

Desarrollo de soja con tolerancia a grandes Estrés Bióticos

Por

J. Grover Shannon, Henry T. Nguyen, Robert E. Sharp and Jeong D. Lee
Division of Plant Sciences, University of Missouri-Columbia

Introducción:

En los Estados Unidos, Brasil y Argentina, donde se encuentra la mayor producción de soja, las malezas, las enfermedades y las plagas se controlan razonablemente bien. Sin embargo, las fluctuaciones de rendimiento de la soja siguen siendo importantes. Las diferencias de rendimiento de año a año en el mismo campo con frecuencia son causadas por estrés abiótico. (Shannon y Carter, 2003). El estrés abiótico en la soja se debe principalmente a la falta o abundancia de agua, a la deficiencia de nutrientes, toxicidad y también a bajas o altas temperaturas. En general estos factores son para el agricultor más perjudiciales que las enfermedades y los insectos. Se han identificado y desarrollado variedades de soja y líneas de plasma germinal que tienen mayor tolerancia a los estreses abióticos tales como la sequía, el calor, los suelos inundados y el exceso de sal. Ahora más que nunca hay optimismo para solucionar estos problemas por medio del cultivo y la biotecnología. Las variedades con tolerancia a estos estreses mejorarán notablemente la producción de las semillas de soja sometidas a estas condiciones extremas. El propósito de esta presentación es la de dar una breve información actualizada sobre las tendencias de los cultivos y de la biotecnología para mejorar la soja sometida a sequías, inundaciones o sal. Estos estreses abióticos son los más difundidos en todo el mundo.

Tolerancia a la sequía La irrigación disminuye el riesgo de sequía y asegura una producción de soja redituable. Sin embargo, la irrigación no es viable para la mayoría de los productores. Es por eso que se considera a la sequía como el principal factor perjudicial del rendimiento en la producción de soja redituable. Como la sequía siempre ha sido un problema grave e implacable, ¿dónde están todas las variedades resistentes a la sequía? ¿Existe verdaderamente la tolerancia a la sequía? A pesar de que se asignan enormes recursos al mejoramiento genético de la soja, los avances con respecto a la tolerancia a la sequía han sido escasos. Carter et al. (1999) ofrecen varios motivos para explicar porqué el progreso ha sido lento en cuanto al mejoramiento genético con respecto a la tolerancia a la sequía. Estos motivos incluyen: 1) el cultivo en medios de alto rendimiento se traduce en un mayor progreso con respecto a variedades mejoradas que el cultivo en medios de bajo rendimiento (es decir, secos). Los datos obtenidos de medios de bajo rendimiento son frecuentemente ignorados porque las diferencias en rendimiento entre líneas no separan adecuadamente las líneas de alto rendimiento de las líneas de bajo rendimiento. Es primordial identificar las líneas con el más alto rendimiento en el cultivo de soja y generalmente se realiza mediante pruebas que examinan dónde se encuentra la humedad óptima y dónde se pueden lograr los rendimientos más altos. 2) La mayoría de las variedades dadas a conocer en los primeros tiempos del cultivo de la soja se seleccionaron para que fueran resistentes a las enfermedades, a los golpes y a otros factores, pero no para que fueran resistentes al estrés abiótico como la sequía. Consecuentemente, se puso poco énfasis en la utilización de germoplasma en los programas de cultivo genético para la tolerancia a la sequía mientras se formaba la base genética. 3) El estudio de la tolerancia a la sequía es de alto riesgo y difícil ya que la sequía es impredecible en cuanto a cuándo y dónde ocurrirá. No se puede progresar demasiado en cuanto a la tolerancia a la sequía sin la capacidad de imponer estrés año tras año. Por lo tanto, un campo con poca capacidad de retención de agua, buena uniformidad del suelo y una probabilidad razonable de sequía todos los años es importante en la selección de genotipos para la tolerancia a la sequía.

