



HERRAMIENTAS BIOTECNOLÓGICAS PARA EL MEJORAMIENTO GENÉTICO DE CULTIVOS

Patricio Esteves¹, Magdalena Mastropiero¹, Alicia Castillo¹,
Leonardo Hernández², Marcelo Rodríguez², Wilmar De León²,
Fernando Pereira², Martín Quincke²

¹INIA Las Brujas
²INIA La Estanzuela

INTRODUCCIÓN

El mejoramiento genético convencional de arroz, trigo y cebada

La creación de nuevas variedades comerciales de cultivos es una actividad de largo plazo, pueden transcurrir al menos 10 o 12 años desde que se inicia un programa de cruzamientos hasta que se libera al mercado el nuevo cultivar agrónomicamente superior a las anteriores variedades elegidas como testigos. Los objetivos de mejoramiento refieren simultáneamente a varios caracteres, por ejemplo, al rendimiento, la calidad nutricional del grano, la resistencia a determinadas enfermedades y otras características particulares que definen a cada variedad comercial.

Típicamente, un programa de mejoramiento de arroz, trigo y cebada consta de tres etapas básicas: a) se realizan cruzamientos iniciales ("F1") entre variedades elegidas como padres, porque poseen diferentes características agronómicas deseables y complementarias, b) se dejan desarrollar varias autofecundaciones sucesivas (al menos 6 u 8) de las plantas F1 para que los descendientes recombinen la información genética heredada de sus padres y que homogenicen y establezcan sus genotipos y c) se evalúan y seleccionan las líneas estabilizadas (genotipos altamente homocigotas) que presentan valor agronómico superior. El proceso se resume en la Figura 1.

En el contexto de un programa clásico, la etapa de autofecundaciones sucesivas es la que consume más

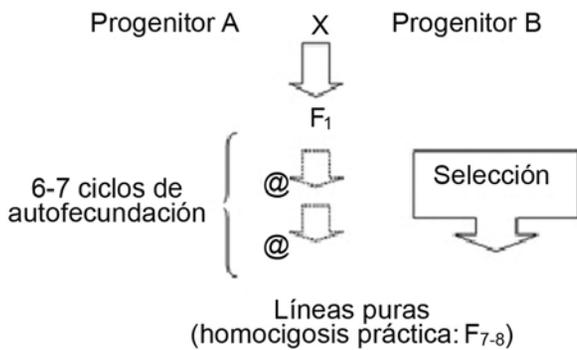


Figura 1 - Esquema de un programa convencional de mejoramiento de trigo, compuesto típicamente por 3 etapas: cruzamientos, autofecundación, y selección (Polci *et al.*, 2014).

tiempo; además, es imprescindible ya que sólo las líneas genéticamente estabilizadas (altamente homocigotas) serán predecibles en sus características agronómicas para la producción comercial (calidad de grano, resistencia a enfermedades, potencial de rendimiento, etc.). A tal punto este aspecto es crítico, que el Instituto Nacional de Semillas (INASE) exige, por ejemplo, un grado de “pureza genética” del 98% para inscribir un nuevo cultivar de trigo.

La etapa de autofecundaciones sucesivas para estabilizar los genotipos recombinantes puede ocupar 6 o más años de trabajos a campo hasta obtener líneas que presenten un grado de homocigosis suficiente para llevarlas a ensayos de caracterización y selección. En las generaciones previas, la selección de genotipos superiores para caracteres tales como rendimiento, o calidad de grano, y otros de naturaleza cuantitativa no es eficaz. Las características fenotípicas de las plantas recombinantes con más de 95 % de homocigosis ya se consideran lo suficientemente estables como para que la expresión de sus genotipos (los fenotipos) sean reproducibles en las futuras generaciones, y es a partir de este punto que pueden comenzarse los ensayos de caracterización y selección.

Nuevos métodos para reducir la duración de los Programas de mejoramiento

Desde hace pocos meses, en INIA se han creado y comenzaron a aplicarse nuevos métodos del área de la biotecnología para apoyar los Programas de Mejora Vegetal de Cultivos. Se trata de diferentes procedimientos que abarcan dos áreas de trabajo, aunque confluyen a un mismo objetivo, que es el de aumentar la eficiencia en el desarrollo de nuevas variedades de cultivo de cereales, por acortar los plazos y reducir los costos implicados en los programas.

El primer método combina tres técnicas: 1) el Avance Rápido de Generaciones (ARG), 2) el Cultivo de Embriones (CE) y 3) la Descendencia de Semilla Única (DSU), y se denomina “ARG+CE+DSU”. El segundo método es la producción de Plantas Haploides-duplicados (HD) tanto por Cultivo de anteras (CA) como por Cultivo de Microsporas aisladas (CMA) (Figura 2).

