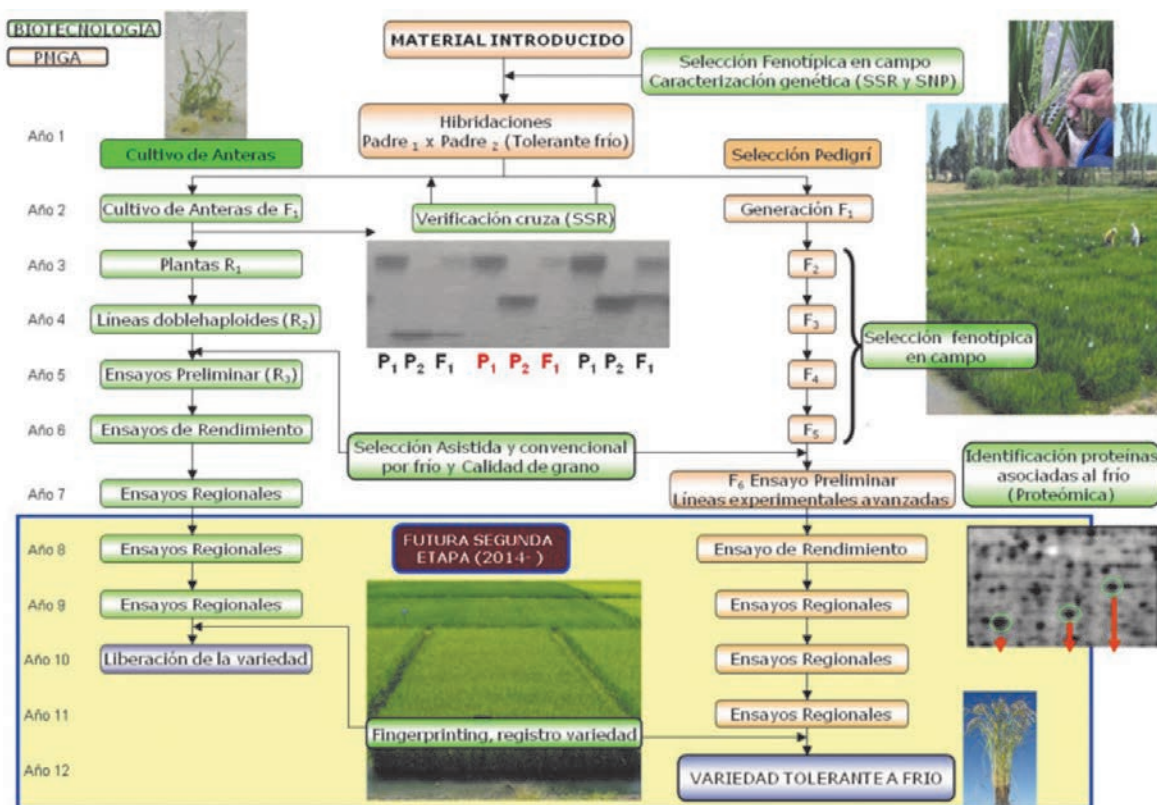


Viviana Becerra
 Mario Paredes
 Gabriel Donoso
 Carmen Rojo
 Eduardo Gutiérrez
 Uberlinda Luengo
 Fernando Saavedra

Uso de nuevas tecnologías para el desarrollo de variedades de arroces INIA

Chile es el lugar geográfico más austral del mundo donde se cultiva el arroz, situación que presenta una excelente oportunidad para desarrollar variedades tolerantes al frío. La tolerancia a frío es una característica difícil de mejorar debido a que está determinada por varios genes y presenta una fuerte influencia ambiental (característica cuantitativa). Por ello, es de suma importancia usar los nuevos conocimientos disponibles, como también usar nuevas tecnologías para obtener los objetivos planteados en el Programa de Mejoramiento de Arroz de INIA (PMGA) (Figura 1). En este sentido, las herramientas biotecnológicas pueden contribuir a la generación de nuevas variedades de arroz tolerantes a frío. Este trabajo ha sido posible al financiamiento de INIA, FONDECYT y FONDEF y las empresas Tucapel S.A, Carozzi S.A. y Basf-Chile.