Los métodos para el mejoramiento de la tolerancia a la sequía en la soja han implicado varios mecanismos. Estos incluyen prácticas de producción para evitar la sequía, marchitez lenta de la canopia, plasticidad de la raíz, fijación continua del nitrógeno bajo el estrés de la sequía y tolerancia a la deshidratación. Evitar la sequía ha involucrado la selección del vencimiento del grano de soja para que se ajuste a los sistemas de producción donde las plantas crecen y llenan las vainas cuando las lluvias de estación son más copiosas. Uno de estos sistemas es el sistema de producción temprana de la soja (ESPS) (Heatherly, 1999) en el que las variedades de maduración temprana en los grupos III y IV son sembradas tan pronto como sea posible (marzo o abril) en el valle del río Mississippi del sur de los EE.UU. Las plantas de estas variedades de madurez temprana crecen, florecen y producen vainas desde mayo hasta julio inclusive cuando el promedio de lluvia es mayor que el que se presenta en verano,

por lo tanto minimiza la sequía durante el período crítico de producción de la vaina. Este sistema ha revolucionado la producción de soja en el sureste de los EE.UU. ya que reemplazó la plantación de mayo de soja de grupo IV y la soja tardía que frecuentemente experimenta daños severos por la sequía durante los meses más secos de julio y agosto. ESPS ha sido adoptado ampliamente en el área sureña del río Mississipi en el cultivo de soja en tierras secas.

han sido identificados los PIs y las líneas de cultivo que se marchitan más lentamente y tienen raíces más prolíficas que las variedades existentes. PI 416937 fue la primera línea de marchitez lenta identificada y es la más estudiada entre las líneas con tolerancia a la sequía en los EE.UU. para identificar mecanismos de tolerancia. Se han brindado explicaciones probables con respecto a la razón por la cual esta línea marchita más lentamente que otras variedades de soja durante la sequía. Estas incluyen raíces altamente ramificadas en el perfil superior del suelo (Hudak and Patterson, 1996) y raíces más profundas (Pantalone, et al., 1996) que las líneas sensibles a la sequía; tolerancia al suelo rico en aluminio (Carter and Rufty, 1993); tolerancia a la sal (Aba-alla et al., 1998) y resistencia al nemátodo del quiste de la soja y otras enfermedades (Barber and Koenning, 1995). Aunque el PI eche raíces más profundas, el uso eficiente del agua no resultó ser mejor que el de las líneas sensibles a la sequía (Purcell et al., 1997). Las líneas de alto rendimiento han sido desarrolladas a partir de PI 416937M PI 471938, N947784 y NTCPR94-5157 que se encontraban entre las mejores fuentes identificadas como resistentes a la sequía. Han sido utilizadas en mejoramiento genético para tolerancia a la sequía en varios programas de los EE.UU. (Shannon and Carter, 2003). G00-3209 un grupo de madurez VII desarrollado en la Universidad de Georgia con 25% de linaje del PI416937, es lento para marchitarse y ha demostrado tener rendimientos excepcionales en pruebas de soja regionales en el sur de los EE.UU. (Gillen and Shelton, 2007). BR-4, Ocepar 4 y BSR 183 son variedades brasileñas que han sido calificadas como tolerantes a la sequía (Neumaier and Farias, 1995; Oya et al., 2004). El linaje de las variedades brasileñas se remonta a líneas de rendimiento de EE.UU sin tolerancia a la sequía. Por lo tanto, el control genético de la respuesta a la sequía no es claro ya que las líneas tolerantes a la sequía pueden derivarse de parentales sensibles a la sequía. En Missouri evaluamos 250 sojas PIs que se originaron en las regiones húmedas y secas de China, Corea y Japón para gradación de marchitez y rendimiento bajo condiciones de sequía. Comparado con parcelas no sometidas a estrés, algunos PIs con marchitez baja no se encontraban necesariamente entre las líneas de rendimiento más alto en condiciones de sequía. Algunas variedades que demostraron tener marchitez alta tuvieron un rendimiento tan bueno como el de las variedades con una marchitez menos pronunciada (datos no publicados). Por consiguiente, la soja tolerante a la sequía es más compleja que la capacidad de las plantas a mantener la turgencia de la hoja en momentos de déficit de humedad. Se están llevando a cabo estudios en la universidad de Missouri en el laboratorio del Dr. Robert E. Sharp para examinar variedades de soja por su capacidad de enraizamiento y para determinar si el crecimiento de la raíz está correlacionado con el rendimiento bajo sequía. Se llevaron a cabo estudios de la plasticidad de la raíz en los que se evaluaron plantas de soja bajo déficits suaves de agua y se utilizó un sistema de tubería profunda. Las variedades cultivadas y la introducción de plantas mostró diferencias de entre un 38% y un 52% (datos no publicados) en el número de raíces laterales y su extensión, respectivamente bajo sequía.

