

# Evaluación y validación de marcadores moleculares para la identificación de cultivares de arroz

Constanza Tarán | INASE Uruguay | ctaran@inase.uy

Juan Rosas | INIA Uruguay | jrosas@inia.org.uy

Ana Laura Pereira | INIA Uruguay | apereira@inia.org.uy



**ESTA INVESTIGACIÓN FORMA PARTE DE LA MAESTRÍA EN BIOTECNOLOGÍA DE LA ING. AGR. CONSTANZA TARÁN, BAJO LA DIRECCIÓN DE JUAN ROSAS (INIA) Y LA CO-DIRECCIÓN DE ANA LAURA PEREIRA (INIA), CON FINANCIACIÓN DE INIA, INASE Y ANII.**

Esta investigación forma parte de la maestría en Biotecnología de la Ing. Agr. Constanza Tarán, bajo la dirección de Juan Rosas (INIA) y la co-dirección de Ana Laura Pereira (INIA), con financiación de INIA, INASE y ANII.

Los primeros avances de este proyecto se presentaron en el artículo de esta revista (N° 105), titulado "Desarrollo de herramientas biotecnológicas para el sector arrocero". En esta edición se presentarán los avances y los resultados obtenidos hasta la fecha.

## INTRODUCCIÓN

La identificación varietal es fundamental en la agricultura para el desarrollo de nuevos cultivares mediante la protección varietal, la certificación de semillas y el mantenimiento de la pureza varietal.

En Uruguay, el proceso de identificación y otorgamiento de títulos de propiedad en cultivares de arroz se basa actualmente en la evaluación visual de caracteres fenotípicos (UPOV, 2020). Los caracteres están sujetos, en distinta medida, tanto a la influencia del ambiente como a criterios subjetivos de la persona evaluadora. Esto hace que sean necesarios al menos dos años de evaluación a campo. Por otra parte, la identificación de líneas experimentales es una herramienta útil para los programas de mejoramiento que favorecen la eficiencia de los recursos.

Contar con marcadores moleculares que discriminen los materiales en evaluación permitirá complementar los ensayos de campo al aportar un método de identificación independiente del ambiente y de la persona evaluadora, así como contribuir a la eficiencia de los programas de mejoramiento genético. Se encuentra disponible comercialmente un panel desarrollado en el Instituto Internacional de Investigación en Arroz (IRRI, Arbeláez et al. 2019) denominado RiCA 1K v.4. Este panel cuenta con 1024 SNP, seleccionados por su variabilidad en una colección de alta diversidad de arroz de tipo indica.

En este trabajo se evalúa la capacidad del panel RiCA 1K v.4 para la identificación molecular y el otorgamiento de títulos de propiedad en cultivares y líneas experimentales avanzadas de arroz uruguayo.

## MATERIALES Y MÉTODOS

La capacidad del panel RiCA 1K v.4 para identificar cultivares y líneas experimentales avanzadas de arroz se evaluó comparando las distancias moleculares entre cultivares/líneas y dentro de un mismo cultivar/línea.

La aptitud de RiCA 1K v.4 para otorgar títulos de propiedad se evaluó con el Criterio 2 de la UPOV, correlacionando las distancias moleculares (Jaccard) con las distancias fenotípicas (GAIA), midiéndose, además, la correlación entre ambas distancias.

### Genotipos utilizados

30 cultivares de arroz (14 variedades índicas, 4 híbridos índicos, 2 variedades japónicas tropicales y 10 variedades japónicas templadas) y 16 líneas experimentales avanzadas (Li) de tipo indica del Programa de Mejoramiento Genético de Arroz de INIA.

### Evaluación fenotípica

Se realizó en las zafras 2022 y 2023 en base a las directrices de la UPOV TG16/9.

### Genotipado

Se extrajo un fragmento de hoja a tres individuos por cultivar o línea experimental en el estadio de macollaje y se genotiparon con el panel RiCA 1K v.4.

### Análisis

Se calcularon las distancias fenotípicas usando el software GAIA y las distancias moleculares usando el método Jaccard con la función `dist()` en Rstudio.

### Validación para la identificación varietal

A partir de las distancias moleculares Jaccard, se obtuvo un dendrograma por agrupamiento jerárquico incluyendo a los individuos de un mismo cultivar o línea experimental y se comparó su agrupación con la de individuos de otros cultivares o líneas experimentales.

