

Mutagénesis como técnica en la búsqueda de variabilidad genética

Ing. Agr. Winkler, Horacio Martín
Dra. Cereijo, Antonela
Dr. Muchut, Robertino
Ing. Agr. Dileo, Pablo
Ing. Agr. Scarpin, Gonzalo MP 3/206
Lic. Fernando Lorenzini
Dra. Roeschlin, Roxana
Dr. Paytas, Marcelo MP 3/116
EEA INTA Reconquista

Dra. Landau, Alejandra
Instituto de Genética "Ewald A. Favret" (IGEAF) del CNIA-INTA

landau.alejandra@inta.gob.ar
winkler.horacio@inta.gob.ar
cereijo.antonela@inta.gob.ar

Introducción

Las técnicas de mutagénesis o inducción de mutaciones en plantas son técnicas muy utilizadas por los fitomejoradores con el objetivo de generar diversidad genética. Esta diversidad puede afectar diversos caracteres de utilidad agronómica como: el rendimiento, la calidad, la resistencia a plagas y enfermedades, y la tolerancia a estreses abióticos, como el estrés hídrico y la salinidad, y además, la tolerancia a herbicidas. El estudio de las técnicas de mutaciones inducidas en plantas comenzó en la década de 1920 y el primer logro comercial fue en 1936. Hoy en día existen más de 3275 cultivares mutantes liberados oficialmente en más de 220 especies de cultivos en todo el mundo (<http://mvd.iaea.org/>). La seguridad alimentaria mundial sigue estando amenazada en particular por el cambio climático, la falta de tierras agrícolas y una población humana en crecimiento. Por lo tanto, existe una presión continua sobre los fitomejoradores para desarrollar cultivares de mayor rendimiento y adaptados a diversos ambientes. En este contexto, el mejoramiento por medio de las técnicas de mutaciones inducidas puede ayudar a satisfacer estas demandas; fundamentándose en el aprovechamiento no sólo de la variabilidad genética espontánea, sino también de la enorme variabilidad genética que puede generarse mediante esta técnica.

El equipo de algodón de INTA Reconquista incluye esta técnica dentro de su programa de mejoramiento, considerando que a partir de poblaciones de plantas provenientes de tratamientos mutagénicos se pueden obtener materiales con mejoras en su respuesta al medio ambiente cambiante. A su vez, esto genera una estrecha vinculación con el grupo de Mutaciones Inducidas en Plantas Cultivadas del Instituto de Genética "Ewald A. Favret" (IGEAF) del CNIA-INTA, que viene trabajando en la aplicación de estas técnicas en plantas cultivadas

desde el año 1949, y ha generado logros de alto impacto en la agricultura de nuestro país y de la región. Como ejemplo de estos logros se pueden citar las variedades mutantes de arroz tolerantes a herbicidas del grupo de las imidazolinonas que fueron obtenidas por el programa de arroz de la EEA Concepción del Uruguay, Entre Ríos, con el apoyo del equipo del IGEAF, las que han llegado a cubrir el 70% del área de arroz irrigado en Latinoamérica.

En este sentido entonces, uno de nuestros objetivos es, mediante la utilización de la técnica de mutaciones inducidas, poder contribuir al mejoramiento de la respuesta al estrés abiótico del cultivo de algodón, con énfasis en estrés hídrico y salino. Para ello, la selección de posibles mutantes se puede realizar por dos vías: utilizando lo que se denomina genética directa o clásica, y/o mediante genética reversa. La primera se basa en la selección de fenotipos que pudieran presentar una mejor respuesta a estos factores adversos; mientras que, por su parte, la genética reversa nos permitiría la búsqueda e identificación molecular de cambios mutacionales en genes que se conoce que están asociados a esas características.

Sección 1. Selección por genética directa

Cuando utilizamos lo que denominamos genética directa existen diferentes etapas que las sucesivas generaciones de plantas mutagenizadas deberán ir atravesando, hasta obtener un número considerable de individuos que puedan ser estudiadas individualmente, para corroborar si se han generado y seleccionado mutantes de interés para la característica deseada. En la **Figura 1** se puede observar un esquema donde se presentan las distintas generaciones luego del tratamiento mutagénico (M1, M2, etc.) que se obtienen por autofecundación, y las distintas acciones llevadas a cabo en cada una de ellas.