Los datos confirman que el crecimiento de cultivos y el rendimiento con déficit de agua son limitados ya que en condiciones de sequía se reduce la fijación del nitrógeno. La fijación del nitrógeno en la línea tolerante a la sequía Jackson se vio menos afectada por los déficits de agua en comparación con la variedad Biloxi. Jackson evita la alta concentración de urea y aminoácidos en las hojas y nódulos que provocan esa reducida fijación del nitrógeno en las etapas iniciales de la sequía (King and Purcell, 2005). El flujo de carbono reducido para la bacteria de fijación de nitrógeno como así también las concentraciones de urea en los nódulos fue más afectado y más rápido en la variedad Biloxi que en la de Jackson (Larera et al., 2007).

Se desarrollaron dos genotipos en la universidad de Arkansas del Jackson x KS4895 que tuvieron un rendimiento significativamente más alto que el de las variedades normales cultivadas en medios limitados en agua (Sinclair et al., 2007). La fijación del nitrógeno en estos dos genotipos persistió en bajos contenidos hídricos del suelo. Estas líneas, R01-416F y R01-581F tuvieron un rendimiento de 17 y 11% más alto respectivamente que las variedades comerciales en medios de bajo rendimiento. Es por eso que pueden ser beneficiosos en el desarrollo de las variedades cultivadas para alcanzar una productividad mejorada en medios con rendimiento limitado. Otros genotipos de soja, además de la Jackson, en los grupos de

soja de madurez V-VI han sido identificados con tolerancia de fijación de nitrógeno al déficit hídrico (Sinclair et al., 2000). La manipulación genética para transferir genes de tolerancia al estrés de otras especies promete mejorar la tolerancia a la deshidratación de la soja. La transferencia de los factores de transcripción AtDREB1D desde *Arabidopsis thaliana* ha mejorado enormemente la tolerancia a la sequía en el trigo y la tolerancia al frío en el arroz, pero ha tenido efectos perjudiciales tales como el enanismo. En 2007 Guttikonda, Valliyodan y Nguyen en el National Center of Soybean Biotechnology University of Missouri transfirieron el gen *ABRC3:CBF4* a la soja. Las plantas de soja transformadas con este gen muestran características de crecimiento normal y resultaron ser muy tolerantes a la deshidratación en comparación con el control después de 25 días de sequía. Los genes DREB también se expresan naturalmente en la soja. Carter et al. (2006) comparó la expresión de *Glycine DREB1* en el gen tolerante a la sequía PI407155 (*G. soja*) y el gen tolerante a la sequía Essex (*G. max*) después de retener agua por un lapso de 15 días. El *GlyDREB1* se expresó a un nivel más alto y las raíces presentaron un nivel más alto de humedad y biomasa en PI 407155 que en Essex. Por lo tanto, la soja silvestre con genes con una mayor tolerancia a la deshidratación ofrece un potencial para la producción de soja con tolerancia mejorada a la deshidratación.

