

Tecnologías modernas de fenotipado aplicadas al mejoramiento genético

› Esteban Mariano Pardo*, Carla Maria Lourdes Rocha*, Gabriela García*

Introducción

El mejoramiento genético es tanto una ciencia como un arte. Practicado de manera empírica desde hace miles de años, el arte reside en la habilidad de los mejoradores para observar las variantes fenotípicas en grandes poblaciones y seleccionar las más adecuadas. La ciencia del mejoramiento genético comenzó en el siglo XX luego de la formulación de las leyes de la herencia por Gregorio Mendel, que explicaron el mecanismo de segregación y recombinación genética. Así, a través de cruzamientos seleccionados, se han producido nuevos genotipos y se han seleccionado los mejores fenotipos, dando lugar a las variedades modernas con mejores rendimientos y caracteres de interés.

La combinación de la información fenotípica con la genética es fundamental para acelerar el desarrollo de nuevas variedades de cultivos adaptadas a los cambios ambientales (Figura 1). En las últimas décadas, tecnologías como el mapeo genético de ligamiento, el mapeo por asociación y la selección genómica han tenido un impacto significativo en la producción de nuevas variedades. La secuenciación de última generación y los estudios genómicos comparativos han permitido identificar genes y marcadores moleculares de interés agronómico, aumentando la diversidad de alelos disponibles a través de la exploración de bancos de germoplasma (Salekdeh *et al.*, 2009; Reynolds *et al.*, 2021). En soja se han identificado numerosos genes, QTLs y marcadores moleculares asociados con la resistencia y/o tolerancia a estrés biótico y abiótico. Además, la secuenciación del genoma de la soja (Schmutz *et al.*, 2010) ha facilitado el acceso a estos conocimientos y el desarrollo de nuevas variedades.

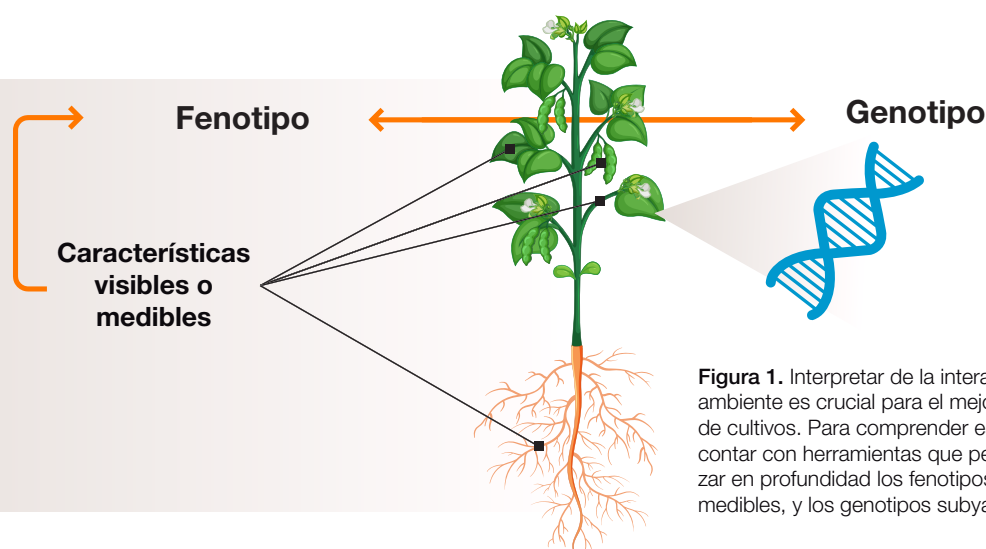


Figura 1. Interpretar de la interacción genotipo/ambiente es crucial para el mejoramiento genético de cultivos. Para comprender esto es necesario contar con herramientas que permitan caracterizar en profundidad los fenotipos observables o medibles, y los genotipos subyacentes.

*Sección Biotecnología, EEAOC. Instituto de Tecnología Agroindustrial del Noroeste Argentino (EEAOC-CONICET).

E-mail: marianopardo@eeaoc.org.ar

Aunque los avances en biología molecular y genómica han generado grandes expectativas para superar las limitaciones en mejoramiento genético, ya que las técnicas y herramientas son ahora más robustas y accesibles que nunca, se ha generado un cuello de botella en la comprensión de la interacción del genoma y el ambiente (Figura 2). Por ello, la caracterización fenotípica profunda y robusta (“fenómica”) es crucial para aprovechar los beneficios de los conocimientos biológicos avanzados para los ecosistemas y mejorar la producción agrícola.

