



RESULTADOS EXPERIMENTALES DE LA RED NACIONAL DE BIOTECNOLOGÍA AGRÍCOLA

Una experiencia exitosa de articulación público-privada en investigación

Equipo de trabajo de la Red Nacional de Biotecnología Agrícola

Atendiendo el desafío de los programas de mejoramiento, de liberar nuevas y mejores variedades en menor tiempo, la RNBA integra técnicas biotecnológicas y logra resultados concretos para soja en tolerancia a sequía y mejora del comportamiento frente a enfermedades.

La Red Nacional de Biotecnología Agrícola (RNBA) surgió en febrero de 2016 para contribuir a incrementar la productividad y adaptabilidad del cultivo de soja mediante la adquisición de capacidades locales de investigación para la aplicación de herramientas biotecnológicas modernas. La RNBA ha sido un ejemplo de integración público-privado. Con la financiación de la Agencia Nacional de Investigación e Innovación (ANII) y mediante los mecanismos de Redes Tecnológicas Sectoriales, INIA y cinco empresas privadas (Barraca Jorge Walter Erro S.A.,

Cooperativa Agraria Nacional - COPAGRAN, Cooperativa Agraria Limitada de Mercedes - CALMER, FADISOL S.A. y LEBU S.R.L.) permitieron una genuina interacción de la UdelaR, IIBCE e INIA con el sector productivo.

Por UdelaR participan los grupos del Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía, el Laboratorio de Biología Molecular Vegetal y el Laboratorio de Fisiología Vegetal del Centro de Investigaciones Nucleares de Facultad de Ciencias; por el IIBCE, el Departamento



Figura 1 - Plataformas de investigación de la RNBA.

de Biología Molecular y por INIA, la Unidad de Biotecnología y el Programa de Cultivos de Secano.

Actualmente la RNBA es un proyecto consolidado basado en seis plataformas de investigación (fenotipado para estrés abiótico, edición génica, transformación genética, respuesta génica a enfermedades, genotipado y desarrollo de poblaciones) que, conjuntamente, contribuyen al mejoramiento genético de soja y a la generación de productos tecnológicos apropiables, como patentes.

El gran desafío para los programas de mejoramiento genético es incrementar la ganancia genética por unidad de tiempo, logrando liberar nuevas y mejores variedades en el menor tiempo posible. Algunas formas de contribuir al incremento de la ganancia genética tienen que ver con: el aumento del tamaño poblacional (lo cual permite incrementar la intensidad de selección); la reducción del número de años correspondientes a un ciclo de mejoramiento; el manejo de una mayor variabilidad genética dentro de las poblaciones y la obtención de estimaciones del valor genético con mayor exactitud y precisión, particularmente en caracteres difíciles de medir, como la tolerancia a sequía.

En el marco de la RNBA se han fortalecido las capacidades de investigación nacional en áreas que permiten actuar directamente sobre estos componentes. En este sentido se puede mencionar: el acortamiento del ciclo de mejoramiento mediante la incorporación de técnicas de avance generacional rápido, el aumento de la precisión de selección mediante la utilización de información molecular para la selección (genotipado) o el desarrollo de herramientas de evaluación de la respuesta a sequía o enfermedades (fenotipado) de las líneas de soja, y el aumento de la variabilidad genética mediante el desarrollo de técnicas de transformación genética y edición génica. Además de los aportes antes mencionados, la RNBA ha sido un instrumento para la capacitación de recursos humanos, la retención de jóvenes investigadores y para la publicación de artículos científicos en revistas arbitradas, que avalan la calidad científica de los resultados obtenidos.

LÍNEAS DE INVESTIGACIÓN

- Desarrollo de metodologías de fenotipado en condiciones controladas.
- Desarrollo de un sistema móvil de fenotipado para sequía en base a sensoramiento remoto.
- Identificación de genes asociados a tolerancia a sequía funcionalmente evaluados en soja y en plantas modelo.
- Desarrollo de líneas de soja cisgénicas expresando genes asociados con tolerancia a sequías.
- Desarrollo de una base de datos integrando información genotípica, fenotípica y ambiental mediante la instalación de una red de recolección de datos fenotípicos/agronómicos y la construcción de modelos de predicción de respuesta.
- Estudio del patógeno *Diaporthe caulivora* principal agente causal del cancro Uruguay.
- Transformación de soja con genes que confieren resistencia a hongos en otras plantas.
- Mejoramiento asistido por marcadores moleculares para aumentar la ganancia genética con foco con la tolerancia a sequía y resistencia a cancro.
- Respuesta a estrés térmico en soja.
- Desarrollo de la tecnología de edición génica en soja.

