

Nuevas Herramientas Genéticas Para el Mejoramiento de Cultivos



JUAN M. OSORNO, Ph.D.
Mejorador y Genetista de Frijol

Department of Plant Sciences
North Dakota State University
Fargo - ND

NDSU NORTH DAKOTA
STATE UNIVERSITY

NDSU
North Dakota State University, Fargo, ND
**ND Agricultural
Experiment Station**

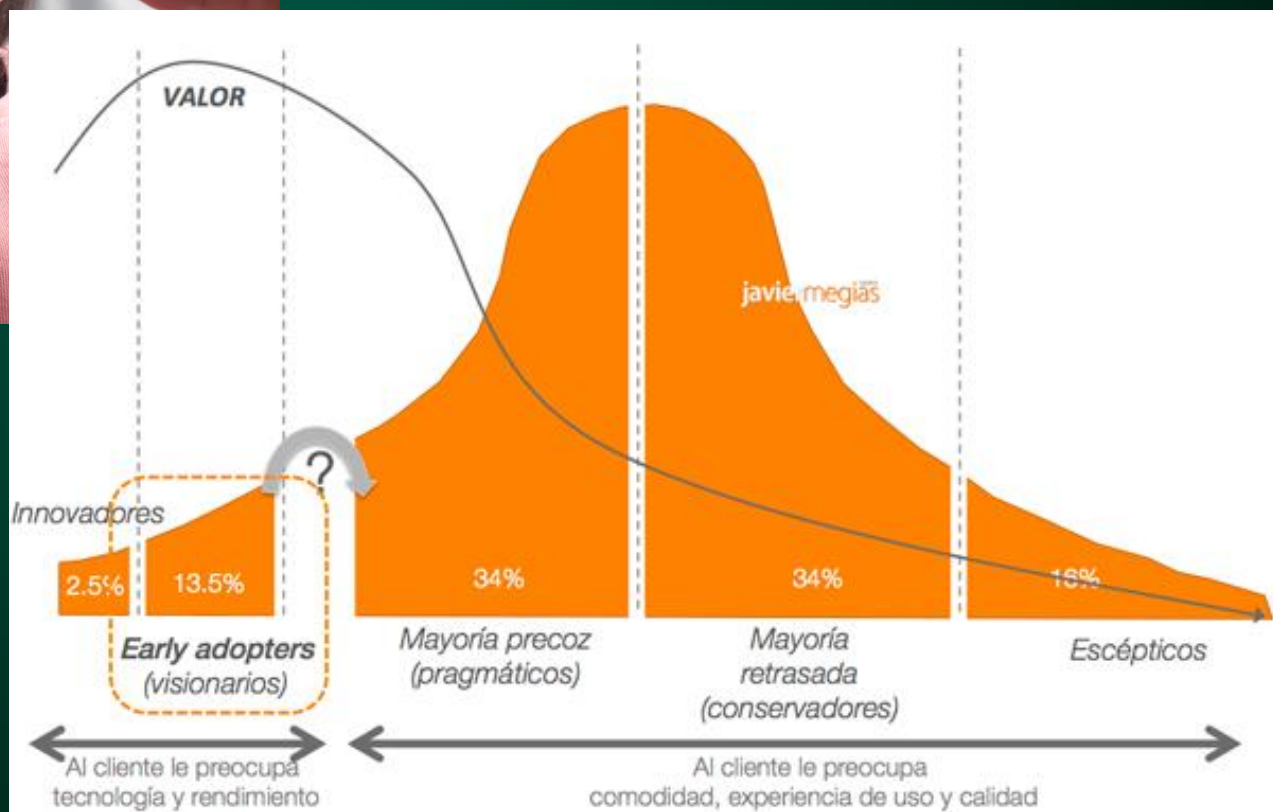
NDSU PLANT
SCIENCES

Primero un Poco de Filosofía

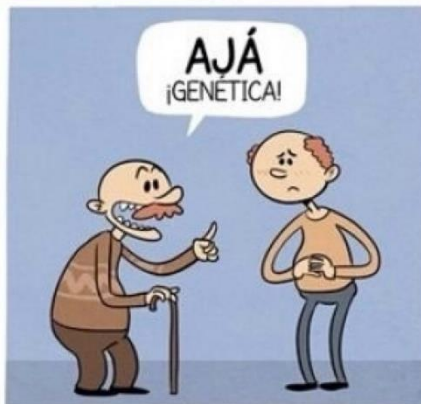
Neofobia: Miedo a lo Nuevo



SI NO TUVIERAS
MIEDO
¿QUE HARIAS?



Indiferencia/Miedo a la Genetica?

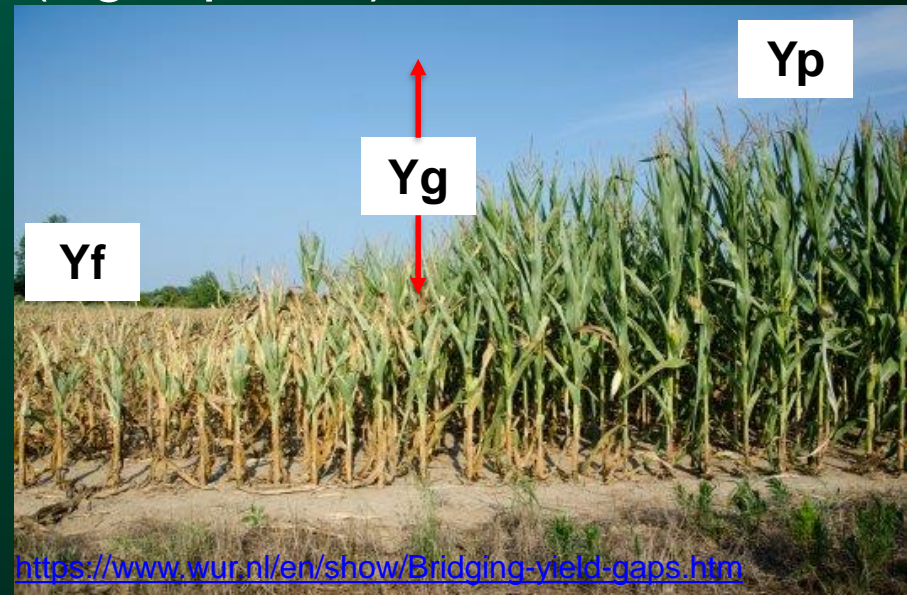


Segundo: Productividad?

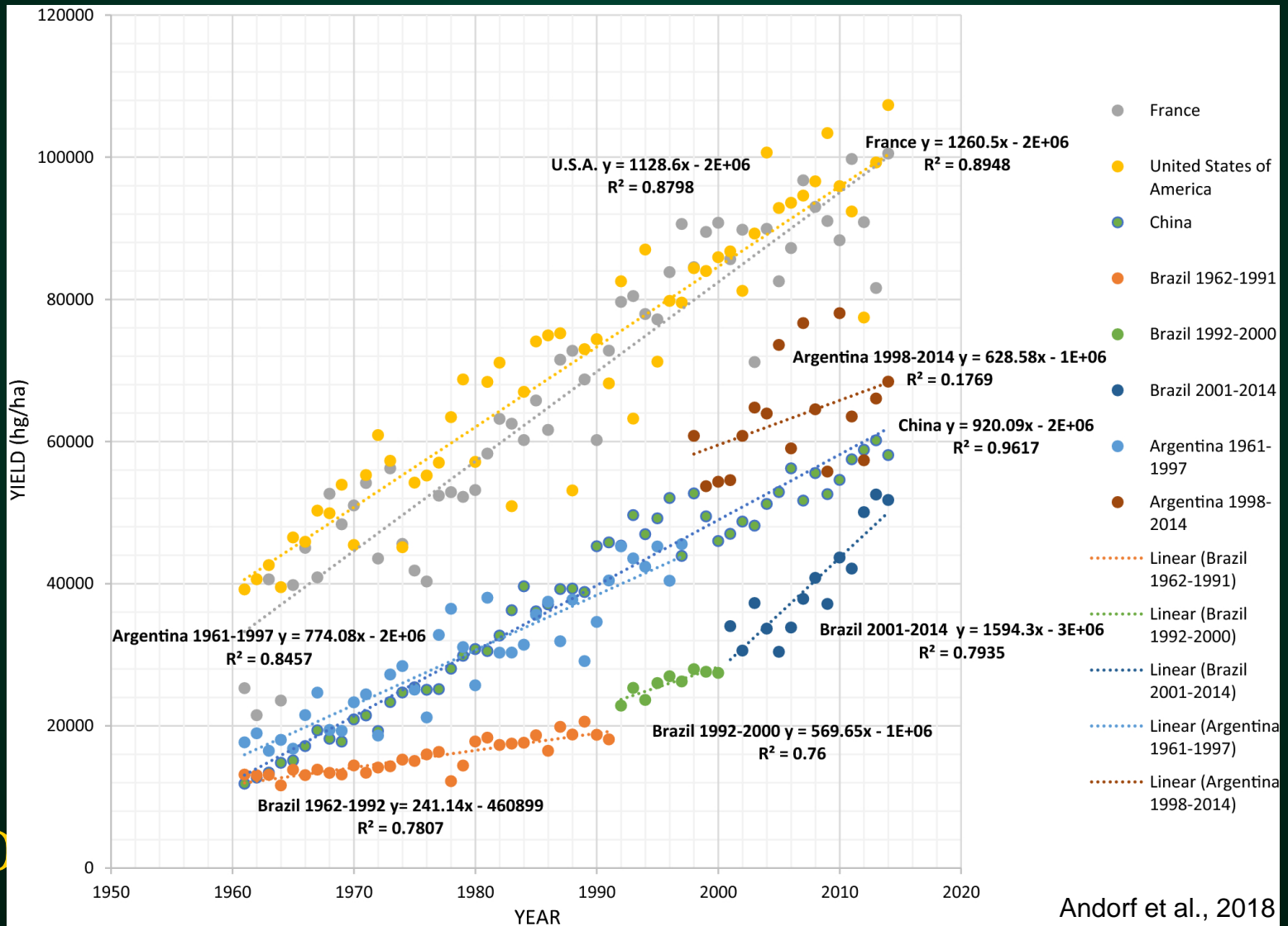
- “Relación entre la cantidad de productos obtenida por un sistema productivo y los recursos utilizados para obtener dicha producción”
- “Indicador de eficiencia que relaciona la cantidad de recursos utilizados con la cantidad de producción obtenida”

Productividad Agrícola

- Método mas común en cultivos:
 - Rendimiento a través del tiempo:
 - Δy : Ganancia en rendimiento (Kg/Ha/Año)
 - Rendimiento potencial (Y_p)
 - Rendimiento real (Y_f)
 - Brecha de rendimiento ($Y_g = Y_p - Y_f$)

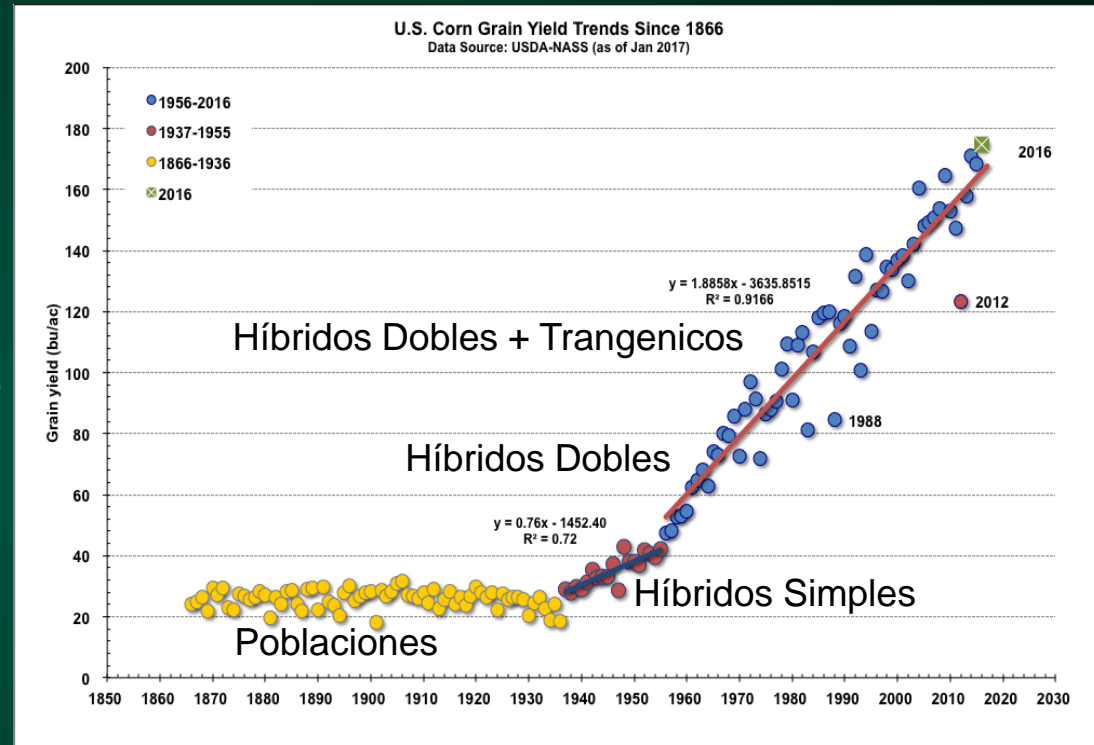


Un Ejemplo: Rendimientos Históricos en Maíz



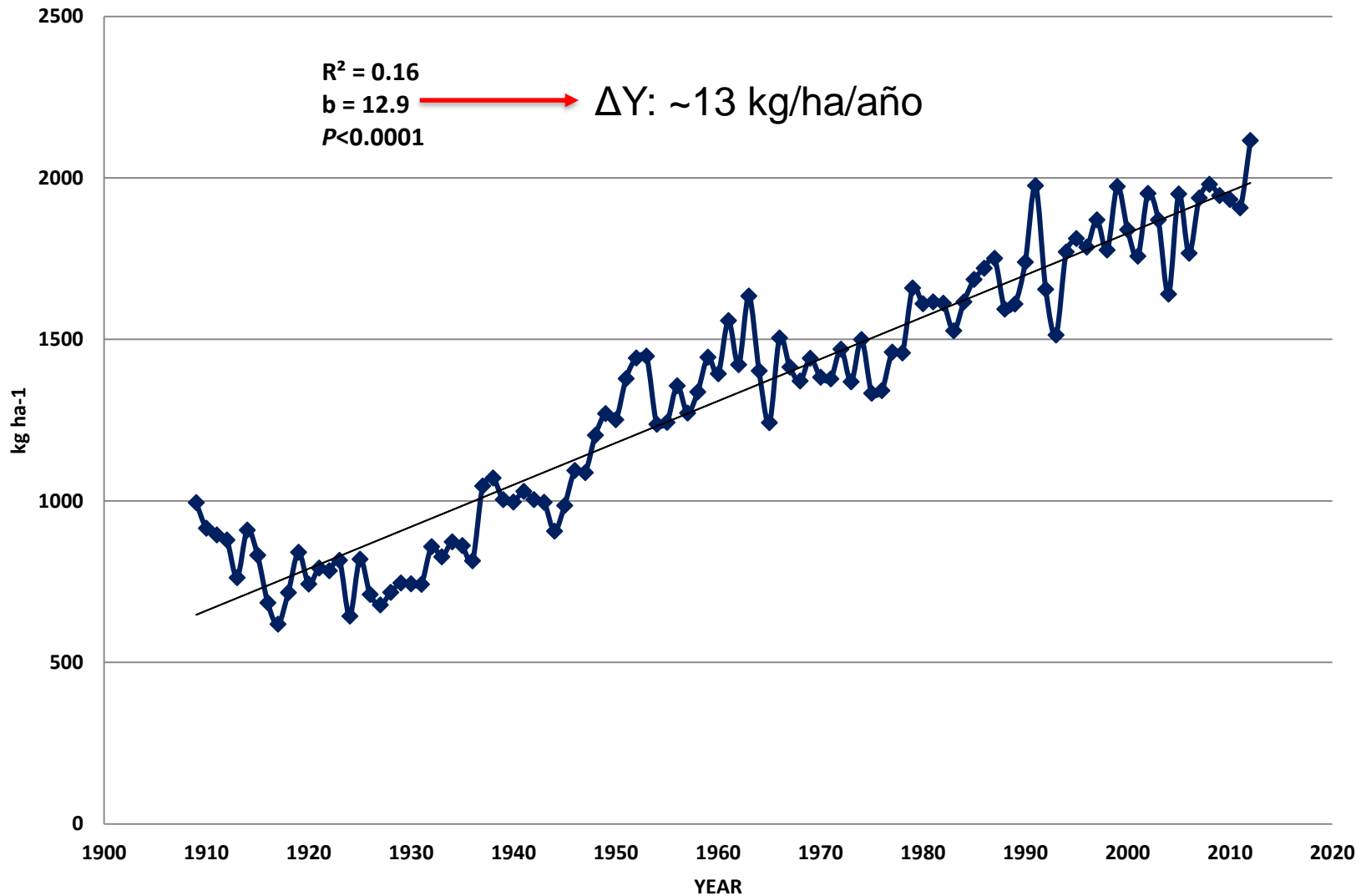
Un Ejemplo: Rendimiento en Maíz - USA

- D. Duvick:
- A que se debe este incremento?
 - ~50: Mejoramiento
 - ~40: Agronomía y Manejo
 - ~10% Tecnología Transgénica