La fenómica combina la genómica con la eco-fisiología y la agronomía. La caracterización de los cultivos no solo facilita la mejora convencional, sino que también es esencial para explotar plenamente las capacidades de la mejora molecular. Además, puede utilizarse para predecir los objetivos de mejora para los próximos años a nivel regional mediante modelos de simulación avanzados y sistemas de apoyo a la toma de decisio-

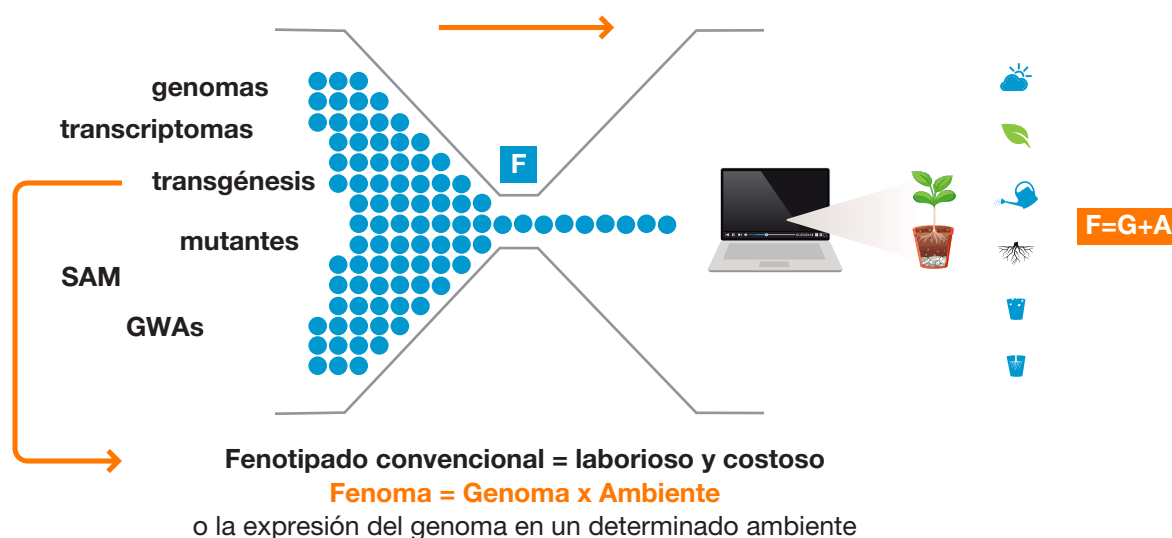


Figura 2. El aumento en las capacidades para evaluar y producir nuevos datos fenotípicos y genotípicos han llevado a la acuñación de nuevos términos que reflejan mejor esta realidad. Hoy debemos centrarnos en cómo se expresa un genoma en determinados ambientes, resultando en lo que se conoce como “fenoma” y, por lógica, su estudio es la “fenómica”.

Es crucial determinar qué rasgos de selección son relevantes en cada situación y qué herramientas o métodos de fenotipado están disponibles para evaluar dichos rasgos. Por ejemplo, las metodologías de teledetección son actualmente enfoques muy populares, aunque los análisis en el laboratorio bajo condiciones controladas siguen siendo pertinentes en muchas circunstancias, como en la interacción planta-patógeno o en la caracterización de la respuesta de las plantas a regímenes hídricos precisos y controlados. La evaluación de los fenotipos vegetales en el campo mediante técnicas convencionales puede ser laboriosa e ineficiente. Una alternativa moderna es la aplicación de sistemas de fenotipado de campo de alto rendimiento, como los sistemas robóticos, que permiten automatizar la recogida de datos y medir rasgos fenotípicos novedosos y detallados que antes eran inalcanzables para los humanos. Sin embargo, esta tecnología no está al alcance de todos debido a sus altos costos.

Otras alternativas para hacer más eficiente el proceso de fenotipado incluyen técnicas a escala de laboratorio, invernaderos y cámaras de cría, que pueden correlacionarse con los datos obtenidos a escala de campo.

Las técnicas de fenotipado a diversas escalas

En la última década, se ha investigado a fondo la cuestión de por qué y cómo medir toda la genómica, y ahora los avances tecnológicos nos permitirán responder a la pregunta de por qué y cómo medir los fenotipos de toda la planta en las próximas décadas. Múltiples genes interactúan con los múltiples entornos (GxE) y esto afecta al rendimiento. Las tecnologías de sensores permiten ahora el registro detallado de la historia ambiental de las plantas, así como la respuesta dinámica de las plantas o los cultivos. Dado que se ha logrado la secuenciación del genoma de muchos cultivos, el siguiente objetivo es describir los fenotipos completos y diseccionar los loci funcionales clave (genes o QTL) y comprender mejor las arquitecturas genéticas de los cultivos. Las plataformas de fenotipado de alto rendimiento desempeñarán un papel clave en la consecución de este objetivo.

