

## La Biotecnología en el campo: el ejemplo del arroz

Victoria Bonnacarrère<sup>1\*</sup>, Juan Rosas<sup>2\*</sup>, Manuel Diez<sup>1</sup>, Alicia Castillo<sup>1</sup>, Silvia Garaycochea<sup>1</sup>,  
Sebastián Martínez<sup>2</sup>, Fernando Perez de Vida<sup>2</sup>, Nestor Saldain<sup>2</sup>, Pedro Blanco<sup>2</sup>.

<sup>1</sup> INIA Las Brujas, Unidad de Biotecnología

<sup>2</sup> INIA Treinta y Tres

\*Ambos autores contribuyeron igualmente al trabajo presentado

En los últimos años el Programa Nacional de Arroz y en particular el Proyecto de Mejoramiento Genético de Arroz, han utilizado diferentes técnicas biotecnológicas, como herramientas para apoyar el mejoramiento genético; así como otros proyectos de investigación vinculados al manejo y a la fitopatología del cultivo. Esta implementación concreta de la biotecnología, se ha logrado gracias a una estrecha vinculación y coordinación del Programa y de la Unidad de Biotecnología. El objetivo de este trabajo es describir resumidamente las principales actividades de investigación que se han realizado.

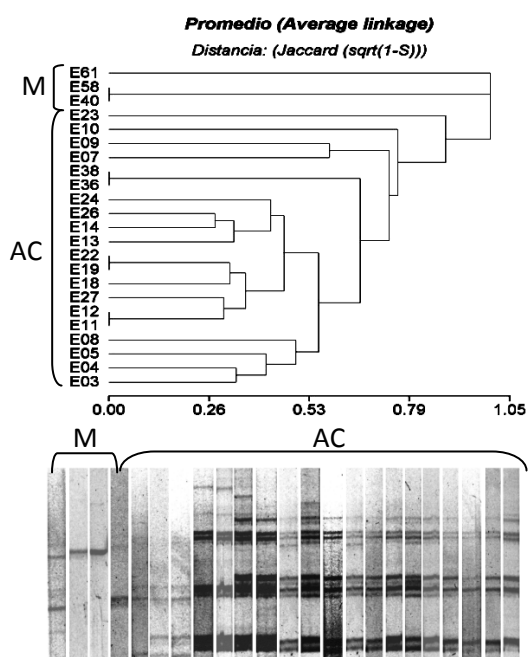
### 1. Incorporación de Genes de Resistencia a *Pyricularia oryzae* en El Paso 144 e INIA Olimar

Actualmente, una de los principales problemas del cultivo de arroz en Uruguay, es la enfermedad conocida como Brusone, la cual es causada por el hongo patógeno *Pyricularia oryzae*. Es por ello que el Programa de Mejoramiento de Arroz se ha propuesto como objetivo mejorar la resistencia a brusone de los cultivares *indica* más sembrados, El Paso 144 e INIA Olimar, sin modificar sus características agronómicas. Para ello se está llevando a cabo un programa de retrocruzamientos (RC) que involucra la incorporación de los genes Pi2 y Pi33 (previamente identificados como genes de resistencia para la población de *P. oryzae* presente en Uruguay) asistido por marcadores moleculares. Este sistema de RC se complementa con obtención de plantas Doble-haploides (DH) para fijar caracteres en una generación.

Los RC comenzaron en la zafra 2006/2007 donde se cruzó el donante (portador de los genes Pi2 y Pi33) con El Paso 144 e INIA Olimar. En las zafras sucesivas se hicieron las RC con El Paso 144 e INIA Olimar. A partir de la zafra 2008/2009 se comenzó la selección asistida por marcadores. Como marcadores se utilizaron microsatélites o SSR, localizados en regiones flanqueantes a los genes a incorporar. En la zafra pasada, además de la selección asistida por SSR, se generaron plantas DH por cultivos de anteras. Actualmente se cuenta con una línea DH denominada, 781-16 portadora del gen Pi2 y una línea DH 782-04, con inserciones de posible interés. Además, se generaron 3 líneas segregantes: una con aproximadamente 80 % similitud con INIA Olimar y portadora del gen Pi2, una con aprox. 85 % similitud con El Paso 144 y portadora del gen Pi-2 y una con aprox. 70 % similitud con El Paso 144 y portadora de los genes Pi2 y Pi33.

## 2. Caracterización de la Población de *Pyricularia oryzae* en Uruguay

La variabilidad genética del patógeno *P. oryzae* se relaciona con su capacidad para quebrar resistencias en el cultivo. En este trabajo se estudió la variabilidad del patógeno utilizando marcadores moleculares conocidos como Pot2 rep-PCR. La región Pot2 es uno de los muchos transposones que tiene *P. oryzae*. El objetivo de este trabajo fue la determinación de la estructura actual de la población del patógeno a partir de aislamientos de arroz y malezas y la adopción de estas metodologías para el monitoreo anual en laboratorio regional de INIA Treinta y Tres.



Se obtuvieron 23 aislamientos de diferentes cultivares (AC) de la región Este en las zafas 2010-11 y 2011-12 y 3 aislamientos obtenidos de malezas (M). Se cultivaron en placas para la obtención de micelio, a partir del cual se extrajo ADN, se amplificaron las regiones Pot2 y se agruparon según similitud genética (distancia Jaccard), utilizando el programa infoGen.

De la Figura se concluye que: la estructura poblacional es homogénea, no se identifican linajes específicos de tipo de cultivar ni variación entre zafas, se diferencian aislamientos de malezas y del cultivo. Además, se ajustaron las metodologías para monitoreo rutinario de la población de *P. oryzae*.