Tolerancia al exceso de agua

Las inundaciones causadas por el exceso de agua en el suelo es el segundo daño más perjudicial en el crecimiento del cultivo, después de la sequía, y afecta cerca del 16% de las áreas de producción mundiales (Boyer, 1982). El suelo puede inundarse si tiene un drenaje deficiente o cuando las precipitaciones o el riego son excesivos. La carencia de oxígeno ha sido considerada el principal problema asociado con el exceso de agua (Kozlowski, 1984). Por lo general la soja no se recupera totalmente del daño causado por el exceso de agua. El anegamiento del suelo puede reducir el rendimiento de la soja entre un 17 a un 43% durante la etapa de crecimiento vegetativo y entre un 50 a un 56% en la etapa reproductiva (Oosterhuis et al., 1990). Las pérdidas en el rendimiento son el resultado de una reducción en el crecimiento radicular, crecimiento de los brotes, nodulación, fijación de nitrógeno, fotosíntesis, acumulación de biomasa, conductancia estomatal, y muerte de la planta por enfermedades o estrés fisiológico (Oosterhuis et al., 1990; VanToai et al., 1994 y 2001).

Por lo general, puede dividirse al exceso de agua en anegamiento, donde solamente las raíces están inundadas, o en inmersión total donde toda la planta se encuentra debajo del agua (Van Toai et al., 2001). El anegamiento es más común que la inmersión total y menos perjudicial. Mientras que los granos mueren dentro de uno o dos días de inmersión total (Sullivan et al., 2001), la planta desarrolla mecanismos adaptivos que permiten la supervivencia de la misma en un anegamiento a largo plazo (Bacanamwo y Purcell, 1999). Se demostró que la variabilidad genética para la tolerancia al exceso de agua entre las variedades de soja tiene lugar en los grupos de madurez II y III (Van Toai et al., 1994). Los genotipos tolerantes a dichos excesos se aclimataron más rápidamente al estrés por exceso de agua que los genotipos susceptibles al mismo (Van Toai et al., 2001).

En el sudeste de Missouri, se llevó a cabo un estudio de tres años, desde 2002 al 2004, para 1) determinar si hay tolerancia al anegamiento de campos entre aproximadamente 350 variedades del grupo III, IV y V y líneas de germoplasma y 2) identificar las variedades de soja y de líneas de germoplasma más tolerantes y establecer los niveles de tolerancia. Fueron evaluados cultivares de soja en parcelas altas con tres repeticiones. Cuando las líneas alcanzaron la floración, las parcelas fueron inundadas con 5 cm de agua y permanecieron así durante 10 días o hasta que la planta se tornaba muy amarilla. Luego se drenó y secó la parcela. Las variedades y líneas PI fueron clasificadas de acuerdo a la lesión provocada luego de un período de recuperación de dos semanas. Las lesiones fueron clasificadas en una escala del 1 al 5, con daño no aparente para el grado 1 y con plantas muertas para el grado 5. Algunas variedades eran consistentes con la tolerancia durante los tres años de evaluación.

Para medir la tolerancia al anegamiento, se comparó el rendimiento de la mayoría de las variedades menos tolerantes bajo condiciones con y sin anegamiento severo. La pérdida promedio en el rendimiento de las cinco variedades más tolerantes calculada sobre todos los grupos de madurez fue del 39% comparada con una pérdida en el rendimiento del 77% para las variedades más sensibles.

La identificación y desarrollo de las variedades tolerantes al exceso de agua en las cuales la pérdida en el rendimiento por el anegamiento del suelo es igual o menor al 10% les brindaría a los productores una mayor protección en los campos con drenaje deficiente. El lanzamiento de nuevas variedades de soja exóticas provenientes de la colección mundial del

MAEU podría ofrecer niveles más elevados de tolerancia al anegamiento que los existentes en los cultivares de soja actuales cultivados por los agricultores. En 2002 evaluamos el lanzamiento de 200 plantas, cada una de ellas en los grupos de madurez IV, V y VI para una tolerancia al exceso de agua en el suelo. Algunas líneas de germoplasma de soja mostraron una buena tolerancia. Una variedad de soja PI del grupo IV mostró una pérdida en el rendimiento por exceso de agua de un 8 % comparada con una pérdida del 30 % para el grupo IV P94B73 más tolerante (Shannon et al., 2005).