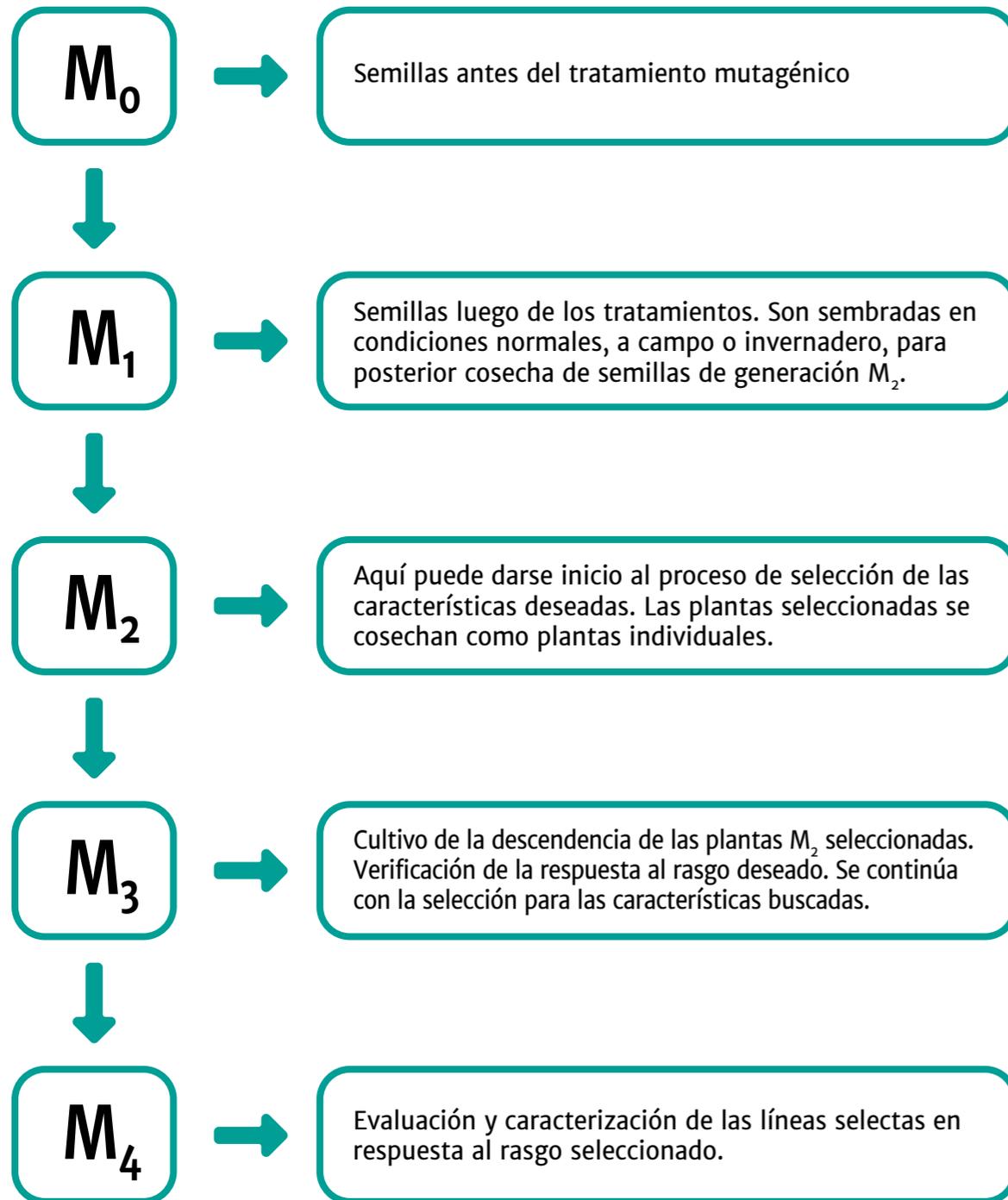


Figura 1. Esquema del proyecto de mutaciones inducidas con descripción de la generación mutada.

En la **Figura 2** se pueden observar los tratamientos químicos o físicos realizados para la generación de mutantes, así como también la siembra a campo de esas semillas mutagenizadas para la obtención de las plantas M1 que generaron la correspondiente descendencia M2. Las etapas de selección se comenzaron en plantas M2 mediante genética directa, como se describe a continuación.