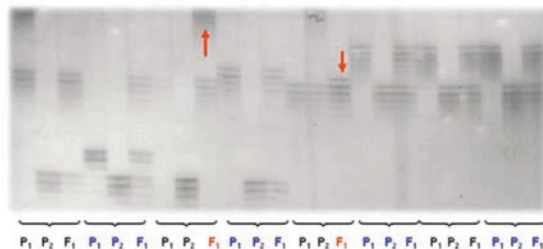


Marcadores moleculares (MM) en la caracterización genética del material genético parental y avanzado del PMGA

Desde 2010, el laboratorio de Biotecnología de INIA Quilamapu está utilizando los marcadores moleculares (MM) en el material genético del Programa de Mejoramiento Genético del Arroz (PMGA) de INIA para dar respuestas inmediatas en aspectos tales como la determinación de la diversidad genética, identificación de variedades, híbridos, progenies en cruzamientos controlados, construcción de mapas genéticos, y localización de genes de importancia económica.

Los MM (microsatélites) se están utilizando para determinar la diversidad genética del germoplasma que usa el PMGA, y también para identificar (“fingerprinting”) las variedades comerciales de arroz. Los niveles de diversidad genética hasta ahora detectados, indican la necesidad de ampliar la base genética del programa para obtener genotipos superiores, mejorar su eficiencia y la capacidad de obtener nuevas variedades.

Una segunda aplicación de los MM en el PMGA ha sido el análisis del material usado como progenitores y el producto de la cruce de éstos, como son las generaciones filiales desde el F1 al F5 e incluso hasta la liberación de la variedad. El conocer genéticamente el germoplasma, facilita la selección de los progenitores que van a ser cruzados para maximizar la ganancia genética. También ha sido posible detectar niveles de errores que pueden ocurrir en cualquiera de las generaciones de selección, a modo de ejemplo, la Figura 1 muestra los dos padres (P1 y P2) y el F1



(hijo), correspondientes de ocho cruces. Este proceso permite complementar la selección fenotípica que se realiza en las principales generaciones y ayuda a descartar el material genéticamente mal identificado, ahorrando recursos por la eliminación temprana de este material mal clasificado (Figura 2).

Selección asistida utilizando marcadores moleculares para tolerancia a frío (MAS)

Diversos estudios genéticos han detectado la existencia de 40 marcadores moleculares asociados a tolerancia a frío en la etapa vegetativa y reproductiva de arroz. Esta información fue utilizada para evaluar el material genético del PMGA y sólo dos de estos marcadores podrían ser utilizados para realizar selección asistida de material tolerante a frío en la etapa reproductiva. Ello indica la necesidad que existe en identificar marcadores asociados a uno de los principales problemas para el arroz, en poblaciones de este cultivo que se han adaptado a las condiciones de nuestro país. La selección asistida en los estados tempranos y reproductivos del desarrollo permitirá complementar la selección fenotípica utilizada en el sistema convencional y acelerar el proceso de desarrollo de variedades.

Por otro lado, se ha realizado también la selección asistida por marcadores moleculares en el proceso de desarrollo de variedades Clearfield, en este caso en líneas experimentales Zafiro-Clearfield, para la detección de plantas que contienen genes de resistencia a las imidizolinonas. Después de cada retrocruza, se aplica herbicida para detectar las plantas resistentes y luego se confirma la presencia de los genes mediante marcadores moleculares (Figura 3).

Figura 2. Certificación de generación F1, en relación a sus padres genéticamente identificados (P1 y P2). Genotipos F1 en rojo no corresponden a hijos, hubo contaminación de polen, por lo cual son eliminados del programa.