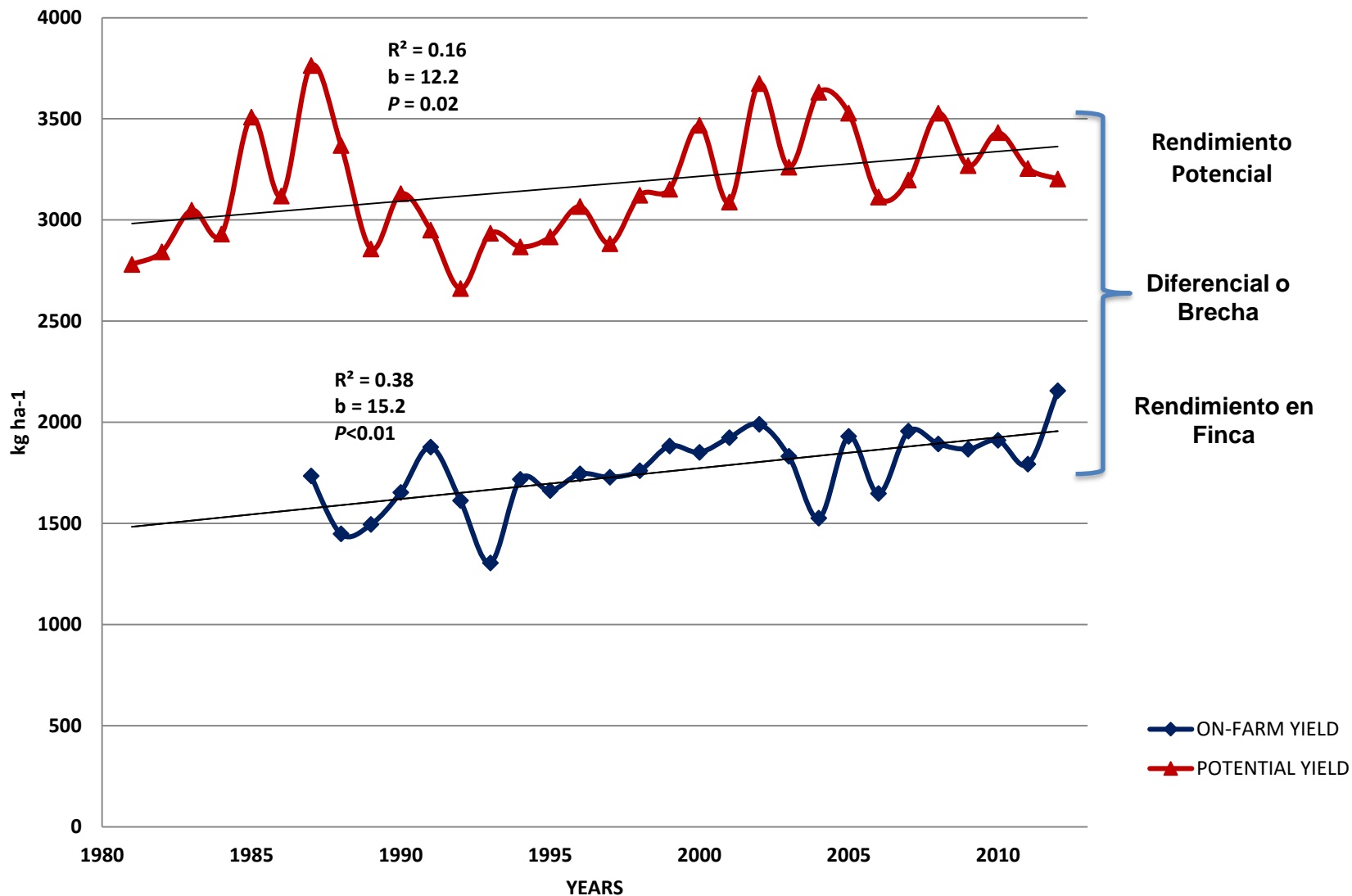


D. Duvick. 2005: https://aae.wisc.edu/aae641/Ref/Duvick_maize_breeding_2005.pdf

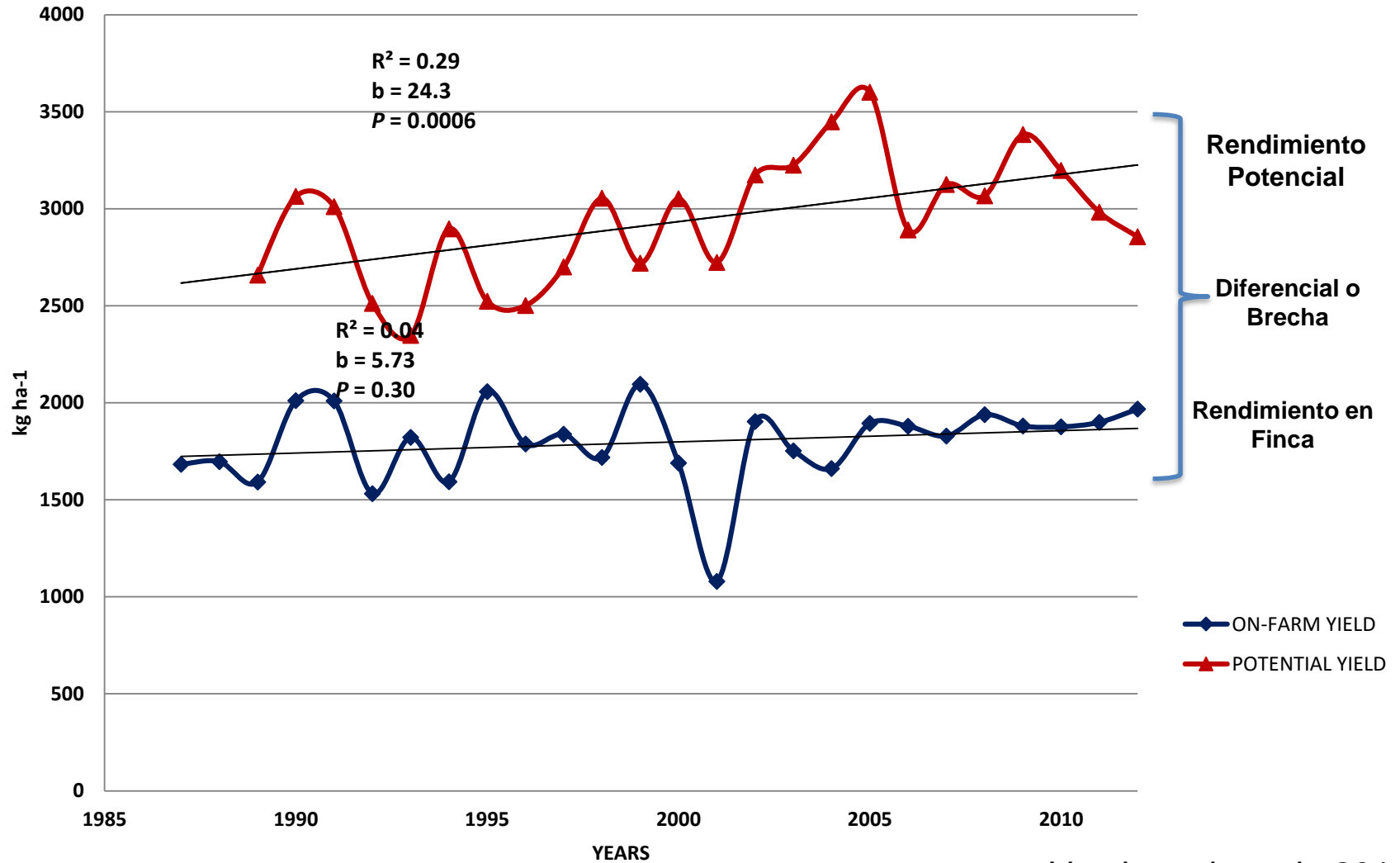
Rendimientos en Frijol – USA (1910-2012)



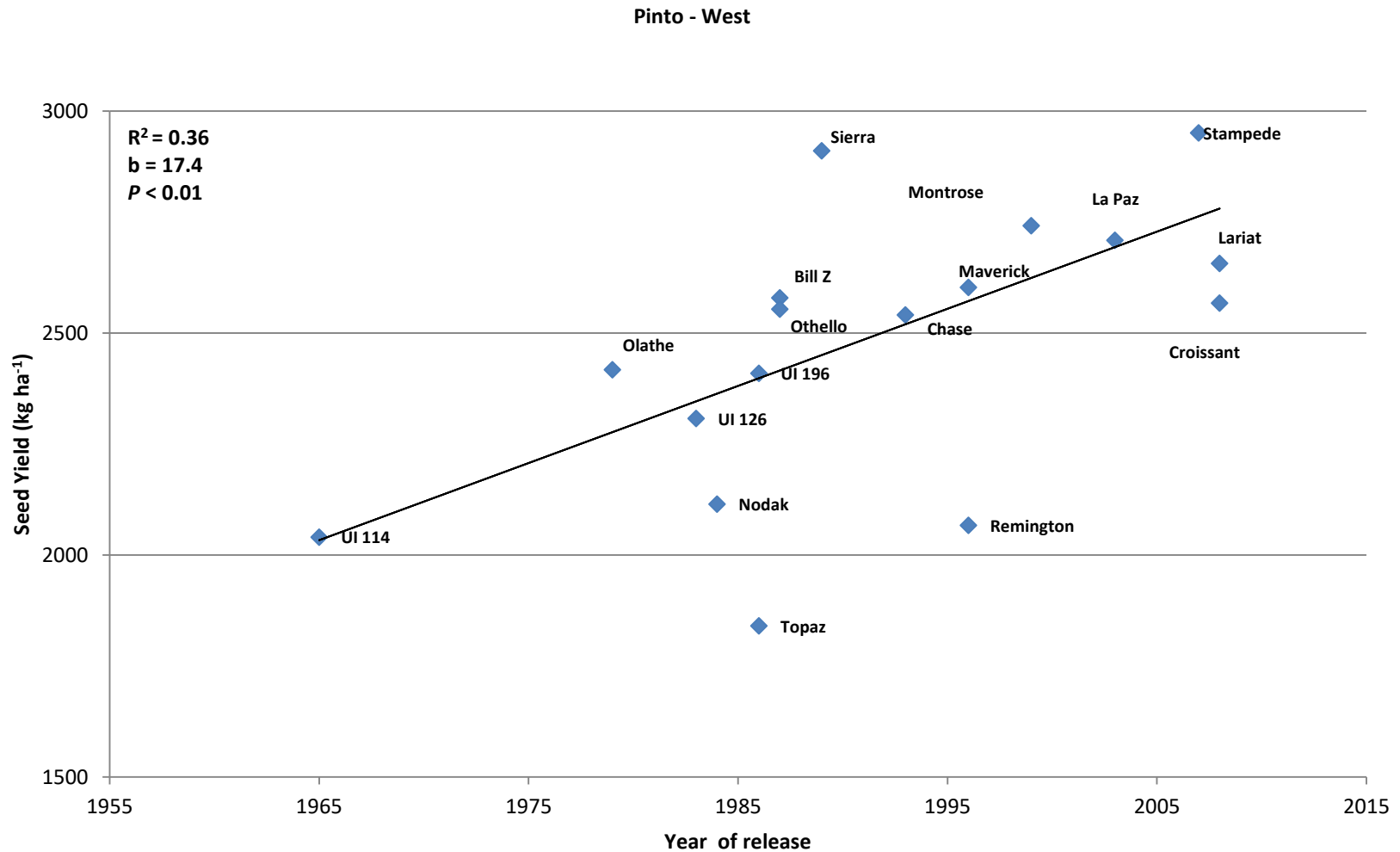
Rendimientos en Frijol Pinto USA



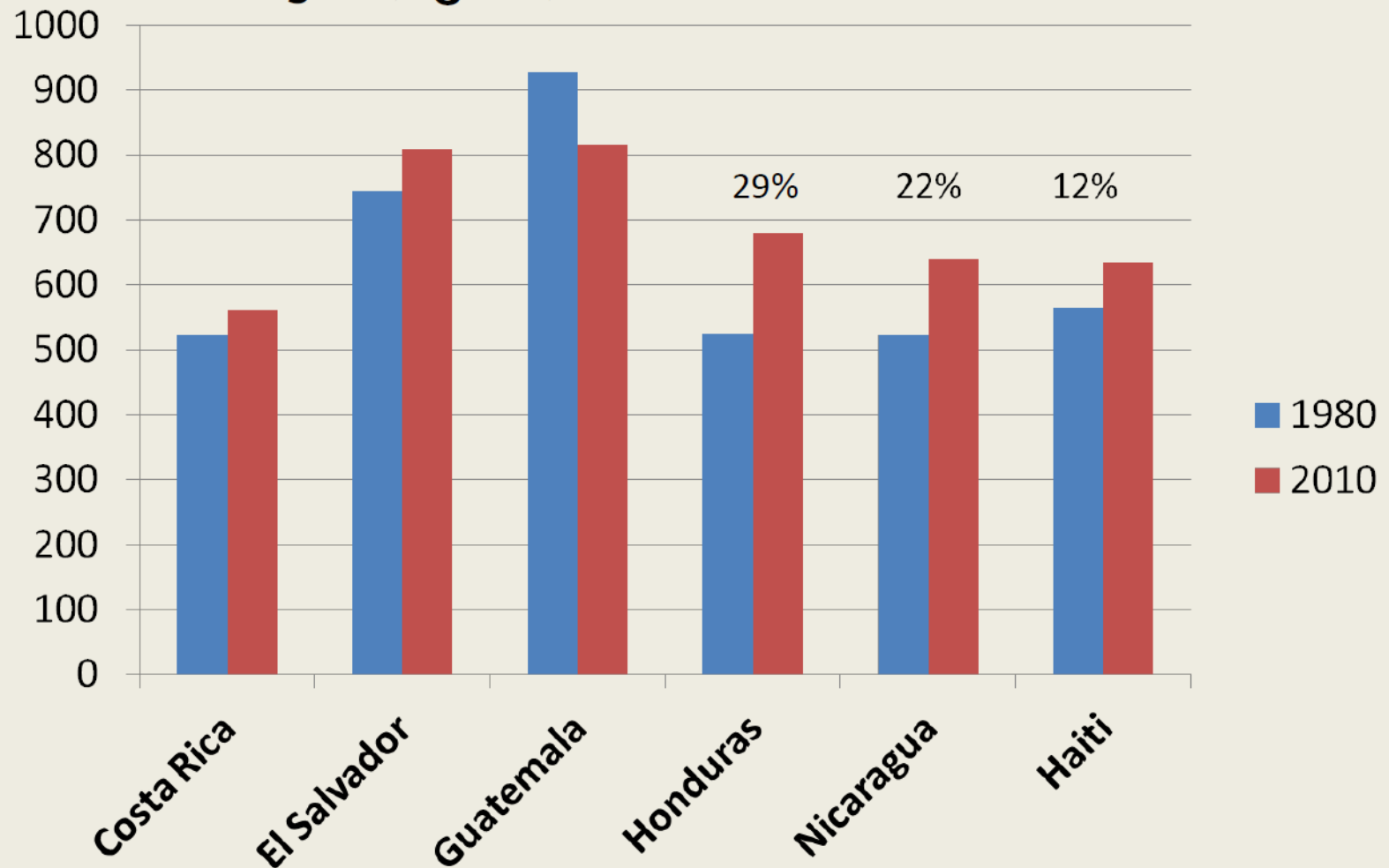
Rendimientos en Frijol Negro USA



Nuevas Variedades Rinden Mas!