## 3. Identificación de marcadores para tolerancia a frío en etapas vegetativas tempranas

Las bajas temperaturas son el principal factor abiótico que afecta el cultivo de arroz en Uruguay, particularmente durante la etapa vegetativa temprana y los estadios reproductivos. En el primer caso, el frío disminuye la germinación, produce amarillamiento de las hojas y ralentización del crecimiento, generando problemas de establecimiento del cultivo. Uno de los objetivos del programa de mejoramiento es seleccionar genotipos tolerantes, en plántulas, a las bajas temperaturas, por lo que la identificación de marcadores moleculares asociados a dicha característica es fundamental para llevar a cabo el mejoramiento asistido. En este trabajo se utilizó un enfoque de genes candidatos para la búsqueda de marcadores SSR (del inglés, Simple Sequence Repeat) asociados a la tolerancia al frío. Se identificaron genes

candidatos reportados (validados en trabajos previos) y por medio de herramientas bioinformáticas de búsqueda en bases de datos de ESTs (del inglés, Expressed Sequence Tag). Luego se identificaron aquellos que presentaban SSR en su secuencia (SSR génicos). Estos SSR fueron amplificados en 134 genotipos de arroz (población elite del programa de mejoramiento) para obtener la información genotípica. Se evaluaron tres indicadores fenotípicos asociados a la tolerancia al frío: emisión de fluorescencia de clorofila (fotoinhibición), apreciación visual del daño e integridad de membrana. Las pruebas de asociación fueron realizadas con modelos lineales mixtos en TASSEL 2.1 teniendo en cuenta la estructura de la población (Q) y el parentesco (K). Se encontraron 4 SSR génicos asociados a los fenotipos analizados.

#### 4. Identificación de marcadores para rendimiento y enfermedades del tallo: Proyecto Mapeo Asociativo

Considerando la importancia de los marcadores en los nuevos modelos de mejoramiento vegetal, el Programa de Arroz apostó en el último plan estratégico de INIA a financiar un proyecto cuyo objetivo es la identificación de un gran número de marcadores asociados a las principales características que son objeto de mejoramiento: rendimiento, resistencia a enfermedades de tallo y calidad culinaria e industrial.

Este proyecto se denomina Mapeo Asociativo en Arroz. El mapeo asociativo es una metodología que permite asociar marcadores distribuidos por todo el genoma con las características fenotípicas de interés. Para ello se están determinando marcadores del tipo SNP (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism) utilizando la metodología de “Genotipado por Secuenciación” o GBS (del inglés, Genotyping by Sequencing). La población de mapeo involucra 650 líneas de arroz que forman parte de la población en evaluación del programa de mejoramiento.

#### 5. Validación de una herramienta bioquímica para la identificación de malezas resistentes a inhibidores de la enzima ALS en el arroz

Una de las limitantes del cultivo de arroz es la existencia de malezas como arroz rojo o arroz maleza (AM). El AM es de la misma especie que el arroz cultivado (*Oryza sativa*) lo cual dificulta su control con herbicidas. Una respuesta comercial a este problema es el Sistema de Producción de Arroz Clearfield®, de reciente adopción en Uruguay. Esta tecnología combina el uso de herbicidas imidazolinonas (IMI) con variedades de arroz cultivado portadoras de una mutación puntual en la enzima acetolactato sintasa (ALS) que les otorga resistencia al herbicida: arroz resistente a IMI (ARI).

Los herbicidas inhibidores de la ALS cuando son aplicados de manera frecuente seleccionan rápidamente biotipos resistentes de la maleza. En Uruguay han sido aplicados una gran cantidad de IMI por lo que las poblaciones de malezas han sido sometidas a una fuerte selección en contra de los individuos susceptibles a estos herbicidas. En el arroz maleza, se han

descripto diversas mutaciones que disminuyen la afinidad de la interacción ALS:herbicida por medio de una sustitución aminoacídica, sin provocar la pérdida de actividad catalítica. Por otro lado, recientemente se ha detectado por primera vez en el país una planta de *Echinochloa crus-galli* (L.) Beauv (capin) que sobrevivió la aplicación de IMI, luego de utilizada la tecnología Clearfield. El capín es una de las cinco malezas más problemáticas del arroz debido a su rápido crecimiento y su gran habilidad competitiva

El objetivo general de este trabajo es contar en el país con una herramienta bioquímica que permita detectar rápidamente biotipos resistentes a los inhibidores de ALS de manera de definir un plan de manejo racional de las malezas en el arrozal. Para ello se ajustó una metodología de determinación de actividad de la enzima ALS en arroces Clearfield®, se determinaron las curvas de dosis respuesta para cada combinación herbicida inhibidores de ALS/variedad de arroz Clearfield®, se ajustaron los modelos no lineales correspondientes utilizando el paquete R. Este procedimiento también fue realizado para capin. En este trabajo se demostró una respuesta diferencial de las malezas a los herbicidas analizados, comprobando la diferencia en la actividad.

## “El BiotecSojaSur: el laboratorio de la soja del Mercosur”.

**Resumen:** la charla sobre el BiotecSojaSur muestra la conformación, el funcionamiento y los resultados de un consorcio constituido por 14 instituciones de los 4 países originales del Mercosur, entre las cuales hay 2 empresas privadas, que posteriormente evolucionó hacia un verdadero laboratorio en red, perfectamente programado y articulado. Este laboratorio mediante un trabajo coordinado y sinérgico que implica innumerable cantidad de acciones reticulares, está llevando a cabo investigación científica y tecnológica tendiente a que la región no sólo lidere mundialmente la producción de soja, sino también el desarrollo biotecnológico integral que subyace y hace posible esta importante agroindustria, contribuyendo a incrementar cada vez más su sostenibilidad ambiental, económica y social.