

EXPLORACIÓN GENÉTICA

Avanzan sobre zonas poco conocidas del genoma de la célula vegetal

Científicos del Instituto de Genética del INTA estudian el ADN contenido en los cloroplastos, organelas del citoplasma de la célula vegetal encargadas de realizar la fotosíntesis. Mediante técnicas de inducción de mutaciones, detectaron genes mutadores que permiten obtener variabilidad en sectores específicos del genoma de las plantas.

POR DANIELA NOVELLI
FOTOS MATÍAS OTTAVIANI

La disponibilidad de variabilidad genética en genes que regulan caracteres de interés, es decir, la posibilidad de contar con versiones o alternativas (alelos) de esos genes, es muy apreciada por los científicos que trabajan en biología y en el mejoramiento genético de los cultivos.

Para aumentar la variabilidad existente en plantas cultivadas, una de las estrategias que puede utilizarse es a través de Técnicas de Mutaciones Inducidas (TMIs), que consisten en la aplicación de estreses físicos o químicos capaces de provocar daños en el genoma por encima de la capacidad de reparación de las células.

En el mundo, las primeras investigaciones sobre estas técnicas datan de fines de la década del 30, mientras que, en el Instituto de Genética "Ewald Favret" del INTA, también tienen una larga tradición y este año se celebran siete décadas de

continuidad en el estudio de estas técnicas y su aplicación en plantas cultivadas. Los trabajos fueron iniciados por el Ing. Agr. Ewald Favret, reconocido investigador argentino y pionero en estudios de genética vegetal, de quien hoy el instituto lleva su nombre.

Otra forma de incrementar la variabilidad disponible, cuya aplicación está mucho menos extendida que la de las TMIs, es a través del uso de plantas que presenten algún defecto en los genes encargados de reparar los daños que suelen ocurrir en el ADN por fenómenos naturales. Al tener impedidas algunas funciones de reparación del ADN, en estas plantas se originan más errores de lo habitual, algunos de los cuales quedan finalmente fijados como mutaciones. Los genes que las originan se denominan Genes Mutadores.

De ambas maneras, es posible acelerar la tasa de mutaciones por encima de la natural y, así, obtener una explosión de nueva variabilidad. "En las siguientes generaciones, nuestra tarea es seleccionar aquellas plantas mutantes que portan alelos útiles, ya sea para investigar la funcionalidad de algunos genes o la base genética de determinados caracteres", explicó Alberto Prina, investigador del Instituto de Genética del INTA, al tiempo que añadió: "Luego, estos conocimientos y los nuevos materiales originados podrán ser utilizados para la obtención de plantas con características agronómicas mejoradas".

Exploración del genoma de los cloroplastos

En los cloroplastos tiene lugar el proceso de fotosíntesis, una función esencial

Para aumentar la variabilidad existente en plantas cultivadas, una de las estrategias que puede utilizarse es a través de Técnicas de Mutaciones Inducidas.





para las plantas y, en gran medida, para la vida en el planeta tal como existe en la actualidad. Junto con las mitocondrias, estas organelas están ubicadas en el citoplasma de la célula vegetal y contienen su propio ADN.

El pequeño genoma de los cloroplastos retuvo un escaso número de genes -algo más de 100 genes- de los que originalmente portaba el organismo procarionte que le dio origen, una cianobacteria que, de acuerdo con la teoría endosimbiótica, fue fagocitada por una célula eucariótica ancestral a partir de la cual evolucionaron a lo largo de un período que se calcula cerca de mil millones de años.

“Muchos detalles de la funcionalidad de los genes del plastoma no son conocidos y su variabilidad genética, que es muy escasa, ha sido muy poco utilizada

para el mejoramiento de los cultivos”, comentó Prina.

A diferencia de los genes del núcleo de las plantas superiores, los genes del plastoma se comportan bajo reglas genéticas más laxas y conforman un genoma altamente conservado. Ambas cuestiones no solo restringen la disponibilidad de variabilidad genética y vuelven muy difíciles las posibilidades de que estos genes muten artificialmente, sino que, además, su diferente comportamiento genético hace que el aislamiento de nuevas mutantes del plastoma sea más dificultoso que el de mutantes de genes del núcleo.

Sin embargo, un equipo de investigadores del Instituto de Genética del INTA -dirigido por Prina- halló la excepción a la regla al identificar un gen que desestabiliza la genética del cloroplasto. La detec-

ción se logró mediante TMs y permitió obtener nueva variabilidad en sectores del genoma de las plantas de los que, por ausencia de variantes, aún hoy se desconocen muchos detalles de su funcionalidad.

