



“Selección asistida por marcadores moleculares para tolerancia al frío del arroz en el cono sur latinoamericano; una estrategia para enfrentar la inestabilidad climática”



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Tabla de Contenido

1	INTRODUCCIÓN:.....	3
2	RESUMEN EJECUTIVO:.....	3
3	FIN, META :.....	5
4	OBJETIVOS.....	5
4.1	Objetivo general.....	5
4.2	Objetivos específicos.....	5
5	ACTIVIDADES.....	5
5.1	Capacitación y Estandarización.....	6
5.2	Desarrollo de poblaciones, evaluaciones fenotípicas y genotípicas.....	6
5.2.1	Desarrollo de poblaciones.....	6
5.2.2	Evaluación Fenotípica de Tolerancia al frío.....	7
5.2.3	Evaluación Genotípica.....	7
5.3	Relación fenotipado y genotipado en las poblaciones BC ₂ F ₂ y BC ₂ F ₃	10
5.4	Actividades desarrolladas por INTA, INIA e IRGA.....	11
5.5	Divulgación.....	12
6	RESULTADOS:.....	12
6.1	Germoplasma:.....	12
6.2	Fenotipado:.....	12
6.3	Genotipado.....	14
6.3.1	Selección de BC ₁ F ₁	15
6.3.2	Selección de BC ₂ F ₁	15
6.3.3	Selección de F1 derivadas de Norin PL 8 y Norin PL11.....	16
6.4	Relación Fenotipado- Genotipado en BC ₂ F ₂ y BC ₂ F ₃	17
6.4.1	BC ₂ F ₂	17
6.4.2	BC ₂ F ₃	20
6.5	Actividades de los socios.....	28
7	CONCLUSIONES:.....	30
8	LECCIONES APRENDIDAS:.....	31
9	PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES:.....	31
10	REFERENCIAS:.....	33
11	ANEXOS.....	34



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

“Selección asistida por marcadores moleculares para tolerancia al frío del arroz en el cono sur latinoamericano; una estrategia para enfrentar la inestabilidad climática”

1 INTRODUCCIÓN:

Se estima que el frío causa daño en siete millones de hectáreas de arroz al año en el mundo (Kariya, 2003). En el cono sur de América Latina hay 1,4 millones de hectáreas potencialmente afectadas. Los estudios sobre cambio climático indican que este factor será cada vez más variable, impredecible y extremo. Los arroceros de la región cuentan con variedades de buena calidad y buen rendimiento pero con baja tolerancia al frío.

El propósito del proyecto fue la incorporación de la Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAM) para tolerancia al frío, en los programas de fitomejoramiento de la región para generar germoplasma tolerante en menor tiempo.

El proyecto inició en junio de 2009 y finalizó en junio de 2013; el consorcio estuvo conformado por: El Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), EL Fondo Latinoamericano para Arroz de Riego (FLAR), el Instituto de Tecnología Agropecuaria (INTA- Argentina), el Instituto Nacional de Investigación Agropecuaria (INIA-Uruguay) y con recursos propios, el Instituto Riograndense do Arroz Irrigado (IRGA-Brasil). El consorcio contó con la colaboración de El “National Agricultural Research Center of Hokkaido (NARO/HARC)”, de Japón.

La estrategia de incorporar la selección asistida por marcadores moleculares en el esquema de mejoramiento por tolerancia al frío en floración del arroz permite evaluar mayor número de poblaciones, reducir el tiempo e incrementar las posibilidades de incorporar esta tolerancia en germoplasma de interés.

2 RESUMEN EJECUTIVO:

En el Cono Sur de América Latina se cultivan cerca de 1,4 millones de hectáreas de arroz que son potencialmente afectadas por bajas temperaturas. Rio Grande do Sul, Brasil, cuenta con un millón de hectáreas de arroz, responsables del 60% del total de la producción del país (7 millones de toneladas). En Argentina se siembran aproximadamente 200 mil hectáreas (1,2 millones de toneladas), similar a Uruguay (1,4 millones de toneladas). En Chile se cultivan cerca de 30 mil hectáreas.

Los modelos climáticos del 4^o Assessment del IPCC para esta región reportan un aumento moderado de la temperatura a 2050, con incrementos mucho menor que en otras partes de América Latina y el mundo. Con relación a las temperaturas mínimas medias que son las más importantes para el arroz, se estima un leve incremento a través de todo el año de solo 1.2 °C (comparado con un promedio mundial de >5 °C). Los modelos estiman también un aumento de la variabilidad en este factor, lo que posibilita la ocurrencia de eventos más extremos. En cualquier escenario seguirá siendo necesario mantener buena tolerancia al frío en las



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

variedades de arroz para esta región y es factible que estos cambios permitan mover la frontera arrocerá hacia el Sur con variedades tolerantes.

Los programas de mejoramiento en la región hacen selección por tolerancia al frío en diferentes estados fenológicos. Generalmente, lo hacen por exposición del germoplasma a condiciones naturales, una metodología que funciona pero es costosa y lenta. La incorporación de la selección asistida por marcadores moleculares (SAM), permitiría una mayor eficacia en la selección por tolerancia al frío y reduciría sustancialmente el tiempo necesario para la obtención de materiales que combinen rendimiento, calidad y tolerancia al frío.

El proyecto, inició en el 2009 con la capacitación de cinco funcionarios del consorcio durante tres meses en el National Agricultural Research Center of Hokkaido (NARO/HARC), sobre fenotipado y genotipado por tolerancia al frío del arroz en etapa reproductiva.

Después de la capacitación y en cada una de las sedes, los funcionarios del consorcio realizaron actividades relacionadas con la validación de los protocolos en los respectivos laboratorios; el proceso contó con la continua colaboración de funcionarios NARO/HARC y una visita técnica de uno de sus funcionarios al CIAT-FLAR en Colombia y al INIA-Uruguay en el año 2012.

Los miembros del consorcio realizaron trabajos específicos de validación de las metodologías e investigación de acuerdo con el interés prioritario en el país; así el INTA-Argentina, trabajó en la tolerancia al frío en estado de plántula. Ellos, en trabajo conjunto con la Universidad de Mar del Plata, desarrollaron un marcador que permitió distinguir a los individuos que portan el SNP (Single Nucleotide Polymorphism) de los que no lo tienen (Tabone, *et al.*, 2009). En el trabajo de Argentina, se realizaron algunas modificaciones a la técnica de amplificación y diseñaron iniciadores específicos que permiten separar a los individuos tolerantes (presencia de banda) de los susceptibles (ausencia de banda). Del total de los genotipos analizados, 21 genotipos presentaron banda. Posteriormente, realizaron evaluaciones en condiciones de campo en siembra temprana y siembra oportuna e identificaron germoplasma con una buena respuesta en siembras tempranas.

El INIA-Uruguay realizó ensayos enfocados en evaluar y seleccionar germoplasma con respuesta al frío en etapa de floración; las condiciones extremas de baja temperatura que se presentaron en el año 2012 evitaron la confirmación de los resultados, debido a que no permitieron la producción de grano incluso en los donantes de la tolerancia al frío.

En cuanto a capacitación y divulgación, se realizaron presentaciones en diferentes ámbitos a través de seminarios, pósters y artículos en diferentes países como: Vietnam, México, Brasil, Uruguay, Colombia y Argentina

Los resultados más sobresalientes fueron la identificación cuatro marcadores que permiten hacer selección por tolerancia al frío en floración. La implementación de la selección asistida en el programa de mejoramiento para tolerancia al frío. La identificación de 15 genotipos provenientes de Chile y Uruguay que superan, en tolerancia al frío en etapa reproductiva, la



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

respuesta de los testigos tolerantes. El incremento en la capacidad de evaluación fenotípica. La incorporación de tolerancia al frío en la variedad IRGA 424 y doce publicaciones.

El impacto del proyecto se verá a largo plazo, al mejorar y acelerar la capacidad de estos programas para liberar variedades de alto rendimiento y con tolerancia al frío, las cuales en función de las tendencias del cambio climático, no solo serán necesarias en las regiones actuales de producción sino que permitirán la expansión del área hacia el sur. Esto beneficiará la producción arroceras nacional, asegurará el abastecimiento interno y colaborará con la seguridad alimentaria mundial por tratarse de una región que exporta sus excedentes.

3 FIN, META U OBJETIVO DEL PROYECTO:

Asegurar la estabilidad y sostenibilidad productiva de los arroceros de Argentina, Uruguay y sur de Brasil frente a los posibles impactos del cambio climático, mediante la liberación de variedades tolerantes al frío, alto potencial de rendimiento y de alta calidad, asegurando la oferta alimenticia regional e internacional.

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo general

Acelerar la selección por tolerancia al frío, mediante la incorporación de la SAM en los programas de mejoramiento genético de cada institución involucrada en el proyecto.

4.2 Objetivos específicos

1. Validación y estandarización de marcadores y metodología de SAM desarrollada en Japón.
2. Implementación de la SAM en poblaciones de los programas de mejoramiento.
3. Capacitación
4. Evaluación de las poblaciones seleccionadas por marcadores moleculares, en condiciones naturales de estrés por bajas temperaturas, en el Cono Sur.

5 ACTIVIDADES

5.1 Capacitación



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

En el desarrollo del proyecto, cinco funcionarios recibieron capacitación en NARO/HARC-Japón. El entrenamiento se desarrolló durante los meses de julio a septiembre de 2009, donde cumplieron los siguientes objetivos:

1. Formación de capacidades en técnicas de evaluación fenotípica y genotípica de la tolerancia al frío en etapa reproductiva del arroz
2. Evaluación preliminar de la aplicabilidad de los marcadores moleculares desarrollados en el NARCH en el germoplasma de los programas de mejoramiento de las instituciones integrantes del consorcio. Procesaron 371 muestras de ADN.
3. Evaluación primaria de la variabilidad del germoplasma de los materiales locales en alelos con asociación a tolerancia al frío en etapa reproductiva reportada para las poblaciones analizadas por el NARCH.

La colaboración por parte del NARO, continuó a través de consultas específicas y, en el año 2012, un funcionario de esta institución realizó vista técnica y de campo al INIA-Treinta y Tres, en Uruguay, posteriormente al CIAT-FLAR, en Colombia.

