

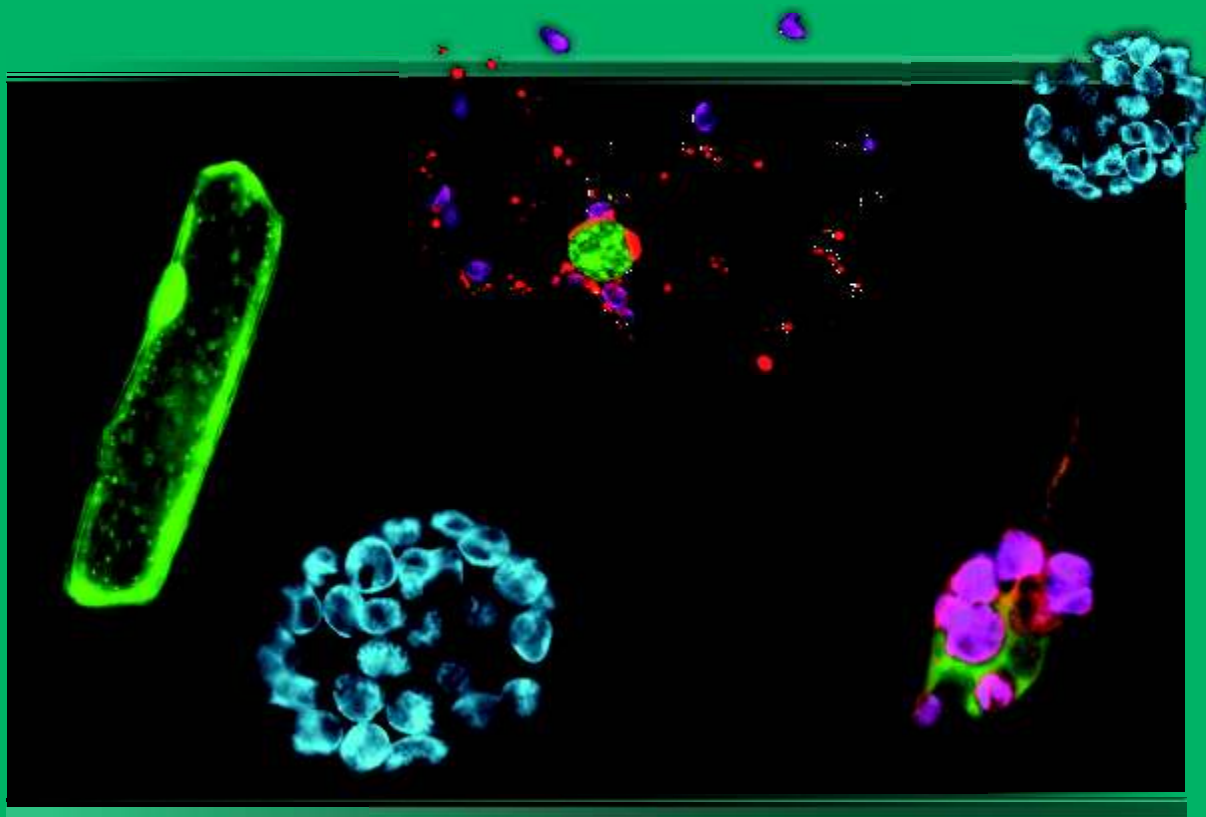
Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II

Editores:

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

ArgenBio 

Consejo Argentino para la Información
y el Desarrollo de la Biotecnología



■ Ediciones

Instituto Nacional de
Tecnología Agropecuaria





Consejo Argentino para la Información
y el Desarrollo de la Biotecnología

Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II

Editores:

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

Índice

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

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

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

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

PREFACIO

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

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

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

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

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

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

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

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

Los Editores

AGRADECIMIENTOS

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

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

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

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

Los Editores

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

LISTAS DE AUTORES (por orden alfabético)

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

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

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

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

PRÓLOGOS

Prólogo a la primera edición

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Dr. Francisco García Olmedo, 2004