Documentado por primera vez en 1992, este genotipo mutador -denominado mutador de cloroplastos de cebada (*cpm*)- es un logro a contramano de la tendencia bibliográfica. Por la relevancia del hallazgo, su publicación le valió a Prina ser distinguido con el Segundo Premio Nacional en Ciencias Biológicas de la Secretaría de Cultura de la Nación (1989-1992) y el Premio Francisco Sáez de la Sociedad Argentina de Genética (1991-1993).

En continua evaluación por el mismo equipo de científicos hasta la actualidad, este descubrimiento permitió la induc-



Pionero en la labor, el Instituto de Genética del INTA trabaja desde hace 70 años en la aplicación de Técnicas de Mutaciones Inducidas.

El pequeño genoma de los cloroplastos está formado por un escaso número de genes -algo más de 100 genes-, de cuya funcionalidad aún hay mucho por conocer.



ción y aislamiento de un gran número de mutaciones en genes del cloroplasto. Se trata, además, del único Gen Mutador de este tipo reportado en plantas monocotiledóneas, categoría en la que se incluyen grandes cultivos como cebada, maíz, arroz y trigo.

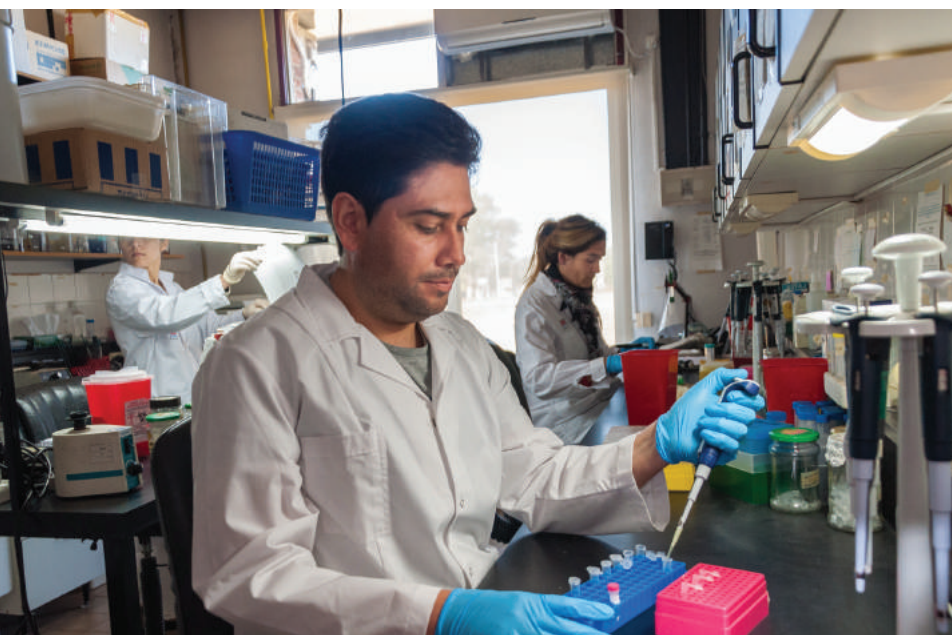
Evidenciado -en primera instancia- por producir unas pocas y sutiles estrías longitudinales deficientes en clorofila en las hojas de las plantas que lo portan, el *cpm* se aisló sobre familias de plantas

provenientes de un tratamiento mutagénico combinado de rayos X y azida sódica. Respecto de este último compuesto químico, uno de los más utilizados en la aplicación de TMI, el Instituto de Genética del INTA ha sido pionero en la realización de estudios que aportan a su conocimiento desde principios de los años 70.

En tanto, Alejandra Landau, actual responsable de la línea de investigación en el Instituto de Genética del INTA,

destacó: “Además de inducir un amplio espectro de mutantes deficientes en clorofila con base genética en los cloroplastos, hemos comprobado que el *cpm*, a su vez, induce una enorme cantidad de polimorfismos moleculares en el plastoma”.

Un estudio reciente -presentado por Franco Lencina, investigador del Instituto de Genética del INTA, en el marco de su tesis doctoral- echó luz sobre el efecto que causa el *cpm* sobre la recombinación





El equipo de investigadores halló la excepción a la regla de la genética conservada de los genes del cloroplasto al identificar un gen nuclear que la desestabiliza.

ción de secuencias particulares del plasmoma, como el gen *rp123* y su pseudogen.