Con el objetivo de acumular alelos favorables para la tolerancia al frío, además de los marcadores suministrados por NARCH, se incluyeron otros marcadores disponibles públicamente.

Después del entrenamiento se desarrollaron las siguientes actividades:

1. Establecimiento de protocolos de siembra para la selección asistida
2. Estandarización de protocolos de extracción
3. Estandarización de PCR
4. Visualización de fragmentos en geles
5. Genotipado de progenitores utilizando marcadores de NARCH-Japón
6. Genotipado de progenitores utilizando marcadores de la Universidad de Davis California
7. Estandarización de la metodología para evaluación fenotípica en etapa reproductiva
8. Programación y ejecución de cruzamientos dirigidos a los objetivos del proyecto

5.2 Desarrollo de poblaciones, evaluaciones fenotípicas y genotípicas

5.2.1 Desarrollo de poblaciones

Con la información de la respuesta fenotípica al frío en floración y plántula, se realizaron 40 cruzamientos simples. Con el trabajo realizado durante la capacitación en Japón y posterior confirmación de la respuesta fenotípica y genotípica de los diferentes progenitores, el grupo se redujo a nueve cruzamientos. Después de evaluar genotípicamente la F1 y cada uno de los padres recurrentes, se procedió a efectuar los retrocruzamientos hasta obtener la BC₃F₁. Sí bien en el proceso de genotipado se incluyeron marcadores microsatélites para tolerancia al frío en las diferentes etapas de desarrollo del arroz (germinación, plántula y reproductiva), en el trabajo se hizo énfasis en la etapa reproductiva. Se realizaron retrocruzamientos hacia las variedades: IRGA 423, IRGA 424 e INIA OLIMAR o padres recurrentes y participaron como donantes de la tolerancia al frío los cultivares: Silewah, L2825-CA, M202, Norin PL8 y Norin PL11. Los genotipos Norin se importaron desde Japón y son las fuentes de tolerancia al frío con los que se han realizado los trabajos de selección asistida (Saito, *et al.* 2004).



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Finalmente, se continuaron siete poblaciones BC_2F_1 , asistidas por marcadores moleculares.

El germoplasma desarrollado se utilizó en diferentes actividades:

- Dos poblaciones BC_2F_2 se evaluaron fenotípica y genotípicamente por tolerancia al frío en floración. Con la población que presentó información relevante para el proyecto se analizó la asociación de los resultados genotípicos y fenotípicos.
- Familias BC_2F_3 , derivadas de una de las dos poblaciones mencionadas anteriormente, se evaluaron genotípica y fenotípicamente para validar la información y resultados obtenidos en BC_2F_2 .
- Dos poblaciones BC_2F_2 fueron enviadas a Argentina y Uruguay, donde fueron sembradas en campo para evaluación en condiciones locales.
- Las siete poblaciones BC_2F_1 se avanzaron por el sistema de descendencia de semilla única modificado hasta BC_3F_4 y BC_4F_3 ; etapa en la que se realizó la evaluación por calidad molinera y culinaria
- Con diez líneas BC_3F_4 y BC_4F_3 , se conformó un vivero que se envió a: Argentina, Brasil (IRGA), Chile y Uruguay.

5.2.2 Evaluación Fenotípica

La evaluación fenotípica se realizó siguiendo la metodología descrita por Cruz (2010). Se evaluaron 257 líneas por tolerancia al frío en etapa reproductiva. Se corroboró la reacción de los testigos o donantes de la tolerancia al frío en etapa reproductiva: M202, L2825-CA NORIN PL8, NORIN PL11 y la de los testigos o variedades susceptibles: Oryzica 1, IR 50, IRGA 423, IRGA 424.

Se evaluaron e identificaron líneas con Índice de Tolerancia (IT) al frío en etapa reproductiva, superior al de los testigos tolerantes. Se evaluaron dos poblaciones BC_2F_2 , por tolerancia al frío en floración y los resultados fueron corroborados en las familias BC_2F_3 .

5.2.3 Evaluación Genotípica

El genotipo fue determinado por la amplificación de los marcadores moleculares que se encuentran a lo largo de diez QTL relacionados con tolerancia al frío en estado reproductivo (Figura 1A) y vegetativo (Figura 1B). Las variedades Silewah, M202, L2825, L3616 y Lemont tienen una buena respuesta al estrés por frío, con gran número de alelos tolerantes (T). En Latinoamérica, el germoplasma tipo *indica* (INIA Olimar, IRGA 423, IRGA 424), cuya respuesta al frío es de susceptibilidad (S), carece de la mayoría de *loci* asociados a la tolerancia o presenta alelos diferentes de esos *loci* (Figura 1A).

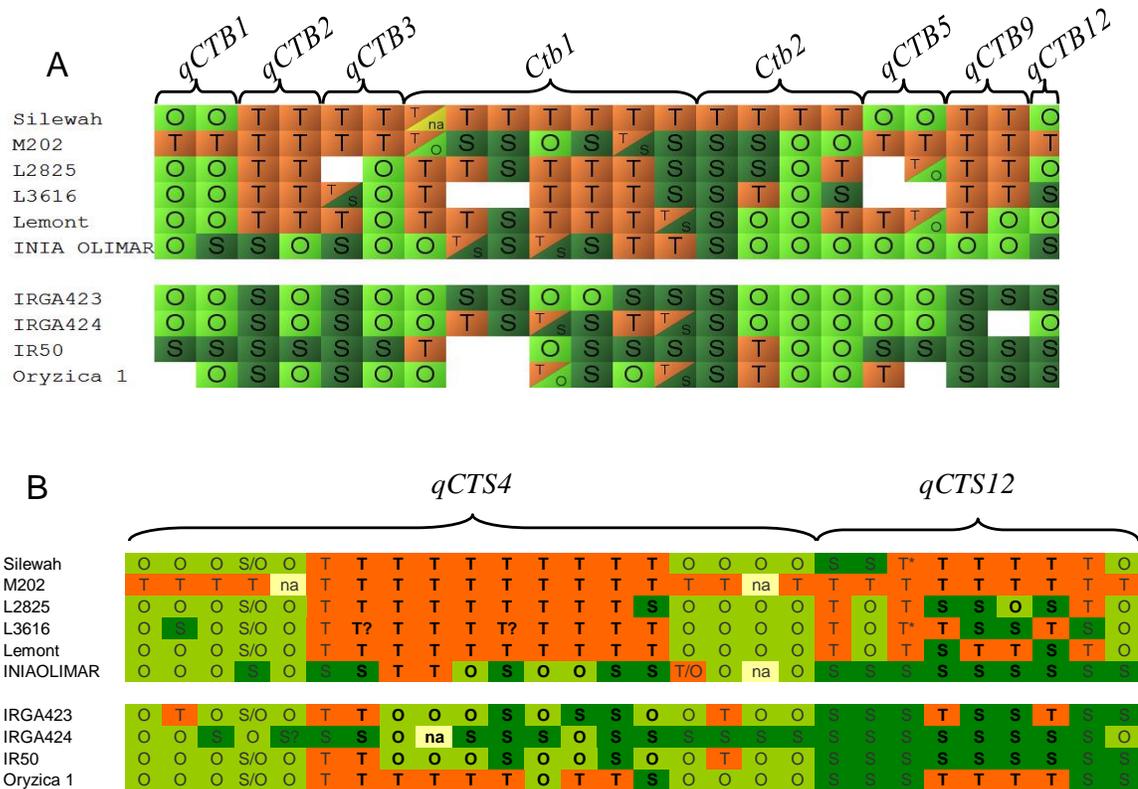


Figura 1. Representación gráfica de los resultados de la evaluación genotípica de los parentales en los diez QTL de interés asociado a la tolerancia al frío. A) En estado reproductivo y B) en estado vegetativo del arroz. S: Susceptible, T: Tolerante, O: Otro alelo, na: no amplificó.

Teniendo en cuenta la información anterior, se seleccionaron como progenitores los materiales que coincidieron en las evaluaciones fenotípicas y genotípicas, y se programaron los cruzamientos F_1 entre materiales contrastantes. Siguiendo el mismo criterio, se programó el primer retro-cruzamiento o cruzamiento triple (Cuadro 1).

Cuadro 1. Listado de cruzamientos evaluados en el proyecto

Poblaciones BC_1F_1 y F_1 Triples	
IRGA424/L2825-CA	// IRGA423
INIA OLIMAR/L2825-CA	//IRGA423
Silewah/IRGA424	// IRGA423
Silewah/IRGA424	// IRGA424
Silewah/INIA OLIMAR	// IRGA423
M202/Lemont	// IRGA423
M202/Lemont	// IRGA424
INIA OLIMAR/M202	// INIA OLIMAR
IRGA424/M202	// IRGA424

Se resalta en negrilla el parental tolerante.



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Criterios para la selección de marcadores

Para facilitar el procesamiento de la información se asignó un código a cada uno de los cruzamientos y se indicó en la casilla de identificación con su respectiva nomenclatura. Se verificó cuáles marcadores se podían amplificar en cada cruzamiento con base en dos criterios:

- 1) Las regiones genómicas que cada parental tolerante aportaba. Por ejemplo, en el caso de los cruzamientos con parental M202 se evaluaron los QTL qCTB1, qCTB5, qCTB9 y qctb12.
- 2) El peso molecular de los alelos y el polimorfismo entre los parentales susceptibles y tolerantes involucrados en el cruzamiento.

Implementación de la SAM en la población BC₁F₁

En conjunto, todos los materiales presentaron un porcentaje de germinación alto, destacándose por tener una germinación del 98% los cruzamientos 11753 (Silewah/IRGA424//IRGA423) y 11754 (Silewah/IRGA424//IRGA424), y con un 91% el cruzamiento 11736 (INIA Olimar/M202//INIA Olimar). El cruzamiento con el menor porcentaje de germinación fue el 11729 (INIA Olimar/L2825//IRGA423) con un 59%. En total se sembraron 660 plantas (126 parentales y 534 individuos de cruzamientos), distribuidas en tres siembras, con un total de plantas germinadas de 539 (100 parentales y 439 individuos de cruzamientos). De estas 539 plantas se seleccionaron 228 (88 parentales y 140 individuos de cruzamiento) para avanzar en el retrocruzamiento BC₂F₁. El porcentaje de selección se obtuvo a partir del cociente entre plantas analizadas y las plantas seleccionadas.

