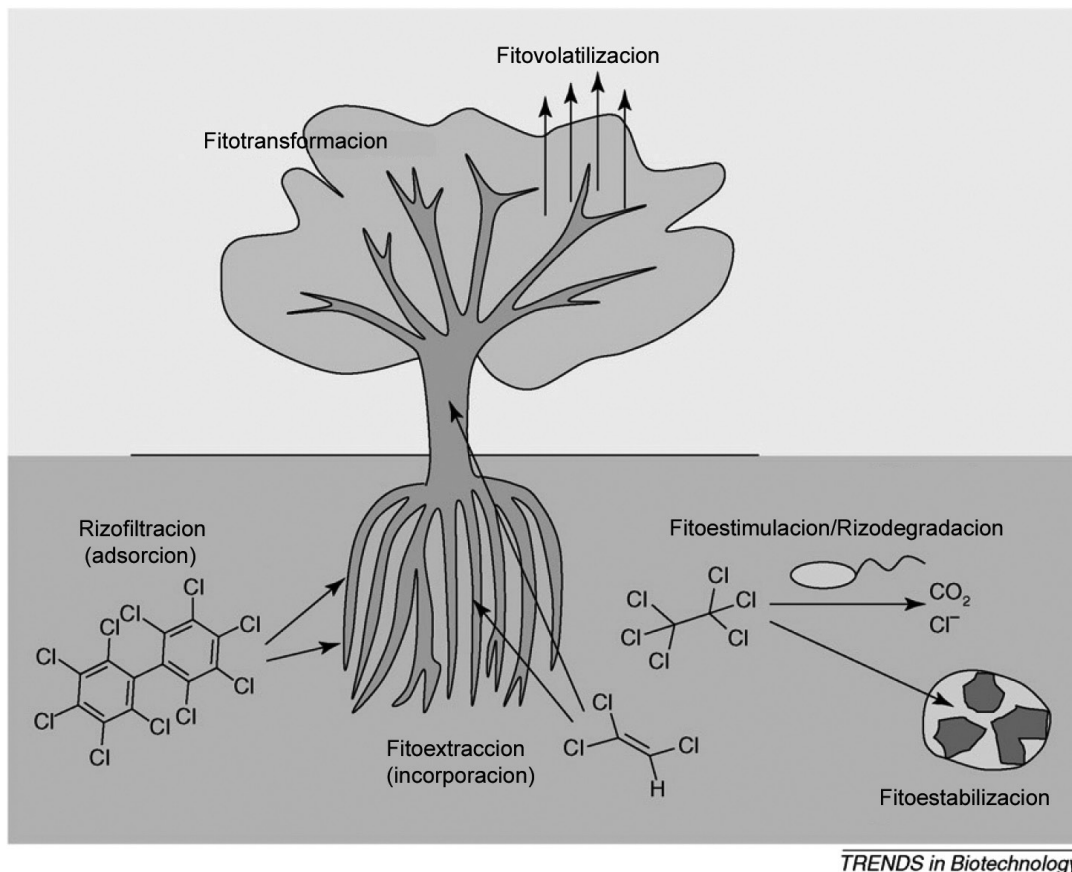


Figura 1. Procesos involucrados en la fitorremediación. La fitorremediación puede involucrar varios procesos: los contaminantes en el suelo y en el agua subterránea pueden ser incorporados a los tejidos vegetales (fitoextracción), o adsorbidos a las raíces (rizofiltración); los contaminantes dentro de 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-