### Validación para otorgar títulos de propiedad

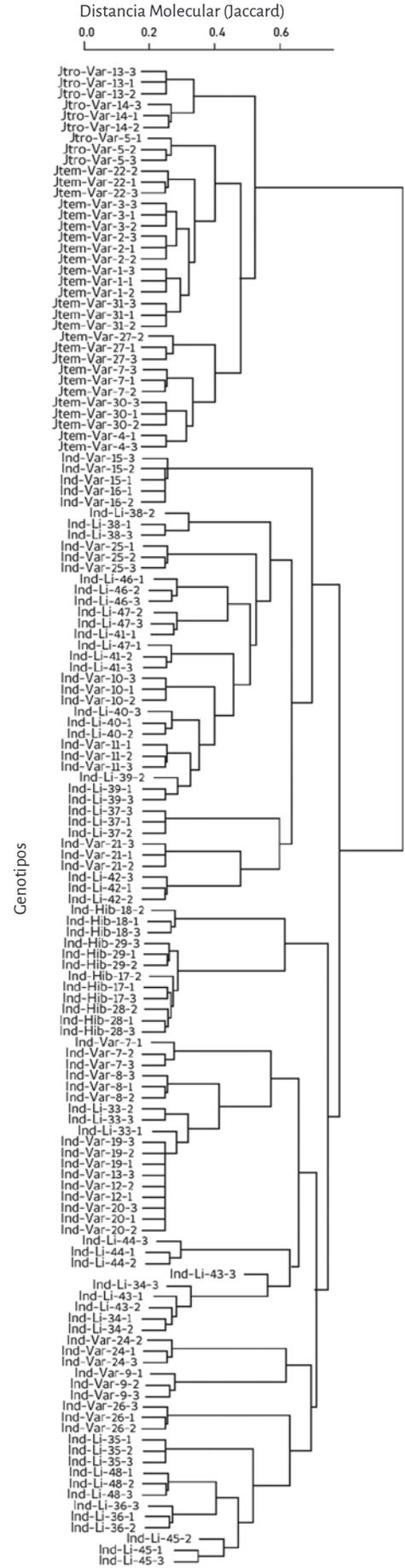
Se utilizaron dos estrategias:

- 1) En base al Criterio 2 de la UPOV, se graficaron las distancias GAIA y molecular, definiéndose el umbral GAIA como la diferencia mínima entre dos cultivares diferentes, y el umbral molecular Jaccard como el promedio de las distancias máximas entre individuos de un mismo cultivar o línea experimental. Con dichos umbrales se definieron cuatro cuadrantes y se observó el cumplimiento del criterio de la UPOV.
- 2) Se estimó la correlación de Mantel entre las matrices de distancias GAIA y moleculares.

### RESULTADOS

El panel RiCA 1K v.4 discriminó correctamente la mayoría de los genotipos estudiados (Figura 1), separando por subespecie índica (Ind) y japónica y a su vez, discriminando los genotipos japónica tropical (Jtro) de los japónica templados (Jtem).

Además, en general identificó correctamente a cada cultivar y línea experimental, y los diferenció del resto al agrupar juntos los tres individuos de cada genotipo, separándolos del resto de los genotipos. Sin embargo, cuando los genotipos son variedades esencialmente derivadas (ej. Ind-Li-33, Ind-Var-12, Ind-Var-20, Ind-Var-19, todas derivadas de la variedad El Paso 144), no fue posible discriminarlas con este panel de SNP. Asimismo, no se encontraron diferencias moleculares detectables entre algunos cultivares híbridos (Ind-Hib-17 y Ind-Hib-18).



**Figura 1** ▶ Dendrograma de clasificación entre las distancias moleculares (Jaccard) y genotipo.

Jtro: japónica tropical  
 Jtem: japónica templada  
 Ind: índica  
 Var: variedad  
 Hib: híbrido  
 Li: línea experimental arroz

En cuanto a la validez del panel para la protección de cultivares mediante el Criterio 2 de la UPOV (Figura 2), se observaron comparaciones en el cuadrante III de no validación, correspondiendo a falta de concordancia entre las distancias moleculares y las fenotípicas. Sin embargo, se observó una correspondencia general entre las distancias moleculares y las fenotípicas (correlación de Mantel 0,58, p-valor <0,0001).