Las plantas BC₁F₁ y de parentales recurrentes seleccionadas con los marcadores se usaron para avanzar al siguiente retrocruzamiento.

Implementación de la SAM en la población BC₂F₁

Los criterios para seleccionar las plantas usadas para generar el siguiente retrocruzamiento fueron: que tuvieran mayor número de alelos tolerantes y que la región del QTL estuviera lo más completa posible. Los cruzamientos BC₂F₁ se derivaron de diferentes plantas BC₁F₁ seleccionadas con marcadores moleculares. El número de plantas sembradas varió dependiendo de la cantidad de plantas de origen.

Una vez terminados los análisis con todos los individuos de esta generación se seleccionaron 129 plantas que correspondieron al 39% del total, cumpliendo los criterios de selección.

El desarrollo de la generación BC₃F₁ se realizó utilizando la información suministrada por el equipo del CIAT, sobre la presencia de bandas asociadas a los marcadores para tolerancia al frío en etapa reproductiva.



Implementación de la SAM en poblaciones con las variedades Norin como progenitores

Las variedades japónicas Norin PL8 y Norin PL11, fuentes originales de las regiones *Ctb1*, *Ctb2* (PL8) y *qctb8* (PL11) con los progenitores IRGA 424 e IRGA 423 se usaron para la generación de plantas F_1 .

En referencia a los protocolos y procedimientos en laboratorio, el equipo de CIAT, desarrollo y publicó una guía práctica de laboratorio (Quintero et al. 2012).

5.3 Relación fenotipado y genotipado en las poblaciones BC_2F_2 y BC_2F_3

Después de realizar el fenotipado y genotipado en las poblaciones BC_2F_2 y BC_2F_3 , se realizaron los análisis sobre 181 individuos de la población BC_2F_2 . Todos los datos tanto genotípicos como fenotípicos se expresaron en forma binaria así:

En términos de respuesta fenotípica, el valor crítico para la clasificación de los individuos fue un valor IT de 0,5, que equivale a tres veces el ITc del progenitor recurrente susceptible IRGA 424 (ITc=0,17). Así, los individuos con $IT \geq 0,5$, se clasificaron con respuesta aceptable (toleran el frío) mientras que, individuos con $IT < 0,5$, se consideraron como no aceptables (no toleran el frío). En cuanto a marcadores moleculares, se analizaron 14 (Cuadro 2) y los individuos se registraron como homocigotos AA, heterocigotos AB y homocigotos BB.

Nota: La evaluación fenotípica incluye una componente de tolerancia y una de capacidad de producción. Se considera sólo IT porque la tolerancia fue el criterio utilizado para la selección de los *loci* marcadores.

Cuadro 2. Marcadores moleculares asociados a la tolerancia a bajas temperaturas analizados en la población BC_2F_2 proveniente del cruzamiento de Silewah por IRGA 424.

Marcador	QTL ¹	Cromosoma	Variedad de origen ²	Referencia
PNK5	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito et al., 2010
PNK7	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito et al., 2010
PNK10	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito et al., 2010
BAC22	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito et al., 2004, 2010
BAC28	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito et al, 2004
SCAB11	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito et al, 2004
SCAM20S	<i>Ctb2</i>	4	Norin PL8	Saito et al, 2004
CB8	<i>Ctb2</i>	4	Norin PL8	Saito, com. pers
CB3	<i>Ctb2</i>	4	Norin PL8	Saito, com. pers
RM324	<i>qCTB2</i>	2	M202	Andaya y Mackill, 2003
RM301	<i>qCTB2</i>	2	M202	Andaya y Mackill, 2003
RM156	<i>qCTB3</i>	3	M202	Andaya y Mackill, 2003



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Marcador	QTL ¹	Cromosoma	Variedad de origen ²	Referencia
RM214	<i>qCTB3</i>	3	M202	Andaya y Mackill, 2003
RM334	<i>qCTB5</i>	5	M202	Andaya y Mackill, 2003

¹ *Ctb1* y *Ctb2* han sido objeto de mapeo fino. ² Norin PL8 es la variedad de arroz fuente de los alelos asociados a la tolerancia al frío y es derivada de la variedad Silewah.

Observaciones preliminares de la distribución de los individuos de acuerdo con las frecuencias de los genotipos observados para cada marcador molecular, mostraron de manera general una alta frecuencia de heterocigotos lo cual hacía difícil la comparación con el fenotipo. Esto llevó a agrupar a los individuos en dos clases genotípicas, AAB (suma de los AA y AB) y los BB (el otro homocigoto) para poderlas confrontar con las dos clases fenotípicas (aceptable y no aceptable).

Para el análisis de los datos, se aplicaron conceptos usados en epidemiología, en los cuales se mide la asociación entre variables de según las frecuencias de sus estados, presentados en tablas de contingencia de RxC (también llamadas matrices de confusión, Cuadro 3). En estas tablas, los individuos de la población se organizaron en función de las dos variables, teniendo en cuenta las siguientes hipótesis:

Ho: Hipótesis nula = independencia entre las variables. No hay asociación entre el resultado de marcadores (genotipo) y la respuesta del arroz al estrés por frío (fenotipo).

H₁: Si hay asociación entre genotipo y fenotipo, lo cual posibilita el uso de selección asistida por marcadores.

Cuadro 3. Ejemplo de tabla de contingencia (RxC, R=2, C=2) para hacer la prueba de hipótesis con cada marcador.

Fenotipo (respuesta al frío)		Genotipo		Marginales
		Clase AAB	Clase BB	
Aceptable		a	b	a + b
	No aceptable	c	d	c + d
Marginales		a+c	b+d	N (Total)

5.4 Actividades desarrolladas por INTA, INIA e IRGA

INTA-Corrientes-Argentina. Después de la capacitación en Japón, esta institución desarrolló actividades enfocadas a la evaluación por tolerancia al frío en germinación y plántula. Sembró una población BC2F2 en su estación experimental Las familias seleccionadas fueron avanzadas y evaluadas por tolerancia al frío en condiciones controladas en Colombia y se evaluaron finalmente en INTA en condiciones de campo. Además, en un trabajo conjunto con la Universidad de Mar del Plata desarrollaron un marcador que permitió distinguir a los individuos que portan el SNP de los que no lo tienen (Tabone *et al.*, 2009). Se realizaron algunas modificaciones a la técnica y se diseñaron iniciadores específicos que permitieron separar a los individuos tolerantes (presencia de banda) de los susceptibles (ausencia de banda). Del total



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

de los genotipos analizados, 21 presentaron banda. Posteriormente, se realizaron evaluaciones en condiciones de campo en siembra temprana y siembra oportuna y se identificó germoplasma con una buena respuesta en siembras tempranas (Anexo 1)

INIA-Uruguay trabajó en la identificación de germoplasma con respuesta diferencial al frío en condiciones de campo y en la preselección de líneas para evaluar la tolerancia al frío en plántula y en etapa reproductiva en condiciones controladas. Del germoplasma seleccionado en la zafra 2011-2012 y sembrado en la siguiente zafra no fue posible seleccionar ningún material debido a que las condiciones de temperaturas mínimas en la etapa de floración fueron extremas, tanto que los donantes de tolerancia no alcanzaron a florecer (Anexo 2).

IRGA- Brasil. El Instituto estuvo en el proyecto con recursos propios; participó en la capacitación efectuada en Japón, estableció su laboratorio e inició actividades; igualmente participaron en la visita técnica que el funcionario del NARO realizó a Treinta y Tres (Uruguay) y recibieron el Vivero FONTAGRO, conformado por BC₃F₄ y BC₄F₄ para evaluarlo en condiciones de campo en Rio grande do Sul.

5.5 Divulgación

Se desarrollaron actividades en capacitación de funcionarios del consorcio, actualización del personal de los laboratorios en cada una de las instituciones involucradas en el consorcio. Difusión del proyecto y resultados del mismo, a través de conferencias en seminarios y comités técnicos.

Difusión de resultados a través de la participación con pósteres en Congresos internacionales.

6 RESULTADOS:

6.1 Germoplasma:

Están disponibles semillas de:

Cruzamientos simples y retrocruzamientos entre germoplasma susceptible y donantes de tolerancia discriminadas en 40 F₁, nueve poblaciones BC₂F₂ obtenidas mediante SAM y 116 líneas BC₃F₄ y BC₄F₃; 10 de estas líneas fueron seleccionadas para conformar el primer vivero del proyecto. Adicionalmente, Tres poblaciones F₂, de cruzamientos simples entre familias BC₂F₃ y líneas FLAR

6.2 Fenotipado:

Se caracterizaron por tolerancia al frío en etapa de plántula y reproductiva, 77 líneas de Uruguay, 50 genotipos del banco de trabajo CIAT-FLAR.



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Se identificaron 15 genotipos provenientes de Chile y Uruguay que superan, en tolerancia al frío, la respuesta de los testigos tolerantes.

Hubo un incremento del 16% en la capacidad de evaluación fenotípica en etapa reproductiva.

Se evaluaron 222 genotipos de la población BC_2F_2 y 177 de la BC_2F_3

Se identificaron 67 plantas BC_2F_3 con mejor tolerancia al frío en floración que IRGA 424 (Padre recurrente, susceptible) y entre ellas una superior al donante de tolerancia Silewah, esta a su vez tiene aceptabilidad fenotípica similar al padre recurrente

De los 177 genotipos BC_2F_3 evaluados en 2012, 154 conservaron la clasificación obtenida en la generación anterior. Es decir, una consistencia o acierto de 87%. En esta generación se identificaron 28 genotipos que produjeron en frío al menos la mitad de lo que produjo el progenitor tolerante. En total, 66 genotipos fueron iguales o superiores al progenitor susceptible. Es decir que con los retrocruzamientos se pudo incrementar la tolerancia al frío de IRGA 424.