“Esto significa que, además de un aumento de la tasa de mutaciones, el *cpm* incrementó notablemente la tasa de recombinación entre segmentos parecidos que habitualmente no deben recombinar”, explicó Lencina, al tiempo que aseguró: “Este fenómeno puede ser de trascendencia para la incorporación de genes en el plasmoma a través de técnicas biotecnológicas”.

De acuerdo con Prina, “el peculiar paisaje de cambios moleculares observado en plantas portadoras del gen *cpm* ha llevado a postular que este gen está involucrado en la reparación del ADN del plasmoma, más precisamente formando parte del sistema de reparación de apareamientos erróneos”.

La genética en unión con el territorio

Para la mejora de cultivos, la aplicación de Técnicas de Mutaciones Inducidas (TMIs) también ha rendido buenos frutos. En el caso del arroz, la interacción entre el Instituto de Genética y el Programa de Mejoramiento de Arroz con sede en el INTA Concepción del Uruguay -Entre Ríos- permitió la obtención de dos patentes internacionales por el registro de mutantes del gen AHAS que confieren tolerancia a los herbicidas de la familia de las imidazolinonas (IMI).

En 2005, el Programa de arroz del INTA lanzó al mercado la primera variedad tolerante a herbicidas IMI en la Argentina basada en una de las mutantes identificadas. Actualmente, los cultivares tolerantes a herbicidas IMI que utilizan uno de los alelos patentados son comercializados en el exterior mediante un acuerdo con la firma BASF.

“Estas variedades se han extendido por varios países europeos y tienen un lugar preponderante en América Latina, donde ocupan el 70 % de la superficie con arroz irrigado”, resaltó Prina, quien expuso los logros de este caso paradigmático en el Simposio Internacional sobre Mejoramiento de Plantas por Mutación y Biotecnología organizado por FAO/IAEA en agosto de 2018 en Viena.

Un trabajo similar al de arroz se realiza por estos días en articulación con el Programa de Mejoramiento de Algodón del INTA Roque Sáenz Peña -Chaco-. Como resultado, los investigadores lograron identificar una mutante tolerante a IMI en algodón, que afecta una base distinta del gen AHAS que la utilizada en arroz.

“Se está avanzando en la incorporación de este gen mutante a diversos fondos genéticos, en los que la tolerancia a IMI podrá ser acompañada por otras características importantes para el desarrollo de variedades comerciales”, especificó Prina.

En relación con los proyectos llevados a cabo con el sector privado, se destaca el convenio de asistencia técnica sobre la aplicación de TMIs entre el Instituto de Genética del INTA y la empresa Advanta Seeds.

A partir de esta articulación, trabajada durante 11 años, la firma obtuvo dos mutantes muy interesantes con respecto al cambio de la calidad de aceite en girasol.

En línea con estos casos de innovación, Prina -así como el resto de los investigadores, que se desempeñan como genetistas especializados en producir y aislar mutantes de interés en diferentes especies agrícolas- resaltó el trabajo que realizan los mejoradores de cultivos y explicó: “Para producir variedades comerciales, en algún momento necesitamos de los mejoradores del cultivo en cuestión, que están y conocen el territorio; de lo contrario, nuestro trabajo corre el riesgo de quedar a media agua”.

Así, el investigador amplió: “Nuestro trabajo puede hacerse desde un principio al lado del mejorador como en los casos mencionados, aunque también es posible producir materiales de premejoramiento que, finalmente, requieren las habilidades de quien está en el territorio para probar su utilidad para la producción de variedades comerciales”.

Esto último se realiza en trigo pan en cuanto al desarrollo de trigos con alta tolerancia a IMI conferida por un solo gen AHAS mutado, una investigación novedosa, ya que, habitualmente, en trigo hexaploide es necesaria la presencia de genes mutados en dos de sus genomas para lograr una tolerancia adecuada para su utilización agronómica. Para el mismo cultivo, a su vez, avanzan con pruebas a campo de familias selectas por parámetros relativos a tolerancia a sequía.

Resultados de ensayos



Las estrías deficientes en clorofila se presentan aisladas en una o en unas pocas hojas de cada planta, y serían la primera manifestación del efecto del mutador *cpm*.



Todas las plantas portan el mismo cloroplasto mutante. La familia verde claro, denominada LC3 (línea de color 3), corresponde a una mutación que afecta a un gen del cloroplasto que codifica una proteína involucrada en el ensamblaje del fotosistema I, que la hace más sensible a alta temperatura y alta irradiación.



