

APROXIMACIONES GENÓMICAS, FISIOLÓGICAS Y DE MEJORAMIENTO PARA INCREMENTAR LA TOLERANCIA A SEQUÍA EN SOJA

Berger, A.¹, Bonnacarrere, V.^{2,6*}, Borsani, O.³, Casaretto, E.³, Castillo, A.², Castro, A.⁴, Ceretta, S.¹, Fleitas, L.⁴, Gallino, J.P.⁴, Garaycochea, S.², Iriarte, W.², Kavanová, M.¹, Quero, G.³, Rey, E.¹, Ruibal, C.⁴, Simondi, S.⁵, Vidal, S.⁴.

Los investigadores vinculados al proyecto están nombrados en orden alfabético.

¹Programa de Cultivo de Secano, INIA. ²Unidad de Biotecnología, INIA. ³Departamento de Biología Vegetal, Facultad de Agronomía, UdelaR. ⁴Laboratorio de Biología Molecular Vegetal, Facultad de Ciencias, UdelaR. ⁵Departamento de Matemática, Facultad de Ciencias Naturales y Exactas, Universidad Nacional de Cuyo.

*⁶ Autor para correspondencia: Ruta 48, Km 10, Rincón del Colorado. vbonnacarrere@inia.org.uy

Palabras clave: sequía, genotipado, fenotipado, edición genómica, soja.

En el año 2016 se comenzó a ejecutar el proyecto que dio origen a la Red Nacional de Biotecnología Agrícola (RNBA) (www.rnba.com.uy). Este proyecto permitió consolidar el grupo interinstitucional e interdisciplinario que estaba investigando la tolerancia a sequía en soja mediante la ejecución de otros proyectos de investigación (Proyecto Innovagro FSA_1_2013_1_12924). El proyecto RNBA es financiado por la ANII (Agencia Nacional de Investigación e Innovación), el INIA, las empresas Erro S.A., FADISOL S.A., LEBU S.R.L. y las cooperativas CALMER y COPAGRAN. Este emprendimiento público-privado, tiene como propósito contribuir al incremento de la productividad y adaptabilidad de los cultivos. Inicialmente se trabajará con soja como cultivo objetivo, para lo cual se están implementando modernas herramientas de mejoramiento genético enfocadas a la mejora de la tolerancia a estrés abiótico y biótico. En este sentido, uno de los objetivos es el establecimiento de estrategias fisiológicas, genéticas y de mejoramiento que permitan mejorar la adaptabilidad de la soja a los fenómenos de déficit hídrico.

El estrés por sequía es uno de los factores ambientales más importantes que reducen el rendimiento de los cultivos. Esta reducción ocurre a pesar del incremento logrado a través de la incorporación de mejores prácticas agrícolas y del mejoramiento genético. La soja (*Glycine max* [L.] Merr) es especialmente susceptible al estrés hídrico por ser un cultivo de ciclo estival (Zipper et al. 2016). La sequía afecta la soja en etapas vegetativas y reproductivas, reduciendo el área foliar, incrementando el aborto de flores y chauchas y disminuyendo el tamaño de chauchas y semillas (Boyer, 1983). Estos efectos pueden llevar a reducir el rendimiento de la soja hasta en un 40 - 55 % (Specht et al. 1999, Specht et al. 2001).

Los programas de mejoramiento de soja están enfocados principalmente al incremento del rendimiento y al mantenimiento de la estabilidad de los mismos. Este último se refiere a la disminución de las variaciones interanuales que se dan principalmente por efecto de la sequía. La manera más directa de incorporar caracteres de resistencia a sequía es introducir variantes genéticas de soja ancestral adaptadas a crecimiento en condiciones limitantes o extremas (Valliyodan et al. 2016). Sin embargo, en programas de mejoramiento como el de INIA, esta estrategia no es posible en la medida que se produce una regresión en la adaptabilidad lo que

conllevaría a un mayor número de ciclos de selección necesarios. Es por esta razón que este grupo de investigación busca analizar desde el punto de vista fenotípico y genético las variaciones existentes en los genotipos ya adaptados a nuestras condiciones de crecimiento con el objetivo de encontrar o generar variantes mejor adaptadas a la sequía.

Con este fin se están utilizando tres estrategias: 1) el desarrollo de métodos de fenotipado de la respuesta a sequía, adaptado a nuestras condiciones y nuestras capacidades; 2) la búsqueda de regiones genómicas asociadas a la tolerancia a sequía como estrategia para el hallazgo de genes candidatos vinculados a la respuesta a sequía 3) introducción de variantes alélicas en genes candidatos mediante edición genómica.