De los 28 genotipos algunos, además de tolerar el frío, producen bien en condiciones normales mientras que otros sólo servirán como donantes potenciales de tolerancia al frío porque su producción de granos llenos es muy deficiente. Los valores de tolerancia al frío en reproductivo excedieron, de dos a cinco veces, el valor del progenitor susceptible lo que indica una incorporación de la característica en IRGA 424 (Cuadro 4).



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Cuadro 4. Índices de tolerancia al frío (IT) y combinados (I) de los mejores genotipos (BC₂F₃) del cruzamiento IRGA 424/Silewah, calculados con respecto al progenitor tolerante (pt) y al progenitor susceptible (ps)

Derivativo	ITpt	Ipt	ITps	Ips
FL12378-2-58	1,1	1,8	5,3	8,2
FL12375-18-137	1,1	10	4,9	4,9
FL12378-24-66	,9	0,2	4,3	1,1
FL12375-18-266	0,9	10	4,3	4,8
FL12375-18-208	0,9	0,8	4,1	3,5
FL12375-18-216	0,8	0,9	4,0	4,2
FL12375-18-267	0,8	0,9	3,9	4,1
FL12375-18-214	0,7	0,8	3,4	3,8
FL12375-18-178	0,7	0,5	3,2	2,3
FL12375-18-222	0,7	0,6	3,2	3,0
FL12378-24-65	0,6	0,6	3,0	2,7
FL12375-18-11	0,6	0,8	3,0	3,7
FL12375-18-215	0,6	0,6	2,8	2,8
FL12378-16-46	0,6	0,5	2,8	2,5
FL12375-18-276	0,6	0,7	2,8	3,1
FL12375-18-138	0,6	0,7	2,7	3,3
FL12375-18-179	0,6	0,6	2,7	2,8
FL12375-26-114	0,6	0,5	2,6	2,1
FL12375-18-219	0,5	0,4	2,5	2,0
FL12375-18-206	0,5	0,5	2,5	2,2
FL12375-18-211	0,5	0,3	2,5	1,4
FL12375-19-82	0,5	0,5	2,4	2,4
FL12375-19-81	0,5	0,6	2,4	2,6
FL12378-16-234	0,5	0,2	2,4	1,1
FL12375-26-118	0,5	0,3	2,4	1,3
FL12375-18-271	0,5	0,5	2,4	2,2
FL12375-17-80	0,5	0,5	2,1	2,2
FL12375-18-144	0,5	0,4	2,1	1,7

ITpt e ITps: índices de tolerancia al frío calculados con relación al progenitor tolerante (pt) y susceptible (ps) respectivamente. Valores iguales a la unidad (1.0) significan que son iguales al valor del pt o ps. Valores por encima o por debajo de 1.0 significan que son mejores o peores que el genotipo con el cual se está comparando, en este caso el pt o el ps respectivamente. Ipt e Ips: índices combinados de tolerancia al frío. I=ITxCP: tolerancia al frío x componente de rendimiento)

6.3 Genotipado

Caracterización genotípica con marcadores microsatélites reportados y validados para selección por tolerancia al frío.



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

6.3.1 Selección de BC₁F₁

El mayor porcentaje de selección con los marcadores moleculares se observó en los cruzamientos FL11730 (IRGA424/L2825-CA//IRGA423) y FL11752 (Silewah/INIA Olimar//IRGA 423) con un 40% y un 42% respectivamente. Los cruzamientos que tuvieron un menor porcentaje de selección fueron FL11736 (INIA Olimar/M202//INIA Olimar) y FL11742 (IRGA424/M202//IRGA424), con un 25% y 26% de selección, respectivamente (Cuadro 5).

Cuadro 5. Resultados de la selección de cruzamientos BC₁F₁ utilizando marcadores moleculares asociados a la tolerancia al frío

Identificación	Donante	Plantas sembradas	Plantas analizadas	# de SSR ¹	Plantas seleccionadas	% selección
FL11729	L2825-CA	54	32	13	9	28
FL11730	L2825-CA	51	40	13	16	40
FL11736	M202	66	60	12	15	25
FL11742	M202	66	46	12	12	26
FL11752	Silewah	54	48	14	20	42
FL11753	Silewah	54	53	13	18	34
FL11754	Silewah	54	53	13	18	34
FL11755	M202	69	52	15	17	33
FL11756	M202	66	55	18	15	27
IRGA 423		42	33	17	25	76
IRGA 424		42	33	17	29	88
INIA OLIMAR		42	34	17	34	100
TOTAL		660	539		228	

1. Marcadores usados para seleccionar

6.3.2 Selección de BC₂F₁

En las siete progenies se analizaron en total 328 plantas con 7 a 11 marcadores moleculares por cruzamiento. Los mayores porcentajes de germinación se registraron en FL11755 (M202/Lemont//IRGA423) y FL11754 (Silewah/IRGA424//IRGA423) con un 84% y 79%, respectivamente. Las demás progenies tuvieron un porcentaje de germinación entre un 40% y un 53% (Cuadro 6.).



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Una vez terminados los análisis con todos los individuos de esta generación, se seleccionaron 129 plantas que correspondieron al 39% del total, cumpliendo los criterios de selección y distribuidas así:

El cruzamiento con mayor porcentaje de selección fue el FL11752 (Silewah/INIA OLIMAR//IRGA423) con un 62%, mientras que los cruzamientos FL11756 (M202/Lemont//IRGA424) y el FL11753 (Silewah/IRGA424//IRGA424) tuvieron un 50% y un 51%, respectivamente. Los restantes tuvieron entre un 20% y un 37% de plantas seleccionadas (Cuadro 6).

Cuadro 6. Cruzamientos analizados en la BC₂F₁

ID	Donante	# BC ₁ F ₁ de origen	# de Plantas sembradas	% de germinación	# de Plantas analizadas	# de SSR	# de Plantas seleccionadas	% de selección
FL11730	L2825	4	72	41	57	7	19	33
FL11736	M202	9	188	43	81	9	16	20
FL11752	SILEWAH	5	152	43	66	9	41	62
FL11753	SILEWAH	5	104	53	55	11	28	51
FL11754	SILEWAH	3	48	79	38	11	14	37
FL11755	M202	2	32	84	27	9	9	33
FL11756	M202	1	10	40	4	9	2	50
TOTAL			606		328		129	

ID:Identificación

6.3.3 Selección de F1 derivadas de Norin PL 8 y Norin PL11

Los porcentajes de germinación estuvieron entre 88% y 95%, se analizaron en total 148 plantas. Se visualizaron en geles de poliacrilamida 10 a 11 (Cuadro 7) marcadores por cruzamiento. Se seleccionaron 61 plantas, lo que corresponde al 41% del total (Cuadro 8). Estas plantas se caracterizaron por tener las regiones *Ctb1*, *Ctb2* y *qCtb8* lo más completas posible.

Cuadro 7. Marcadores analizados para cada uno de los cruzamientos con variedades Norin

Cruzamiento	Marcador
FL12386	RM38-2
Derivado de Norin PL11	PLA53
[qctb8]	PLA41
	PLA27
	PLA46



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Cruzamiento	Marcador
	RM5647
	RM3819
	PLA61
	RM6670
	RM5434s
	PLA19
	BAC1
	PNK10
	BAC22
	PNK2
	PNK5
	PNK7
FL12387	BAC28
FL12388	SCAB11
Derivado de Norin PL8	SCAM20S
[<i>Ctb1</i> , <i>Ctb2</i>]	CB8
	CB3
	CB28

Cuadro 8. Plantas analizadas en la BC₁F₁ con parentales Norin PL8 y Norin PL11

ID	# de Plantas sembradas	% de germinación	# de Plantas analizadas	# de SSR analizados	# de Plantas seleccionadas	% de selección
FL12386	80	95	76	11	31	41
FL12387	48	92	44	10	23	52
FL12388	32	88	28	10	7	25
TOTAL	160		148		61	

6.4 Relación Fenotipado- Genotipado en BC₂F₂ y BC₂F₃

6.4.1 BC₂F₂

Se observó la distribución de los individuos según la combinación de los estados de las variables genotipo y fenotipo (Figura 2): Las cuatro posibles combinaciones de variables (AAB y fenotipo aceptable; BB y fenotipo aceptable; AAB y fenotipo no aceptable, BB y fenotipo aceptable) se observaron en 11 de los 14 marcadores analizados. Para 10 de los 14 marcadores analizados, se observó una mayor frecuencia de individuos BB y fenotipo no aceptable (Figura 2) con un rango de 55.2% (BAC28) a 9,6% (RM301 y RM324). Los valores más altos de individuos AAB con fenotipo no aceptable se observaron en los marcadores BAC28, CB3, PNK5 y SCAB11.

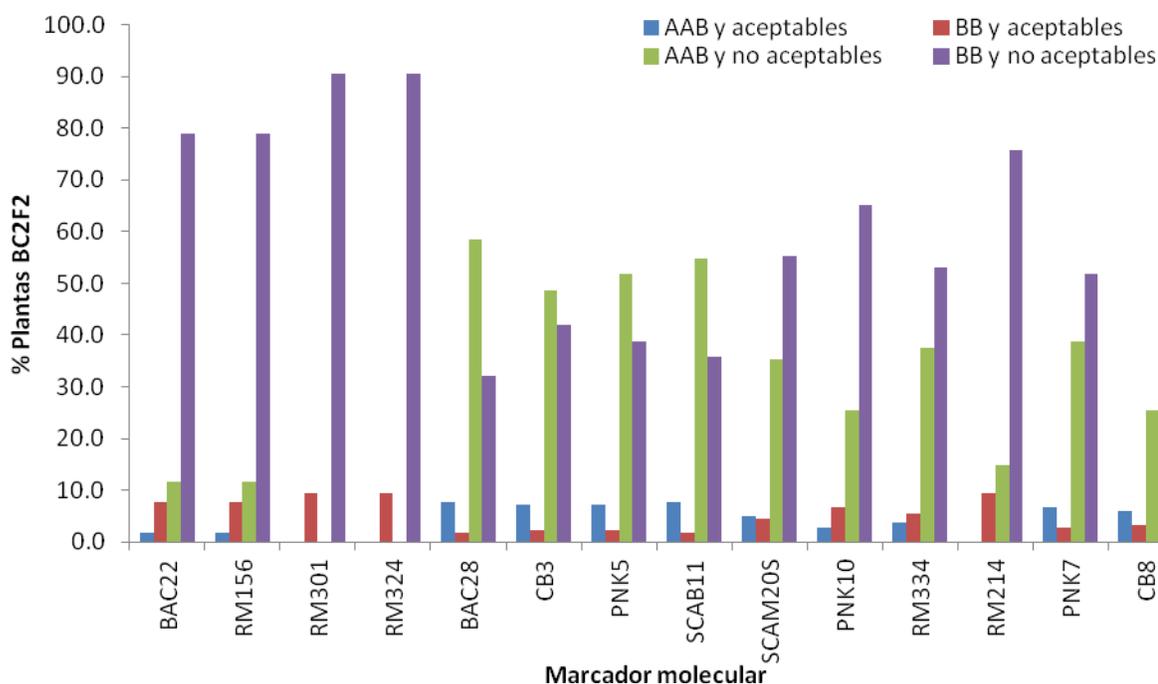


Figura 2. Distribución de los individuos BC2F2 según la combinación de los estados de las variables genotipo y fenotipo, para cada marcador analizado.