Los fisiólogos llevan mucho tiempo utilizando instrumentos portátiles de mano especializados para medir una serie de funciones y desarrollando una serie de técnicas y metodologías que requieren mucha labor, conocimiento y además, en muchos casos, requieren disponer de la planta completa para extraer tejidos específicos para realizar mediciones. La mayoría de estos procesos son destructivos, costosos y muy limitados en cuanto a parámetros medibles (Figura 3). Por otro lado, las herramientas de fenotipado "de bolsillo" o portátiles proporcionaron una tecnología disruptiva que aceleraron los procesos fenotipado y aumentaron la cantidad de parámetros y muestras medidas. La mayoría de estos equipos son costosos y requieren un entrenamiento específico del investigador, además, no cubren los requerimientos de "gran escala", para ensayos donde se contemple la interacción global genoma/ambientes. Para investigar a gran escala en los cultivos más importantes se requieren plataformas más costosas, basadas en imágenes de alta calidad, como imágenes hiper-espectrales, termografías y otras. A lo que hay que agregar que los instrumentos de medición requieren instalaciones específicas (drones por ejemplo), análisis de datos complejos e informática avanzada.



Figura 3. Las metodologías de fenotipado a diferentes escalas requieren formación, instrumentalización y recursos económicos distintos. El objetivo de los investigadores está orientado a correlacionar las distintas escalas y acelerar y simplificar los procesos de tomas e interpretación de datos.

Debido a esto, la atención está puesta en desarrollar métodos de fenotipado que sean cada vez más económicos y seguros y permitan llevar adelante estrategias de selección mediante marcadores morfofisiológicos, bioquímicos y/o moleculares para desarrollar nuevas variedades mejor adaptadas al cambio climático. Sin embargo, el reto para utilizar eficazmente los métodos de selección reside en el desarrollo de marcadores fiables y reproducibles (Toum et al., 2022). Estos marcadores deberían, en principio (i) estar fuertemente relacionados con el rendimiento y los rasgos de tolerancia al estrés, siempre que sea posible, (ii) no ser destructivos, (iii) ser fácilmente medibles en las primeras etapas fenológicas, y (iv) tener una alta heredabilidad en sentido estricto para facilitar la selección en las poblaciones reproductoras. Por lo tanto, identificar y validar estos rasgos son pasos esenciales para obtener marcadores valiosos para los programas de mejora y seleccionar genotipos superiores.

Nuestra experiencia en la EEAOC

En la Sección Biotecnología hemos estado trabajando en la optimización de metodologías de fenotipado para identificar genotipos tolerantes y susceptibles a la sequía, teniendo en cuenta los principios expuestos. En una primera etapa, a través de la medición del rendimiento bajo condiciones controladas en invernadero, logramos optimizar una metodología para discriminar genotipos tolerantes de susceptibles

La figura 4 esquematiza el proceso complejo de varios años. Pudimos comparar los datos obtenidos en invernadero con los datos de varios años de mediciones en campo que ya había realizado el PMGS de la EEAOC. Se observó una correlación entre los mismos y se validaron los parámetros del experimento. Finalmente esto sirvió para optimizar una metodología automatizada, lo que permitió aumentar la cantidad de muestras y mejorar las mediciones, eliminando el error humano (Peirone *et al.*, 2018). Cabe destacar que la EEAOC es una de las instituciones propietarias de la patente del fenotiador automático (WO 2012/042084 A1).

Con todas estas mejoras, finalmente se desarrolló una metodología basada en marcadores morfo/fisiológicos y moleculares que permiten identificar genotipos tolerantes de manera rápida y económica en las primeras etapas fenológicas, sin necesidad de desarrollar el ciclo completo del cultivo en campo (Toum *et al.*, 2022). Esto podría utilizarse para identificar genes que pudieran estar asociados con la tolerancia y/o seleccionar genotipos promisorios durante las primeras etapas del proceso de mejora, lo que aceleraría la obtención de variedades con tolerancia a la sequía en el programa de mejoramiento genético, disminuyendo el costo ambiental y económico de los ensayos en campo.

