

SELECCIÓN ASISTIDA CON MARCADORES MOLECULARES PARA LA CALIDAD CULINARIA EN ARROZ (*Oryza sativa* L.)

Colazo J.L.¹, Liberman C.², Livore A.³

Palabras claves: marcadores, calidad culinaria

Introducción

En el programa de mejoramiento genético de arroz del INTA-Concepción del Uruguay uno de los objetivos es la obtención de variedades que satisfagan las demandas en calidad culinaria (CC) de los mercados actuales. El contenido amiloso (AAC) es uno de los principales factores que caracteriza al arroz durante y después de la cocción. Cultivares de bajos AAC usualmente están asociados con cocciones blandas y pegajosas. A su vez, altos niveles de AAC, están ligados a arroces duros y suaves después de la cocción. La temperatura de gelatinización (TG) es la temperatura a la cual el agua caliente es absorbida por los granos de almidón que se hinchan perdiendo irreversiblemente su estado cristalino. La TG se correlaciona positivamente con el tiempo de cocción. La determinación de AAC y TG son dos de los parámetros principales aplicados a líneas promisorias para su selección. Genéticamente, el ACC en arroz ha sido asociado con el gen *Waxy* (*wx*) codificante de la enzima *Granule-Bound Starch Synthase I* (*GBSSI*) en el cromosoma 6. La TG es controlada por el gen *SSIIa* que codifica la enzima *starch synthase IIa* también ubicada en el cromosoma 6 de arroz. Bao *et al.* (2006) encontraron una fuerte asociación entre un SNPs funcional (GC/TT) y la TG. Por su sencillez estos dos marcadores serían una herramienta útil para ser aplicados en la selección de genotipos con una combinación específica de ACC y TG. A pesar de esto, cada marcador debe ser válido en cuento a su asociación con la característica de interés agronómico.

Objetivo

Validar los marcadores moleculares RM 190 y SSIIa con datos fenotípicos.

Materiales y Métodos

Genotipado

Se analizaron 25 materiales provenientes de germoplasma disponible en Argentina. El ADN se extrajo usando el protocolo de Dellaporta modificado (Dellaporta *et al.*, 1983). Para determinar el ACC se evaluó el polimorfismo del microsatélite RM 190 según Ayres *et al.* (1997). La TG se asoció el marcador *SSIIa* según Bao *et al.* (2006). Los productos de amplificación se analizaron en geles de poliacrilamida al 6% teñidos con bromuro de etidio.

Determinación del AAC

El porcentaje de amilosa se determinó aplicando la metodología de Juliano (1971). Se utilizó la siguiente escala: ALTA AAC > 26%, INTERMEDIA: 23-25% y BAJA < 20% (Livore, 2004).

1. Lic. en Biotecnología, (M.Sc.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Ruta Prov. 39 Km. 143.5. Concepción del Uruguay, Entre Ríos. Argentina. CP (3260). Email: colazo.jose@inta.gob.ar.
2. Lic. en Ciencias Aplicadas, (M.Sc.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
3. Ingeniero Agrónomo, (Ph.D.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

La temperatura de gelatinización se calculó realizando el test de álcali (Little *et al.*, 1958). Este test usa una medida indirecta del grado de dispersión del grano elaborado álcali clasificando los genotipos en temperatura alta, intermedia y baja.

Análisis de datos

Se realizó un análisis de la variancia (ANAVA) para estimar la variación en el AAC explicada por el microsatélite RM 190. Para estimar la asociación entre el marcador SSIIa y los datos de TG se usó el coeficiente de chi-cuadrado de Pearson mediante una tabla de contingencia. El ANAVA (Fisher, $p=0.05$) y el análisis de asociación se realizaron mediante el software INFOSTAT.

Resultados y discusión

La amplificación del marcador RM 190 generó la presencia de 4 alelos. Se identificaron los alelos CT₁₁, CT₁₇, CT₁₈ y CT₂₀.

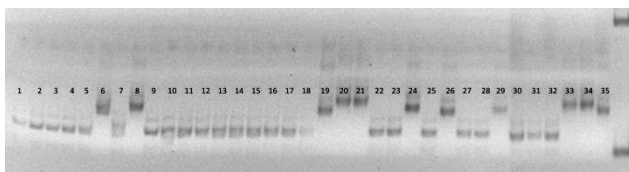


Figura 1. Marcador RM 190. Diferentes alelos generados por el marcador, las líneas 10, 11, 12, 13 poseen el alelo CT₁₁

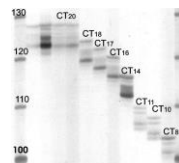


Figura 2. Ocho de los alelos testigo citados por Ayres *et al.* (1997)

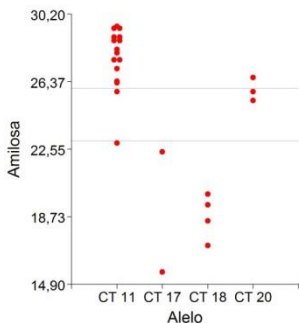


Grafico 1. Dispersión de datos de ACC en función de la secuencia microsatélite que portan. Las líneas horizontales representan los cortes para seleccionar por alta, intermedia y baja amilosa según datos de espectrofotometría.