La prueba de independencia chi-cuadrado (a un nivel de significancia de $P < 0,01$) es una medida de asociación entre filas y columnas. Para 13 de los 14 marcadores las pruebas no fueron significativas por lo cual se aceptó la hipótesis de independencia entre las variables fenotipo y genotipo (Cuadro 9).

Cuadro 9. Valores de Chi-cuadrado para probar la hipótesis de asociación del genotipo con el fenotipo.

Marcador	Valor Chi ²	Probabilidad
PNK5	2.33804	0,12625
PNK7	4.84056	0,02780
PNK10	0,01414	0,90535
BAC22	0,31401	0,57523
BAC28	2.16436	0,14124
SCAB11	3.17482	0,07478
SCAM20S	1.23966	0,26554
CB8	9.59381	0,00195
CB3	3.25004	0,07142
RM324	-	-



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Marcador	Valor Chi ²	Probabilidad
RM301	-	-
RM156	0,31401	0,57523
RM214	3.28948	0,06973
RM334	0,00052	0,98176

Para el marcador CB8 del QTL *Ctb2*, la prueba de chi-cuadrado fue altamente significativa ($P=0,00195$) pero como ésta sólo determina que la distribución de los porcentajes de filas (fenotipos) y columnas (genotipos) no es homogénea, el análisis exige considerar el sentido en el cual se está dando esta asociación para poder usarlo en la forma adecuada: aceptar con AAB y rechazar con BB, o al contrario. Para evaluar la capacidad diagnóstica de los marcadores moleculares se determina su validez en términos de sensibilidad y especificidad; y su confiabilidad en términos de valor predictivo de un resultado positivo o negativo.

Sensibilidad es la probabilidad de encontrar un individuo aceptable con genotipo AAB (Capacidad de los marcadores para detectar la tolerancia). Especificidad es la probabilidad de encontrar un individuo no aceptable con genotipo BB (Capacidad de los marcadores para detectar susceptibles al frío). Lo ideal sería que cada marcador presentara altos valores de sensibilidad y especificidad, es decir, que el mayor número de individuos esté concentrado en las diagonales del cuadro 2 (celdas a y d, o en las celdas b y c).

El marcador CB8 clasificó correctamente con AAB el 64.7% de las plantas BC_2F_2 que fueron tolerantes y con BB el 71.9% de las plantas BC_2F_2 con fenotipo no aceptable. En conjunto, este marcador tuvo una validez de 71.3% por clasificar correctamente este porcentaje de los individuos de la población.

La capacidad de los marcadores para predecir el fenotipo (seguridad de la prueba), se evaluó mediante la determinación de los valores predictivos positivo y negativo, así:

Valor predictivo positivo, VPP (o negativo, VPN): ante un resultado AAB (o negativo BB) en la prueba de marcadores, ¿Cuál es la probabilidad de que la planta de arroz realmente tenga fenotipo aceptable (negativo, no aceptable)?

Para el marcador CB8, VPP fue de 19.29% y VPN fue de 95.16%. Es decir que, cuando se observe un resultado AAB, el 19% de las plantas observadas con ese genotipo tendrá fenotipo aceptable mientras que cuando se observe un resultado BB, el 95% de las plantas observadas con ese genotipo tendrá fenotipo no aceptable.

La tasa de falsos negativos (plantas AAB con fenotipo no aceptable) fue de 80%. Es decir que, si se observa AAB, la probabilidad de ser aceptable es del 19.29%, con riesgo de error de 80%.



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

La tasa de falsos positivos (Plantas BB con fenotipo aceptable) fue de 4.8%. Si se observa BB, la probabilidad de ser no aceptable es del 95.16%, con un riesgo de error de 4.8%.

6.4.2 BC₂F₃

Se analizaron 200 plantas de las cuales 181 fueron individuos BC₂F₃ provenientes del cruzamiento entre la variedad japónica Silewah, donante de tolerancia al frío, y la variedad susceptible IRGA 424. Los QTLs *Ctb1* y *Ctb2*, fueron rastreados con diez marcadores. En el estudio de esta generación se incluyó un QTL recientemente encontrado por Mori *et.al*, 2011, también asociado con la tolerancia al frío de Silewah (Cuadro 10).

Cuadro 10. Marcadores moleculares asociados a la tolerancia al frío analizados en la población BC₂F₃ proveniente del cruzamiento de SilewahxIRGA 424.

Marcador	QTL ¹	Cromosoma	Variedad de origen ²	Referencia
BAC1	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito, com. pers
PNK5	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito <i>et al.</i> , 2010
PNK7	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito <i>et al.</i> , 2010
PNK10	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito <i>et al.</i> , 2010
BAC22	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito <i>et al.</i> , 2004, 2010
BAC28	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito <i>et al.</i> , 2004
SCAB11	<i>Ctb1</i>	4	Norin PL8	Saito <i>et al.</i> , 2004
SCAM20S	<i>Ctb2</i>	4	Norin PL8	Saito <i>et al.</i> , 2004
CB8	<i>Ctb2</i>	4	Norin PL8	Saito, com. pers
CB3	<i>Ctb2</i>	4	Norin PL8	Saito, com. pers
RM6676	<i>qCTB3</i>	3	Silewah	Mori <i>et.al</i> , 2011
RM3180	<i>qCTB3</i>	3	Silewah	Mori <i>et.al</i> , 2011
RM6974	<i>qCTB3</i>	3	Silewah	Mori <i>et.al</i> , 2011

¹ *Ctb1* y *Ctb2* han sido objeto de mapeo fino. ² Norin PL8 es la variedad de arroz origen de los marcadores asociados a la tolerancia al frío y es derivada de Silewah.

6.4.2.1 Evaluación Molecular

Los alelos observados en los marcadores correspondieron en su mayoría a los esperados, a excepción de BAC22, CB3, CB8 que presentaron alelos de diferente tamaño tanto en BC₂F₂ como en BC₂F₃, y se codificaron como alelo "X". Los alelos X fueron de menor tamaño, lo cual puede ser producto de deleciones en estas regiones del genoma que estén afectando la constitución genética de los individuos, cuya consecuencia puede ser la ruptura del ligamiento entre el genotipo y el fenotipo.

En BC₂F₃, tales alelos se encontraron en 65 progenies FL12378 y en siete de las 116 progenies FL12375. De esa manera los genotipos observados para los marcadores mencionados fueron seis y no tres como se esperaban (Figura 3).

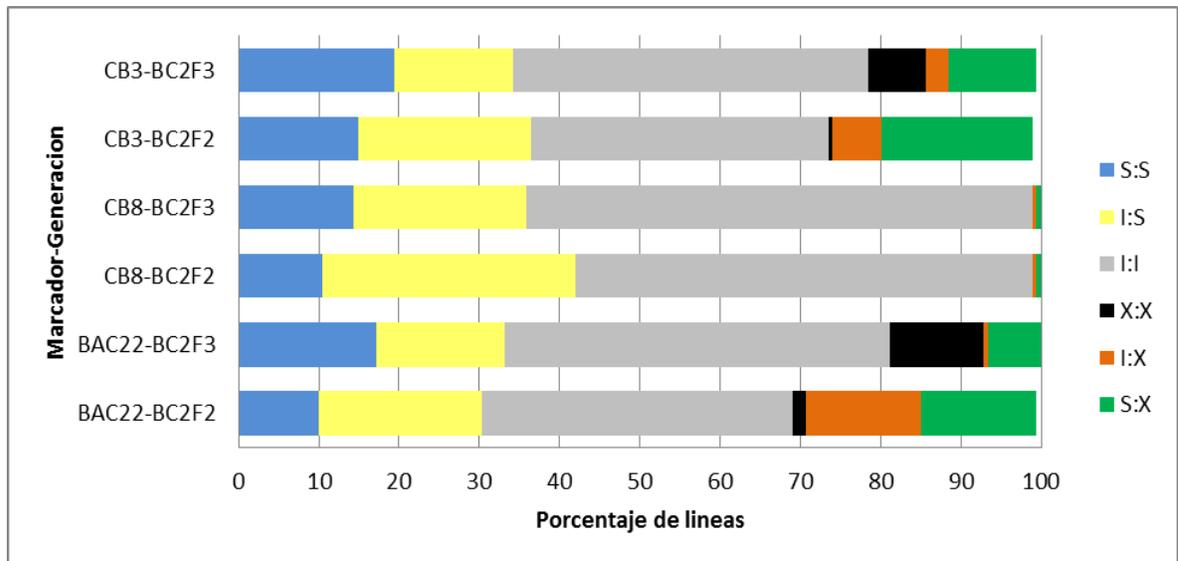


Figura 3. Genotipos observados en los marcadores BAC22, CB8 y CB3. S, alelo de Silewah. I, alelo de IRGA424. X, alelo de diferente tamaño a Silewah e IRGA424.