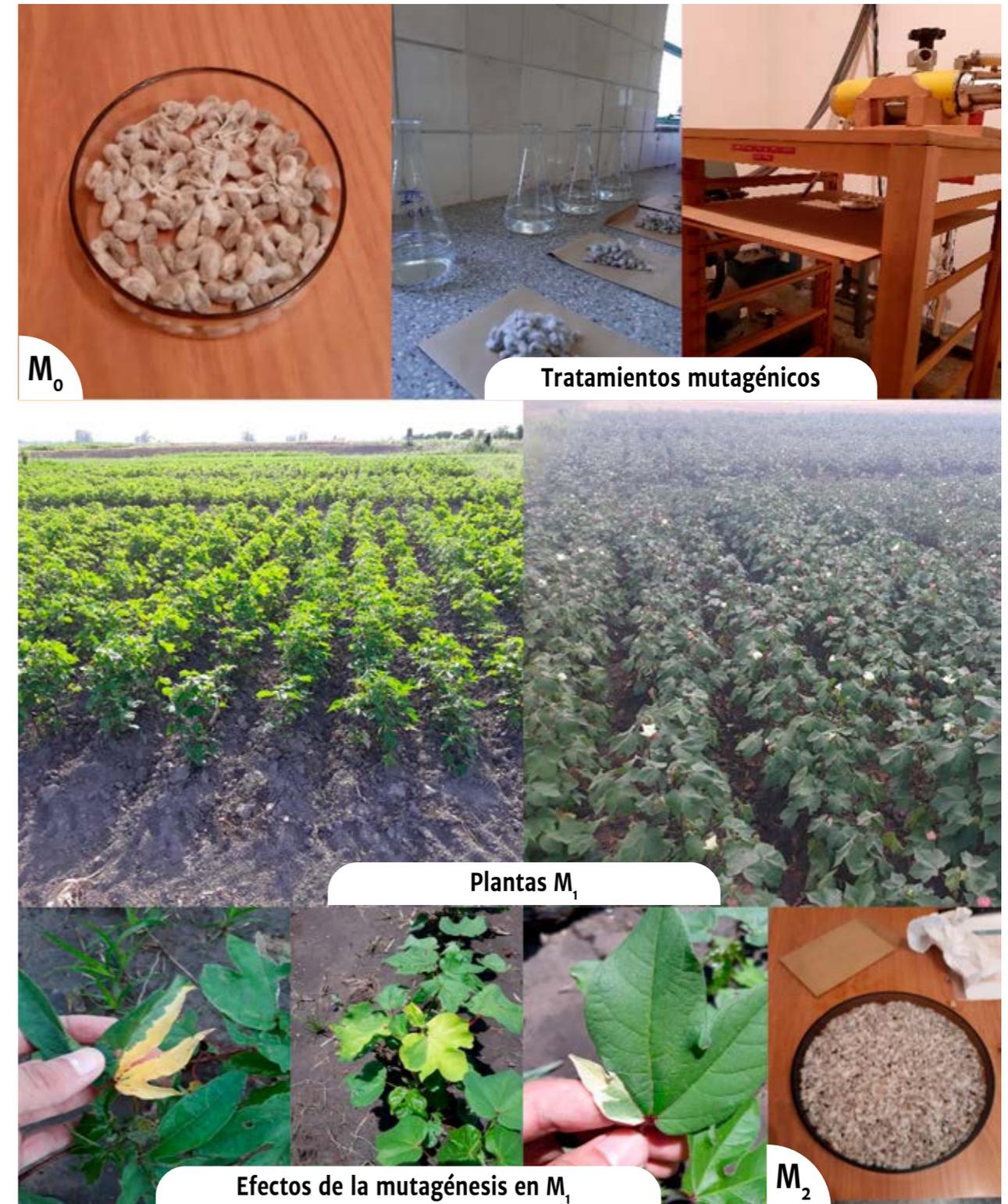


Figura 2. Proceso de mutagénesis hasta llegar a M2. Para este proceso se parte de un cierto número de semillas (M0) sobre las cuales se aplican diferentes tratamientos mutagénicos, que pueden ser químicos (izquierda) o físicos (derecha). Estas semillas mutagenizadas (M1) son sembradas a campo y se obtienen las plantas M1. En estos individuos se pueden observar efectos generados por los tratamientos, como una pérdida de pigmentación en sectores de las hojas, lo que se interpreta como que ese sector mutado ha sufrido un cambio genético que origina lo que se conoce con el nombre de quimeras, que consiste en un individuo que tiene diferente constitución genética en distintas partes de su cuerpo. Finalmente, estas plantas M1 darán su progenie M2, sobre las cuales se puede comenzar la selección.