Prólogo a la segunda edición

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

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

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

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

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

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

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

Dr. Francisco García Olmedo, 2010

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

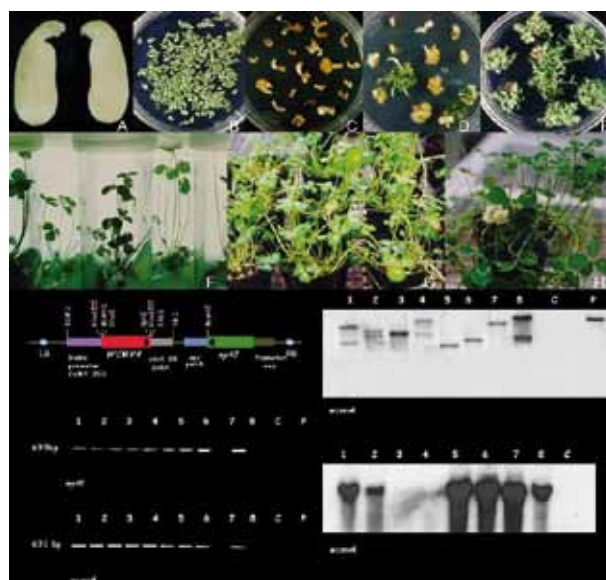


Figura 1. Transformación de trébol blanco para resistencia virus. A-H) Sistema prolífico de regeneración de plantas resistentes al virus del mosaico de la alfalfa (AMV) y al virus del mosaico del trébol blanco (WCMV) a partir de explantos cotiledonales. La transformación se llevó a cabo utilizando *Agrobacterium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

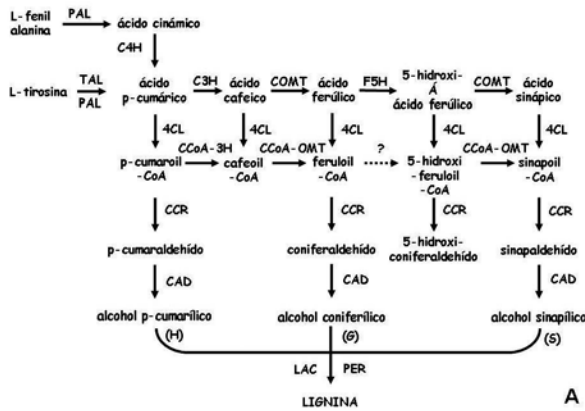


Figura 2. A) Vía biosintética de la lignina. PAL: fenilalanina amonio liasa; TAL: tirosina amonio liasa; C4H: cinamato-4-hidroxilasa; C3H: *p*-cumarato 3-hidroxilasa; COMT: cafeato-O-metiltransferasa; F5H: ferulato-5-hidroxilasa; 4CL: 4-cumarato CoA ligasa; CCoA-3H: cumaroil CoA hidroxilasa; CCoA-OMT: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

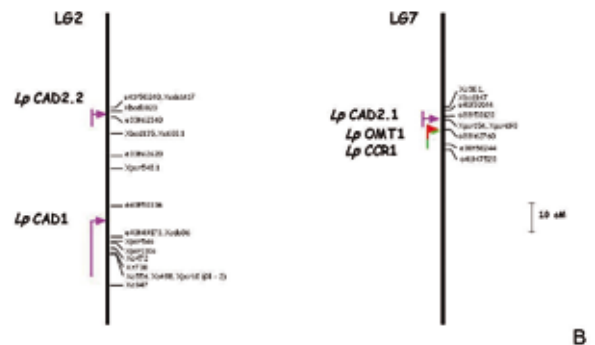


Figura 2. B) Mapeo de los genes correspondientes a la vía de biosíntesis de lignina, en los grupos de ligamento LG2 y LG7 de raigrás perenne.

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

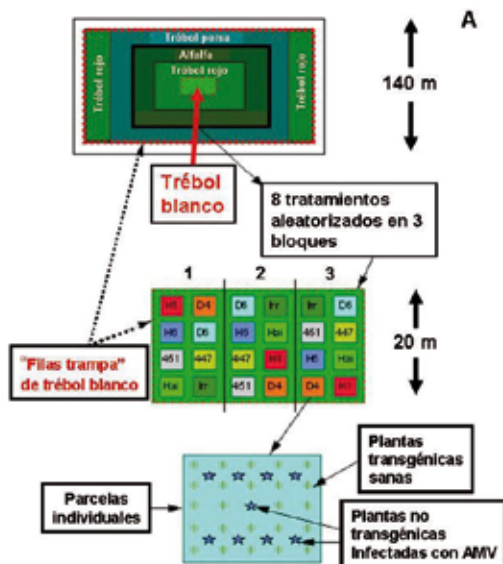


Figura 3. A) Esquema de la liberación a campo, a pequeña escala, de plantas transgénicas de trébol blanco inmunes a AMV.

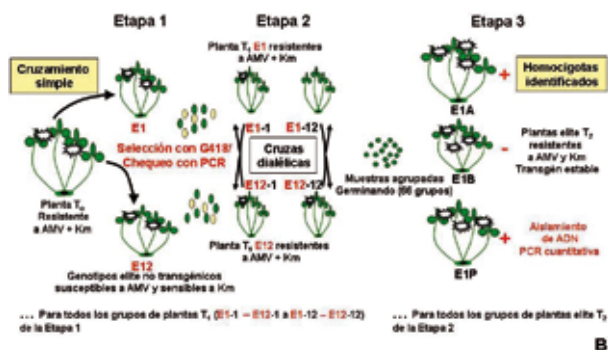


Figura. B) Estrategia para el desarrollo de germoplasma elite transgénico de trébol blanco inmune a AMV, basada en la utilización de PCR cuantitativa para detectar las plantas homocigotas para los transgenes (*npt2* y *AMV4*).