Un caso particular fue el marcador RM6974, de *qCTB3*, para el cual todas las plantas de Silewah presentaron un alelo de aproximadamente 150pb, mientras que no se observó alelo alguno, en ninguna de las plantas de IRGA 424 analizadas, luego de varias repeticiones y variaciones en las condiciones experimentales (Figura 4). En efecto, esto se confirmó al analizar la progenie BC₂F₃ para la cual se mantuvo como un alelo nulo (ausencia de alelo) en el 88.4% de los individuos lo cual hace posible discriminar solamente los individuos homocigotos S:S (21%) del resto.

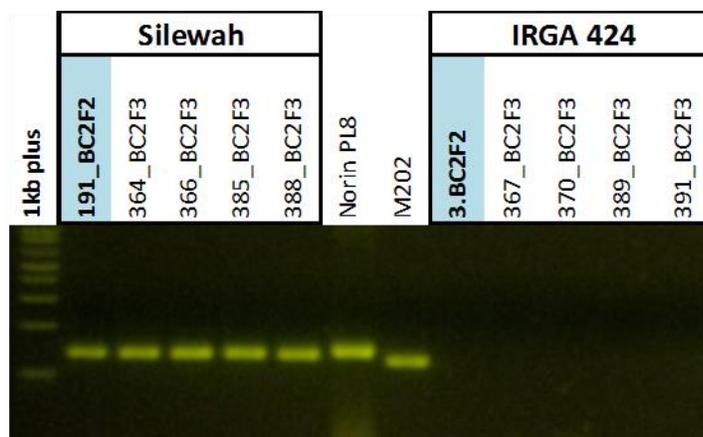


Figura 4. Amplificación de RM6974 en los progenitores Silewah e Irga424

Para los marcadores BAC1 y RM6974, sólo se presentaron dos clases genotípicas, mientras que para todos los otros marcadores se observó una proporción de heterocigotos que estuvo entre 0,072 y 0,265 (Cuadro 11).

Cuadro 11. Alelos, genotipos y heterocigocidad observados en la población BC₂F₃

Marcador	No. Alelos observados	No. Genotipos Observados	Heterocigocidad
BAC1	2	2	0,000
PNK5	2	3	0,200
PNK7	2	3	0,215
PNK10	2	3	0,072
BAC22	3	6	0,210
BAC28	2	3	0,109
SCAB11	2	3	0,200
SCAM20S	2	3	0,200
CB8	3	6	0,205
CB3	3	6	0,265
RM6676	3	3	0,238
RM3180	2	3	0,063
RM6974	2	2	0,000

En cuanto a la acumulación de alelos de tolerancia en las progenies BC₂F₃, se observó que solamente la línea FL12378-253 presentó introgresión de los tres QTLs, a lo largo de los 13 marcadores analizados aunque algunos de ellos siguen en condición heterocigota, como lo muestra el siguiente genotipo gráfico.

		<i>Ctb1</i>						
Identificación	Origen	BAC1	PNK5	PNK7	PNK10	BAC22	BAC28	SCAB11
FL12378-2	253	S:S	S:S	S:S	I:S	S:S	S:S	S:S

		<i>Ctb2</i>		
Identificación	Origen	SCAM20S	CB8	CB3
FL12378-2	253	S:S	S:S	S:S

<i>qCTB3</i>		
RM6676	RM3180	RM6974
I:S	I:S	S:S

Para todas las otras progenies el fragmento *Ctb1* se encontró interrumpido debido principalmente a la condición homocigota I/I (genotipo de IRGA 424) en los marcadores PNK7 y PNK10.

En cuanto al QTL *Ctb2*, este se observó completo en 22 progenies, como homocigoto de Silewah (S:S). De igual manera, el *qCTB3*, se observó completo en las progenies FL12378-2-254 y FL12378-24-70.

Para el análisis de asociación, los individuos se registraron como homocigotos AA, heterocigotos AB y homocigotos BB.

6.4.2.2 Evaluación Fenotípica



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

En términos de respuesta fenotípica, el valor crítico para la clasificación de los individuos fue un valor índice de tolerancia (IT) de 0,5. Así, 26 individuos (14.5% de la población) con $IT \geq 0,5$, se clasificaron con respuesta aceptable (toleran el frío) mientras que 153 individuos con $IT < 0,5$ (85.5%), se consideraron como no aceptables (no toleran el frío).

6.4.2.3 Análisis de asociación

Para el análisis de los datos, se midió la asociación entre variables de según las frecuencias de sus estados, presentados en tablas de contingencia de 2x2 (Cuadro 12). En estas tablas, los individuos de la población se deben organizar en función de las dos variables, teniendo en cuenta que las hipótesis:

H_0 : Hipótesis nula = independenciam entre las variables. No hay asociación entre el resultado de marcadores (genotipo) y la respuesta del arroz al estrés por frío (fenotipo).

H_1 : Si hay asociación entre genotipo y fenotipo, lo cual posibilita el uso de selección asistida por marcadores.

Este análisis permitió realizar una estimación de la coherencia entre los marcadores y el fenotipo observado.

Cuadro 12. Matriz de frecuencias absolutas (RxC, R=2, C=2) para hacer la prueba de hipótesis con cada marcador.

		Genotipo		Marginales
		Clase AA	Clase BB	
Fenotipo (respuesta al frío)	Aceptable	a	b	a + b
	No aceptable	c	d	c + d
	Marginales	a+c	b+d	N (Total)

Como la variable genotipo tuvo tres estados para la mayoría de marcadores, se determinó el mejor manejo de los heterocigotos, a través de la cuantificación del error en la clasificación de los individuos cuando estos heterocigotos se agrupaban con el homocigoto AA y cuando se agrupaban con el otro homocigoto BB. La dirección de la selección se determinó por la menor magnitud del error. Para todos los marcadores, el menor error se encontró al agrupar los heterocigotos con el homocigoto BB, con lo cual se definió la misma dirección para todos: elegir tolerantes con AA y rechazar susceptibles con ABB (suma de con AB y BB).

La distribución de los individuos de acuerdo a la combinación de los estados de las variables genotipo y fenotipo se muestra en la Figura 5, y para todos los marcadores, los datos se concentraron en individuos con genotipo ABB y fenotipo no aceptable.

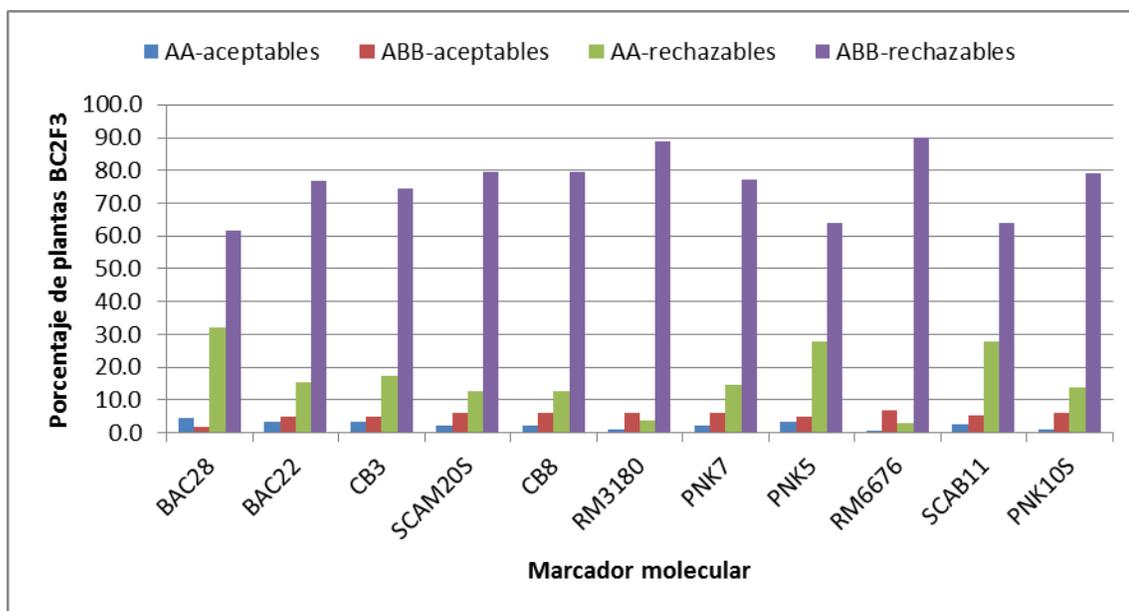


Figura 5. Distribución de los individuos BC₂F₃ de acuerdo a la combinación de los estados de las variables genotipo y fenotipo, para cada marcador analizado.

La prueba de independencia chi-cuadrado (a un nivel de significancia de $P < 0,05$) es una medida de asociación entre filas y columnas, y fue significativa para cuatro marcadores (Cuadro 13), lo cual indica que para ellos no hay independencia entre genotipo y fenotipo.

Cuadro 13. Valores de Chi-cuadrado para probar la hipótesis de asociación del genotipo con el fenotipo

Marcador	Uso posible	Valor	Probabilidad	
BAC1	Elige con AA, rechaza con BB	7.722	0,021	*
RM6974	Elige con AA, rechaza con BB	15.155	0,0005	**
BAC28	Elige con AA, Rechaza con ABB	5.175	0,02291	*
BAC22	Elige con AA, Rechaza con ABB	5.022	0,02503	*
CB3	Elige con AA, Rechaza con ABB	3.731	0,05342	NS
SCAM20S	Elige con AA, Rechaza con ABB	1.876	0,17079	NS
CB8	Elige con AA, Rechaza con ABB	1.876	0,17079	NS
RM3180	Elige con AA, Rechaza con ABB	3.214	0,07303	NS
PNK7	Elige con AA, Rechaza con ABB	1.124	0,28908	NS
PNK5	Elige con AA, Rechaza con ABB	0,622	0,43043	NS



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

RM6676	ABB Elige con AA, Rechaza con	0,837	0,36015	NS
SCAB11	ABB Elige con AA, Rechaza con	0,065	0,79905	NS
PNK10S	ABB Elige con AA, Rechaza con	0,002	0,96083	NS

*, significativo al 0,05%

** , significativo al 0,01%

Para evaluar la capacidad diagnóstica de los marcadores moleculares se determinó su validez en términos de sensibilidad y especificidad; y su confiabilidad en términos de valor predictivo de un resultado positivo o negativo. De acuerdo con la dirección de selección encontrada para estos marcadores, la sensibilidad es la probabilidad de que un individuo que haya presentado fenotipo aceptable esté en la clase genotípica AA (Capacidad de los marcadores para detectar la tolerancia) y la especificidad es la probabilidad de encontrar un individuo no aceptable sabiendo que tiene genotipo ABB (Capacidad de los marcadores para detectar susceptibles al frío) (Cuadro 14).