Es necesario que la generación M2 presente un importante tamaño poblacional, para poder seleccionar el fenotipo deseado. Para que la selección sea factible de realizar en estas grandes poblaciones, se debe encontrar un método eficiente que permita hacer un descarte rápido de individuos. En nuestro caso, teniendo en cuenta que buscamos obtener materiales que presenten tolerancia a estrés abiótico, lo que realizamos es una secuencia de selección en distintas etapas y niveles, sobre diferentes estadios de la planta, para así ir eliminando los materiales que no hayan logrado sobrevivir a las situaciones extremas de estrés a las que han sido expuestos. En general, el desarrollo de las plantas frente al estrés hídrico y salino varían con el ciclo de vida de la planta; siendo las etapas críticas más sensibles, la germinación, el establecimiento de plántulas y la floración. En este sentido, los ensayos de laboratorio que simulan circunstancias de estrés hídrico han ayudado a la identificación de cultivares con un nivel elevado de tolerancia a tales condiciones adversas en diferentes cultivos.

Partiendo de una cantidad de 15.000 semillas M2, se han realizado hasta el momento distintas evaluaciones *in vitro* sobre la germinación (en M2) y al estado de plántulas (en M3), donde las plantas se sometieron a una simulación de estrés hídrico y salino.

El primer paso consistió en realizar una búsqueda dentro de la M2 en etapa de germinación, donde estos miles de individuos fueron sometidos a niveles extremos de potenciales osmóticos y de alta concentración de sales (Figura 3). Los individuos que lograron germinar/sobrevivir en esas condiciones adversas, fueron seleccionados y llevados a macetas para obtener su descendencia (M3), la cual será posteriormente expuesta a la próxima etapa de selección. Las pruebas de germinación son efectivas y fáciles de realizar, permitiéndonos manipular grandes cantidades de individuos y obtener resultados rápidos (Figura 3).