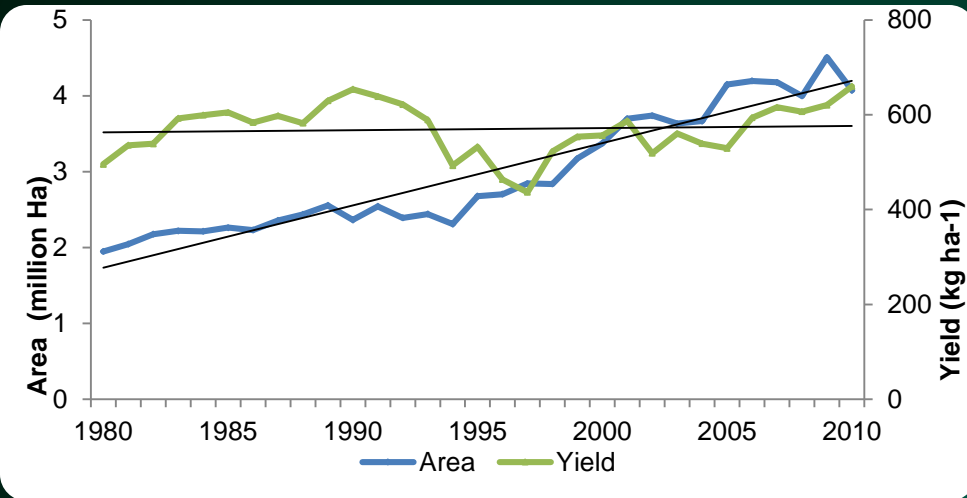
Cambio en el rendimiento de frijol (kg/ha) en América Central



Fuente: FAOSTAT

Rendimientos de Frijol

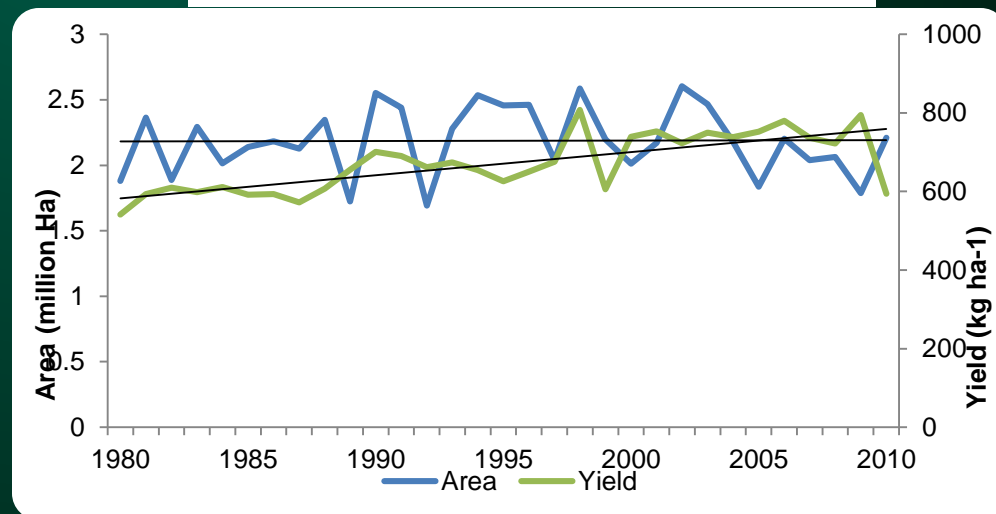
Países en Vía de Desarrollo



East and South Africa

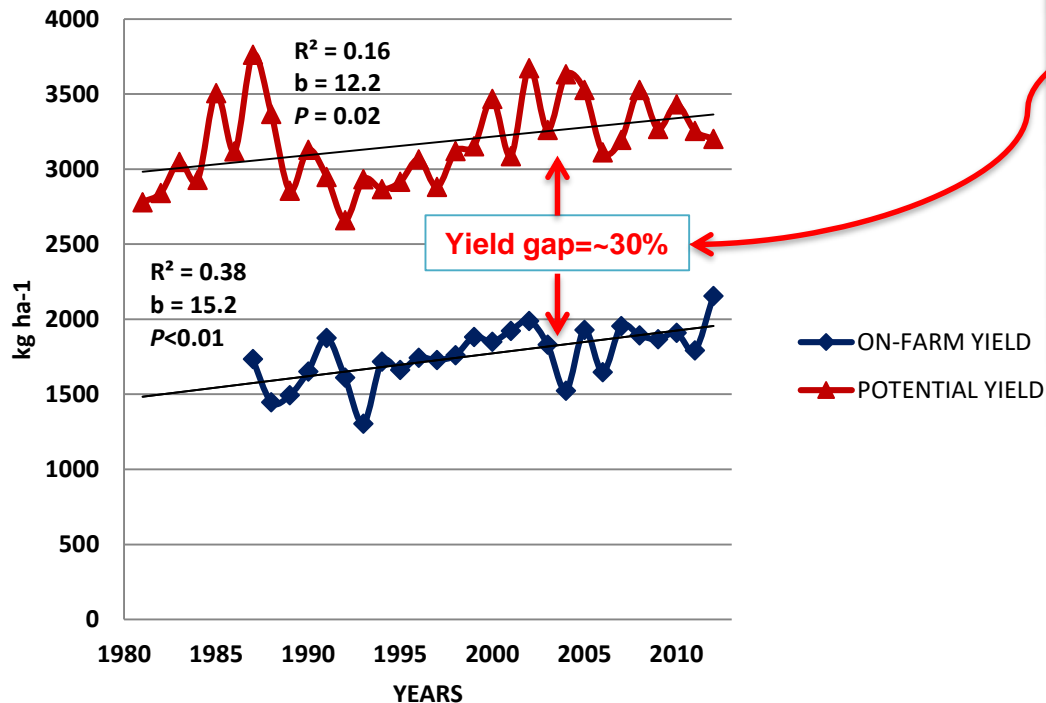
Region	Avg. Yield (2008-10 avg.)	Potential Yield	Yield Gap	
		kg ha ⁻¹	%	
Latin America and Caribbean	856	1800	944	52
East and South Africa	675	2020	1345	67
West and Central Africa	840	2125	1285	60

Latin America and Caribbean



Source: CGIAR Collaborative Research Program for Grain Legumes (CRP 3.5 - 2012)

Seed Yield Gap USA vs. Developing Regions



Pinto Seed Yields (1980-2012)
Source: Vandemark et al., 2014

Region	Avg. Yield (2008-10 avg.)	Potential Yield	Yield Gap	
	kg ha ⁻¹		%	
Latin America and Caribbean	856	1800	944	52
East and South Africa	675	2020	1345	67
West and Central Africa	840	2125	1285	60

Source: CGIAR Collaborative Research
Program for Grain Legumes (CRP 3.5 - 2012)

Situación Actual y Necesidades

- Cambio Climático
- Incremento poblacional
- Presión de Migración?
- Expansión agrícola es limitada
- Incrementos en rendimientos son modestos para casi todos los cultivos
- Como continuar el incremento en productividad agrícola?

Incrementando productividad a Través del Fitomejoramiento

- Formula clásica (1930's):
- Fenotipo = Genotipo + Ambiente + ~~XXX~~
 - Fenotipo: cualquier característica o rasgo observable y/o medible en un organismo
 - Genotipo: variedades, razas, híbridos, etc.
 - Ambiente: región, clima, etc.

Versión Mejorada

– Mas recientemente:

$$- F = \text{G} - A + M + G \times A + G \times M + G \times A \times M$$


– Genotipo: genes (potencial genético)

– Ambiente: lo que **NO** se puede controlar

– Manejo: lo que se puede controlar

– **ΔG = Ganancia genética**

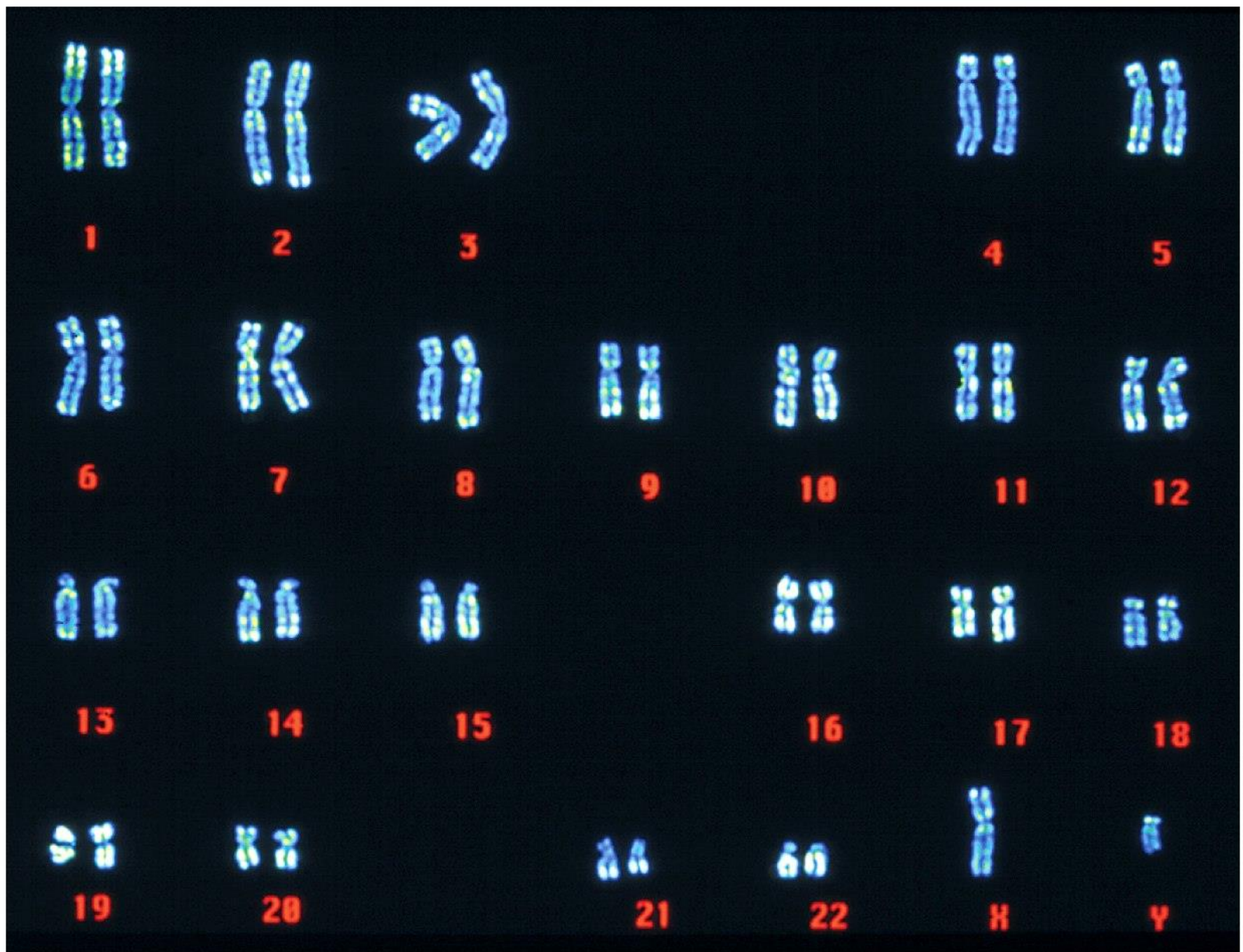


Figure 1-3 Essentials of Genetics, 6/e
© 2007 Pearson Prentice Hall, Inc.

De vuelta a Mendel:

Proporción genotípica
en la F2: 1:2:1

3 genotipos

Genotype

WW

(homozygous)

Ww

(heterozygous)

ww

(homozygous)

2 fenotipos

Phenotype



Purple



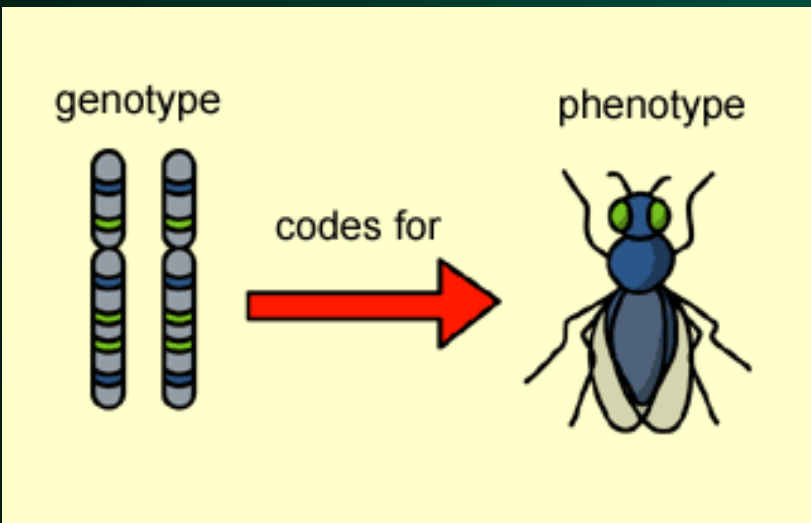
Purple



White

Proporción fenotípica
en la F2 : 3:1

- Varios problemas:
- No podemos ver genes *per se* (genotipo), sino su expresión (fenotipo).
- Expresión genética es afectada por el ambiente.
- Muchas variantes de la misma característica! (genotipo=fenotipo?)



https://geneticsk8vaneckv.weebly.com/uploads/8/9/6/2/8962580/9334814_orig.gif?163

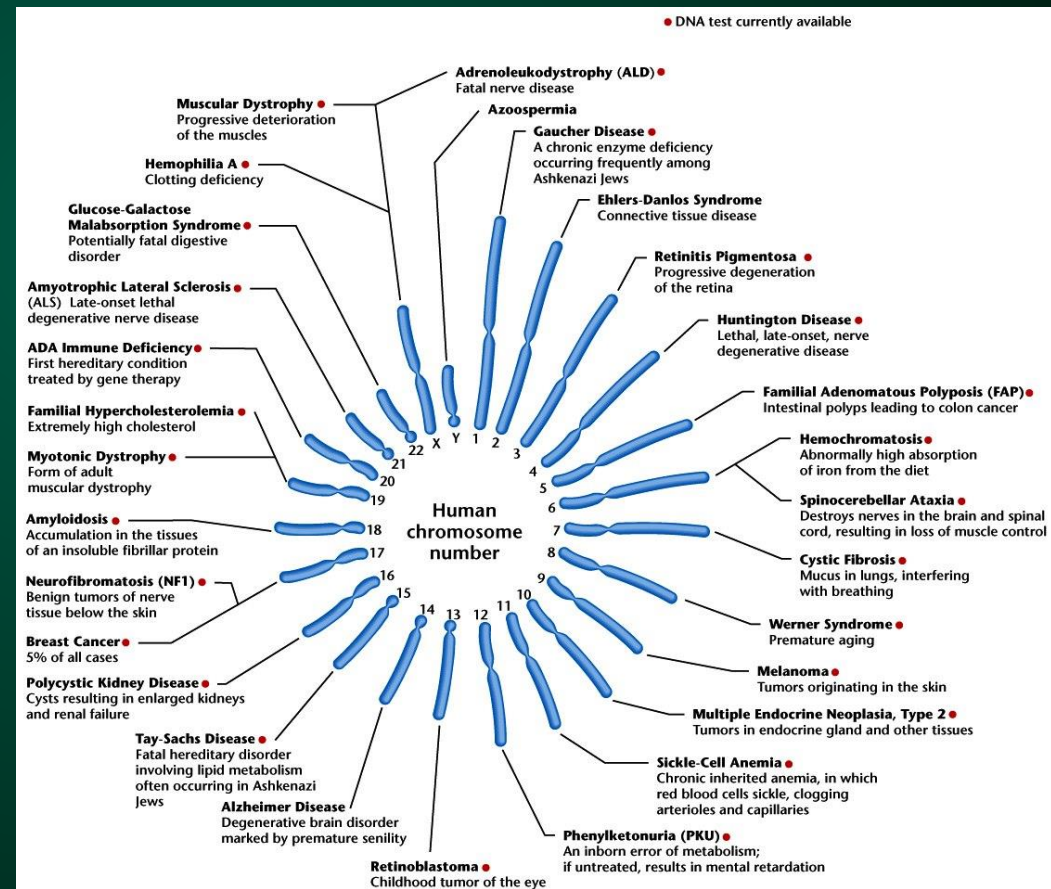


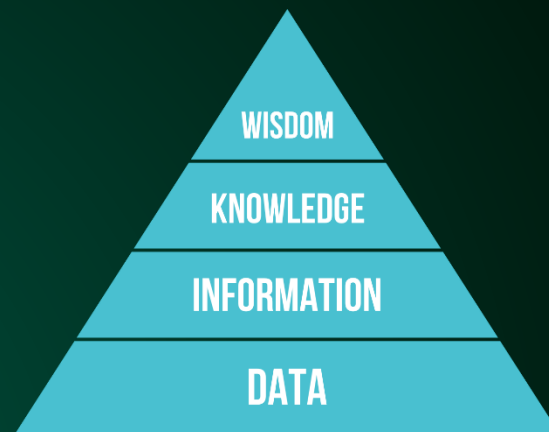
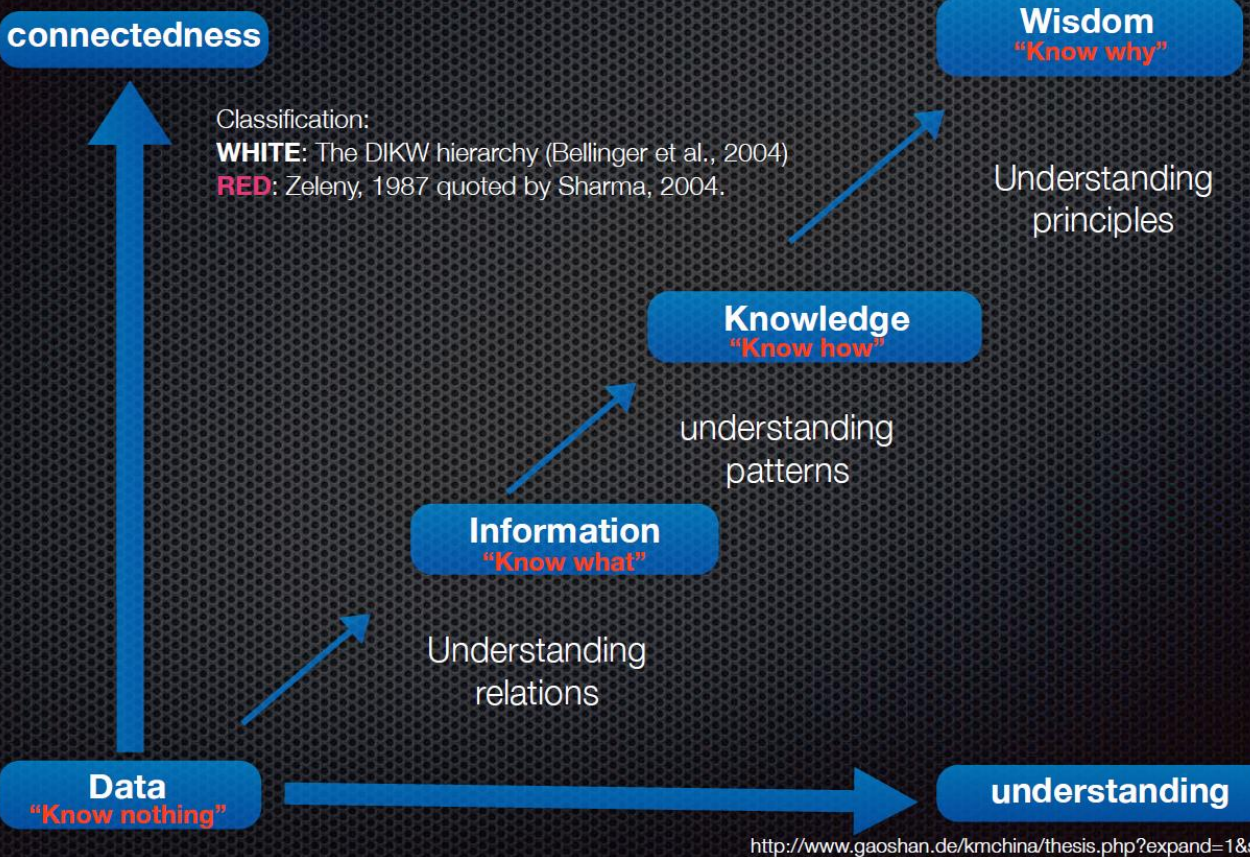
Figure 1-18 Essentials of Genetics, 6/e
© 2007 Pearson Prentice Hall, Inc.