Cuadro 14. Probabilidades condicionales dado que se conoce el genotipo para predecir el fenotipo

		Criterio de verdad		Marginal
		AA	ABB	
Predicción del fenotipo	Aceptable IT \geq 0,5	p(a/AA) Sensibilidad	p(a/ABB) Falsos Rechazables	1.0
	No aceptable IT $<$ 0,5	p(n.a/AA) Falsos aceptables	p(n.a/ABB) Especificidad	1.0
Marginal		1.0	1.0	

La capacidad de los marcadores para predecir el fenotipo (seguridad de la prueba), se evaluó mediante la determinación de los valores predictivos de aceptación y de rechazo según las siguientes definiciones:

Valor predictivo de aceptación, VPA (ó rechazo, VPR): ante un resultado AA (ó ABB) en la prueba de marcadores, ¿cuál es la probabilidad de que la planta de arroz realmente tenga fenotipo aceptable (ó negativo, no aceptable)?

El Cuadro 15 muestra los valores de sensibilidad, especificidad, VPA y VPR, para los cuatro marcadores significativos en la población BC₂F₃.

Cuadro 15. Capacidad diagnóstica de los marcadores para tolerancia al frío (%).

Marcador	Sensibilidad ¹	Especificidad ²	VPA ³	VPR ⁴
BAC1	35.7	83.3	15.2	94.0
RM6974	23.1	88.1	13.0	93.7
BAC28	70,0	65.8	12.1	97.0
BAC22	40,0	83.4	17.6	94.0

¹Sensibilidad: Probabilidad de los aceptables, de ser observados AA.

²Especificidad: Probabilidad de los no aceptables, de ser observados ABB

³Valor predictivo positivo o de aceptación: Probabilidad de los AA, de ser observados como aceptables.

⁴Valor predictivo negativo o de rechazo: Probabilidad de los ABB, de ser observados como no aceptables.

En general los marcadores fueron más específicos que sensibles. El marcador más sensible para identificar individuos tolerantes fue el BAC28, es decir que de los individuos AA detectados por este marcador, el 70% fue tolerante, pero para el caso de especificidad, de los ABB el 65.8% fue no aceptable por su tolerancia al frío. Los cuatro marcadores tienen mejor uso para descartar individuos con IT $<$ 0,5, que para identificar individuos con IT $>$ 0,5, dado su alto valor predictivo de rechazo.



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

De hecho, al observar el conjunto de datos con estos marcadores y usar como criterio de selección a BAC28 y BAC22 (Cuadro 16), se observó que de las 200 plantas evaluadas, se eliminaron 129 progenies no aceptables, junto a Oryzica 1 (testigo susceptible) e IRGA424, progenitor susceptible. En las 40 plantas retenidas por los marcadores están incluidos los testigos tolerantes L2825-CA, L3616 y el progenitor Silewah, además de cinco progenies tolerantes. En conjunto, estos dos marcadores descartaron el 80% de las plantas del proceso de mejoramiento, y retuvieron el 20%. Solamente el 19% de las progenies tolerantes al frío (5/26) está siendo retenido por los marcadores. Pero, de todas las plantas susceptibles ($IT < 0,5$), el 85% se eliminaría efectivamente del proceso de mejoramiento, de ahí que estos dos marcadores tengan los más altos valores predictivos de rechazo.

Cuadro 16. Selección con BAC22 y BAC28

Selección con BAC22 y BAC28	Plantas tolerantes (testigos)	Plantas tolerantes (población)	Plantas susceptibles (testigos)	Plantas susceptibles (población)	Total
Retenidas	11	5	0	24	40
Eliminadas	0	21	8	129	158
Total	11	26	8	153	198

En conclusión, el uso de estos marcadores está más encaminado hacia la predicción de genotipos susceptibles.

Para cuantificar la contribución de cada alelo tipo Silewah, en terminos de la respuesta a frío (Peso de grano lleno en frío, PGF; o Índice de tolerancia, IT), se hizo un análisis de regresión simple, para el cual los genotipos se transformaron, asignándoles valores numéricos de acuerdo con la presencia de alelos de tolerancia (de Silewah) observados, así:

Valor asignado	Genotipo observado	Descripción
0	I/I, I/X, X/X	Ausencia de alelo de Silewah
1	I/S, S/X	Un alelo de Silewah presente
2	S/S	Dos alelos de Silewah presentes

En las regresiones se expresaron PGF o IT, como función del número de alelos de Silewah, teniendo en cuenta como covariable el peso de granos llenos en condiciones naturales (PGN).

Los valores máximos de R^2 se obtuvieron cuando todas las variables (13 marcadores y PGN) hicieron parte de la regresión y estuvieron entre 15% cuando la variable de respuesta fue IT y 25% cuando la variable dependiente fue el PGF. Es decir, que la variación en tolerancia a frío explicada por todas las variables estuvo entre 15 y 25%.



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Teniendo en cuenta solamente los 13 marcadores, estos explicaron el 13.6% de la variación en IT y 12.1% de la variación en PGF. Estos valores no están muy lejos de la realidad pues los QTLs *Ctb1* y *Ctb2* explicaron aproximadamente el 20% de la variación observada cuando fueron identificados en la población derivada de Norin PL8 y Kirara 397 (Saito, comunicación personal).

6.5 Actividades de los socios

El INTA-Corrientes en colaboración con la Universidad de Mar del Plata, desarrollaron actividades en relación a la tolerancia al frío en estado vegetativo en cuanto a variación alélica de genes candidatos y sus resultados fueron:

Se encontró un total de 34 regiones polimórficas en los tres genes, 10 de ellas en el gen *OsGSTZ1*, 9 en *OsGSTZ2* y 16 en *OsCDPK13*, siendo estos polimorfismos 28 SNPs y 6 indels. Para el gen *OsGSTZ2* no pudo identificarse ningún indel con claridad. Se determinó la ubicación y la densidad de polimorfismos encontrados (SNP/kb).

De los SNPs detectados, siete (denominados 9, 11, 12, 13, 15, 19 y 28) separaron a los materiales genéticos según su fenotipo (susceptibles y tolerantes) al igual que un indel (denominado 4 en la Cuadro 17). Solamente tres de los SNPs (SNPs 9, 13 y 28) se localizaron en exones, mientras los restantes SNPs y el indel se hallaron en intrones.

Cuadro 17. Indels detectados en los genes en estudio para los genotipos analizados. Los números en la parte superior identifican las diferentes variantes encontradas. Para cada valor, diferencias en color indican variaciones en la secuencia.

Genotipos		1	2	3	4	5	6
Susceptibles	15	T	C	-			
	86	-	C	G	TATGCCAGCT		
	95				TATGCCAGCT	T	T
	119				TATGCCAGCT	-	T
	120				TATGCCAGCT	-	-
Tolerantes	103				-		
	104				-	T	-
	112				-	-	-
	114			G	-		
	115				-		
		I	I	E	I	I	I
		OsGSTZ1			OsCDPK13		

I: intrón; E: exón; ■: sin dato.

Se determinó la ubicación de la base polimórfica en el triplete de nucleótidos (codón) y se realizó la traducción de la región de ADN codificante a proteínas a fin de determinar el tipo de cambio producido. Se comprobó la ubicación del SNP 28 fuera de la región codificante.

El SNP 9 corresponde a un cambio de adenina por guanina (A>G) en la tercera posición del codón que codifica el aminoácido treonina (ACU, ACC, ACA, ACG). En la treonina esta posición es cuatro veces degenerada ya que todas las sustituciones de nucleótidos en este lugar son sinónimas, es decir no varían el aminoácido.

Unicamente el SNP 13 que corresponde a una sustitución A>G y está ubicado en el gen OsGSTZ2 resultó en un cambio de aminoácido. El cambio producido es isoleucina por valina (Ile>Val) (Cuadro 18).

Cuadro 18. Descripción de los cambios producidos por los SNPs 9 y 13 en el gen OsGSTZ2, variación en la secuencia, posición de la sustitución en el codón, tipo de mutación su efecto y tipo de aminoácido resultante

SNP	Secuencias	Mutación			Aminoácido	Tipo
		Posición	Tipo	Efecto		
9	AACA GAT	3°	Transición	Silenciosa	Treonina	Polar
	AACG GAT				Treonina	Polar
13	AAC ATAG	1°	Transición	Sin efecto	Isoleucina	Apolar
	AAC GTAG				Valina	Apolar

Los aminoácidos valina e isoleucina son ambos neutros o no polares, de cadena ramificada y muy similares. Ambos aminoácidos son inertes pero juegan un papel importante en el plegamiento porque generan interacciones hidrofóbicas.

La distribución de este SNP entre los materiales analizados indicaría una asociación del alelo G con la sensibilidad a bajas temperaturas. Estos resultados concuerdan con lo obtenido por Kim *et al.* (2011) quienes afirman que por su distribución en los materiales analizados este SNP contribuiría a la respuesta diferencial al estrés por frío generalmente expresada por las dos subespecies principales de arroz, *indica* y *japónica*.

Posteriormente, en trabajo conjunto con la Universidad de Mar del Plata, se desarrolló un marcador que permitió distinguir a los individuos que portan el SNP de los que no lo tienen (Tabone *et al.*, 2009). Se realizaron algunas modificaciones a la técnica (Figura 6) y se diseñaron iniciadores específicos que permiten separar a los individuos tolerantes (presencia de banda) de los susceptibles (ausencia de banda) como se observa en la Figura 5. Del total de los genotipos analizados, 21 genotipos presentaron banda.