Desarrollo de métodos de fenotipado para tolerancia a sequía en soja

Incluir la tolerancia a sequía como criterio de selección requiere del desarrollo de estrategias de fenotipado de alta capacidad, precisas y de bajo costo (Tuberosa, 2012). En la actualidad existen plataformas que cumplen con las primeras dos características pero los costos de su adquisición superan las capacidades nacionales. En el marco de este proyecto desarrollamos modelos matemáticos que nos permiten evaluar las diferencias genotípicas en cuanto al consumo de agua en condiciones controladas. Por otro lado, se generó un equipo de fenotipado a campo que mediante diferentes sistemas de medición (sensores, dataloggers, espectrómetros, GPS) permitirá determinar temperatura de la canopia, reflectancia, altura de la planta y condiciones meteorológicas locales. Con estas mediciones se podrá determinar: tasa de evapotranspiración instantánea, área foliar (biomasa), ángulo de las hojas, contenido de clorofila por unidad de área, conductividad estomática, índices espectrales (pasivos) vinculados al contenido relativo de agua y nivel de estrés hídrico. Además se adquirió un equipo de discriminación isotópica de oxígeno que nos posibilita conjuntamente con la cuantificación de la discriminación isotópica de carbono, determinar con precisión la eficiencia del uso del agua de los diferentes genotipos.

Los efectos del estrés por sequía se encuentran asociados al estrés causado por las altas temperaturas o estrés térmico. Por esta razón, en el marco de la RNBA también se está investigando la respuesta diferencial de genotipos al estrés generado por altas temperaturas.

Hasta el momento, se ha podido determinar que en los genotipos de mejoramiento nacionales existen dos tipos de respuesta a la sequía agrupando a los genotipos respecto a la cinética de diferentes parámetros fisiológicos, en particular la cinética del consumo de agua. Estos grupos están vinculados con los grupos contrastantes en cuanto a la velocidad de marchitamiento.

Identificación de regiones genómicas asociadas a tolerancia a sequía

En el marco de la RNBA se han desarrollado poblaciones para estudios de mapeo asociativo y poblaciones biparentales generadas por cruzamiento de parentales con fenotipos contrastantes en cuanto a su respuesta a la sequía. Estas poblaciones han sido genotipadas mediante técnicas que permiten la exploración del genoma completo (GBS y chips de SNP) y fenotipadas utilizando las metodologías ya mencionadas. Mediante complejos análisis de asociación se han podido determinar regiones genómicas y marcadores asociados a la sequía las que están siendo estudiadas para la identificación de genes candidatos. El uso de marcadores como herramienta de mejoramiento para introgresar regiones genómicas asociadas a caracteres complejos, no es viable en la medida de que cada uno por separado explica solamente una baja proporción de la varianza genética. Contrariamente, la identificación de genes candidatos en dichas regiones

utilizando anotación genómica *in silico*, es una valiosa herramienta fundamental para los estudios de modificación genética (transgénesis y edición genómica) también implementados en este proyecto.

Introducción de variantes alélicas mediante edición genómica.

La edición genómica permite la creación directa de alelos favorables de genes candidatos de forma guiada, a partir del conocimiento de la secuencia del gen a editar. Existen diversas herramientas de edición genómicas disponibles, pero en este proyecto se está utilizando el sistema CRISPR/CAS-9. Además, se está investigando la posibilidad de realizar edición genómica sin utilizar transgénesis. En este momento se está trabajando en la edición de genes asociados a la respuesta a sequía (previamente identificados por este grupo) y genes asociados a caracteres de calidad del grano (tamaño del grano y disminución de compuestos anti-nutricionales).

Referencias bibliográficas

Zipper, S.C., J. Qiu, and C.J. Kucharik. 2016. Drought effects on US maize and soybean production: spatiotemporal patterns and historical changes. *Environ. Res. Lett.* 11:094021.

Boyer JS. 1983. Environmental stress and crop yields. In: *Crop reactions to water and temperature stresses in humid, temperate climates*, Raper, CD Jr., Kramer PJ (eds.). Westview Press, Boulder, CO, 3-7.

Specht JE, Hume D, Kumudini S. 1999. Soybean yield potential—a genetic and physiological perspective. *Crop Science* 39(6): 1560-1570.

Specht JE, Chase K, Macrander M, Graef GL, Chung J, Markwell JP, Germann M, Orf JH, Lark KG. 2001. Soybean response to water: A QTL analysis of drought tolerance. *Crop Sci.* 41(2): 493-509.

Valliyodan B, Heng Y, Song L, Murphy M, Shannon JG, Nguyen HT. 2016. Genetic diversity and genomic strategies for improving drought and waterlogging tolerance in soybeans *Journal of Exp. Bot.* 68(8):1835–1849.

Tuberosa R. 2012. Phenotyping for drought tolerance of crops in the genomics era. *Front Physiol.* 3: 347.

Humlík JF, Lazár, D, Husičková, A, Spíchal, L. 2015. Automated phenotyping of plant shoots using imaging methods for analysis of plant stress responses – a review. *Plant Methods*, 11:29.