A Pesar de Este Problema Genético:

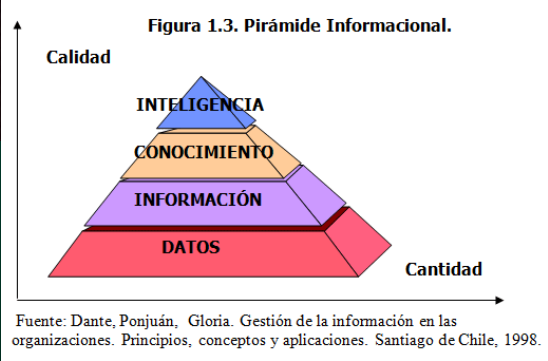
- Múltiples logros en:
 - Medicina
 - Plantas/cultivos
 - Producción animal y microbiología
 - Etc.
- En algunos casos, progreso fue logrado a pesar de no tener todas las respuestas:
 - Que?
 - Como?
 - Por que?

Jerarquía del Conocimiento

DIKW hierarchy... also in life sciences
Functional relationship model



https://en.wikipedia.org/wiki/DIKW_pyramid#/media/File:DIKW_Pyramid.svg



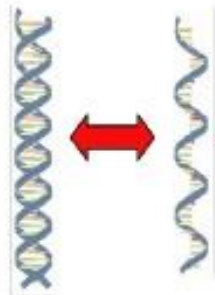
Integrando Genotipo con Fenotipo

MANCHESTER
1824

The University
of Manchester

Genotype to Phenotype

Genotype



DNA

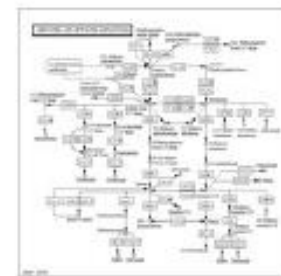
RNA



Protein

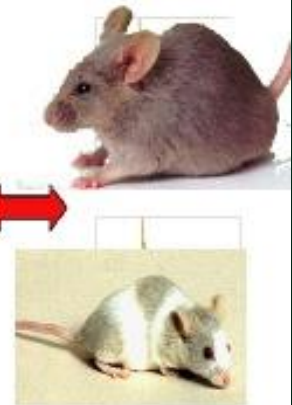


Protein-Protein
interaction



Pathway

Phenotype



Trait

Dogma Central de la Biología:
DNA → RNA → Proteína

Modelo es mas Complejo:
Interacciones, rutas metabólicas
Regulación de la Expresión!

P. Fisher

<https://www.slideshare.net/fisherp/a-systematic-approach-to-genotype-phenotype-correlations>



Otro Problema: El Dilema del Fitomejorador



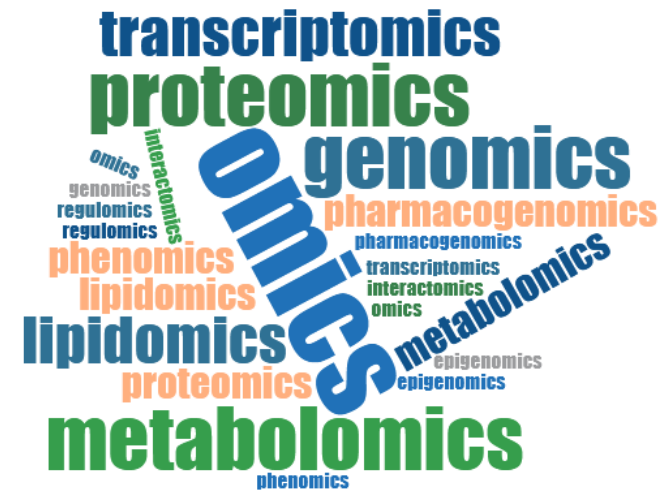
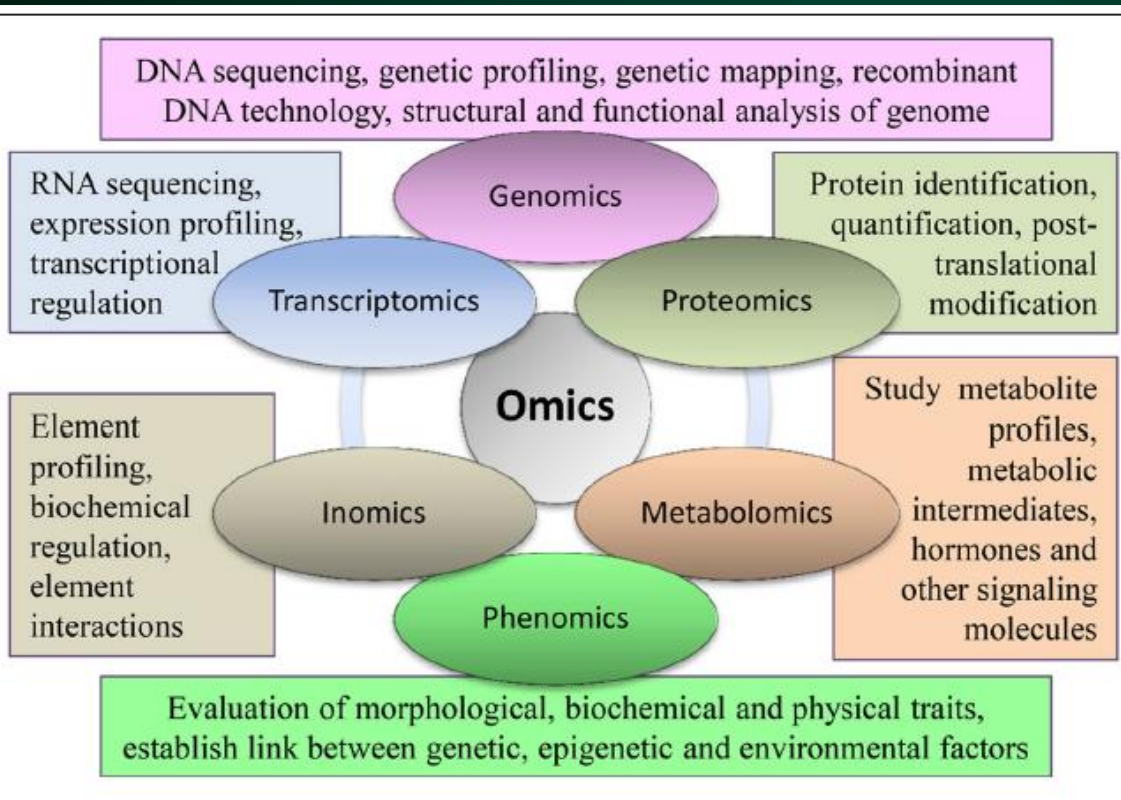
- El mejorador es como un atleta de Decatlon:
 - “El mejorador es bueno en todo pero no es excelente en nada”



Que Herramientas Nuevas Hemos Logrado Usar Hasta Ahora en Fitomejoramiento?

- Selección Asistida por Marcadores
- Transformación Genética / Mutagénesis
- Explosión de Información Genómica
- Bioinformática
- Proteómica?
- Fenotipado intensivo (High Throughput phenotyping)

“Omics”



<https://rd-connect.eu/what-we-do/omics/>

Deshmukh et al., 2014

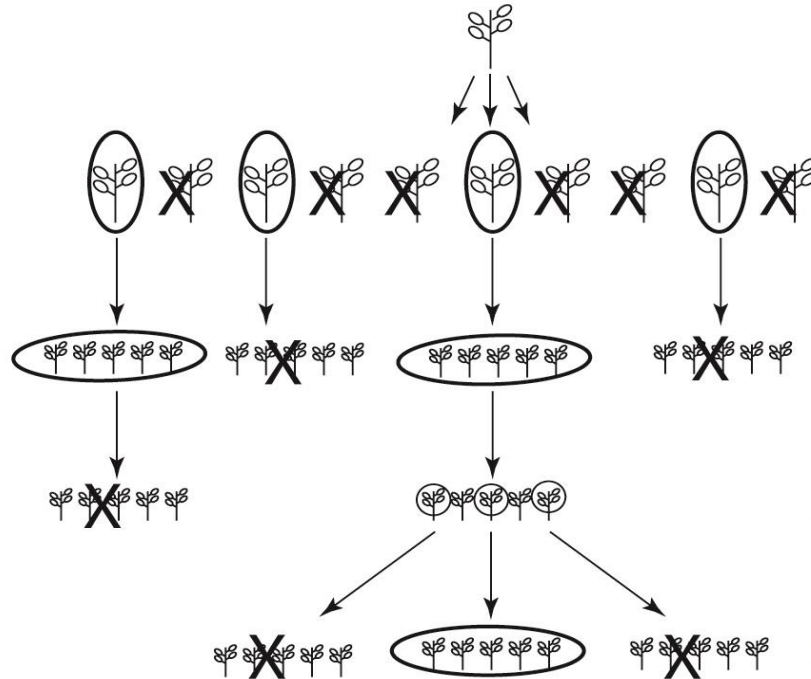
Selección Asistida por Marcadores

- Muy eficiente para genes mayores
 - Enfermedades
 - Insectos
 - Tamaño de semilla/fruta
- Un poco mas difícil para caracteres controlados por genes múltiples
 - Rendimiento
 - Sequia/calor
- Lo mas útil: ayuda a reducir tamaño de poblaciones para ensayos de campo

Modified Pedigree Bean Breeding at NDSU

Stage in Breeding Program

Cross Parents A and B (AxB) and produce F1 seed in Fargo greenhouse



Breeding Activity

Evaluate F1 in New Zealand; select for vigor, appearance

Evaluate F2 in ND for vigor, appearance; select F2 plant and bulk F3 seed

Grow F3 row selection in PR; select for vigor, appearance; bulk F4 row

Grow F4 row selection in ND; evaluate for vigor, appearance; bulk seed form select few (3-4) uniform plants

Grow F5 plant selection in PR; evaluate for vigor, appearance; bulk row and enter into preliminary yield trial

Grow in multiple ND locations over multiple years in preliminary yield trial; move to advanced yield trial if performance is good

Marker Application

P1xP2: *Select parents for cross based on divergece*

F1: *Determine if F1 is a true cross*

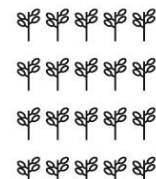
F2: *Evaluate plants for tightly linked markers to simple trait of interest*

F4: *Check for marker linked to quantitative trait*

F7-9: *Fingerprint line for identity preservation and IP protection*



ND location 1

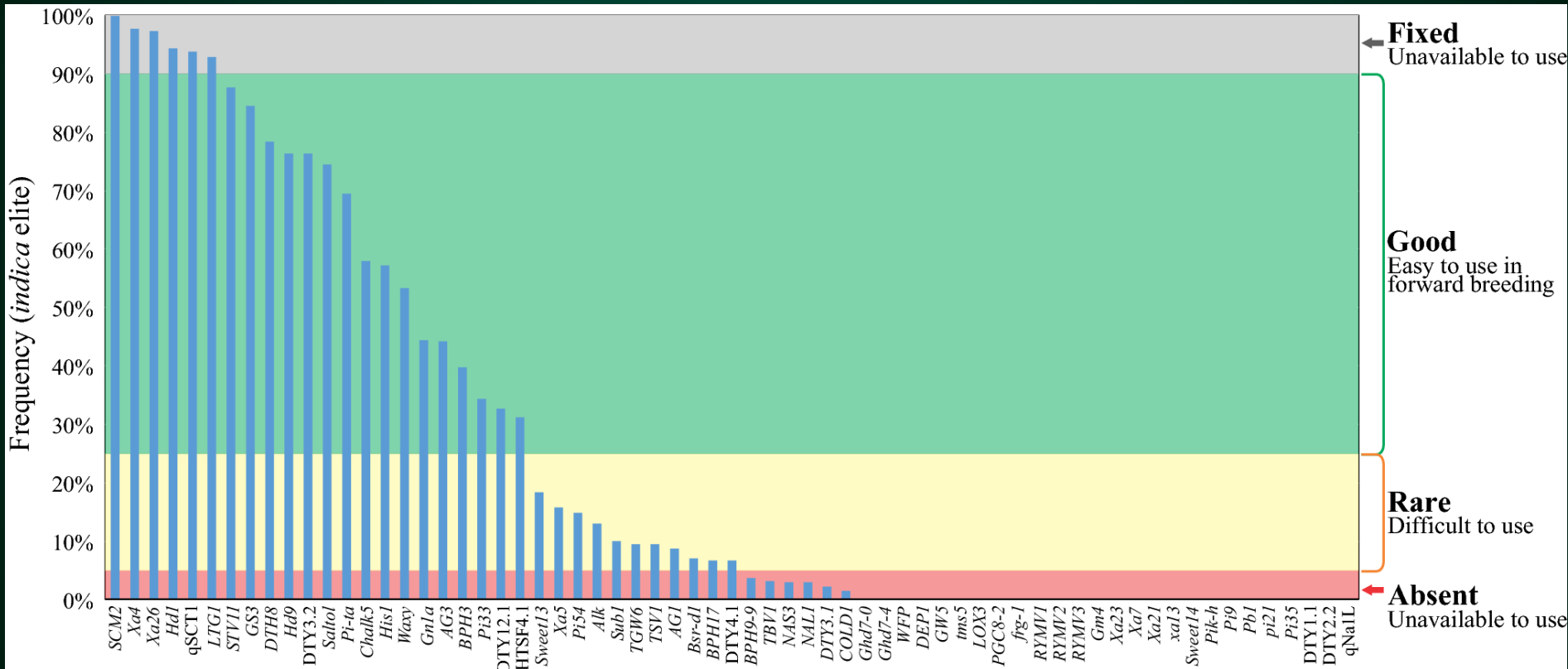


ND location 2



ND location 3

Arroz: Frecuencia de Genes Importantes en Germoplasma Elite



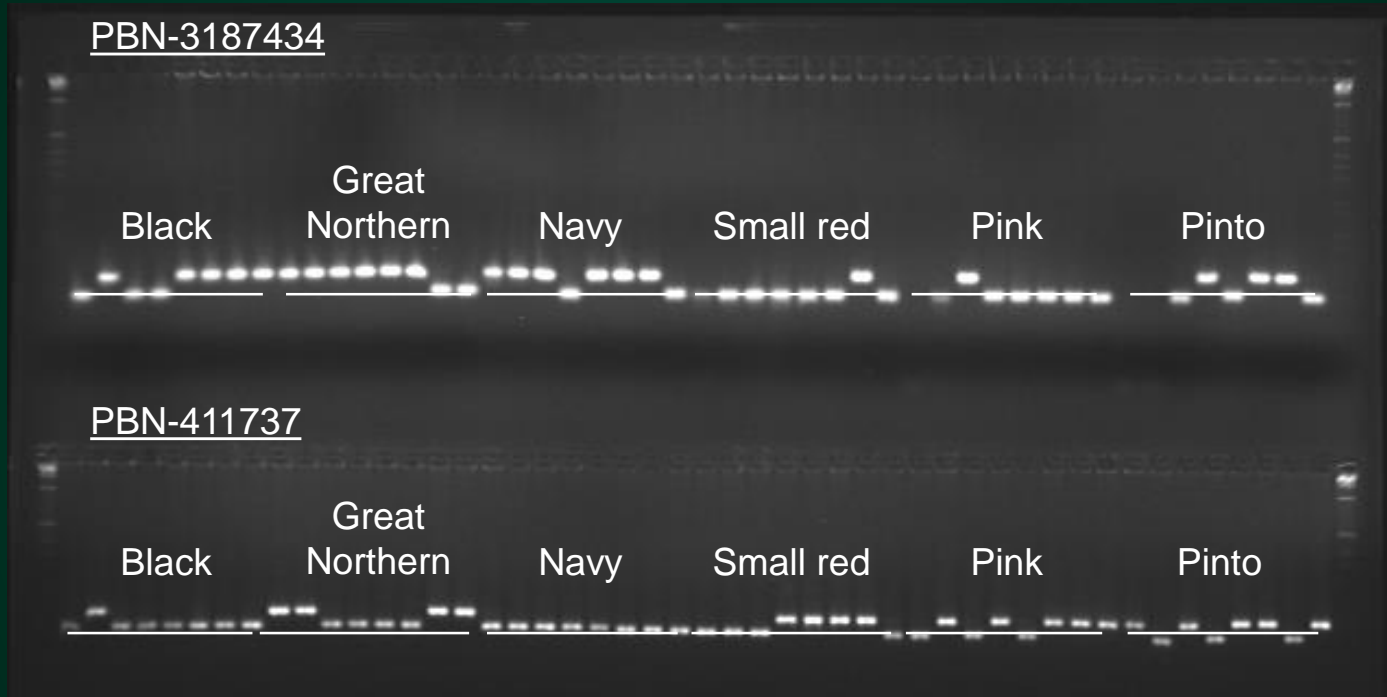
Selección Asistida por Marcadores (MAS)