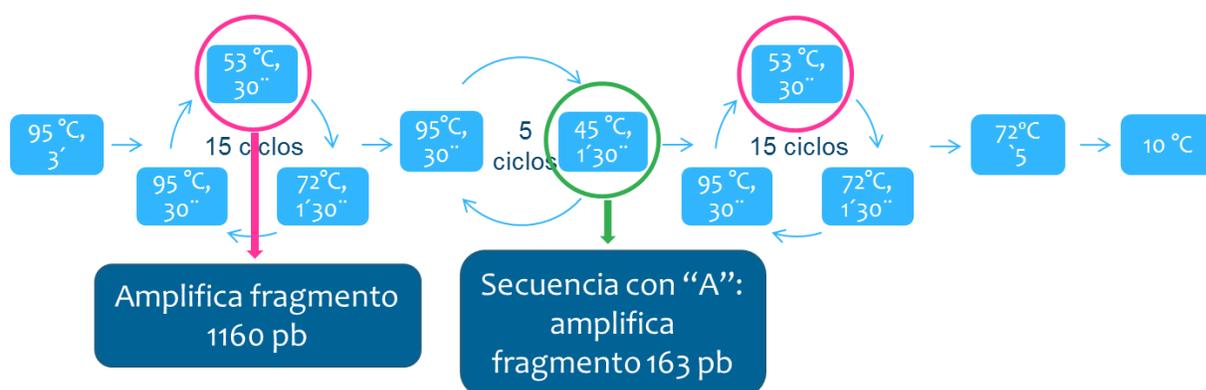


Figura 6. Diagrama de la reacción empleada para la amplificación de los fragmentos (Tabone *et al.*, 2009 modificado)

7 CONCLUSIONES:

El proyecto alcanzó el objetivo de implementar la selección asistida por marcadores moleculares en el proceso de fitomejoramiento para tolerancia al frío en etapa reproductiva.

La interacción interinstitucional fortaleció los programas de fitomejoramiento locales y hubo ganancias en el aprendizaje de técnicas más eficientes tanto en el genotipado como el fenotipado.

Se fortalecieron las instituciones con las nuevas capacidades tanto técnicas como de infraestructura y equipo.

Se hizo un aporte a la comunidad por medio de las publicaciones, capacitaciones y suministro de germoplasma útil para el mejoramiento de la tolerancia al frío; a su vez, se dio continuidad al proyecto para su perfeccionamiento.



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

8 LECCIONES APRENDIDAS:

Se reafirmó la importancia del trabajo colaborativo y el aprovechamiento de oportunidades de financiación para avanzar en la implementación regional de estrategias generales que beneficien a la región en temas como la capacitación, actualización en temas que están en constante desarrollo tecnológico.

Se deben tener en cuenta en la planeación de los proyectos el tiempo requerido para los trámites administrativos (Cartas de entendimiento) y cuarentenarios para el intercambio de germoplasma.

9 PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES:

Cruz, R.P. da. O arroz no Japão. **Lavoura Arrozeira**, Porto Alegre, v.57, n.451, p.23-26, Dez.2009

Quintero, C.; Cruz, M.; Morales, M.; Corredor, E.; Saito, K.; Ishitani, M. Tohme, J. and Zorrilla, G. Towards marker assisted selection for cold tolerance in rice: an initiative for the Latin American Southern Cone. [poster]. *In*: 3rd. International Rice Congress IRRI (Nov, 2010, Hanoi, Vietnam).

Quintero, C.; Cruz, M.; Morales, M.; Corredor, E.; Saito, K.; Ishitani, M. Tohme, J. and Zorrilla, G. Towards marker assisted selection for cold tolerance in rice: an initiative for the Latin American Southern Cone. [Poster]. *En*: "VII Encuentro Latinoamericano y del Caribe sobre Biotecnología Agropecuaria, REDBIO México 2010" en la Expo-Guadalajara, Centro de Convenciones.

Corredor, E.; Cruz, M and Berrio, L. Cold tolerance, grain quality and high yield potential: FLAR'S Challenge for temperate Lantin America. [poster]. *In*: 3rd. International Rice Congress IRRI, noviembre 2010, Hanoi, Vietnam.

Pachecoy, Ml.; Marin, A.; Pontaroli, AC. *Tolerancia a bajas temperaturas en estadios tempranos del desarrollo en arroz: caracterización fenotípica y variación alélica en genes candidatos* *En*: XI Conferencia Internacional de ARROZ para América Latina y el Caribe. Setiembre 2010, Cali, Colombia

Quintero, C.; Cruz, M.; Morales, M.; Corredor, E.; Saito, K.; Ishitani, M. Tohme, J. and Zorrilla, G. Towards marker assisted selection for cold tolerance in rice: an initiative for the Latin American Southern Cone. [Poster]. *In*: *En* "3rd International rice congress IRRI", noviembre 2010, Hanoi, Vietnam.



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

Quintero, C.; Morales, M.; Saito, K. y Tohme. Guía práctica de laboratorio “Selección asistida por marcadores moleculares para la tolerancia al frío del arroz en estado reproductivo”, agosto, 2013, ISBN 978-958-694-122-8

Pachecoy, MI.; Marín, A.; Pontaroli, AC. *Caracterización de germoplasma de arroz de origen diverso frente a bajas temperaturas en estadios tempranos del desarrollo* XIV Congreso latinoamericano de genética (ALAG), VIII Congreso de la asociación latinoamericana de mutagénesis, carcinogénesis y teratogénesis ambiental (ALAMCTA), XLIII Congreso de la sociedad de genética de Chile (SOCHIGEN), XXXIX Congreso de la sociedad argentina de genética (SAG). Octubre 2010, Viña del Mar, Chile

Pachecoy, MI; Marín, AR; Pontaroli, AC. *Tolerancia a frío en estadios tempranos del desarrollo en arroz: caracterización fenotípica de germoplasma de origen diverso y variación alélica en genes candidatos*. En: VII Congreso Brasileiro de Arroz Irrigado. Agosto 2011, Camboriú, Brasil.

Pachecoy, MI; Ramirez, I; Marín, AR; Pontaroli, AC. *Variación alélica en genes candidatos para la tolerancia al frío en estadios tempranos del desarrollo del cultivo de arroz*. En: XL Congreso Argentino de Genética, III Simposio Latinoamericano de Citogenética y Evolución, I Jornadas Regionales SAG-NEA. Setiembre 2011, Corrientes, Argentina.

Pachecoy, MI., Ramirez, I., Marín, A. y Pontaroli, A.C. *Assessment of cold tolerance at early developmental stages and allelic variation at candidate genes in rice germplasm of diverse origin --Manuscript Draft--* Euphytica.– EN REVISIÓN

Corredor, E.; Cruz, M. y Quintero, C. “Estrategia de selección asistida por tolerancia al frío en floración del arroz (*Oryza sativa* L.) [Poster]. En:”VIII Congreso Arroceros Brasileiro de Arroz Irrigado”. Santa Maria, Brasil. 2013

Cruz, M.; Quintero, C. y Corredor, E. Actualización en metodologías de fenotipado y genotipado para tolerancia al frío [Video conferencia], Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). 2010 <http://marafri.ciat.cgiar.org:8080/Webex/FLAR/>

Visita Técnica al CIAT, de un grupo de investigadores del INIA-Chile, que tenían especial interés en el programa de tolerancia al frío en arroz. Diciembre de 2011.

Visita técnica del investigador del NARO, Doctor Shuichi Matsuba, a las instalaciones del CIAT-FLAR, en Colombia y del INIA-Uruguay en Treinta y Tres y La Estación Experimental del Paso de la Laguna, en el Uruguay. Abril 2012

Presentación del proyecto en la conferencia internacional del arroz, en Daule-Ecuador, en de 2012.



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

10 REFERENCIAS:

ANDAYA, V.C.; TAI, T.H. 2006. Fine mapping of the *qCTS12* locus, a major QTL for seedling cold tolerance in rice. *Theoretical and Applied Genetics*. 113:467–475.

Blanco, P., F. Molina, R. Méndez, A. Roel and F. Pérez de Vida. 2004. Rice breeding for cold tolerance in Uruguay. In: Abstracts of the International Cold Tolerance Workshop. Cooperative Research Center for Sustainable Rice Production. Canberra, Australia.

Cruz, M. 2010.0, Tolerancia del arroz a la temperatura baja. In: Degiovanni Beltramo, Víctor M.; Martínez Racines, César P.; Motta O., Francisco (eds.). *Producción eco-eficiente del arroz en América Latina*. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. p. 180-190, (Publicación CIAT no. 365).

FONTAGRO, 2012. Informe de seguimiento técnico 2011. Disponible en: http://www.fontagro.org/sites/default/files/stecnico/2011_ISTA_08_09.pdf

Kariya, K. 2003. Chilling injuries in reproductive phase of rice plants. National Agricultural Research Center for Hokkaido. 3ra. Conferencia Internacional de arroz de Clima Templado. Uruguay.

Saito, K., Y. Hayano-Saito .W. Maruyama-Funatsuki, Y. Sato . A. Kato. 2004. Physical mapping and putative candidate gene identification of a quantitative trait locus *Ctb1* for cold tolerance at the booting stage of rice. *Theor. Appl. Genet.*, 109: 515–522.

Saito, K.; Saito, Y; Kuroki, M. and Sato, Y. 2010. Map-based cloning of the rice cold tolerance gene *Ctb1*. *Plant Science* 179: 97–102

TABONE, T.; MATHER, D.E.; HAYDEN, M.J. 2009. Temperature switch PCR (TSP): Robust assay design for reliable amplification and genotyping of SNPs. *BMC Genomics* 10:580, doi:10.1186/1471-2164-10-580-

Para mayor información sobre el proyecto, visitar el siguiente enlace:

<http://www.flar.org/index.php/es/flar-research/improvement/mild-temperate-zone/fontagro>



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08

11 ANEXOS

11.3 Anexo 1. Informe Final de las Actividades desarrolladas por INTA-Corrientes

11.2 Anexo 2. Informe Final de las Actividades desarrolladas por INIA-Uruguay



INFORME TÉCNICO FINAL

Proyecto No. FTG-8009/08