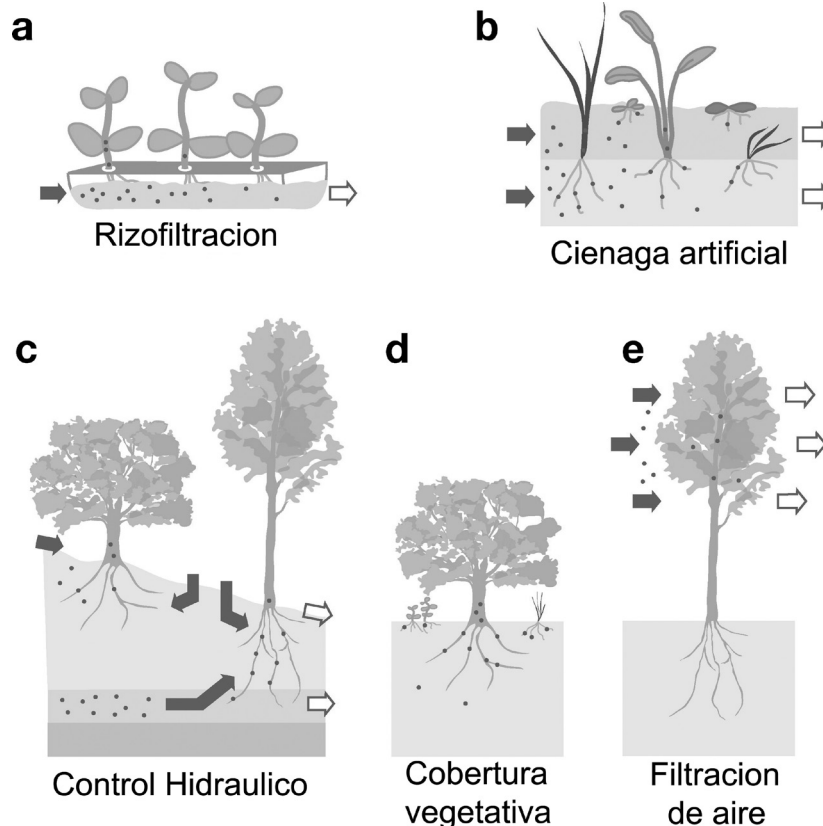


Figura 2. Esquemas de fitorremediación para tratar diferentes sustratos contaminados. Tecnologías de fitorremediación utilizadas para remediar distintos sustratos contaminados: agua, suelo y/o aire. Los círculos rojos representan al contaminante. Adaptado de Pilon-Smith, 2007

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 N_2) 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-

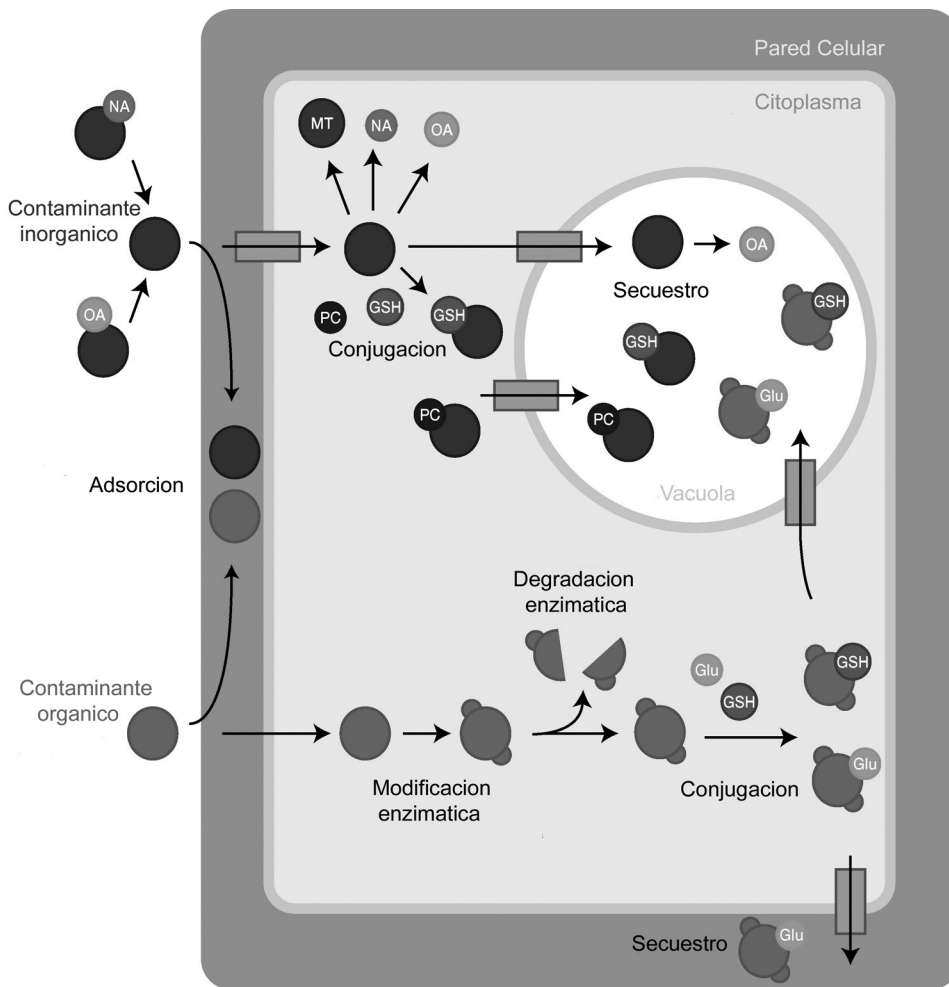


Figura 3. Mecanismos de tolerancia de las células vegetales a contaminantes orgánicos e inorgánicos. La detoxificación generalmente involucra procesos de conjugación seguidos por el secuestro activo del complejo en la vacuola y/o el apoplasto, lugares donde el contaminante genera menos daño. Los compuestos 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 período 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).