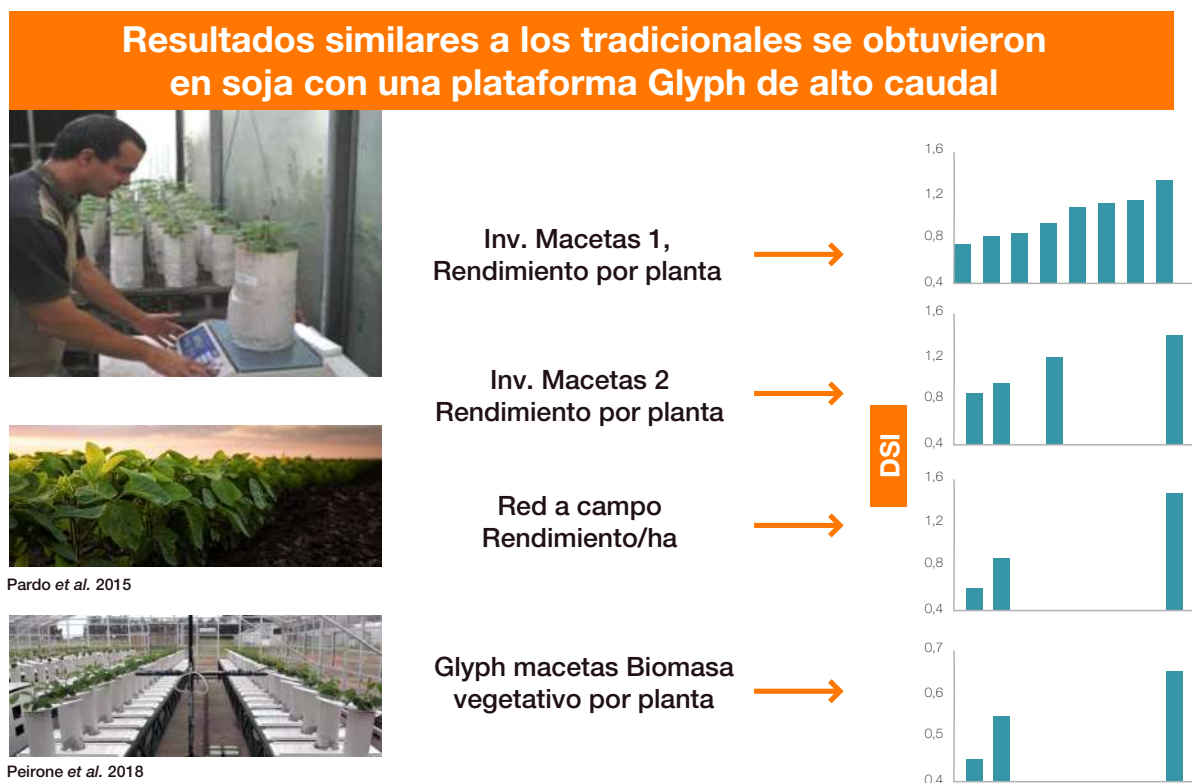


Figura 4. Resumen de los experimentos que condujeron a la determinación de parámetros óptimos para identificar genotipos tolerantes a la sequía bajo condiciones controladas.

¿Hacia dónde vamos?

En la actualidad nos encontramos abocados a la mejora continua de este sistema. Para ello se han obtenido fondos a través de los proyectos Equipar Ciencia y Redes Federales de Alto Impacto que nos permitieron adquirir equipamiento de última generación. Estamos instalando un fitotrón para cría de plantas y ensayos bajo condiciones totalmente controladas, adosado al laboratorio de biología molecular, con cámaras de cría que tendrán un sistema de luces que podrá brindar la cantidad y calidad de luz necesaria para el crecimiento óptimo de la soja. Esto permitirá realizar ensayos a contra-estación controlando el fotoperíodo y la temperatura. La segunda mejora, y la más costosa, es la instalación de dos fenotipadores automáticos a escala de laboratorio (marca Phenospex) que permitirán automatizar y aumentar considerablemente la toma de datos no destructivos, nos solo relacionados al rendimiento bajo condiciones de estrés hídrico, sino también evaluar todo tipo de estrés biótico en cualquiera de los cultivos de interés de la EEAOC (Figura 5).