- Muchísimos sistemas disponibles
- SNPs: Single Nucleotide Polymorphism
 - Eficientes, estables, y abundantes
 - ~200k SNPs disponibles solo en frijol!
 - Genotype by Sequencing (GBS): Millones de SNPs?
 - Re-secuenciación

 - La secuencia genómica nos ayuda a saber la posición física de cada marcador!
 - Genes pueden ser mapeados con precisión

 - Desventaja: Necesita algo de equipo sofisticado
 - Solución: Convertir SNPs en marcadores fáciles de usar

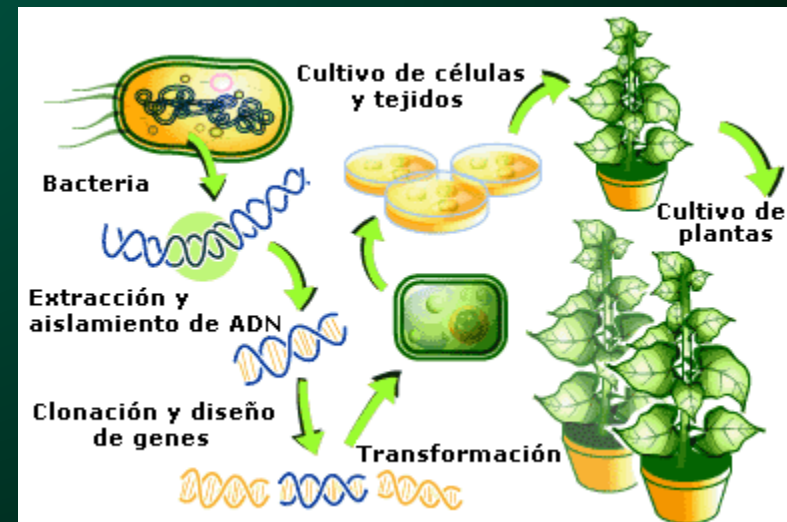
InDel Markers



- Fácilmente aplicables en un laboratorio básico
- Co-dominantes
- Muy bajo costo

Transformación Genética

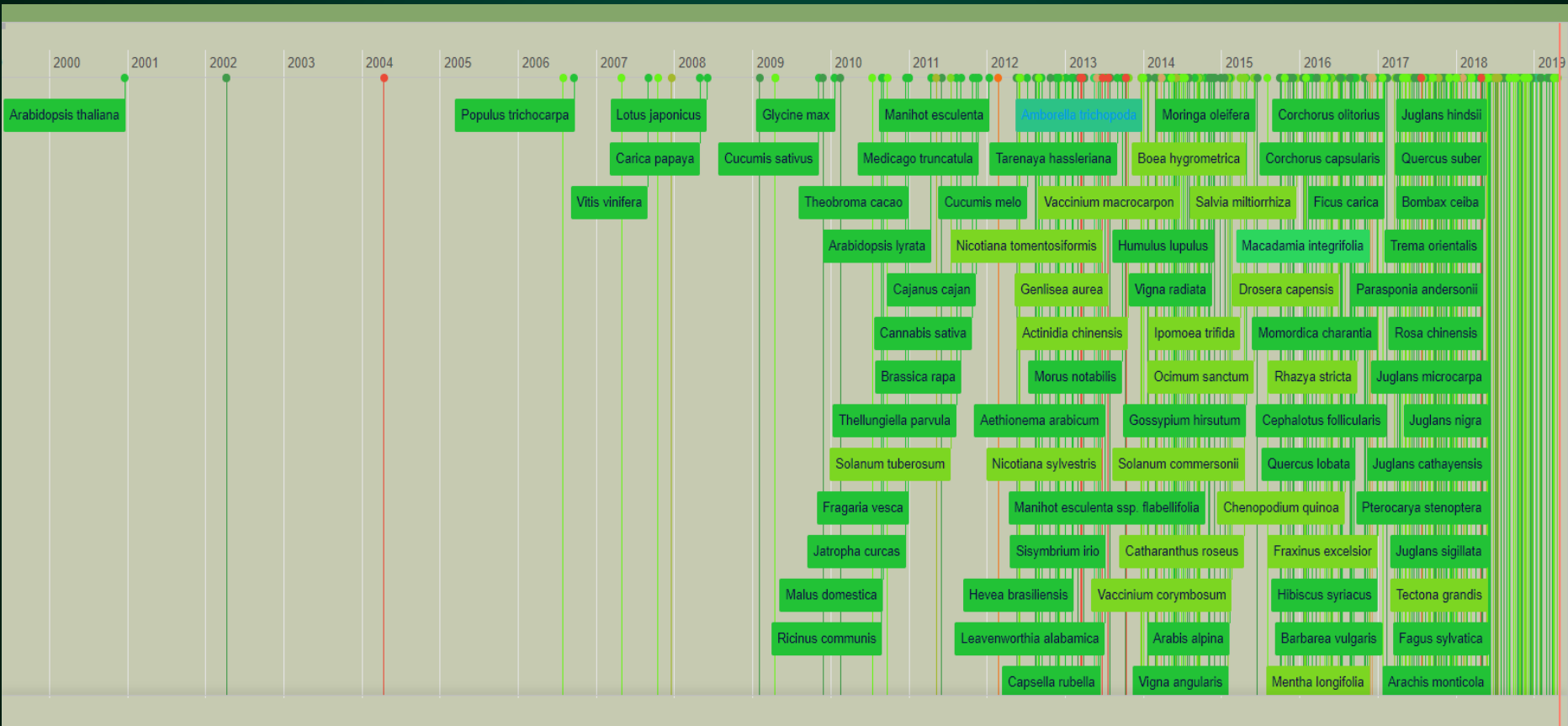
- Tema ha sido cubierto en otras presentaciones
- Innegable impacto en la agricultura
- Pero existe un problema de conexión:
 - La mayoría de caracteres transgénicos son a nivel de finca, no necesariamente a nivel del consumidor final (pocas excepciones):
 - Golden rice
 - Innate potato
 - Artic Apple
 - Maduramiento lento



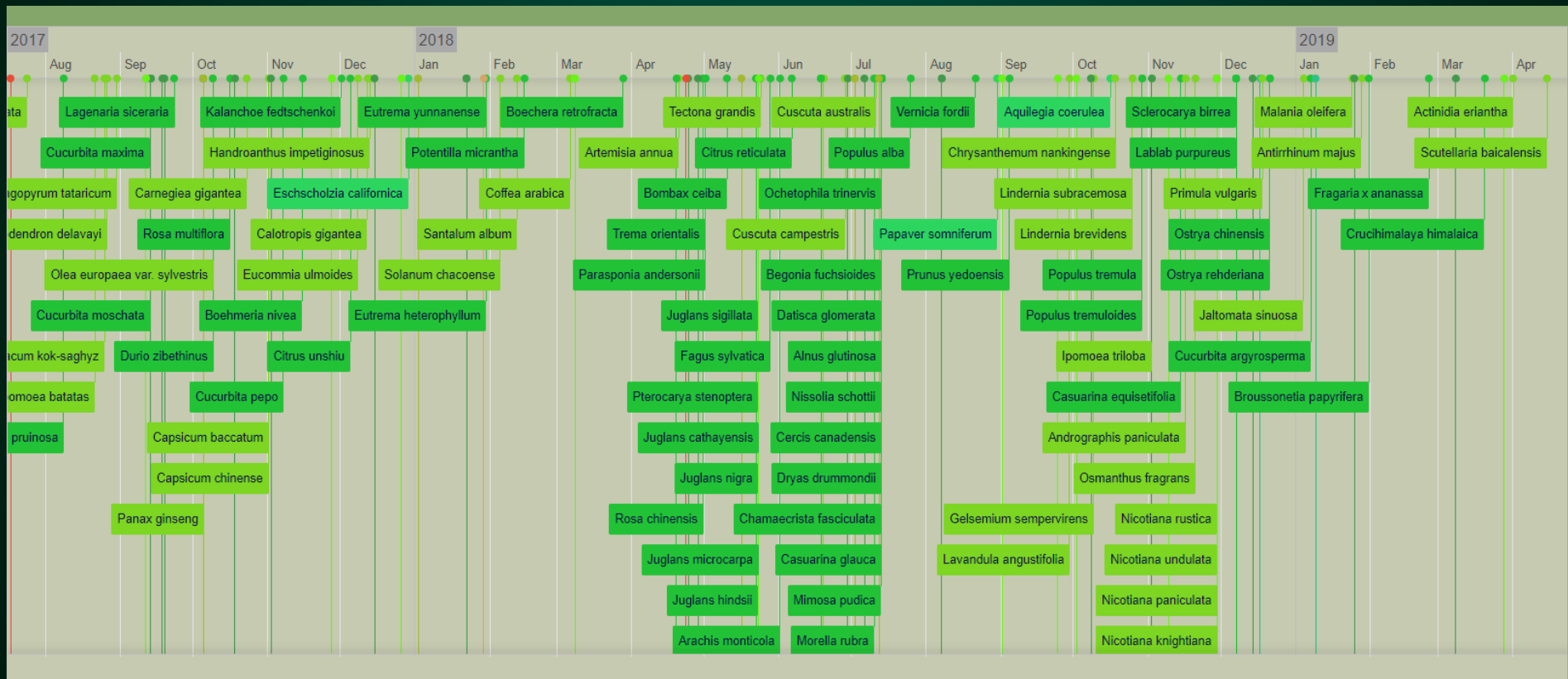
Explosión Genómica

- 236 especies de Angiospermas han sido secuenciadas!
 - (Chen et al., 2018)

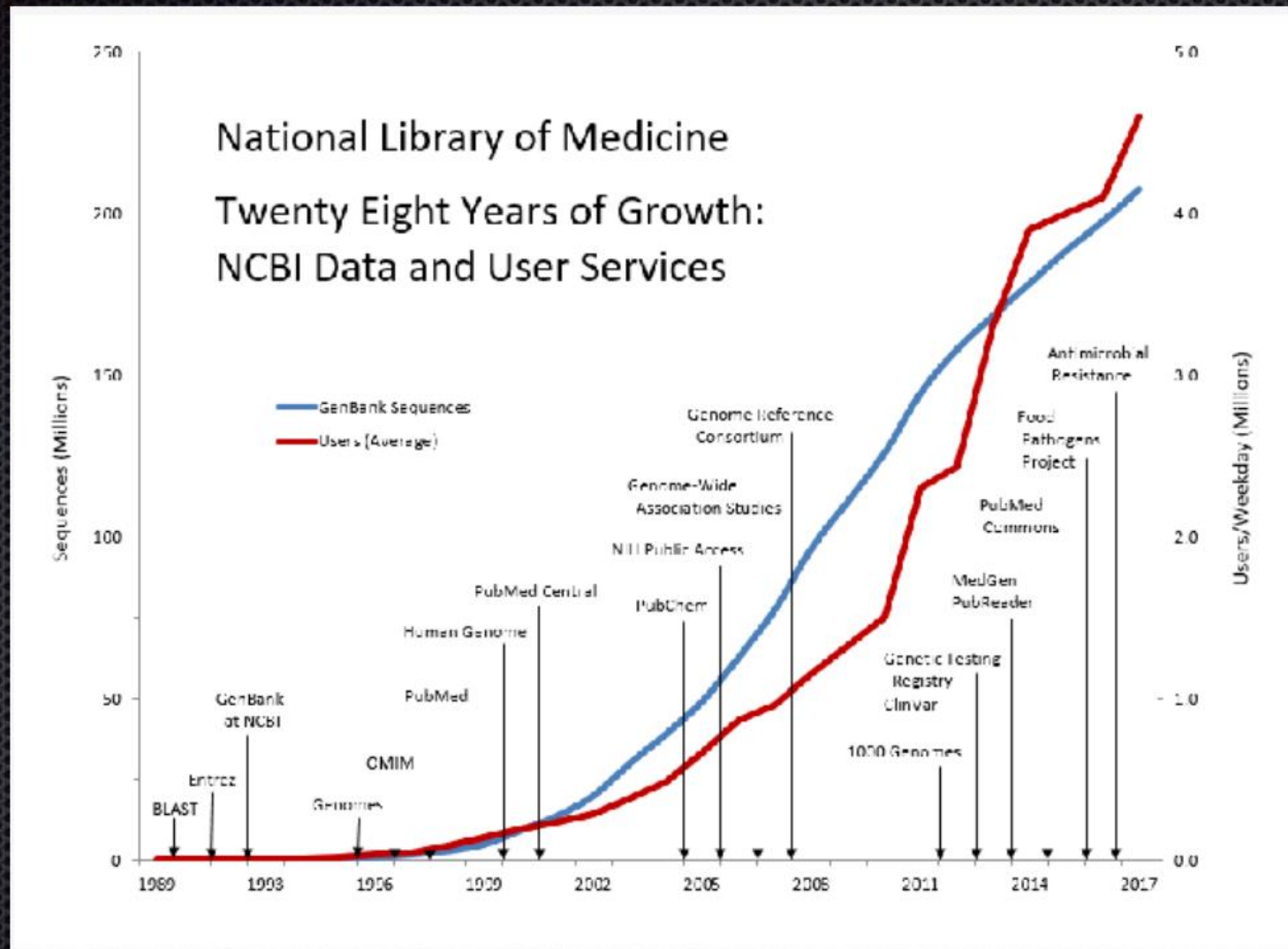
Plantas con Secuencia Genómica Disponible 2001-2019



Plantas con Secuencia Genómica Disponible 2018-2019



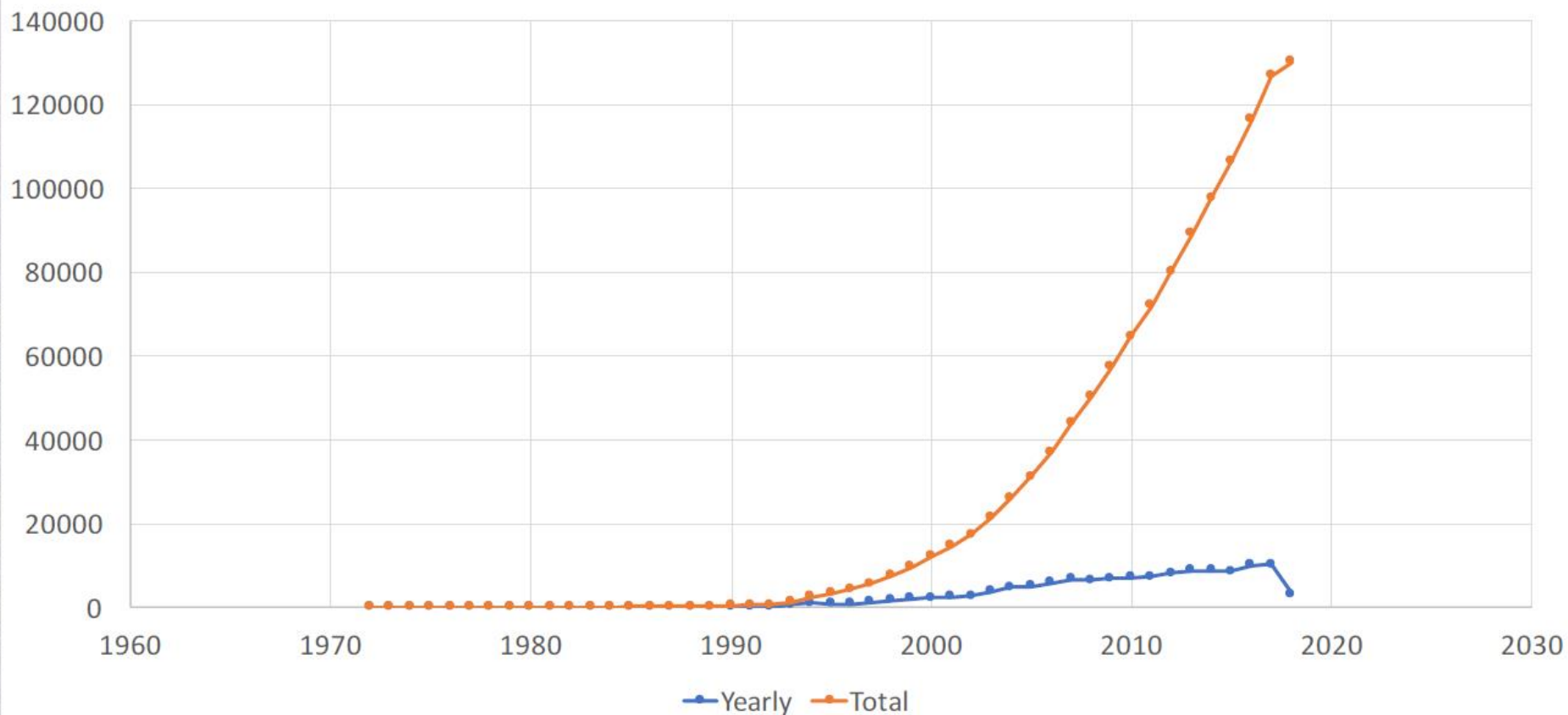
Genomic databases - GenBank - Sequences



“An annotated collection of all publicly available nucleotide and amino acid sequences”