La RNBA ha fortalecido las capacidades de investigación nacional en áreas estratégicas y ha favorecido la capacitación y retención de recursos humanos.

NUEVAS CAPACIDADES EN INGENIERÍA GENÉTICA

Mediante la adquisición de equipamiento y la capacitación de investigadores uruguayos en centros de excelencia de Estados Unidos, se pusieron a punto protocolos de transformación genética de soja (Figura 2). De esta forma, se obtuvieron plantas transgénicas que sobreexpresan genes de soja asociados a la tolerancia a sequía. Estos genes, identificados previamente por el grupo del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal de Facultad de Ciencias y otros grupos colaboradores, fueron caracterizados y evaluados en soja a lo largo de este proyecto. La RNBA, junto a otras fuentes de financiación, permitieron el patentamiento de dichos genes en Argentina, Bolivia, Paraguay, Uruguay, Estados Unidos y el PCT (Patent Cooperation Treaty). La patente se denomina "Métodos para mejorar la tolerancia al estrés abiótico en plantas y el rendimiento de las mismas". Actualmente, el grupo se encuentra abocado a ajustar metodologías más eficientes de transformación. Recientemente, se ha podido poner a punto una metodología de transformación mediante la inyección de flores de soja.

Por otro lado, se adquirieron las capacidades para realizar edición génica (EG) en soja. La EG es una herramienta que permite realizar cambios en la secuencia de ADN de manera dirigida. Estos cambios pueden: 1) modificar la expresión de genes específicos mediante cambios puntuales en la secuencia; 2) reemplazar alelos (versiones del gen) e introducir alelos favorables o 3) introducir transgenes en sitios específicos del genoma. En los primeros dos casos, la EG no incorpora secuencias foráneas de ADN por lo que los productos desarrollados son indistinguibles de los generados por mejoramiento convencional. La primera etapa en el proceso de EG es seleccionar los genes objetivo a ser

Se adquirieron capacidades para realizar edición génica en soja, focalizada en cambios del genoma que incrementen la tolerancia a sequía o la calidad del grano.

modificados. En el caso de este proyecto, se ha dirigido la EG a cambios del genoma que incrementen la tolerancia a sequía o la calidad del grano (disminución de factores anti-nutricionales o mejora del perfil proteico).

AVANCES EN ESTUDIOS DE RESPUESTA A SEQUÍA

Durante el desarrollo de la RNBA se priorizó la instalación de la infraestructura necesaria para el desarrollo de protocolos de caracterización de respuesta al déficit hídrico en soja. Esto se llevó adelante, para generar la capacidad de identificar genotipos con respuesta contrastantes a este tipo de estrés ambiental y para suministrar marcadores funcionales asociados a regiones génicas con el fin de incorporar características deseables para la tolerancia al déficit hídrico en líneas de soja.

En este sentido el grupo de investigación fue capaz de desarrollar modelos de predicción de respuesta de cambios en el consumo de agua en situaciones de déficit hídrico. La aplicación de parámetros bioquímico-fisiológicos y el uso de modelos matemáticos permitieron la identificación de genotipos de soja con respuestas contrastantes. Un grupo de genotipos no tenía grandes cambios en los parámetros asociados al consumo de agua, lo que determinaba una menor percepción del riesgo de sequía.



Figura 2 - Método de transformación de soja.

Fotos: Equipo del Laboratorio de Biología Molecular Vegetal

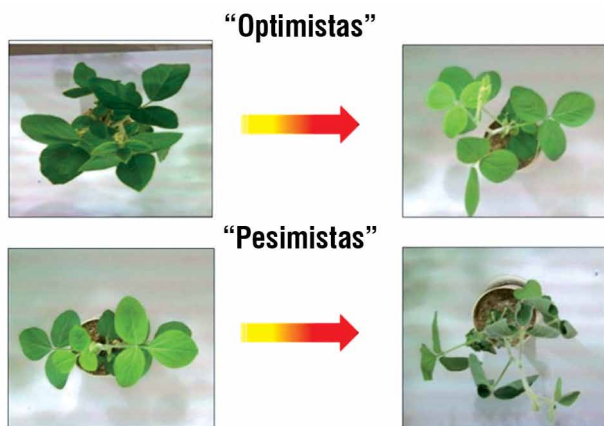


Figura 3 - Comportamiento en el consumo de agua en dos genotipos contrastantes (optimistas y pesimistas).