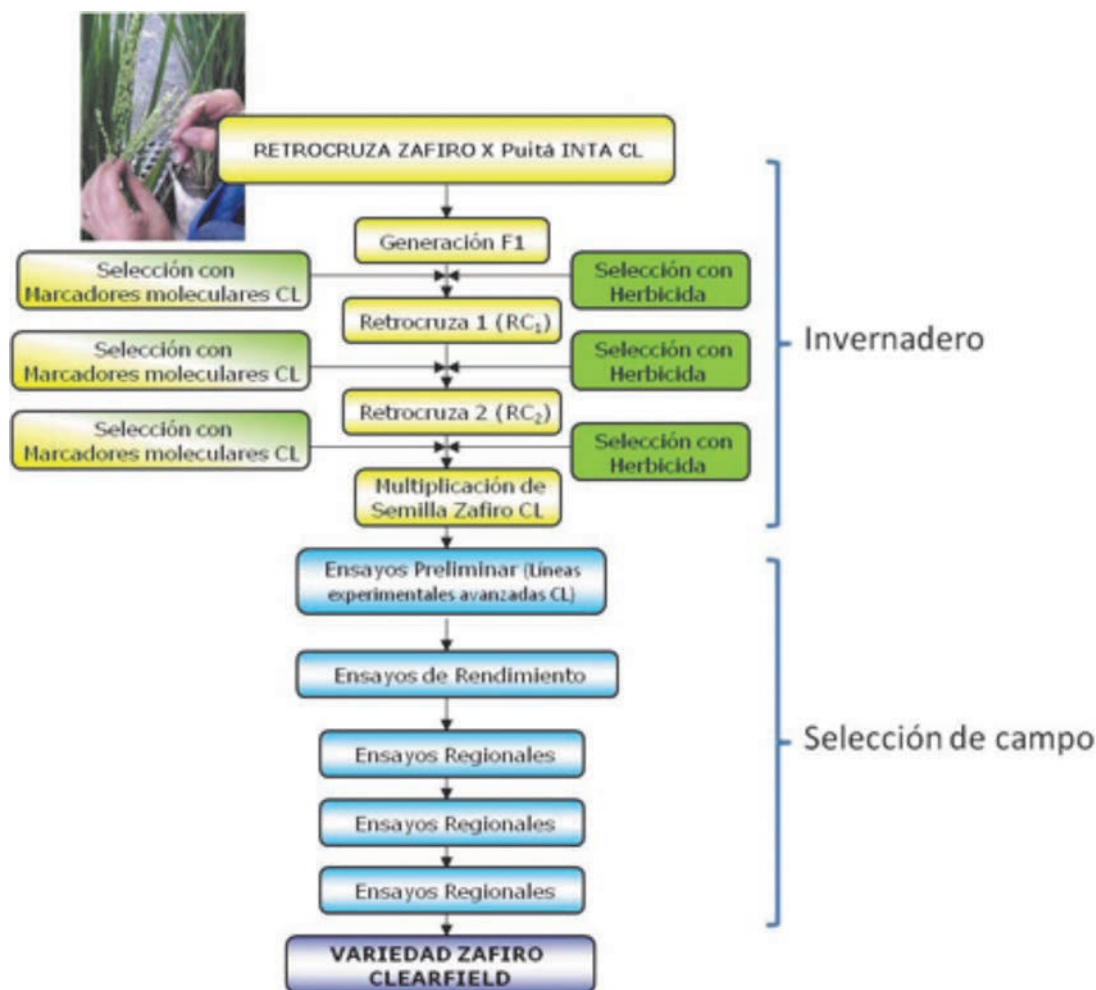


Figura 3. Desarrollo de líneas experimentales avanzadas tolerante a frío y resistente a herbicidas de la familia de las imidazolinonas.

Marcadores moleculares de última generación

El desarrollo de diferentes tipos de marcadores moleculares ha sido muy prolífico en los últimos años, dentro de los cuales se destacan los marcadores polimórficos de un nucleótido único (SNP). Este tipo de marcadores genéticos han sido utilizados en diferentes procesos en los programas de mejoramiento genético como son: caracterización de germoplasma, selección asistida, mapeo asociativo, análisis de pedigrí, prueba de pureza de semilla e identificación varietal, entre otros.

A nivel mundial, estos marcadores están reemplazando los SSR debido a su mayor abundancia, herencia co-dominante, estabilidad, factibilidad de automatización y eficiencia en su costo. Debido a estas características los SNPs son de gran utilidad para diferenciar germoplasma que tiene un alto grado de parentesco genético, situación común en varias especies cultivadas.

En este sentido, parte del germoplasma del PGMA de INIA está siendo analizado, utilizando SNPs, en colaboración con la Empresa Brasileña de Investigación Agropecuaria (EMBRAPA).

Cultivo de Anteras para el avance de generaciones

El método de pedigrí es el sistema convencional más utilizado en los PMGAs en el mundo y también en INIA. Básicamente, este método considera la selección de plantas individuales desde la generación F2 en adelante, lo que implica mantener una detallada información de las líneas seleccionadas en cada generación filial. Las líneas seleccionadas (F5 en adelante) que cumplen con los objetivos del PGM son evaluadas posteriormente en ensayos preliminares, y de rendimiento. Finalmente, las líneas experimentales seleccionadas en los ensayos de rendimiento son evaluadas en ensayos regionales en varias localidades para evaluar su adaptación a diferentes ambientes e identificar una posible candidata a variedad. Por lo tanto, la liberación de una variedad toma aproximadamente 14 años (Cuadro 1).