Basados en este estudio, algunos lanzamientos de plantas sufrieron menos pérdida en el rendimiento y tenían mayor tolerancia al anegamiento del suelo que las variedades actuales. En 2005 cerca de 300 lanzamientos de plantas del grupo III extraídas tanto de zonas húmedas como secas del mundo se plantaron en alturas con tres repeticiones cerca de New Franklin, MO, en canales especialmente construidos donde la duración y cantidad del exceso de agua pueden ser controlados con precisión bombeando agua dentro y fuera de las parcelas como sea necesario. Cuatro de estas variedades de soja PI tenían grados de tolerancia al exceso de agua entre un 1,0 y un 2,0 lo que demostraba que los mismos tenían una buena recuperación luego de un exceso de agua severo. En el futuro se seguirán realizando más estudios para determinar la continuidad de la tolerancia de las mejores variedades de soja PI de los grupos III y IV a través de los años y de los territorios.

El daño provocado por exceso de agua es más problemático en suelos altamente arcillosos o con drenaje deficiente (Scott et al., 1989). Los suelos con drenaje deficiente son también más propicios a contraer podredumbre de raíz por phytophthora. Como consecuencia surge la pregunta: ¿pueden los genes resistentes a la podredumbre de raíz por phytophthora (PRP) proteger a la soja del exceso de agua? Van Toai et al. (2001) informaron acerca de un locus de rasgo genético cuantitativo (LRGC) o gen asociado con un crecimiento mejorado de la soja (18%) y con rendimientos de granos (180%) en medios anegados. Este LRGC estaba asociado con el marcador Sat _064 del parental Archer y fue identificado en dos lugares de experimentación en dos años diferentes y puede estar cerca de un alelo para la resistencia a la PRP.

En la soja hay alelos *Rps* para la resistencia al PRP en ocho o más lugares, teniendo algunos de ellos más de un alelo. En Missouri comparamos el rendimiento de los rps Williams (susceptibles) y de otras 13 isolíneas Williams con genes simples resistentes a la PRP en siete lugares distintos bajo condiciones con y sin exceso de agua y una irrigación óptima. El exceso de agua redujo el rendimiento de 467 a 667 kg/ha por acre tanto para los rps Williams como para los AG 3906, una variedad en uso de Roundup Ready. Ninguna de las variedades tiene un gen mayor para la resistencia a la PRP. Las isolíneas de Williams con genes *Rps1k* y *Rps3b* resistentes a la PRP tuvieron un rendimiento igual o mayor bajo condiciones con exceso de agua que los tratamientos donde no había tal exceso, demostrando así que los genes resistentes al PRP pueden ayudar a proteger a la soja que crece en condiciones con exceso de agua. Las otras isolíneas que tenían otros alelos resistentes a la PRP mostraron un rendimiento reducido por el exceso de agua. Diferentes alelos resistentes al PRP que se pueden encontrar en los mismos o diferentes lugares, pueden o no proteger a la soja del exceso de agua. Hay más de 70 razas de PRP y diferentes genes de resistencia que protegen a la planta del ataque de muchas o pocas cepas. De esta manera, la efectividad de los genes resistentes a la PRP bajo condiciones con exceso de agua dependerá de las razas del patógeno presente en el campo. Sin embargo, la resistencia a la PRP no es la respuesta a futuras pérdidas de soja por exceso de agua. Obviamente hay otros factores relacionados especialmente con el exceso de agua severo.

La diversidad genética para la tolerancia al exceso de agua promete el desarrollo de variedades de soja con una alta tolerancia al anegamiento. Mejorar dicha tolerancia traerá aparejado grandes beneficios para los productores agropecuarios, especialmente en regiones donde vastas extensiones de suelo con drenaje lento tienen que ser irrigadas o donde el drenaje del suelo es imposible o poco viable.