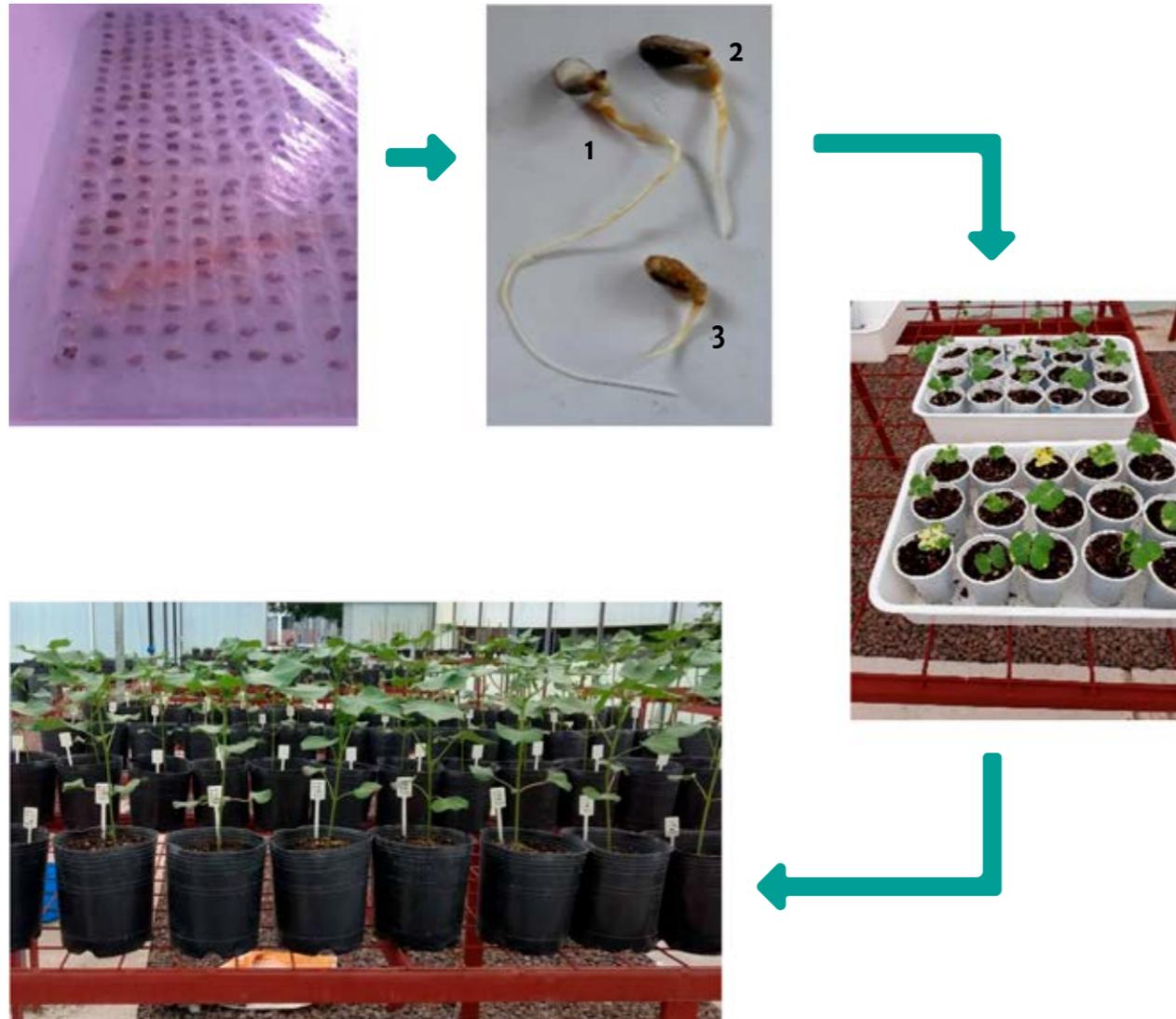


Figura 3. Primer paso en la selección de mutantes en la M2 mediante genética directa. Las fotos muestran las etapas del proceso de evaluación de la germinación, en plántulas sometidas *in vitro*, a condiciones de estrés hídrico y salino. Los individuos que sobrevivieron y fueron seleccionados en esta etapa se colocaron en macetas para que completen su ciclo y generen su descendencia.

Las plantas que lograron germinar y sobrevivir a esta primera etapa de selección, se trabajaron de aquí en adelante como líneas independientes y diferentes entre sí, de las cuales se obtuvo su descendencia (M3). La generación M3 fue sometida a evaluaciones de supervivencia de plántulas, para lo cual las semillas se sembraron en un sustrato inerte estéril, en ambiente controlado, como muestra la Figura 4, y se aplicaron condiciones de estrés hídrico y salino. Para realizar la selección, en esta etapa se evaluó la supervivencia, el crecimiento de las plántulas y desarrollo radicular. Esto nos permitió reducir el número de individuos aproximadamente a la mitad, para así avanzar con la siguiente etapa de selección en una generación M4.

