



De izq. a der. Las investigadoras Margarita Stritzler, Emilia Bottero y Gabriela Soto.

PRODUCTIVIDAD FORRAJERA

Editar el genoma de la alfalfa para aumentar su rendimiento

Desde el INTA aseguran que, mediante esta herramienta biotecnológica, se mejoran los caracteres agronómicos de interés de los alimentos consumidos por los animales, lo que impacta en una mayor sustentabilidad y eficiencia. Las ventajas de impulsar el diseño genético como estrategia productiva.

POR LAURA PÉREZ CASAR

Al analizar el escenario mundial, el aumento de la producción de alimentos por superficie es escaso, por lo que surge la necesidad de plantear estrategias que consideren el incremento del rendimiento por unidad de área. Ese es el camino para poder dar respuesta a la demanda de alimentos que, cada vez, será mayor.

En este contexto, los especialistas ponderan el rol que ocupa la edición génica vegetal al permitir mejorar los forrajes y alimentos consumidos por los animales, lo que impacta en una mayor sustentabilidad, previsión y eficiencia de las producciones. En el INTA impulsan la edición del genoma de la alfalfa para aumentar la obtención de biomasa, resistencia a estrés abiótico y el retraso de la floración.

Aníbal Pordomingo—coordinador del programa Carnes y Fibras del INTA—, subrayó el gran aporte que hace y hará la edición génica (EG) a la ganadería, tanto en el mejoramiento en animales como en las plantas en beneficio de la producción sustentable y la predictividad de los resultados, en especial, en ambientes extremos.

Y aseguró que “el mayor avance en el sector ganadero se va a dar por la edición génica en la producción vegetal, con grandes aportes a la ganadería de la mano de mejores forrajes y alimentos”.

Por su parte, Sergio Feingold—coordinador nacional del programa nacional de Biotecnología del INTA—, aseguró que “la edición génica representa una revolución tecnológica pocas veces vista, debido no solo a sus particulares ventajas técnicas,

sino a la posibilidad de introducir modificaciones genéticas con alta eficiencia e inusitada velocidad”.

En esta línea, Gabriela Soto—especialista en ingeniería genética de leguminosas del Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABiMo, INTA-CONICET)—, especificó: “El INTA trabaja en la edición del genoma de alfalfa, en especial en los genes que brindan información o están directamente relacionados con el aumento de la productividad de esta forrajera”.

“Con este objetivo, y mediante la técnica de edición génica vía CRISPR/Cas, logramos generar cuatro vectores binarios para la eliminación de un gen endógeno determinado (*knock out*) y para la edición puntual un gen endógeno (*base editing*) de alfalfa”, explicó Soto.

La edición génica representa una revolución tecnológica pocas veces vista.



Con herramientas biotecnológicas como la edición génica, se potencia el mejoramiento genético convencional.

Según especificó la investigadora, este trabajo permitirá potenciar el crecimiento y desarrollo vegetativo de la alfalfa, como así también obtener un fenotipo de mayor producción de biomasa fácilmente reconocible. Además, en estos individuos, se estudiará el retraso de la floración, que también es un carácter deseable en alfalfa.

A su vez, se trabajará en la tolerancia a condiciones de estrés abiótico y retraso de senescencia. “Para ello, realizaremos un *knock out* de un gen previamente caracterizado en nuestro grupo mediante mutantes en *Arabidopsis*”, indicó Soto, quien agregó: “Otro punto que considera la investigación es la fijación biológica de nitrógeno”.

Actualmente, el grupo de trabajo de ingeniería genética de leguminosas busca desarrollar una sintética experimental de alfalfa tolerante a herbicidas, editada genéticamente vía CRISPR/Cas9.

“Esto responde a una necesidad a partir de la problemática existente con las malezas”, reconoció Soto, quien advirtió sobre la presencia de más de 120 especies de malezas que generan entre un 50 y un 80 % de pérdidas en la productividad potencial en las pasturas de alfalfa en el país.

De acuerdo con la investigadora, “la falta de herbicidas selectivos, sumado a la ausencia de cultivares tolerantes y el mal manejo de los lotes intensifica la aparición de malezas resistentes, complejizando aún más el panorama futuro”. A lo cual agregó: “En la actualidad, el manejo de lotes de alfalfa con herbicidas es complejo y, por consiguiente, necesita de un alto grado de capacitación”.

Edición génica: una herramienta para superar las limitaciones

“Combinando técnicas convencionales con herramientas biotecnológicas, como la edición génica, pudimos superar las limitaciones del mejoramiento genético convencional”, aseguró Soto, quien no dudó en resaltar que “el trabajo se focalizó en mejorar la productividad y sustentabilidad del cultivo de alfalfa”.

Para eso, “identificamos los caracteres agronómicos de interés, generamos herramientas moleculares para mejorar y estudiar aspectos relevantes de caracteres seleccionados tales como la tolerancia a herbicidas y al estrés abiótico —particularmente la salinidad y el frío—, el retraso de la floración y la fijación biológica de nitrógeno”, detalló la investigadora. Y adelantó que, en un futuro, pretenden explorar estrategias que permitan mejorar las *performances* de los cultivos frente a anegamiento y a sequía.

Una vez seleccionados los caracteres de interés, diseñaron las estrategias moleculares para su mejoramiento, vía edición génica. Para lo cual utilizaron herramientas bioinformáticas disponibles, como es la reciente secuenciación del genoma de alfalfa y la disponibilidad de microarreglos y otras herramientas bioinformáticas específicas para la especie.