Protein Structure Database - PDB - Proteomics

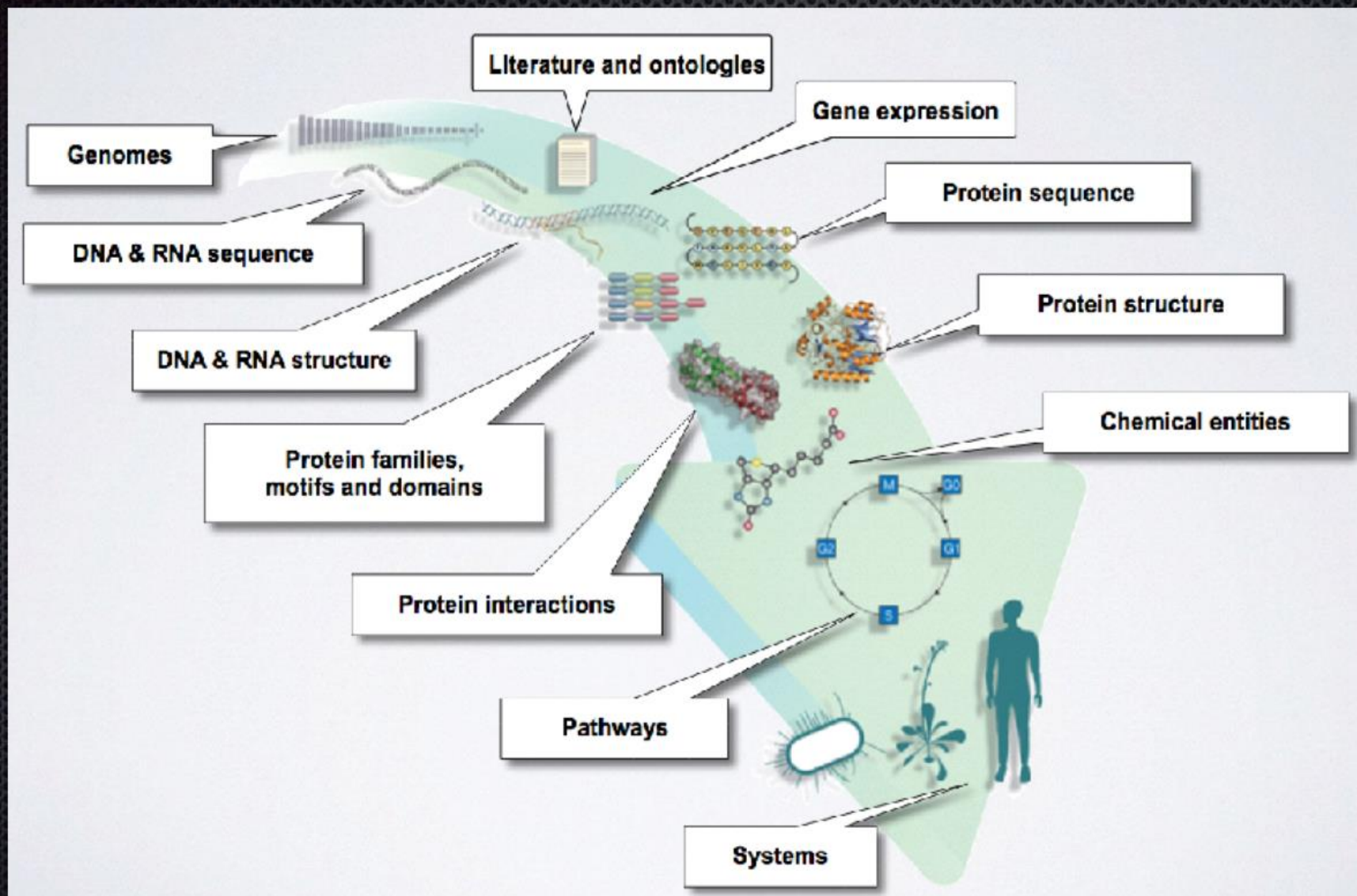
PDB - Protein Data Bank
Yearly growth of Protein Structures



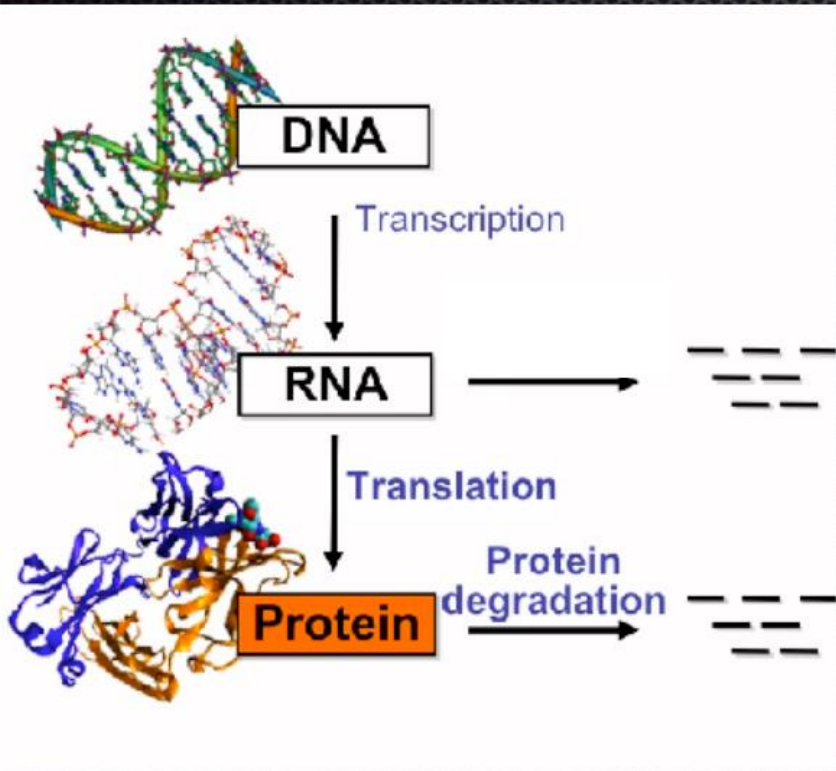
Bioinformática

- Investigación, desarrollo, o aplicación de herramientas computacionales para expandir el uso de datos biológicos incluyendo:
 - Adquisición
 - Almacenamiento
 - Organización
 - Visualización
 - Análisis

Major types of data in bioinformatics



How does a central Dogma looks like in a computer?



(Vogel 2009)

```
4  #### The Central Dogma ####
5  #####
6
7  ### Genome
8  $DNA_seq = "ATGACCCCTACTAGATCATCTATGATAGCTCAT";
9
10 ### Transcription
11 $RNA_seq = $DNA_seq;
12 $RNA_seq =~ s/T/U/gi;
13 print "$RNA_seq\n";
14
15 ### Translation
16 $position = 0;
17 while (substr $RNA_seq,$position,3) {
18     $codon = substr $RNA_seq,$position,3;
19     print translate_codon($codon);
20     $position = $position + 3;
21 }
22 sub translate_codon {
23     if ($_[0] =~ /GC./i) {return Ala;}
24     if ($_[0] =~ /UGC|UGU/i) {return Cys;}
```

(Tisdall 2001)

Nuevas Oportunidades

- Nuevas tecnologías en el campo
- Herramientas para fenotipado intensivo
 - High-throughput phenotyping
 - Speed and Fastrack Breeding (Australia y USA)
- Herramientas genómicas y bioinformáticas
 - Nuevos métodos de secuenciación genómica (GBS, Pac Bio[®], etc.)
 - Mapeo genético por asociación (GWAS, NAM, MAGIC)
 - Pan-genomics y sintenia
- Herramientas Genéticas
 - Selección genómica
 - Edición de genes
 - Plataformas integradas de mejoramiento

Agricultura Asistida por Tecnología

- Biología Molecular/DNA
- Optimización de producción:
 - Sensores (suelo, aire, agua)
 - GPS
 - Comunicación inalámbrica (WiFi)
 - Drones (UAV)
 - Biometría
 - Paquetes/software/Apps
- Automatización
- Precisión



<http://sdcorn.s3.amazonaws.com/legacy-content/sdcornblog/uploads/2012/03/Connected-Farm-Image.jpg>

High Throughput Phenotyping UAV Sensing - *Unmanned Aircraft Vehicles*

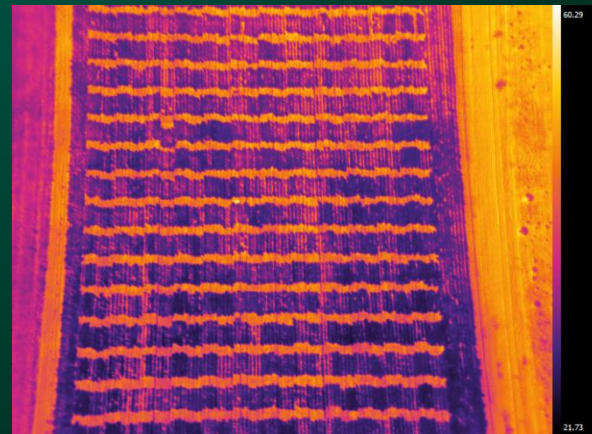
Drone Technology in Action



Drone Imagery



Phil Miklas
USDA/ARS
Prosser, WA



DSU STATE UNIVERSITY

Sindhuja Sankaran
Wash St Univ

Técnicas para desarrollar frijol con mayor resistencia al cambio climático

Porch, T.G., USDA-ARS, Mayagüez, Puerto Rico

Linares, J., USDA-ARS, Mayagüez, Puerto Rico

Hart, J., USDA-ARS, Mayagüez, Puerto Rico

Beaver, J.S., Estación Exp. Agrícola, Univ. de Puerto Rico, Mayagüez, Puerto Rico

Miklas, P.N., USDA-ARS, Prosser, Washington

Moghaddam, S.M., North Dakota State University

Rosas, J.C., Escuela Agrícola Panamericana (Zamorano), Honduras

White, J., USDA-ARS, Maricopa, Arizona

Mobile Data Collection Cart

USDA/ARS, Mayaguez, Puerto Rico



Based on design of: White and Conley. 2013. Low cost cart for proximal sensing. Photo: Isabela, PR (R. Goenaga)

Designer/Operator: Jesus Linares

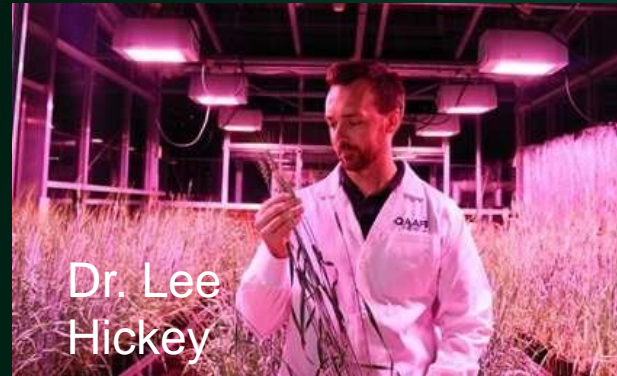


DSU NORTH DAKOTA
STATE UNIVERSITY

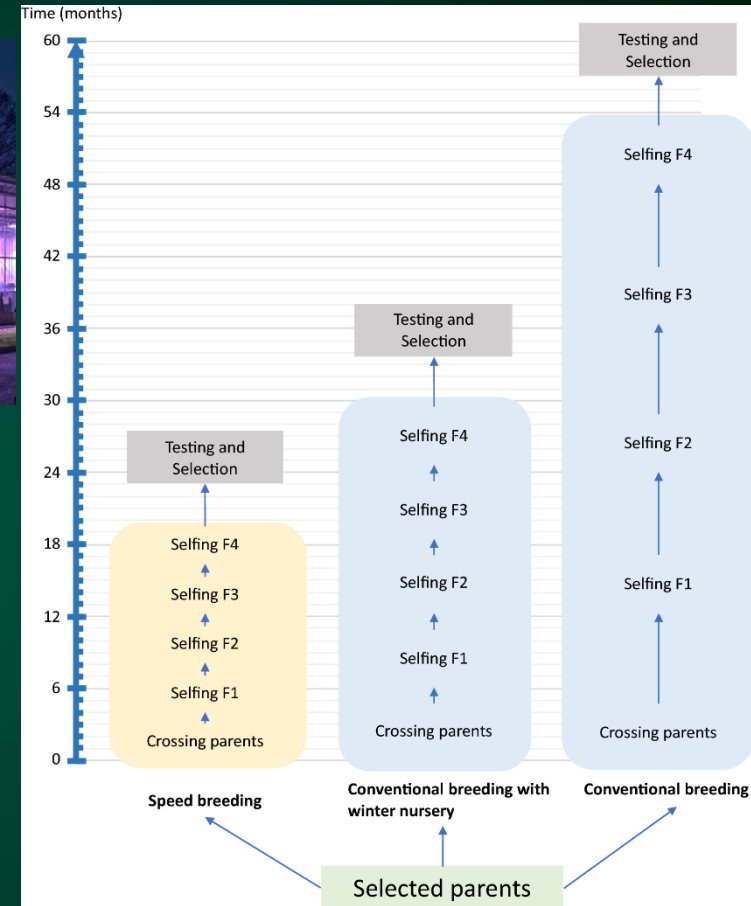
Tim Porch, USDA/Mayaguez, leader

Jesus Linares

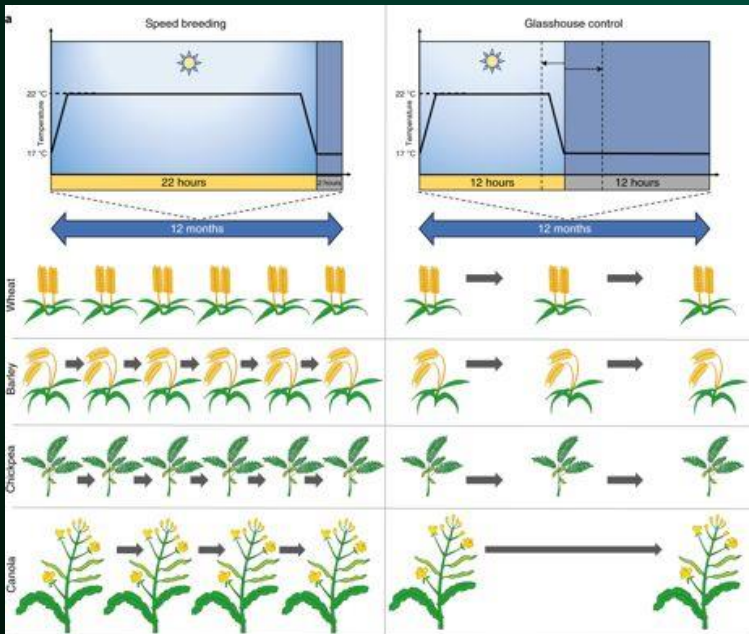
Speed Breeding - Australia



<https://www.nature.com/articles/s41477-017-0083-8?dom=pscau&src=syn>



Chiurugwi et al., 2018



USDA-ARS and UC Davis 'FASTRACK' BREEDING

A TECHNOLOGY FOR THE RAPID IMPROVEMENT OF TREE FRUIT AND
OTHER LONG-GENERATION CYCLE SPECIALTY CROPS



FRUITING TREES IN ONE YEAR !