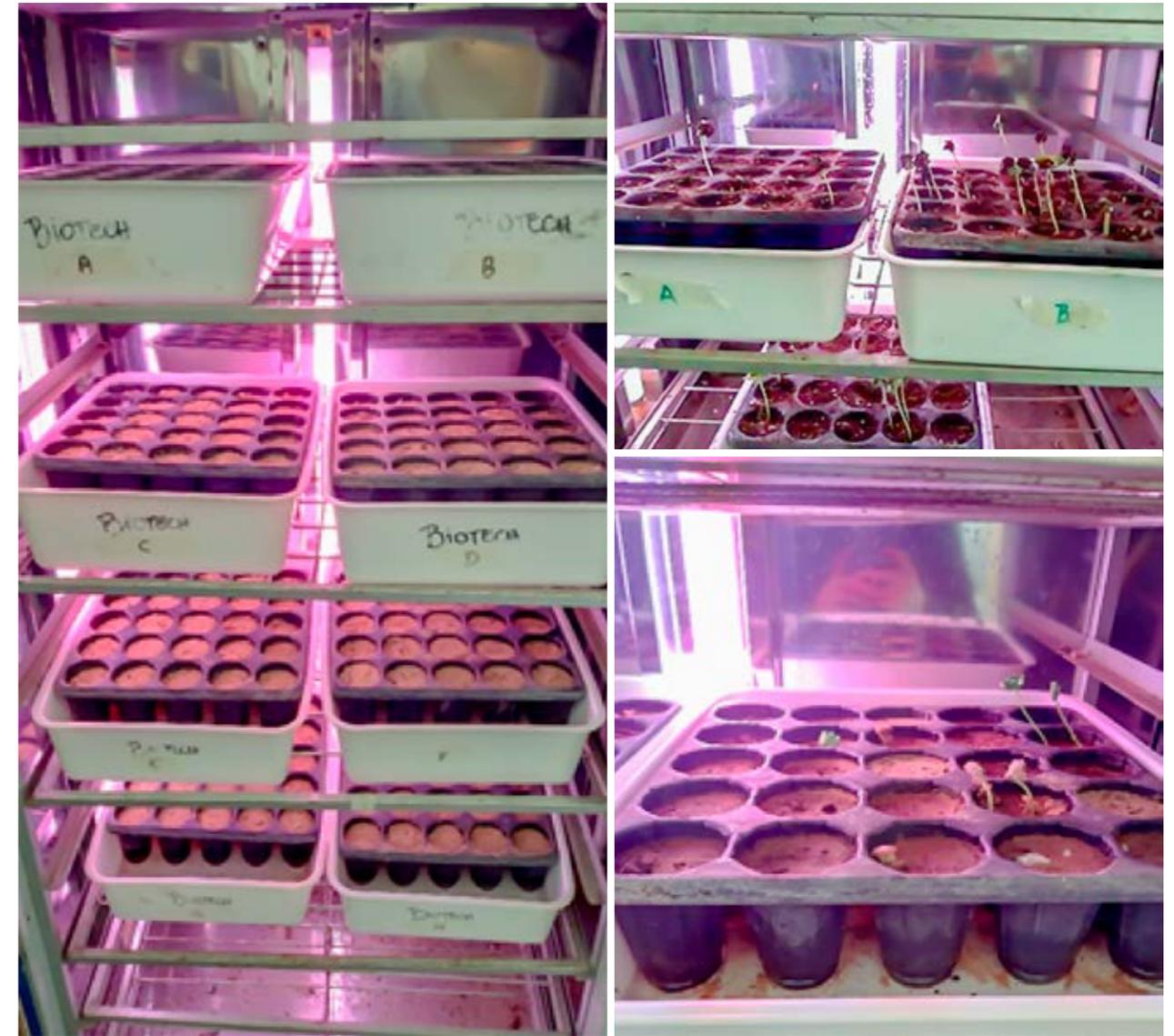


Figura 4. Selección de mutantes M3 mediante genética directa. Las imágenes permiten observar las condiciones en las que se realizó el crecimiento y evaluación de la supervivencia y desarrollo de las plántulas ante condiciones de estrés hídrico y salino. Los individuos que sobrevivieron y mostraron un mejor comportamiento frente a estas condiciones, fueron pasados a macetas hasta completar su ciclo y generar su descendencia.

Situación actual

Hoy en día nos encontramos con una generación M4 (progenies de las plantas M3), la cual será evaluada mediante la determinación de metabolitos osmocompatibles. Específicamente, se evaluará el nivel de contenido de prolina en los individuos sometidos al estrés. La prolina es un aminoácido que se acumula en las plantas bajo condiciones de deshidratación por sequía y alta salinidad, que actúa como compuesto protector de las mismas ante estas condiciones de estrés. De los individuos seleccionados en esta etapa se obtendrá su descendencia M5, sobre los cuales se realizará una caracterización morfológica y fisiológica que permitirá determinar si se han seleccionado mutantes con una respuesta diferencial hereditaria a las condiciones de estrés expuestas.



Sección 2. Selección por genética reversa

Como se mencionó previamente, la selección de individuos luego de un tratamiento mutagénico, puede realizarse por genética directa o por genética reversa. El método directo permite la selección por características fenotípicas de interés; sin embargo, existen situaciones en las que los cambios inducidos a nivel genético no son apreciables a simple vista, en las condiciones de cultivo ensayadas. En este contexto, realizar un análisis a nivel genético es esencial para seleccionar individuos que, *a posteriori*, puedan ser evaluados en condiciones específicas de cultivo, en las que puedan presentar características deseadas. La técnica de selección de mutantes mediante genética reversa, permite identificar las mutaciones en ciertos genes o regiones génicas de interés. Al igual que en la selección por genética directa, la genética reversa consta de varias etapas.