Ambos métodos son de gran utilidad para desarrollar Líneas Recombinantes con alto grado de homocigosis. Por ejemplo: en sólo un año, a partir de cada una de las cruza F1 iniciales, el método ARG+CE+DSU brinda al menos 30 granos de cada una de 100 familias F6, lo cual permite comenzar con esos materiales los ensayos de caracterización y de evaluación a campo. Por su parte, el método de producción de HD brinda en un plazo menor a un año poblaciones de tamaño n= 30, 80 o 300 individuos que son 100 % homocigotas, que genéticamente son productos directos de la recombinación de los genes de sus padres, y que están prontos para ser evaluados en ensayos a campo.

FUNDAMENTOS BIOLÓGICOS DE LOS NUEVOS MÉTODOS

Método ARG+CE+DSU

El Avance Rápido de Generaciones, ARG, es una técnica que consiste en controlar los factores externos que influyen en el crecimiento de las plantas, como son la temperatura, la calidad e intensidad de la luz, el fotoperiodo, la nutrición y el riego con el objetivo de acortar el ciclo desde siembra a floración. Tiene un antecedente claro en el trabajo de “Speed Breeding” del Dr. Lee Hickey (Quensland University, Australia), quien con plantas de trigo cultivadas en invernáculo bajo 24 horas de luz/día,

MÉTODOS EN APLICACIÓN PARA ASISTIR EL MEJORAMIENTO CONVENCIONAL	
<p>1-Combinación de 3 técnicas:</p> <p>Avance rápido de generaciones + Cultivo de embriones Descendencia de semilla única</p>	<p>2-Produccion de dobles-haploides por:</p> <p>Cultivo de anteras + Cultivo de microsporas aisladas</p>
<p>Producto: líneas F6 (homocigosis >90%) derivadas de F1 en 1 año</p>	<p>Producto: líneas 100 % homocigotas en aproximadamente 10 meses</p>

Figura 2 - Síntesis de los métodos en aplicación en INIA para aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento de arroz, trigo y cebada.



Figura 3: Cultivo de plantas en Avance Rápido de Generaciones (ARG) en INIA. Individuos que crecen con poco sustrato y alta temperatura consiguiendo acortar el ciclo a 35-40 días hasta extraer los embriones para el cultivo *in vitro* (CE).

alta temperatura y estrés hídrico, logra acortar el lapso entre siembra y cosecha de granos a unos 60 días, en lugar de los aproximadamente 130-160 días que requiere el cultivo a campo en su estación normal. De esta forma se desarrollan hasta 6 generaciones/año, y entre ellas se aplican sucesivos ciclos de selección por resistencia a enfermedades y, además, selección asistida por marcadores moleculares (Christopher *et al.*, 2015). Luego, a la técnica reportada por el Dr. Hickey, para acortar aún más el lapso inter-generacional se agregó la técnica de Cultivo de Embriones (CE) publicada por Zheng *et al.* (2014).

Con ella en post-floración se extraen los embriones inmaduros de las espigas, se siembran en un medio de cultivo artificial -en condiciones de esterilidad- para que germinen, y en tan sólo 7-10 días desde que se extrajeron ya se desarrollaron en plántulas que pueden reintegrarse al ciclo de ARG. Zheng *et al.* consideraron que combinando el ARG y el CE teóricamente es posible avanzar 7 o más generaciones de trigo y 8 o más de cebada en tan sólo 1 año.

En Uruguay, desde hace algunos meses se están utilizando estas metodologías en el programa de mejoramiento de trigo de INIA: se cultivan las plantas en almacigueras, con escaso sustrato para cada una, y son expuestas a alta temperatura (26°C) e iluminación de calidad e intensidad adecuadas (Figura 3). En estas condiciones se logra que transcurran sólo 35-40 días desde siembra a floración y formación de embriones en los granos.

A continuación, en el estadio lechoso-pastoso del endosperma de los granos, se practica el CE, disponiendo los embriones en placas de Petri con medio de cultivo adecuado, almacenándolas en un ambiente de luz y temperatura controladas (Figura 4).

En total, con el ARG y el CE es posible avanzar al menos 5 y 6 generaciones/año en trigo (desde la F1 a la F6), librando la cosecha de la última generación a tiempo para llevar los materiales a ensayos de evaluación a campo.

Además de hacer el CE, otra modificación que se introdujo al método del Speed Breeding, es que de las poblaciones F2 conformadas por $n=96$ plantas cada una, de cada planta se cosecha solamente 1 grano para avanzar a la generación siguiente.

Esta es una antigua técnica llamada "SSD" por sus siglas en inglés para "Single Seed Descent", que se traduce como Descendencia de Semilla Única -DSU- en español.