<https://www.ars.usda.gov/ARSUserFiles/80800000/FastTrackFruitBreeding/Fast%20Track%20project%20slides%20for%20AFRS%20Website%2011%202-12-10.ppt>

Selección Genómica

Reference population: Development of prediction equations



Phenotypes
+
Thousands of SNP

Associations
between SNP and
phenotypes:
*Prediction
Equations*

*Genetic
relationships*



Thousands of SNP
+
Prediction Equations

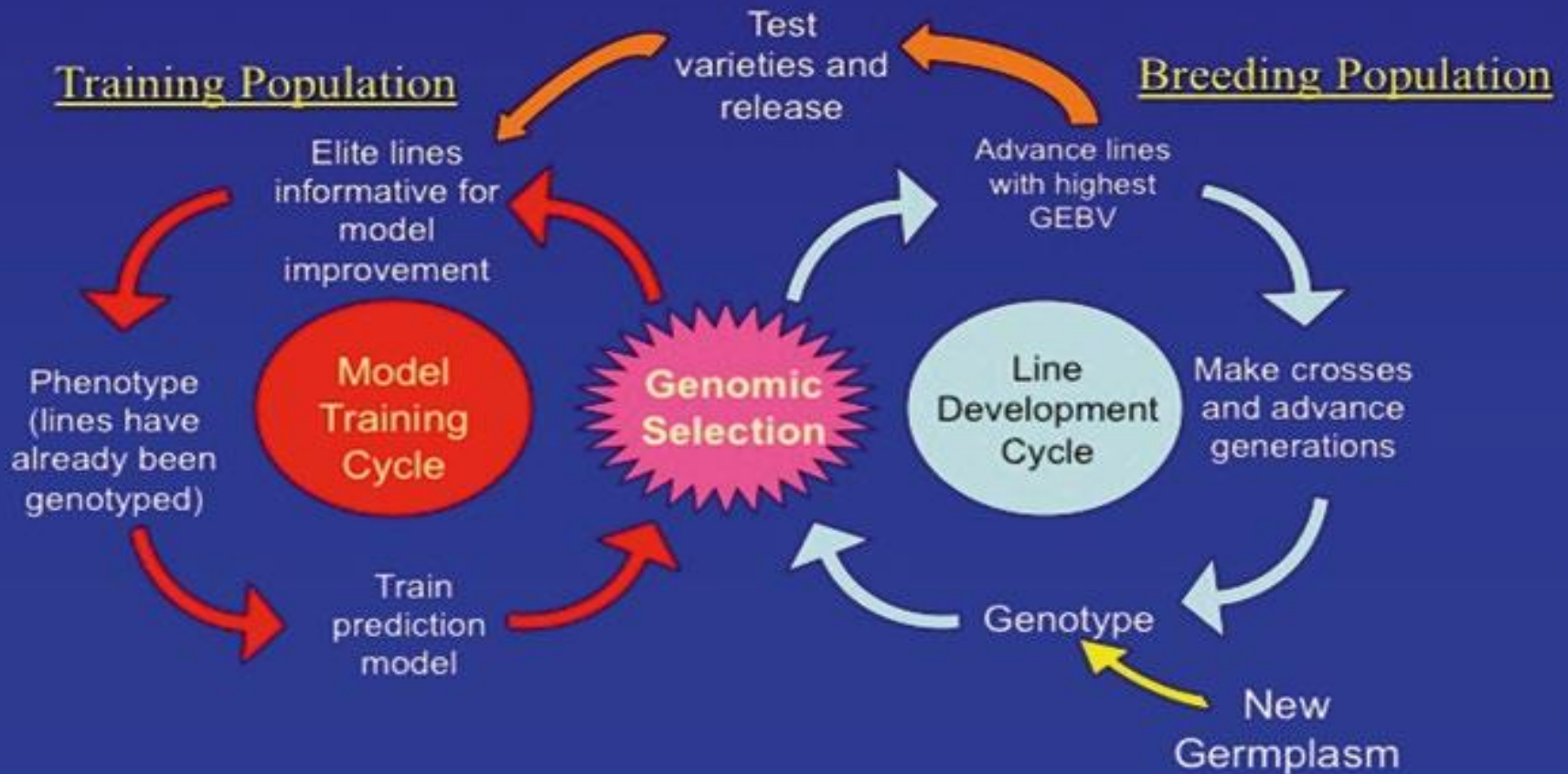
gEBV

Main population: Application of prediction equations

Selección Genómica

GS in a Plant Breeding Program

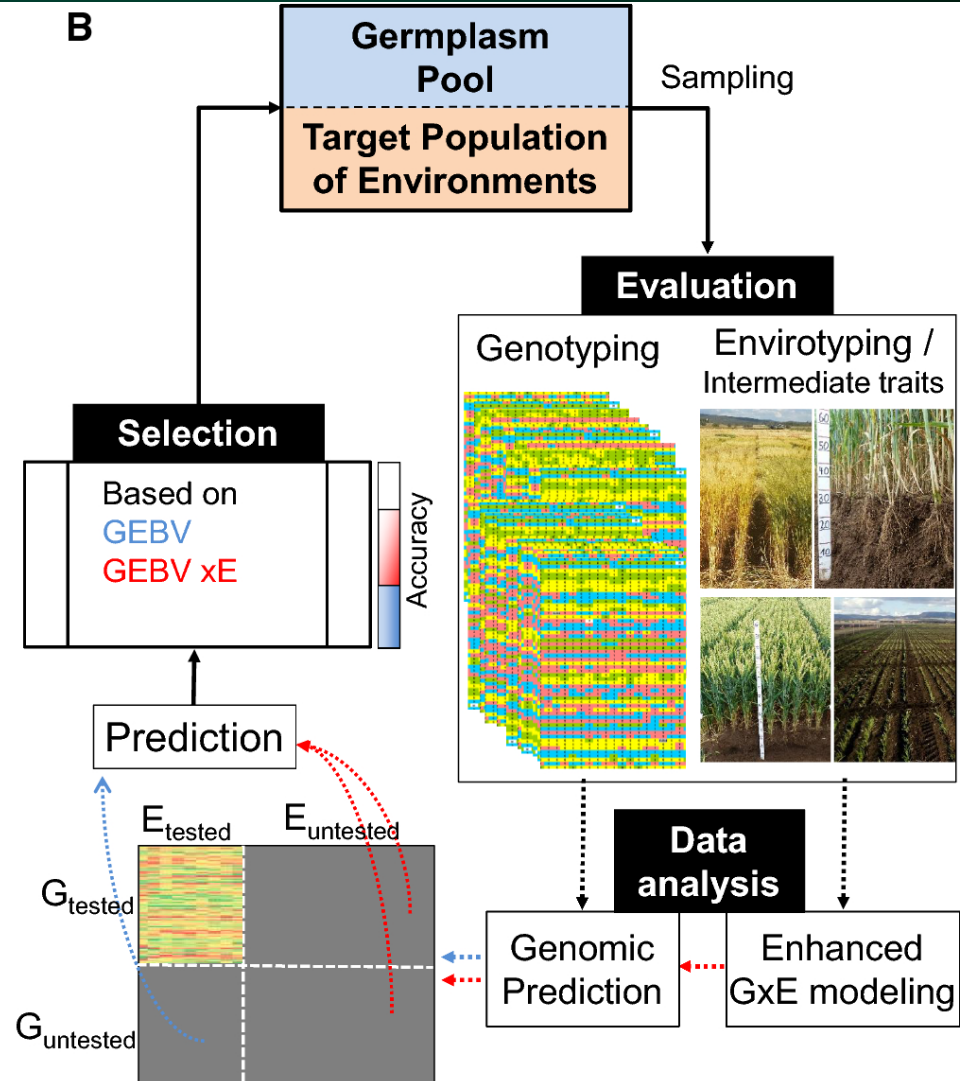
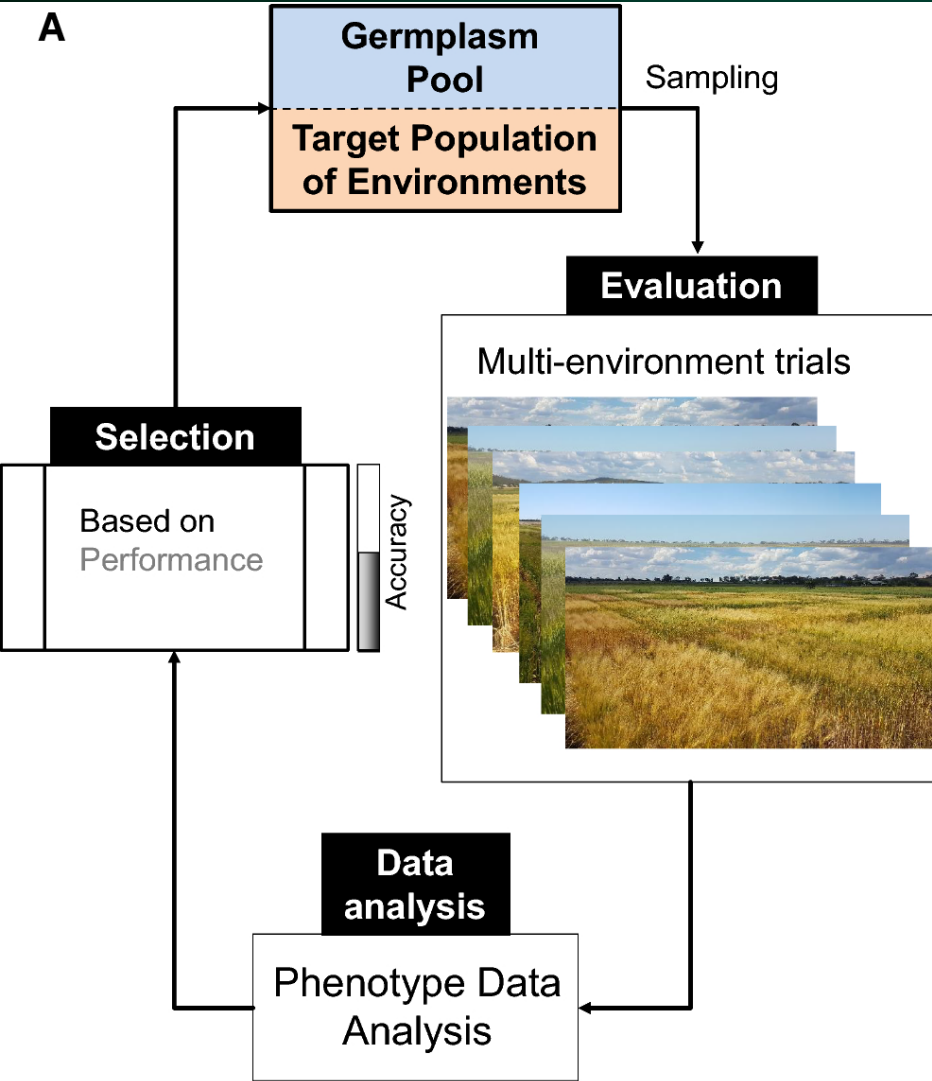
Heffner, Sorrells & Jannink. 2009. Crop Science 49:1-12



Genomic selection reduces cycle time & cost by reducing frequency of phenotyping

Programa Convencional

Programa con Selección Genómica

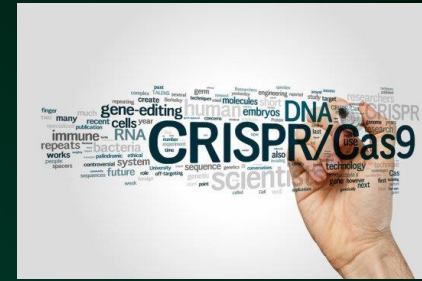


Selección Genómica

- Diferente de MAS:
 - Usa miles de marcadores simultáneamente
 - No es necesario saber la relación exacta entre carácter y marcador
- Excelentes resultados para ciertos caracteres
- Gran ventaja: permite eliminar material genético “basura”
- Modelos/algoritmos de predicción no son perfectos (~50-85%), pero siguen mejorando
- Cuidado con la relación costo-beneficio



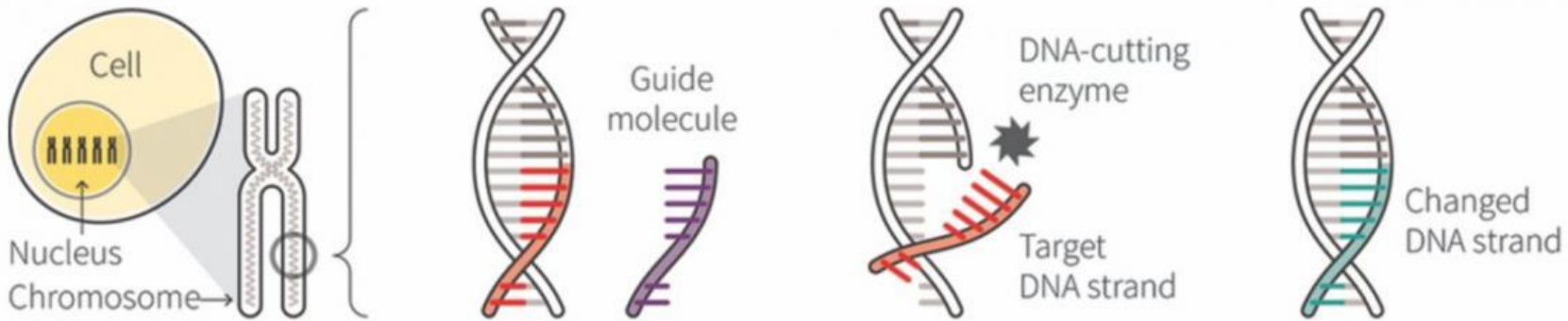
Edición de Genes





Gene editing

A DNA editing technique, called CRISPR/Cas9, works like a biological version of a word-processing programme's "find and replace" function.

HOW THE TECHNIQUE WORKS



A cell is transfected with an enzyme complex containing:

-  Guide molecule
-  DNA-cutting enzyme

A specially designed synthetic guide molecule finds the target DNA strand.

An enzyme cuts off the target DNA strand.

The amended DNA strand repairs itself.

Edición de Genes No es Nuevo! Proceso Natural en Células

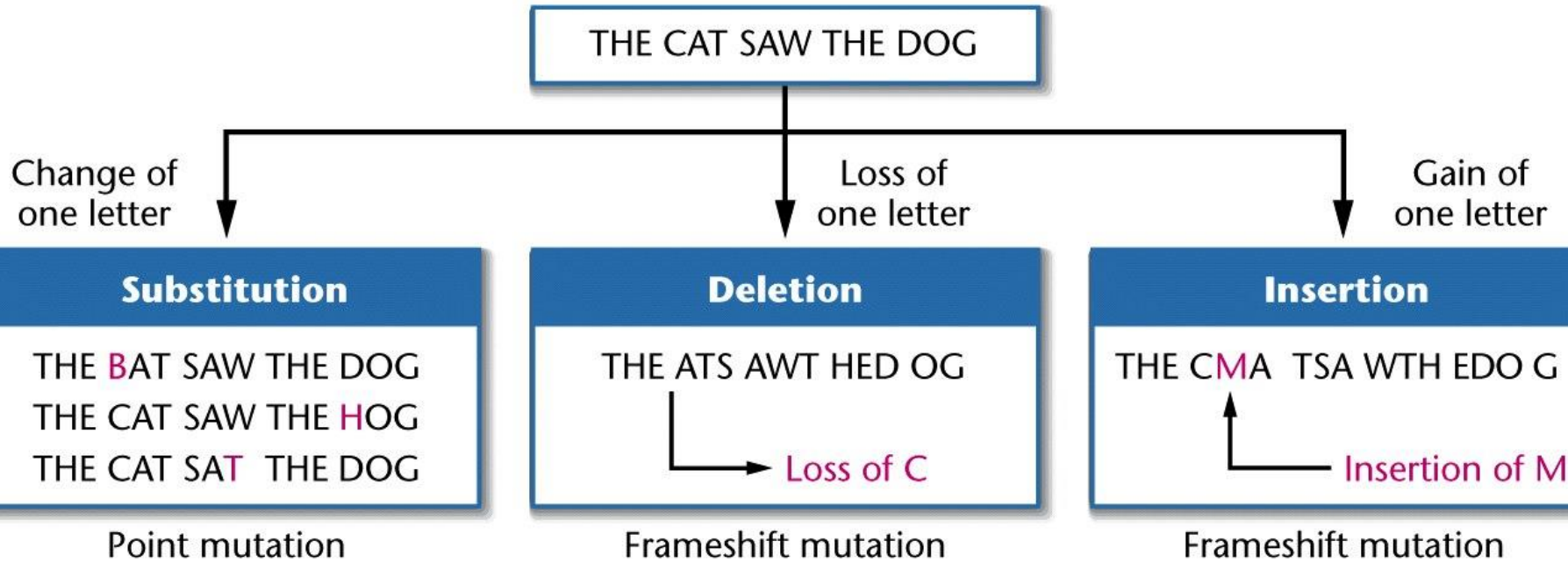


Figure 14-1 Essentials of Genetics, 6/e
© 2007 Pearson Prentice Hall, Inc.

Resultado: ganancia/perdida de función del gen

También hay cambios post-transcripción (epigenetics?):

- Regulación de expresión de un gen: cuánto producto se necesita?
- Silenciamiento por RNA de interferencia (RNAi, mRNA, etc.)
- Modificación de histonas (metil + acetyl)

Edición de Genes

- Varios métodos:
 - Nucleasas recombinantes:
 - **CRISPR/CAS9: Sistema natural en bacterias para protección contra virus**
 - Meganucleasas
 - TALEN
 - Zinc fingers
 - Sistemas virales (rAAV)
 - Transposones
 - MAGE
 - Otros?
- Ventajas:
 - No se considera transgénico? → varia por país/región
 - Alta eficiencia de transformación
- Desventajas:
 - Off-target changes: Cambios en otros sitios del genoma?
 - Cambios pueden afectar otras rutas metabólicas o niveles de expresión de otros genes?