Tolerancia a la sal

Según la FAO(Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación)/ Mapa de los suelos del mundo de la Unesco, la superficie total de suelos salinos representa más del 26% de la superficie del mundo potencialmente cultivable.(FAO, 2006) La salinidad provoca dos estrés principales para la planta. En primer lugar, la salinidad provoca una alta presión osmótica en la solución del suelo (fuera de la planta), lo que dificulta la extracción de agua para la planta. Este estrés osmótico reduce el crecimiento de la hoja y la

raíz, la conducción estomatal y por consiguiente, la fotosíntesis. En segundo lugar, la salinidad provoca estrés iónico específico debido a la acumulación de Na^+ y Cl^- en la planta. La acumulación de Na^+ y Cl^- tiene múltiples consecuencias perjudiciales, a saber: un desequilibrio en proporciones K^+/Na^+ y $\text{Ca}^{2+}/\text{Na}^+$ que causa la inhibición de la actividad enzimática; fotosíntesis reducida; y la formación de radicales superóxidos que dañan la membrana (Munns, 2006). Este estrés sal específico se expresa fenotípicamente como hoja clorótica y necrótica. (Lee et al., 2004).

La toxicidad salina es el principal factor abiótico que reduce el rendimiento de la soja en muchos lugares del mundo. El daño provocado por la sal en los Estados Unidos ocurre como resultado de las tormentas provenientes del Atlántico y del Golfo de Méjico, o como resultado del riego con agua que contiene alto contenido en sal. Más del 60% de la soja de Arkansas se riega (NASS, 2006) y con frecuencia la toxicidad salina es un problema. Históricamente, se ha investigado si los genotipos de la soja son tolerantes a la sal en un sistema hidrotópico (Lee et al., 2004) para excluir el ion cloruro de las plantas. Las variedades que excluyen el cloruro reducen la absorción de cloruro desde las raíces hasta las hojas y se consideran tolerantes a la sal. Las variedades que incluyen cloruro se consideran intolerantes a la sal y pueden mostrar un grave daño foliar debido a la acumulación de iones. Alrededor del 20% de las variedades tienen un alelo dominante principal para la resistencia trazado de S-100 de Lee y sus líneas hermanas (Lee et al., 2004). Los campos con altísima concentración de sal pueden superar este alelo (Shannon et al 2003).

Se llevaron a cabo estudios en Carolina del Norte para sondear la base genética de la soja en las semillas de soja de los Estados Unidos con el objeto de identificar las fuentes de tolerancia salina utilizadas en los programas de cultivos de soja estadounidenses. Once genotipos que incluyen, Fiskeby, S100, Dunfield, Bilomi #3, Illini and PI 88788 fueron tolerantes a la sal. Otros estudios muestran esa tolerancia con PLs del plasma germinal de la colección de la soja USDA, la tolerancia de sal es común en la adquisición de las especies *G max*, *G. soja*, and *other glycine*. Los niveles de tolerancia parecen variar en cada especie.

La investigación sobre la tolerancia salina ha tenido lugar en campos con alto contenido de sal. También se llevó a cabo en invernaderos con hidroponía, o en invernaderos planos sembrados, o macetas llenas con arena o tierra donde se regaron las raíces con agua salada. En la Universidad de Missouri hemos desarrollado un sistema más fácil y económico que el costoso sistema de labor intensivo hidropónico para investigar si los genotipos de la soja son tolerantes a la sal. Los genotipos se siembran en contenedores cónicos rellenos de tierra arenosa y se ubican en una bandeja que contiene 98 conos. Las bandejas se ubican en tinas con agua que cubre casi hasta la mitad del alto de los conos. En la etapa de crecimiento V2 (dos hojas trifoliadas completamente desarrolladas) se agrega en la tina una solución salina de 100mM. Los genotipos se miden en una escala de 1= ninguna hoja chamuscada a 5= plantas muertas alrededor de los 14 días de iniciado el tratamiento con sal. El método del contenedor cónico se correlaciona bien ($R^2.96$) con los resultados del método de hidroponía para evaluar los genotipos a la tolerancia salina.