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

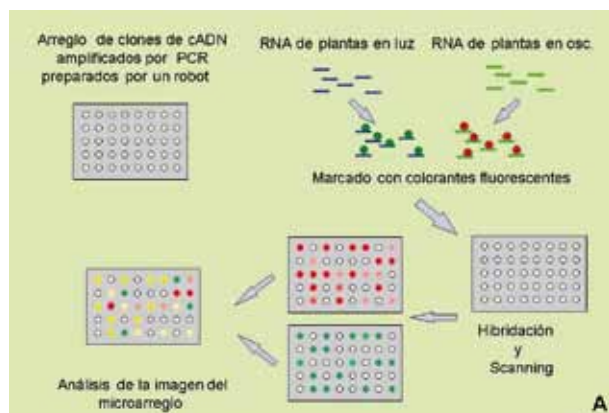


Figura 4. A) Perfiles de expresión a través de microarreglos de ADNc utilizando dos colorantes fluorescentes (Cy5 y Cy3) para marcar dos muestras de RNA total provenientes de distintas situaciones de crecimiento o desarrollo, por ejemplo plantas creciendo en luz (Cy3) y plantas creciendo en oscuridad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

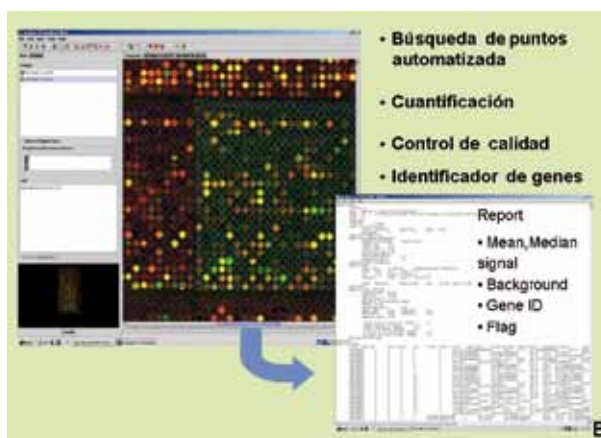


Figura 4. B) Análisis de la imagen de los microarreglos de etiquetas expresadas de ADN (ESTs) (Image-Gene Software).

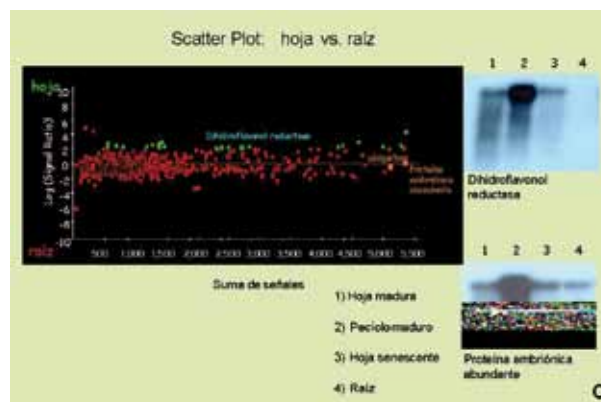


Figura 4. C) Microarreglos de ADNc de trébol blanco utilizando RNA de hojas y raíz. Confirmación por Northern de la expresión de los genes para la dihidroflavonol reductasa y una proteína embrionaria.

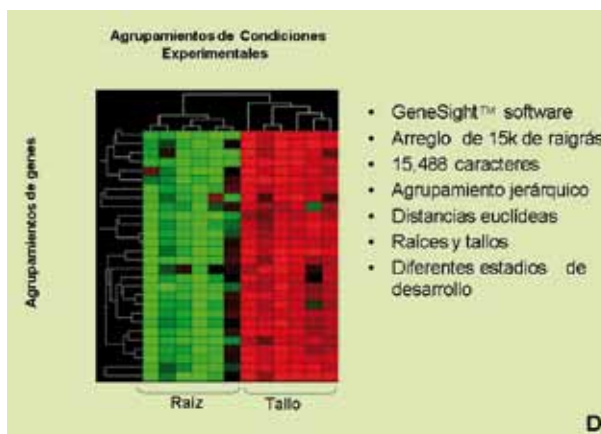


Figura 4. D) Perfiles de expresión de genes de raigrás, comparando genes que se expresan en tallo y raíz.

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.