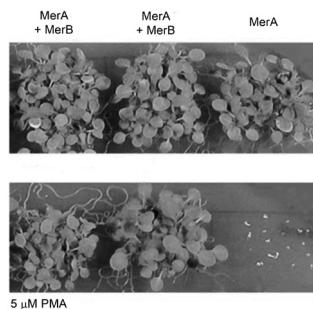


Figura 4. Plantas de *Arabidopsis* que expresan tanto *merA* como *merB* son altamente resistentes a mercurio orgánico. La expresión de ambos transgenes permite que el metilmercurio o el PMA se convierta a formas menos tóxicas, como Hg(0). Las plantas MerA/MerB (panel inferior izquierdo) crecen en presencia de altas concentraciones de PMA (5 µM) 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 peroxidasa y oxidasa. 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.

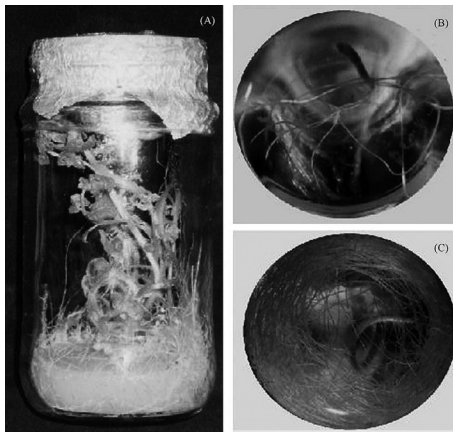


Figura 5. (A) Planta transgénica de tomate *in-vitro*. (B) Raíces en cabellera transgénicas luego de 1 semana en medio líquido. (C) Raíces en cabellera transgénicas después de 4 semanas en medio líquido. Tomado de Weaver Oller y col., 2005

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 sulfhidrido en detrimento de la función proteica en general. La mayor fuente de contaminación del agua bebible 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. *Unasyuva* 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 Bravo Almonacid; 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 homologa, 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

Tabla 1. Características de distintas plantas utilizadas en sistemas de expresión. La especie a utilizar debe seleccionarse de acuerdo con las necesidades de producción de la proteína a sintetizar y en cada caso habrá que considerar cuestiones de bioseguridad para garantizar el éxito del proyecto.

| | |
|--------------------------------|--|
| 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 homóloga. |

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,

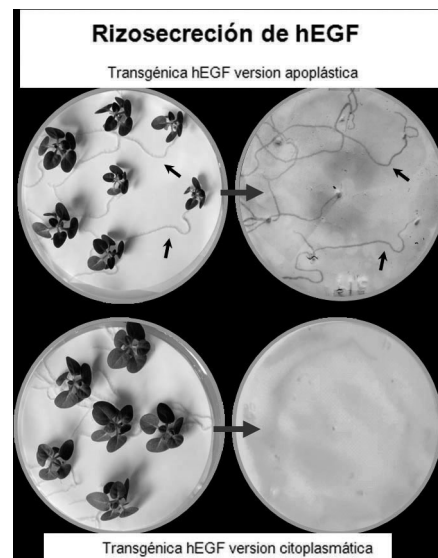


Figura 1. Rizosecreción en plantas transgénicas. Plantas transgénicas de tabaco que expresan hEGF, creciendo en medio MS sobre un disco de nitrocelulosa (izquierda), ensayo de *root blot* realizado sobre estas membranas y revelado con un anticuerpo anti-hEGF (derecha).

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 procesado 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-

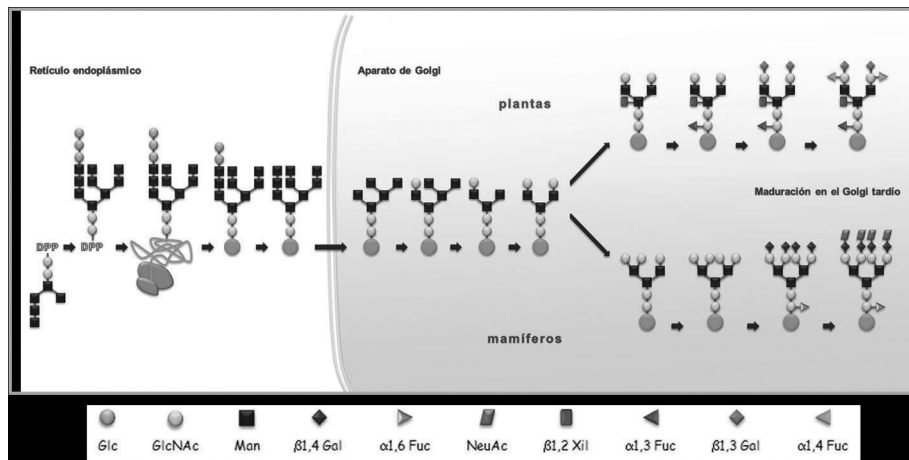


Figura 2. Adición y procesamiento de N-glicanos en el retículo endoplásmico (ER) y aparato de Golgi en células vegetales y de mamíferos. Un oligosacárido precursor ensamblado en un transportador de lípidos es transferido a residuos Asn específicos en el polipéptido en síntesis. Durante los eventos de 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 enteropatógenicas 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. mutants* 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 aptotina 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 | Maiz | 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_public/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., Bussmann 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.