Plántulas de cebada de la familia mutante LC2. Tienen una mutación en el gen *infA*, que codifica una proteína encargada de hacer más eficiente la síntesis de proteínas en el cloroplasto. Es la primera mutante de este gen en plantas superiores, que se distingue por presentar habitualmente la punta de la primera hoja muy clara.



Ensayos en invernáculo de tolerancia a imidazolinonas en trigo. Las dos líneas de macetas con plantas chiquitas son de una variedad sensible utilizada como control, mientras que las restantes corresponden a la mutante tolerante en distintos fondos genéticos.

Búsqueda implacable

En el transcurso de la investigación, que hoy lleva 35 años desde el aislamiento de la mutante inestable, se detectaron más de 60 polimorfismos que afectan una amplia variedad de genes del plastoma y varias regiones intergénicas -regiones de ADN situadas entre los genes-.

“Los genes afectados pertenecen, en general, a la maquinaria genética del plástido y al aparato fotosintético, aunque también se aislaron otras mutantes en genes como el *matK*, que se encuentra en estudio actualmente y cuyas funciones aún no están establecidas con claridad”, describió Landau.

Gracias al uso del mutador *cpm*, pudo obtenerse un amplio espectro de mutantes del plastoma, muchas caracterizadas por cambios en la pigmentación clorofílica y otras que muestran diferencias notables en la estabilidad genética y en las respuestas a estrés abiótico y a herbicidas. “Algunas de las mutantes aisladas resultaron ser absolutamente novedosas”, remarcó Prina.

Publicada como hallazgo científico en 2003, una de las mutantes identificadas correspondió al gen plastídico *infA*, cuya funcionalidad en las plantas hasta ese entonces se infería a partir del conocimiento en bacterias. “La proteína codificada por este gen se encarga de hacer más eficiente la síntesis de proteínas en el cloroplasto; existen similares en todo el abanico de los seres vivos, desde las bacterias hasta el ser humano”, indicó Landau.

En el mismo año, también se documentó en la revista *Theoretical and Applied*

Documentado por primera vez en 1992, este genotipo mutador -denominado mutador de cloroplastos de cebada (*cpm*)- es un logro a contramano de la tendencia bibliográfica.

Genetics el descubrimiento de una mutante de cebada tolerante a herbicidas del grupo de las triazinas, que mereció el Premio Francisco Sáez de la Sociedad Argentina de Genética (2001-2003). Actualmente, luego de un extenso trabajo de cruza y retrocruza con variedades comerciales y posterior selección, se mejoró notablemente su comportamiento agronómico.

“Su uso en el desarrollo de cultivares tolerantes podría cubrir una necesidad importante para el combate de malezas en el cultivo de cebada”, anticipó Landau.

De acuerdo con Gabriela Pacheco, actualmente directora del Instituto de Genética del INTA, “los resultados obtenidos muestran que las TMI son una herramienta poderosa, tanto para investigaciones fundamentales en vegetales, como para su aplicación en el mejoramiento de los cultivos”.

En este último caso, “los bajos costos y requerimientos de infraestructura y la fácil adaptación a distintos cultivos y ob-

jetivos de mejoramiento hacen de esta metodología una excelente estrategia para contribuir a la resolución de muy diversas problemáticas que se presentan en los programas de mejoramiento”, argumentó Pacheco, quien ha realizado investigaciones en el grupo que también integran Vanina Brizuela, María Elizabeth Petterson y Susana Costoya.

“En el Instituto de Genética Ewald Favret hay una extensa experiencia en el desarrollo y la aplicación de diferentes tecnologías de generación de variabilidad genética, y particularmente las estrategias TMI son priorizadas para continuar aportando novedades genéticas de alto valor para el SAAA (Sistema Agropecuario, Agroalimentario y Agroindustrial)”, destacó la investigadora.

Más información: Alberto Prina prinaalbertoraul@inta.gov.ar; Alejandra Landau landau.alejandra@inta.gov.ar; Franco Lencina lencina.franco@inta.gov.ar; María Gabriela Pacheco pacheco.maria@inta.gov.ar

Gracias al uso del mutador *cpm*, pudo obtenerse un amplio espectro de mutantes del plastoma. Una de las mutantes identificadas correspondió al gen plastídico *infA*, cuya funcionalidad en las plantas se infería a partir del conocimiento en bacterias.



Izq. a der.: Franco Lencina, José Cuello, Vanina Brizuela, Alberto Prina, María Elizabeth Petterson, Abel Moglie, Alejandra Landau, Gabriela Pacheco, Daniel Díaz y Susana Costoya.