Figura 4 - (Arriba): Esquema anatómico del grano de trigo (Fuente: <http://www.eufic.org/article/es/expid/Hoja-informativa-grano-integral/>). En fin del estado lechoso-pastoso del grano se extrae el germen (los embriones) y -en esterilidad- se llevan a medio de cultivo para que germinen. En el curso de 5-7 días ya pueden devolverse al cultivo en sustrato (Abajo).

Métodos de producción de haploides-duplicados (HD)

Los métodos de producción de HD aprovechan una característica particular de los vegetales que se denomina “totipotencialidad” (Haberlandt, 1906), por la cual a partir de una única célula es posible reconstruir una planta completa controlando los factores de crecimiento.

La evolución de técnicas de biotecnología permite hoy que, por cultivo *in vitro* de granos de polen inmaduros (= microsporas), se formen directamente embriones reprogramando su ruta de desarrollo y sin intervención de proceso sexual alguno. El proceso se denomina “embriogénesis gamética” (Germaná, 2011) (Figura 5), el que con diferentes medidas de éxito es posible inducirlo en todas las especies cultivadas de cereales.

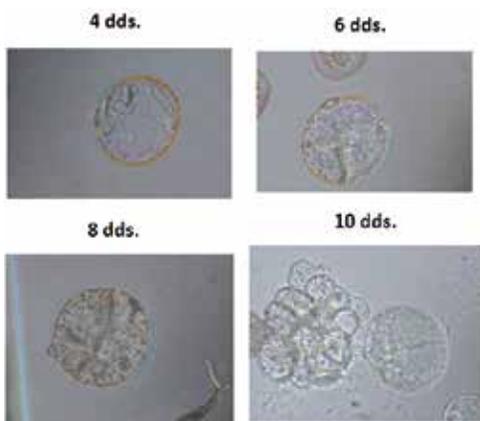


Figura 5 - Comienzo de la regeneración de embriones a partir de microsporas aisladas en cultivo. Dds: días desde la siembra. A los 10 días ya se aprecian estructuras multicelulares, y a los 15-18 días ya pueden recogerse embriones y transferirlos a un medio de germinación.

El proceso completo de producción de HD, tanto por Cultivo de Anteras (CA) o por Cultivo de Microsporas Aisladas (CMA) se hace típicamente a partir de plantas madre F1, y se representa en la Figura 6.

De este modo, en una población de plantas HD el conjunto va a representar varias de las infinitas maneras de recombinar las múltiples características de los padres, mientras que cada individuo va a ser un genotipo único y estabilizado. Es por esta razón que los HD son denominados “líneas instantáneas”, ya que cada una de esas plantas es potencialmente una nueva variedad comercial, según los resultados de los ensayos de evaluación y caracterización a los que se someterá una vez que se haya multiplicado semilla de cada individuo HD. Comparación entre ambos métodos de apoyo al mejoramiento.



Figura 6 - Etapas de un protocolo de cultivo de microsporas aisladas. Las espigas se cosechan en el estadio correcto y se someten a estrés –para condicionar las células a formar embriones–. Luego se realiza sucesivamente un licuado de espigas, filtrado y repetidos lavados de las células, antes de seleccionarlas en una centrifugación en gradiente de densidad. Así se aísla una banda de microsporas embriogénicas y viables, que en aproximadamente 20 días formarán embriones, y luego plantas.

El método de ARG+CE+DSU se está empleando exitosamente en el programa de mejoramiento de trigo de INIA desde mediados de 2016, y más recientemente en el de cebada. En el lapso de 6 meses se avanzó entre 3 y 4 generaciones en cada una de las numerosas cruza F1 iniciales, y se prevé llegar con las generaciones F6 al momento propicio para hacer los ensayos a campo en 2017. Este método requiere recursos de laboratorio de cultivo *in vitro* de baja complejidad y el protocolo es relativamente fácil de aplicar para el operador. En estos dos últimos aspectos la diferencia es radical al compararlo con la producción de dobles-haploides, que requiere de operadores muy bien entrenados, insumos costosos y, particularmente para el cultivo de microsporas aisladas, equipamiento y útiles de mayor complejidad.

Además, las técnicas de producción de HD suelen presentar una alta influencia del genotipo sobre la tasa de regeneración y la frecuencia del albinismo (plantas carentes de clorofila que aparecen en alta proporción y son inútiles para cualquier uso práctico), mientras que estos dos problemas son inexistentes en el método ARG+CE+DSU.