Una alternativa para acortar este tiempo es la posibilidad de usar el Cultivo de Anteras. Esta tecnología se refiere al cultivo de microesporas -polen inmaduro, haploides- en un medio nutritivo con el propósito de regenerar plántulas dihaploides, que son completamente homocigotas. De este modo, la técnica de cultivo de anteras permite obtener líneas homocigotas en un año, a partir del uso de anteras provenientes de plantas F1 lo que permite reducir el tiempo en la obtención de variedades (Cuadro 1).

Actualmente, en el laboratorio de Biotecnología de INIA Quilmapu se está usando esta tecnología para acelerar el proceso de obtención y liberación de variedades de arroz (Figura 4). En el tercer año del uso de esta técnica se están evaluando 11 líneas experimentales en Ensayos Regionales.

Proteómica en arroz

En el país se han desarrollado por casi 50 años, variedades de arroz que se han adaptado a condiciones frías. Es por ello, que es de gran interés estudiar los mecanismos asociados a su tolerancia. Actualmente, existen diversas herramientas para determinar estos mecanismos, uno de ellos es la proteómica mediante la cual se detectan proteínas (Figura 5) que responden al estrés y sus modificaciones postraduccionales. Por ello, el enfoque principal de nuestra investigación es encontrar proteínas que estén relacionadas con la tolerancia al frío en la etapa vegetativa (germinación y plántula) y en la etapa reproductiva. Para lograr este objetivo se está comparando el perfil de proteínas de variedades nacionales de conocida tolerancia al frío y de variedades testigos extranjeras de conocida susceptibilidad al frío.



Figura 4. Cultivo de anteras para la producción de plantas dihaploides en arroz.

El PMGA tiene por objetivo desarrollar variedades de alto potencial de rendimiento, buena calidad, adecuada precocidad, altura de planta, entre otras. Por lo tanto, el entender las bases genéticas de estas u otras características agronómicas es un desafío constante en el proceso de mejoramiento genético de los cultivos, incluido el arroz.

La tecnología mayormente usada en plantas para detectar los genes o marcadores genéticos (QTLs) asociados a características complejas, ha sido el mapa de ligamiento, usando poblaciones bi-parentales. Uno de los objetivos de mapeo de QTL es identificar la asociación de una característica con un marcador que se pueda utilizar para la selección asistida, dentro de un programa de mejoramiento. Aunque muchos QTLs han sido detectados mediante esta tecnología, muy

pocos han sido incorporados en los procesos de selección de los PMG, debido a la falta de masividad del uso de esta tecnología, entre otras razones.

Una alternativa a esta tecnología son los estudios de asociación de todo el genoma (GWAS, por su sigla en inglés), basada en el desequilibrio de ligamiento (LD). Mediante este procedimiento es posible identificar marcadores que están distribuidos en todo el genoma de la planta asociados a características agronómicas, u otras de interés, para posteriormente usarlos en selección asistida (MAS). El Programa de Biotecnología de INIA Quilamapu espera usar esta tecnología en el breve plazo, para el estudio del germoplasma de arroz y detectar posibles asociaciones con características agronómicas de interés en el PGMA.

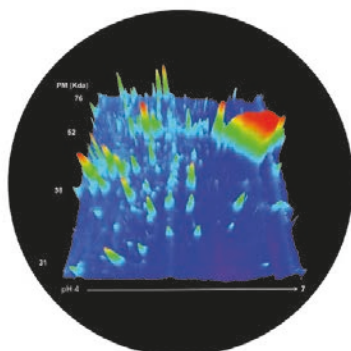


Figura 5. Visualización virtual 3D de las manchas correspondientes a las proteínas teñidas en un gel de poliacrilamida bidimensional. El color rojo indica alta cantidad de proteína, color azul representan baja cantidad de proteína.

	Biotecnología	PMGA
Ciclo/Año	Cultivo de Anteras	Pedigrí
Año 1		Hibridaciones
Año 2		Generación F1
Año 3	Plantas R1	F2
Año 4	Líneas doble haploides (R2)	F3
Año 5	Ensayo Preliminar de Rendimiento (R3)	F4
Año 6	Ensayos de Rendimiento	F5
Año 7	Ensayos de Rendimiento	F6
Año 8	Ensayos Regionales	Ensayos Preliminar de Rendimiento
Año 9	Ensayos Regionales	Ensayos de rendimiento
Año 10	Ensayos Regionales	Ensayos de rendimiento
Año 11	Liberación de la variedad	Ensayos Regionales
Año 12		Ensayos Regionales
Año 13		Ensayos Regionales
Año 14		Liberación de la variedad

Cuadro 1. Cuadro comparativo del avance de generaciones entre Cultivo de Anteras y el método de Pedigrí.