De acuerdo con la técnica, “esta información acorta mucho los tiempos, ya que habilita tanto el estudio como el desarrollo directamente en el cultivo de interés y no indirectamente en especies modelos”.

En una primera instancia, se secuenció cada gen a editar para asegurar y diseñar guías, que serán las secuencias que dirijan la maquinaria de edición específicamente a la región que se quiere manipular, que hibriden perfectamente con la secuencia deseada (*target*).

Una vez confirmada la secuencia, se diseñaron los guías tomando la precaución de elegir aquellos con el menor porcentaje de hibridación con secuencias inespecíficas. De esta forma se minimiza el número de *off-targets* —genes modificados no intencionalmente—.

Luego, para cada uno de los caracteres se siguieron diferentes estrategias. Para el caso de la tolerancia a herbicidas, tanto los genes involucrados como sus mecanismos de tolerancia están ampliamente estudiados en la literatura y también por el INTA en alfalfa.

En base a toda la información disponible, se eligió la estrategia de mutaciones puntuales dirigidas. Así, se generaron dos vectores binarios para producir mutaciones puntuales en genes endógenos a través del sistema CRISPR/Cas9.

Para esto, se utilizaron vectores que poseen una caspasa, optimizada para plantas, que reconoce las secuencias *target*, pero que es enzimáticamente inactiva, fusionada a una enzima citidina deaminasa que produce la desaminación de las citosinas que se encuentran aguas arriba de la secuencia PAM del gen *target*.

En cuanto al resto de los caracteres, Soto especificó que la estrategia consistió en generar *knocks outs* de genes específicos, algunos de estos genes fueron

Una forrajera con numerosas ventajas

Considerada la reina de las forrajeras, la alfalfa se destaca por sus altos rendimientos de materia seca, excelente calidad forrajera, gran adaptabilidad a diversas condiciones ambientales y su capacidad para la fijación de nitrógeno.

Mientras que Córdoba es la principal productora de alfalfa pura, Buenos Aires es la mayor productora de esta forrajera consociada con gramíneas anuales o perennes. Como especie pura o consociada, la alfalfa integra el 58 % del total de las forrajeras de la Región Pampeana.

En esta área, la alfalfa se cultiva casi exclusivamente en condiciones de secano y es la principal especie forrajera del país, así como la base de la producción de carne y leche en la zona.

Sus rendimientos promedio en forraje —obtenidos en parcelas de cultivos puros correspondientes a la red de evaluación de cultivares del INTA— son de entre 6 toneladas de materia seca por hectárea por año en Anguil, La Pampa, y 20,5 en Marcos Juárez, Córdoba.

La extensa distribución que la alfalfa tiene en la Argentina supone un amplio rango de adaptación a las particulares condiciones de precipitaciones, suelos, temperatura, plagas, enfermedades y modalidades de manejo de cada zona.

En los últimos 25 años, se inscribieron cerca de 300 variedades en el Registro Nacional de Cultivares (INASE). Si se descuentan las obsoletas y las fuera del mercado por diversas razones, los materiales disponibles en el mercado rondan los 130.



elegidos en base a datos bibliográficos y otros en base a estudios en curso en el grupo de trabajo.

En todos los casos se eligió el sistema modular de vectores multiplex y, a partir de todos estos, se utilizó el sistema de clonado *Golden Gate* a fin de obtener vectores de expresión para la transformación estable en plantas dicotiledóneas. Por su parte, los guías fueron diseñados para hibridar en el primer y/o segundo exón del gen target ya que de esta manera aumenta la eficiencia del *knock out*.

“Se eligieron guías con un score elevado y el menor número de off-targets posibles”, detalló Soto quien, a su vez, explicó que “en los genes que forman parte de grandes familias se tuvo especial cuidado en no elegir guías que hibriden con zonas conservadas que pudieran *knock out* otro gen similar”.

Por último, indicó que todas las construcciones generadas, tanto para mutaciones puntuales como para *knock out* de genes de interés fueron realizadas por miembros del grupo en la Universidad de California, Davis —Estados Unidos—, en el marco de una colaboración con el laboratorio del Dr. Eduardo Blumwald.

La experiencia, líder del proyecto

A partir de su reconocida experiencia, el grupo de trabajo de ingeniería genética de leguminosas (IABiMo, INTA-CO-NICET) generó eventos transgénicos de alfalfa en forma eficiente para, a partir de estos, desarrollar sintéticas experimentales y realizar evaluaciones en condiciones de invernáculos como en campo.

“Según la especie, las estrategias que se usan para obtener organismos genéticamente editados son diferentes”, detalló Soto.

Para el caso de la alfalfa, la edición génica en todos los casos se realizará mediante el protocolo de transformación vía *Agrobacterium tumefaciens* y, luego, para los eventos prometedores se realizarán cinco ciclos de cruzamientos manuales con material *elite* seleccionado por mejoradores de alfalfa del INTA para obtener una sintética experimental con los caracteres modificados en *background* genético *elite* y libre de transgenes.

Más información: Gabriela Soto soto.gabrielacynthia@inta.gob.ar; Anibal Pordomingo pordomingo.anibal@inta.gob.ar; Sergio Feingold feingold.sergio@inta.gob.ar

La alfalfa es considerada la reina de las forrajeras con una extensa distribución en La Argentina.