Obtención de individuos mutantes

El primer paso es generar la población de individuos mutagenizados. Esto, como se explicó en el esquema de la sección anterior (Figura 1), se realiza mediante el tratamiento con métodos físicos o químicos de las semillas de algodón (Figura 2). Las plantas provenientes de la población M1 (proveniente de la semilla que recibió el tratamiento mutagénico), que han logrado completar el ciclo, proveen de las semillas M2 (Figura 5). Sobre la población de plantas M2 se comienza la evaluación y proceso de selección de las mutantes de interés mediante genética reversa.

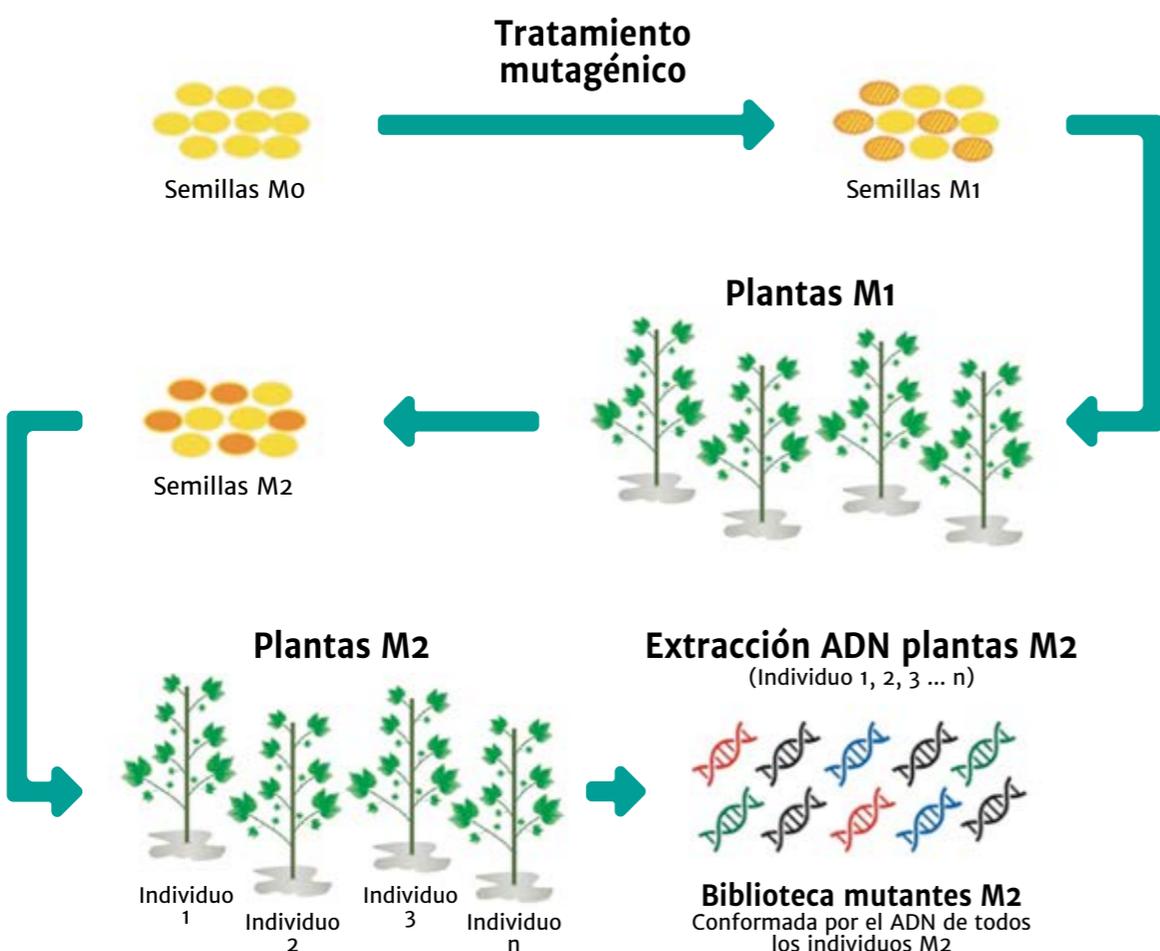


Figura 5. Esquema de trabajo para la detección de mutantes de interés mediante genética reversa; generación de la biblioteca de mutantes putativas M2. Esta biblioteca está compuesta por el ADN extraído de cada planta M2 en forma individual. Los diferentes colores en el ADN representan las diferentes mutaciones generadas al azar en el genoma de las plantas M2; el ADN de algunos individuos presentará mutaciones en el gen de interés, mientras que otros no.