Casos Aprobados (sin regulación) por USDA-APHIS

- A Noviembre del 2018: 22 aplicaciones para GE plantas/cultivos:
 - Papa, camelina, alfalfa, soya, maíz, arroz, tabaco, tomate, trigo, champiñón, pastos
- Recientemente: todas fueron aprobadas o des-reguladas

Table 2: Overview of organisms genetically engineered with nucleases and classified as USDA / APHIS (CBI: Confidential Business Information; PEG: polyethylene glycol (PEG)-mediated transformation method; Step 1 and Step 2: see Table 1)

Date of publication of the decision	Species	Applicant	Method	Intended trait
1 16.12.2011	Not specified	Collectis (now Calyxt)	(1) not specified (2) Meganucleases	Not specified
2 08.03.2012	Maize (corn)	Dow AgroSciences (now DowDuPont / Corteva Agriscience)	(1) not specified (2) zinc finger nuclease	Reduced phytates content
3 28.8.2014	Potato	Collectis (now Calyxt)	(1) PEG (2) TALEN	Not specified / CBI
4 05.05.2015	Soybean	Collectis (now Calyxt)	(1) CBI (2) TALEN	Changed fatty acid composition
5 20.05.2015	Soybean	Collectis (now Calyxt)	(1) CBI (2) TALEN	Changed fatty acid composition
6 22.05.2015	Rice	Iowa State University	(1) not specified (2) TALEN	Improved resistance to bacterial blight
7 12.11.2015	Maize (corn)	Agrivida	(1) CBI (2) Meganucleases	Changed starch composition
8 15.04.2016	Mushroom	Penn State University	(1) PEG (2) CRISPR	Non browning / improved storage
9 18.04.2016	Maize (corn)	DuPont Pioneer (now DowDuPont / Corteva Agriscience)	(1) 'gen canon' (2) CRISPR	Changed starch composition („waxy corn”) (no precise information, CBI)
10 15.9.2016	Potato	Calyxt	(1) PEG (2) TALEN	For improved processing (no precise information, CBI)
11 02.11.2016	Wheat	Calyxt	(1) 'gen canon' (2) TALEN	Improved resistance to powdery mildew
12 02.12.2016	Potato	Simplot	(1) <i>Agrobact. tumefaciens</i> (2) TALEN	Improved storage
13 07.4.2016	Green foxtail	Danforth Center	(1) <i>Agrobact. tumefaciens</i> (2) CRISPR	Change in timing of flowering for higher yield
14 29.8.2017	Camelina	Yield 10	(1) <i>Agrobact. tumefaciens</i> (2) CRISPR	Changed oil composition (no precise information, CBI)
15 25.9.2017	Alfalfa	Calyxt	(1) not specified (2) TALEN	For improved digestibility (no precise information, CBI)
16 16.10.2017	Soybean	USDA	(1) <i>Agrobact. tumefaciens</i> (2) CRISPR	Knock-out of two genes that are assumed to affect stress and salt tolerance
17 29.12.2017	Tobacco	Universität North Carolina	(1) <i>Agrobact. tumefaciens</i> (2) Meganucleases	Reduced nicotine content
18 16.1.2018	Maize (corn)	Pioneer (now DowDuPont / Corteva Agriscience)	(1) 'gene gun' (2) CRISPR	For improved resistance to northern leaf blight (NLB), with insertion of a repair template DNA (SDN ₂).

Date of publication of the decision	Species	Applicant	Method	Intended trait
19 20.3.2018	Wheat	Calyxt	(1) not specified (2) TALEN	For improved nutritional quality (exact gene and phenotype, CBI).
20 14.5.2018	Tomato	University of Florida	(1) <i>Agrobact. tumefaciens</i> (2) CRISPR	For easier harvesting
21 8.6.2018	Pennycress	Illinois State University	(1) <i>Agrobact. tumefaciens</i> (2) CRISPR	Changed oil composition (increased number of changed genes) (exact gene and phenotype, CBI)
22 7.9.2018	Camelina	Yield 10	(1) <i>Agrobact. tumefaciens</i> (2) CRISPR	Changed oil composition (nine target genes changed) (Exact gene and phenotype, CBI)

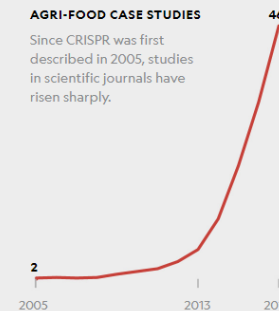
C. Then, 2019 -TestBiotech.org

The Promise of Gene Editing

The first successful application of Crispr came in 2013, and it's been driving buzz and investment ever since. It is currently the simplest, most accessible, and precise method of genetic manipulation.

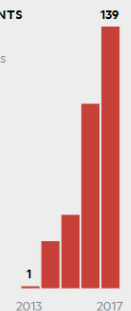
AGRI-FOOD CASE STUDIES

Since CRISPR was first described in 2005, studies in scientific journals have risen sharply.



AGRI-FOOD PATENTS

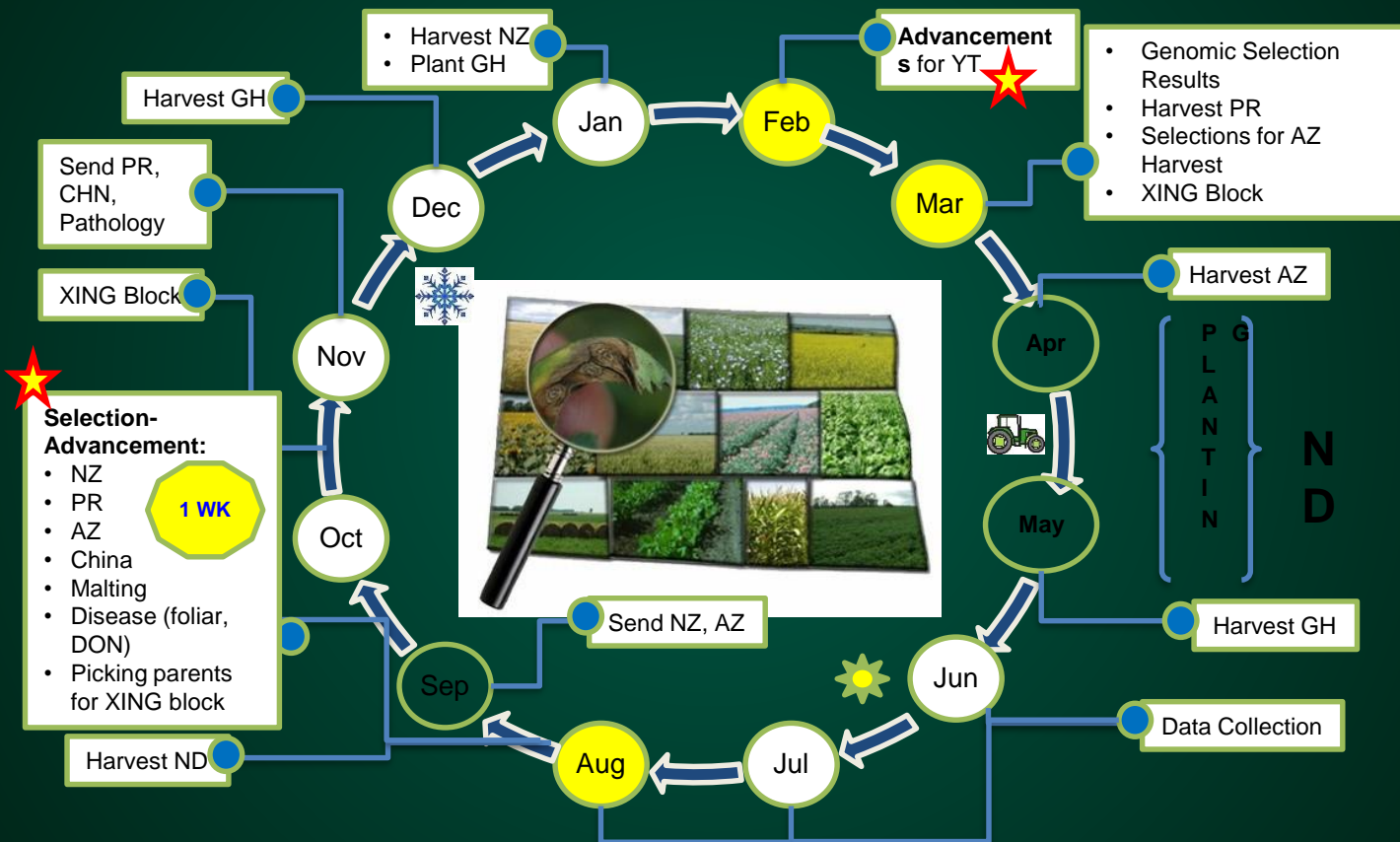
Crispr-linked development leaps with each year.



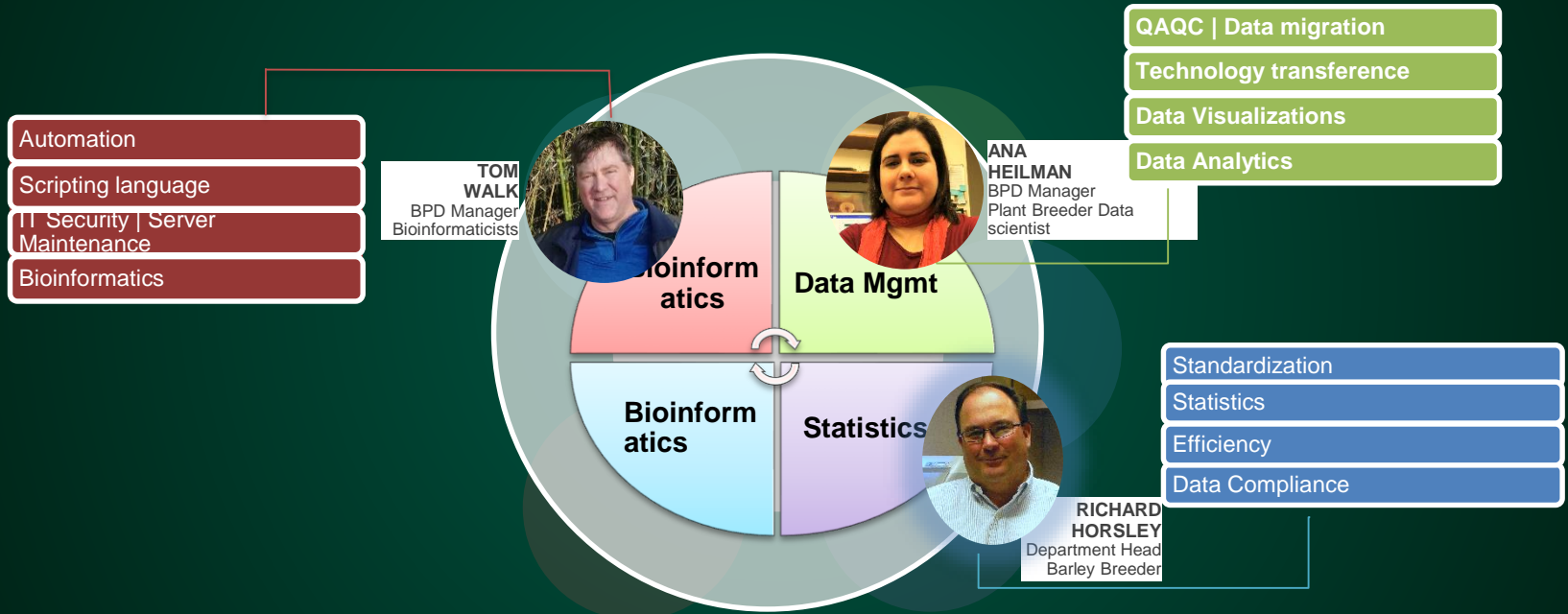
SOURCE: NICHOLAS KALAITZANDONAKES, UNIVERSITY OF MISSOURI

<https://www.nationalgeographic.com/environment/future-of-food/food-technology-gene-editing/>

Ciclo Anual de Mejoramiento



Bases de Datos de Mejoramiento “Breeding Pipeline” “Breeding Platforms”



Benefits

1

Disponibilidad de datos

Acceso en tiempo real

A través de un PC, tablet, tel
24/7

3

Análisis Integrado

Rutinas estadísticas

Randomizations, means, spatial analysis, and ANOVA stored in DB. Quickly create multiyear summary, H2H and GxE analyses

2

Almacenamiento

Automatización

Backed up daily during peak season work weeks (i.e. planting, harvesting, analyzing)

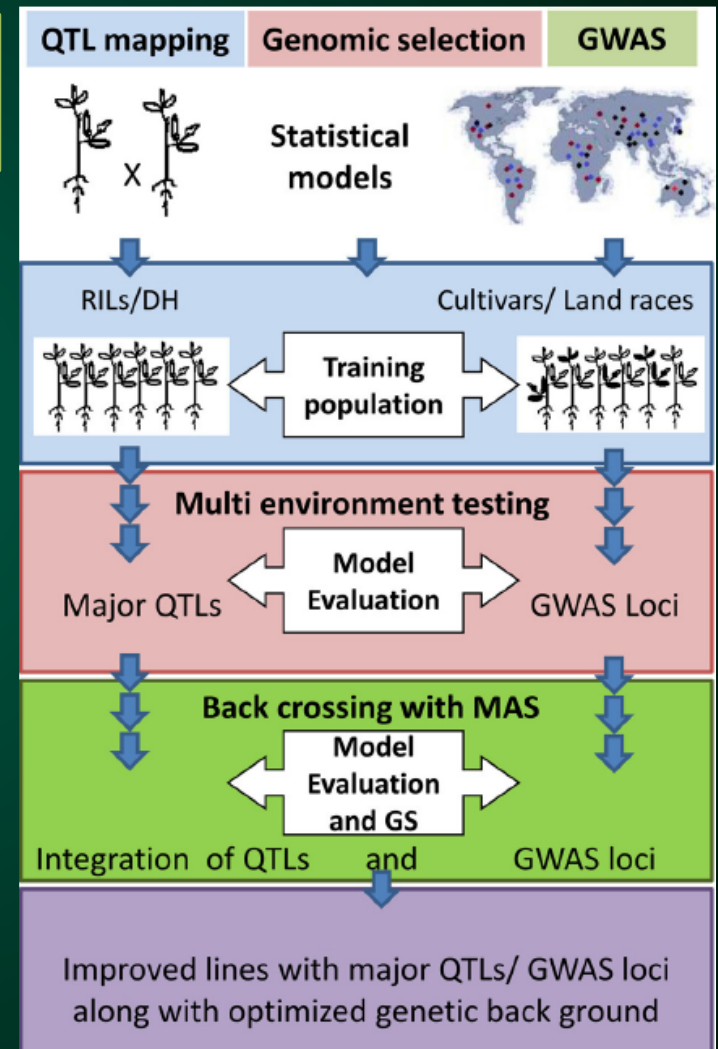
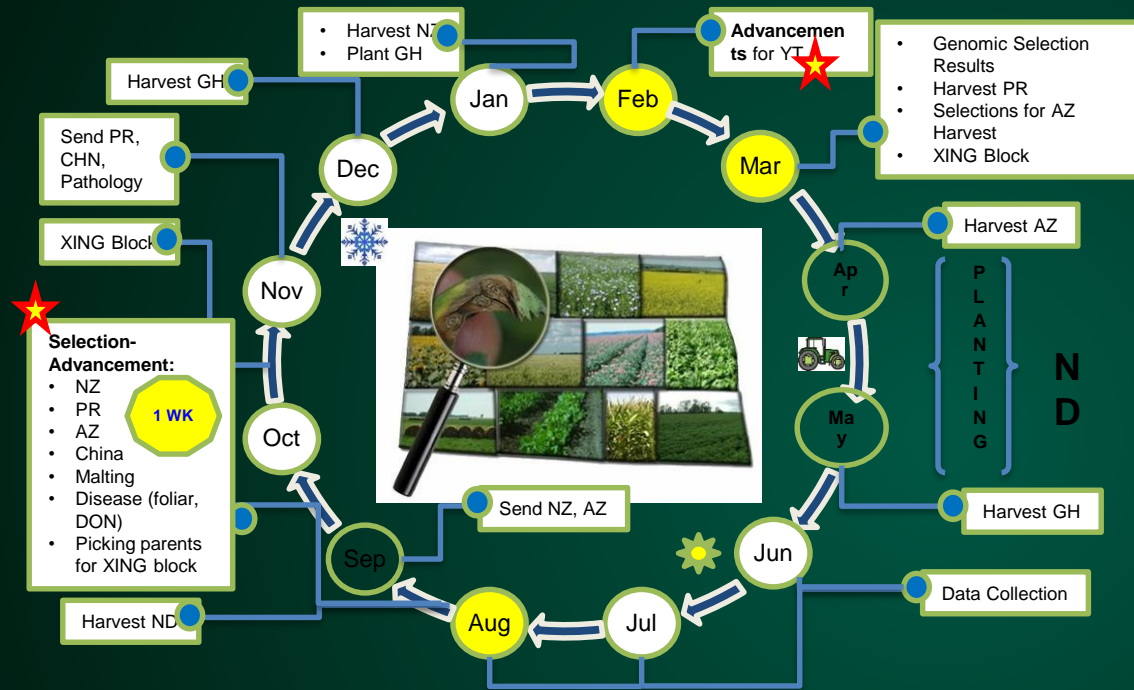
4

Planeación & visualización

Apoyo integral al programa de mejoramiento

Field layouts, labels, reports, and field books. Manage pedigrees for self-pollinated and hybrid crops.

Integrando Mejoramiento y Genética



Cuales de estas herraminetas se aplican en nuestro programa de mejoramiento en NDSU?

- Para el próximo año!

Conclusiones Generales

- Nuevas herramientas genéticas permiten ser mas eficiente y preciso
- Ningún método es perfecto
 - Herramientas integradas es la solución
- Análisis de asignación de recursos es importante
 - Relación costo/beneficio
 - Ganancia (tiempo, espacio, dinero, etc.)

Agradecimientos

- Diapositivas/Ideas:
 - Dr. Phil McClean
 - Dr. Ana M. Heilman-Morales
 - Dr. Daniel Restrepo-Montoya
- Dr. Narcizo Meza - DICTA
- Comité organizador - PCCMCA