Fotos: Equipo del Laboratorio de Bioquímica de Facultad de Agronomía

Estos genotipos se denominaron consumidores rápidos u optimistas. Por otro lado, el grupo denominado consumidores lentos o pesimistas ajustaban rápidamente su consumo a la nueva situación de disponibilidad hídrica (Figura 3). El comportamiento optimista o pesimista puede ser predicho mediante modelos matemáticos. Estas características tienen una base genética y permitirá evaluar cuál puede ser el comportamiento de determinados genotipos frente a periodos de sequías leves, moderadas o severas.

Por otro lado, se desarrolló y está operativo, un fenotipador móvil que permitirá mediante tecnología de análisis espectral conocer en tiempo real y en forma masiva el comportamiento a campo de un gran número de genotipos de soja. Los datos generados por este sistema, conjuntamente con la información de las respues-



Foto: Andrés Berger

Figura 4 - Tractor adaptado con sensores espectrales relevando parámetros de comportamiento fisiológico en parcelas de soja a campo con o sin déficit hídrico.

tas fisiológicas obtenidas en condiciones ambientales controladas, permitirá una evaluación ajustada de las respuestas al déficit hídrico a campo de una población de individuos acorde a los manejados en los programas mejoramiento (Figura 4).

Estos desarrollos han permitido identificar líneas de soja con capacidad diferencial de respuesta a estrés por sequía. A partir de esa información se han planificado cruces específicas para maximizar la variabilidad genética de las poblaciones a los efectos de mejorar la tolerancia a sequía (Figura 5 – Tabla 1). Los avances mencionados muestran que a través de la RNBA se ha consolidado una estrategia de evaluación del impacto del estrés ambiental en soja, pero que podría ser extendido a otros cultivos y tipos de estrés.

ESTUDIOS DEL CANCRO DEL TALLO EN SOJA

La producción de soja está limitada por enfermedades, entre las que se encuentran varias causadas por especies de hongos del género *Diaporthe*. En el marco de la RNBA se aislaron diferentes especies de *Diaporthe* asociadas a lesiones de cancro del tallo de plantas de soja.



Foto: Sergio Ceretta

Poblaciones	PLSF4	PLS
	Sembradas	Cosechadas
SJ15-008	50	3
SJ15-010	120	21
SJ15-054	40	7
SJ16-062	21	7
SJ16-064	15	2
SJ16-077	30	10
Total	276	50

Figura 5 y Tabla 1 - Desarrollo de poblaciones para tolerancia a estrés hídrico.

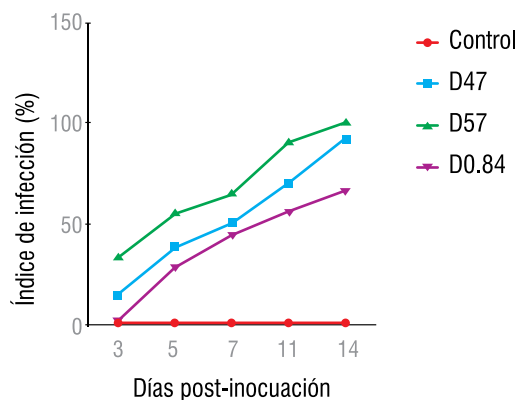
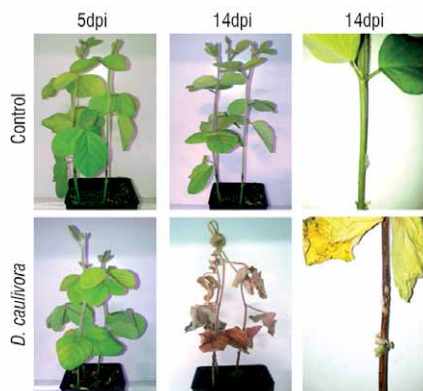


Figura 6 - Evaluación de la infección de *Diaporthe caulivora* en soja. *a* - Índice de infección en tallos de plantas de soja inoculadas con tres cepas distintas de *Diaporthe caulivora* (D47, D57 y D08.4) y plantas control a diferentes días post-inoculación. *b* - Plantas de soja (variedad Williams) control e inoculadas con *Diaporthe caulivora* D57 mostrando síntomas de la enfermedad del cancro del tallo a los 5 y 14 días post-inoculación.