Al comparar genotipos japónicos se observó gran variabilidad en la distancia fenotípica, no obstante, las distancias moleculares fueron similares. Por el contrario, cuando se comparó genotipos índicos se observó menor variabilidad fenotípica y mayor variabilidad molecular. En lo que respecta a las distancias fenotípicas observadas, son esperables, dado que los materiales índicos son similares y los japónicos no. Los japónicos se diferencian en el tamaño de grano al presentar granos cortos y medios (Japónicos templados) y granos largos (Japónicos tropicales). Al comparar materiales de distintas subespecies se observó mayor variabilidad, tanto a nivel genotipo como molecular.

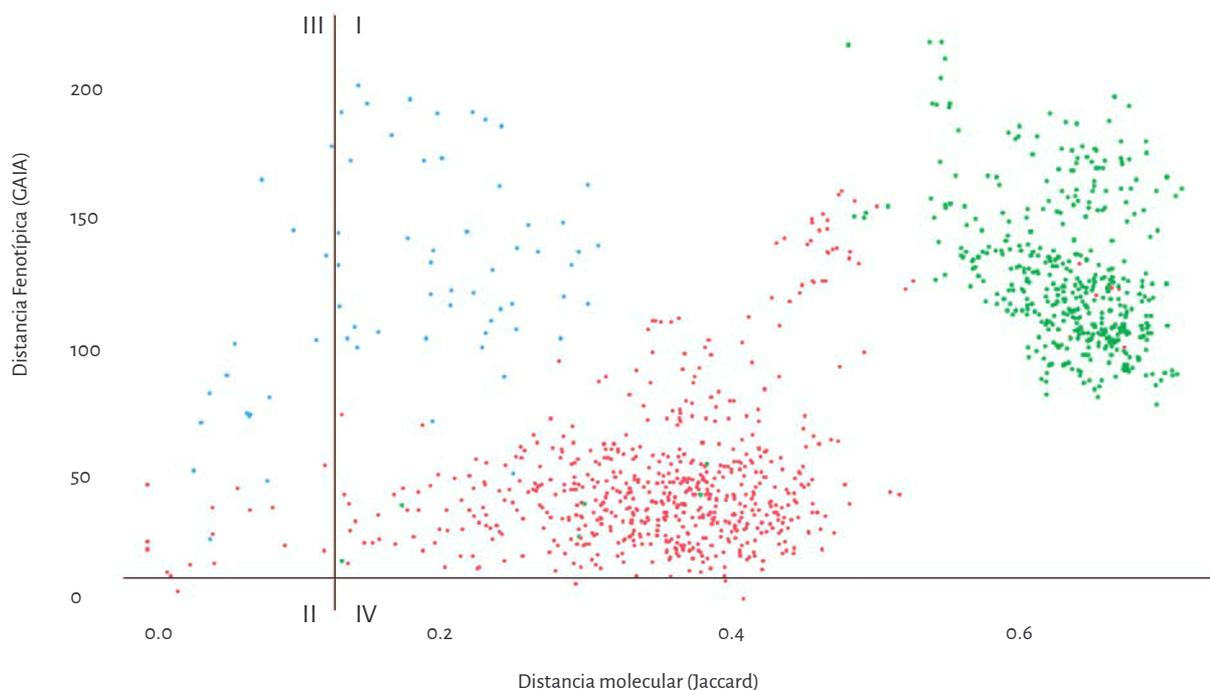


Figura 2 ▶

Gráfico de dispersión de distancias moleculares (Jaccard) y fenotípicas (GAIA) con los umbrales de distinción marcados en rojo en valor 0,04 para distancias moleculares y 3 para distancias fenotípicas. Se colorearon las comparaciones entre pares de cultivares según la subespecie.

● Japónica/Japónica ● Índica/Índica ● Japónica/Índica

## CONCLUSIONES

El panel de SNP RiCA 1K v4 es útil para identificar cultivares de arroz en el monitoreo de la multiplicación de semillas y la fiscalización del comercio, lo que genera mayor eficiencia y confianza en el mercado, y favorece el uso de semilla legal.

Además, mostró una adecuada capacidad para identificar y discriminar líneas experimentales del PMGA.

En Uruguay, mantener la trazabilidad de los cultivos en la producción y el comercio de arroz es fundamental, por lo que esta técnica es una herramienta invaluable para la industria.

Respecto al otorgamiento de títulos de propiedad, el panel RiCA 1k v4 no cumple con el Criterio 2 de la UPOV, por lo que no se aconseja su uso para este propósito.

En resumen, se validó una herramienta biotecnológica de gran utilidad para el sector arrocero. ■