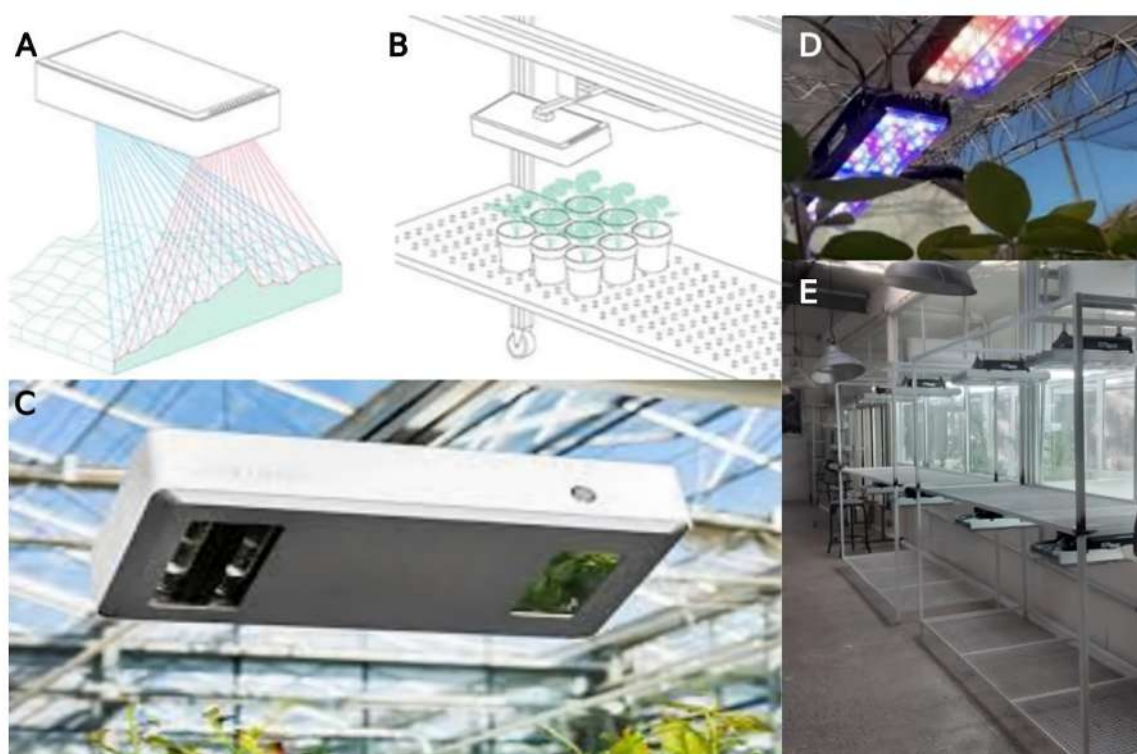


Figura 5. Detalles de las nuevas instalaciones en proceso. A y B: esquemas de la instalación del sensor PlantEye 600 (Traitfinder Phenospex) que permite lecturas multi-espectrales y morfológicas no destructivas. D y E: cámaras de cría con sistema de luces óptimas para la cría de soja bajo condiciones controladas y contra-estación.

En conclusión, la mejora continua nos permite seguir brindando servicios e investigaciones de calidad, acorde a los tiempos actuales, donde el cambio climático nos plantea la necesidad de responder rápidamente y desarrollar metodologías y sistemas sostenibles y amigables con el ambiente. Para disminuir los costos ambientales y económicos de producción e I+D+i es necesario aplicar tecnologías modernas e innovativas. Sólo de esta manera podremos estar a la altura de las necesidades de nuestra sociedad.

Bibliografía

Aguirrezabal, L. (2012). 'Plataforma automática de fenotipado'. Available at: <https://patents.google.com/patent/WO2012042084A1/es?q=WO2012042084A1>.

Pardo, E.M. et al. (2015). 'Drought tolerance screening under controlled conditions predicts ranking of water-limited yield of field-grown soybean genotypes', *Journal of Agronomy and Crop Science*, 201(2), pp. 95–104. Available at: <https://doi.org/10.1111/jac.12106>.

Peirone, L.S. et al. (2018) 'Assessing the Efficiency of Phenotyping Early Traits in a Greenhouse Automated Platform for Predicting Drought Tolerance of Soybean in the Field', *Frontiers in plant science*, 9(May), pp. 1–14. Available at: <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00587>.

Reynolds, M. et al. (2021) 'Addressing Research Bottlenecks to Crop Productivity', *Trends in Plant Science*, 26(6), pp. 607–630. Available at: <https://doi.org/10.1016/j.tplants.2021.03.011>.

Salekdeh, G. H. et al. (2009). 'Conceptual framework for drought phenotyping during molecular breeding', *Trends in plant science*, 14(9), pp. 488–496.

Schmutz, J. et al. (2010). 'Genome sequence of the palaeopolyploid soybean', *Nature*, 463(7278), pp. 178–183. Available at: <https://doi.org/10.1038/nature08670>.

Toum, L. et al. (2022). 'Selecting putative drought-tolerance markers in two contrasting soybeans', *Scientific Reports*, 12(1), p. 10872. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41598-022-14334-3>.