Fotos: Departamento de Biología Molecular del IIBCE.

Mediante marcadores moleculares se determinó que la especie causal del cancro del tallo en Uruguay es predominantemente *Diaporthe caulivora*, seguida por *Diaporthe longicolla*.

Dada la importancia de *D. caulivora* en Uruguay y la región, se caracterizaron en mayor profundidad los aislamientos de *D. caulivora* y se identificaron tres aislamientos con diferente nivel de agresividad en la variedad susceptible Williams (PI 548631) (Figura 6a). Utilizando el aislamiento más virulento, se observaron las lesiones de cancro en tallo (Figura 6b) y se realizó el seguimiento de la infección mediante microscopía confocal, demostrando que *D. caulivora* coloniza rápidamente el tallo, alcanzando los haces vasculares a las 72 horas post inoculación.

Las plantas de soja infectadas activan mecanismos de defensa descritos en una reciente publicación del grupo de trabajo. Estos resultados son la primera aproximación para identificar componentes claves en la respuesta de defensa de plantas de soja que permitan diseñar estrategias para aumentar la resistencia a importantes patógenos del cultivo. Por otro lado, se estudió una familia de genes asociados a la percepción de los patógenos como alternativa para generar plantas resistentes a patógenos.

MEJORAMIENTO GENÉTICO MOLECULAR Y AVANCE GENERACIONAL RÁPIDO

Estudios bioestadísticos de poblaciones del programa de mejoramiento que asocian información molecular (marcadores) con datos fenotípicos (grupo de madurez, respuesta a sequía, estabilidad de rendimiento y contenido de proteínas) permitieron identificar regiones genómicas asociadas a esos caracteres.

Esta información es utilizada para introducir más rápidamente las versiones genómicas favorables dentro de las líneas de mejoramiento y para identificar genes candidatos a tener un efecto sobre el carácter medido.

Actualmente se están haciendo estos estudios para identificar genes de resistencia a cancro del tallo. Además de los marcadores identificados por las técnicas mencionadas, se están validando marcadores asociados a otros caracteres (hábito de crecimiento, resistencia a herbicidas y de azúcares del grano) para su uso rutinario en el programa de mejoramiento genético. Por otro lado, recientemente se puso a punto una metodología en condiciones de cámara de crecimiento e invernáculo, que permite realizar cinco ciclos por año (desde siembra a cosecha). Esta metodología, conocida como avance generacional rápido, permite avanzar las plantas seleccionadas por cruzamientos a etapas donde los caracteres seleccionados están fijados genéticamente en las líneas.

CONCLUSIÓN

Los resultados presentados muestran que la RNBA ha generado avances significativos en soja en cuanto al mejoramiento genético mediante el desarrollo de tolerancia a sequía y la mejora del comportamiento frente a enfermedades. No obstante, se espera continuar trabajando para poder generar impactos de largo plazo, acelerando el progreso genético en soja mediante la aplicación rutinaria de técnicas biotecnológicas al mejoramiento.

EQUIPO DE TRABAJO DE LA RNBA (Por orden alfabético)

Facultad de Agronomía (UdelaR): Esteban Casaretto, Gastón Quero, Omar Borsani. **Facultad de Ciencias:** Alexandra Castro, Alfonso Álvarez, Cecilia Ruibal, Joel González, Juan Pablo Gallino, Leonardo Delgado, Luciana Fleitas, Marcos Montesano, Sabina Vidal. **IIBCE:** Eilyn Mena, Ines Ponce de León. **INIA:** Alicia Castillo, Andres Berger, Carolina Balestra, Edgardo Rey, Monika Kavanova, Sergio Ceretta, Silvia Garaycochea, Victoria Bonnacarrere, Wanda Iriarte. **Barraca Jorge Walter Erro S.A.:** Germán Bremermann. **Cooperativa Agraria Limitada de Mercedes – CALMER:** Roberto Verdera. **Cooperativa Agraria Nacional – COPAGRAN:** Gustavo Flores. **FADISOL S.A.:** Jorge Foderé. **LEBU S.R.L:** Pablo Uteda.