CONSIDERACIONES FINALES

En cualquier programa de mejoramiento los recursos son siempre limitados, y el jefe del programa está continuamente confrontado a decidir cómo asignarlos para lograr la mayor eficiencia en la creación de variedades superiores. La planificación de qué cantidad de cruza iniciales se realizará, el número de progenies que se destinarán a formar líneas recombinantes, y cuántas y cuáles líneas avanzadas se llevarán a ensayos de evaluación son decisiones que cada año se deben tomar

para hallar recombinaciones beneficiosas pero poco probables entre las líneas avanzadas idealmente se debería emplear un número “ilimitado” tanto de cruces F1 como de progenies recombinantes. En este contexto, la inclusión de la técnica DSU, así como también el hecho de limitar a $n = 100$ las progenies que participarán en el método de ARG+CE puede considerarse una limitante, o incluso inconveniente para algunas situaciones particulares de programas de mejoramiento.

Por su parte, una alta eficiencia de producción de HD es muy dependiente de recursos tecnológicos y del genotipo utilizado, de equipamientos de laboratorio que son costosos y no fácilmente accesibles en el mercado de Uruguay. Este es el caso de las cámaras de cultivo de las plantas madre de microsporas, que permiten controlar eficazmente la iluminación y temperatura y además permiten reducir la contaminación con hongos y bacterias, que son muy frecuentes cuando se emplean plantas crecidas a campo, y que causan pérdidas a veces muy importantes de los materiales en cultivo *in vitro*.

A diferencia de los métodos de producción de HD, el método ARG+CE+DSU es independiente del genotipo, por lo que se puede aplicar con éxito en cualquier material que se considere de interés, lo que es una gran ventaja frente a las otras técnicas de producción de variedades comerciales en cereales

IMPLEMENTACION DE LOS NUEVOS MÉTODOS EN LOS PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO DE INIA

El método ARG+CE+DSU es la combinación de tres técnicas bien conocidas, y constituye en total un desarrollo científico original logrado por el trabajo de un grupo interdisciplinario de varios colaboradores de INIA Las Brujas e INIA La Estanzuela. Los primeros resultados exitosos de estos trabajos se presentaron en el VIII Congreso Nacional de Trigo (Pergamino, Argentina, septiembre de 2016), donde se distinguieron con la “Mención de Honor”. En lo referente a formación de recursos humanos, se han incorporado tres tesis que buscan aplicarlo en proyectos de investigación en trigo, en cebada y en soja. Simultáneamente, se han obtenido consultas tanto de parte de empresas privadas de Argentina como de investigadores de UdelaR para implementarlo en sus programas de mejoramiento. También cabe mencionar que empresas y universidades del extranjero ya han manifestado su interés por adoptar esta metodología para asistir sus programas de mejora de cultivos (Québec, Canadá). Según estos indicios, puede considerarse que el impacto de este trabajo de investigación es significativo a nivel regional e incluso internacional.

AGRADECIMIENTOS

A las integrantes del sector de cultivo *in vitro* de tejidos vegetales de la Unidad de Biotecnología de INIA Las Brujas: Belén Bonilla, Daniela Dieppa, Maribel Teresa Ceppa, Laura Rogel, Valeria López y Yanel Cuello, por su constante y eficiente colaboración y consejos técnicos, brindados siempre con su mejor ánimo y disposición. Al Coordinador de la Unidad de Biotecnología Marco Dalla Rizza, y a los investigadores Silvia Germán, Silvina Stewart y Silvina Baraibar, por su apoyo permanente, sin el cual la realización de estos trabajos no habría sido posible.

BIBLIOGRAFÍA

- Christopher J, C Richard, K Chenuc, M Christopher, A Borrelle & L Hickey (2015) *Procedia Environmental Sciences* 29: 175-17
- Esteves P & F Belzile (2014) *Plant Cell Rep.* 33(6): 993-1001
- Germanà M.A. (2011) *Plant Cell Rep* 30: 839–857
- Haberlandt, G. (1902) *Sitz-Ber. Mat. Nat. Kl. Kais. Akad. Wiss. Wien* 111: 69–92.
- He J, X Zhao, A Laroche, Z-X Lu, H Liu & Z Li (2014) *Frontiers in Plant Science*. Review article. [Doi 10.3389/fpls.2014.00484](https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00484)
- Zheng Z, Wang HB, Chen GD, Yan GJ & CJ Liu (2013) *Euphytica* 191: 311-316.



Figura 7 - Algunos integrantes del grupo interdisciplinario de INIA que desarrollaron y trabajan sobre los nuevos métodos para asistir al mejoramiento de trigo, arroz, cebada y soja. (Izq. A derecha, atrás): Magdalena Mastropiero, Marcelo Rodríguez, Leonardo Hernández, Patricio Esteves, Wilmar De León y Fernando Pereira (al frente).