Detección de mutaciones génicas

Cada planta M2 es un individuo que podría presentar mutaciones al azar en su genoma, generadas por el tratamiento mutagénico aplicado (Figura 5). En este contexto, la genética reversa es una herramienta que permite identificar, entre todas las plantas M2, cuáles presentan una mutación en un gen de interés y cuáles no.

Para la detección de las mutaciones puntuales, se aplicará una técnica denominada TILLING (por sus siglas en inglés de *Targeting Induced Local Lesions IN Genomes*). Esta técnica combina diferentes herramientas de biología molecular, como la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), utilizando el ADN extraído de cada individuo M2 como material de trabajo (Figura 5). De esta forma, podremos identificar plantas M2 individuales, que presenten una o más mutaciones en los genes de interés, así como también determinar qué tipo de mutación se ha generado.

Una vez identificadas las plantas M2 que presenten mutaciones en las regiones blanco de interés, es necesario evaluar el efecto de las mismas en la planta de manera fenotípica, ensayando diferentes condiciones de crecimiento, para lo cual se utilizará la población M3.

Selección de los genes candidatos

La identificación de mutaciones, mediante esta técnica de genética reversa, se realiza sobre genes o regiones génicas de interés. La elección de estos genes depende de los objetivos planteados y lo que se pretenda obtener en la planta. En este sentido, en el equipo de algodón decidimos evaluar, en una primera instancia, la presencia de mutaciones en un gen codificante de una proteína (enzima) involucrada en la degradación del aminoácido prolina. Como fue mencionado previamente, la prolina se acumula frente a situaciones de estrés y ayuda a la planta a tolerar estas condiciones adversas. Mutaciones en el gen encargado de sintetizar esta enzima, podrían producir una inactivación de la misma o una disminución en su actividad normal, conduciendo así a que se genere un aumento en los niveles de prolina en las células. Estos niveles incrementados de prolina en forma basal, podrían contribuir a que la planta se encuentre mejor preparada para tolerar situaciones de estrés hídrico o salino, presentándose así como una planta con características positivas que pueda ser posteriormente utilizada en los programas de mejoramiento, objetivo primordial de nuestro equipo de trabajo.

Situación actual

Actualmente, en el equipo de algodón de la EEA INTA Reconquista, contamos con las semillas mutantes M2, las cuales serán sembradas en el mes de septiembre. Sobre cada una de las plantas M2 obtenidas (utilizando una hoja de cada una de ellas), se realizará una extracción de ADN (Figura 5), el que será almacenado individualmente y conformarán en conjunto, algo que se conoce como "biblioteca" de mutantes. Esta biblioteca de ADN proveniente de las plantas M2 será el material de trabajo sobre el cual se realizará la búsqueda de las mutaciones en los genes de interés. El armado de esta biblioteca es fundamental, ya que, aunque en este momento se plantea el análisis sobre un gen encargado de la degradación de prolina, la misma puede ser utilizada a futuro para la búsqueda de mutantes en otros genes o regiones de interés.

Además, nos encontramos en la etapa de puesta a punto de la técnica de TILLING en nuestro laboratorio, de manera tal que una vez conformada la biblioteca de ADN de la población M2, proceder a la búsqueda de mutaciones en el gen candidato.

Consideraciones Finales

Mejorar el cultivo de algodón y/o generar nuevas variedades adaptadas para la región es un desafío actual en constante demanda de la producción algodonera. El mejoramiento de algodón, utilizando técnicas de mutaciones inducidas, permitiría el desarrollo de nuevos genotipos tolerantes a diversos factores climáticos como estrés hídrico o salino y también con mejores estándares de productividad y calidad de fibra. De esta forma, se presenta como una práctica validada que, complementándose a otras técnicas de mejoramiento genético tradicional, podrían acelerar de manera considerable el proceso de mejora del cultivo.