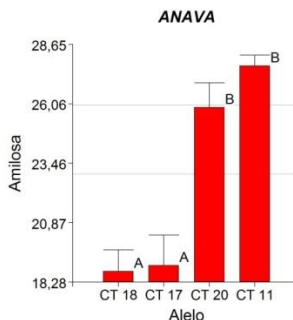


Grafico 2. ANAVA representando media, desvío estándar de cada alelo. Letras diferentes representan diferencias significativas.

1. Lic. en Biotecnología, (M.Sc.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Ruta Prov. 39 Km. 143.5. Concepción del Uruguay, Entre Rios. Argentina. CP (3260). Email: colazo.jose@inta.gob.ar.
2. Lic. en Ciencias Aplicadas, (M.Sc.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
3. Ingeniero Agrónomo, (Ph.D.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

La identificación de cuatro alelos en gen GBBS nos permitió explicar el 82% de la variación en el ACC. Este resultado es similar al de Ayres *et al.* (1997) con un 82.9% en germoplasma de Norte América, Dobo *et al.* (2010) con un 81.2% analizando germoplasma germoplasma americano y europeo, Biselli *et al.* (2014) con 74.9% analizando 127 accesiones accesiones de arroz de diferentes orígenes. La falta de ajuste total podría deberse a que el el microsatélite RM 190 está cercanamente ligado al gen GBBS y el carácter ACC está controlado por otros genes menores. La secuencia CT₁₁ mostro gran robustez para seleccionar genotipos con alta amilosa y pudo distinguirse sin ningún problemas de las secuencias CT₁₇ y CT₁₈ (bajo contenido de amilosa). La secuencia CT₂₀ no pudo diferenciarse estadísticamente de CT₁₁, aunque la media de los valores (25.9%) cae dentro del rango intermedio está muy cerca de los límites de alta amilosa. Si bien el número de muestras es chico (n=3) hay que analizar un número mayor de muestras para aumentar el poder estadístico y asegurar la robustez de este alelo para seleccionar.

Temperatura de gelatinización

La amplificación del marcador SSIIa generó dos alelos moleculares correspondientes al alelo TT asociado a baja temperatura y el alelo CG correspondiente a alta temperatura. Según este marcador el 61% de las muestras tienen el alelo de baja TG (TT) mientras que el 39% el alelo CG de alta TG.

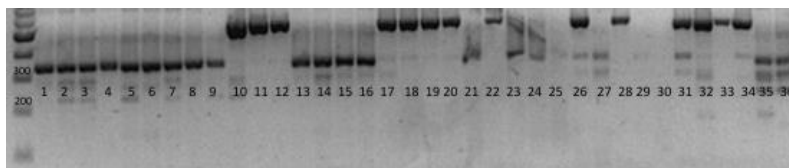


Figura N°2. Marcador SSIIa. Se puede apreciar el alelo TT en la muestra 1 y el alelo CG en la muestra 10.

Se pudieron asociar 31 datos del marcador SSIIa con datos de temperatura de gelatinización. El chi-cuadrado de Pearson tuvo una $p < 0,0001$ rechazando la hipótesis de independencia de datos entre los alelos y la temperatura de gelatinización. El alelo TT de tuvo una concordancia con una frecuencia relativa de 0,95 con baja temperatura (álcali test) mientras que el alelo CG de 0.92 con respecto a alta temperatura. El marcador molecular no logro distinguir los individuos con temperatura intermedia. La falta de ajuste total del marcador podría deberse a otros SNPs funcionales que se encuentran dentro del gen afectando la actividad enzimática.

Conclusiones

El marcador RM 190 tuvo una buena asociación con los datos de espectrofotometría para alta y baja amilosa pero no es capaz de predecir con exactitud genotipos de AAC intermedia. A pesar de esto logro explicar un 82% de la variación siendo un marcador útil para seleccionar por alta y baja amilosa.

El marcador SSIIa mostró una buena asociación con los datos fenotípicos de TG. No puede discriminar la clase intermedia de TG pero si tiene una buena asociación para BAJA/ALTA.

1. Lic. en Biotecnología, (M.Sc.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Ruta Prov. 39 Km. 143.5. Concepción del Uruguay, Entre Rios. Argentina. CP (3260). Email: colazo.jose@inta.gob.ar.
2. Lic. en Ciencias Aplicadas, (M.Sc.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
3. Ingeniero Agrónomo, (Ph.D.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).

La combinación de estos dos marcadores representaría una herramienta costo efectiva, sencilla y rápida para seleccionar genotipos usando selección asistida por marcadores moleculares en programas de mejoramiento genético.

Bibliografía

Ayres, N.M. et al. Microsatellites and single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germ plasm. *Theor. Appl. Genet.* 94:773-781.1997

Bao, J.S. et al. Nucleotide diversity in starch synthase IIa and validation of single nucleotide polymorphisms in relation to starch gelatinization temperature and other physicochemical properties in rice (*Oryza sativa L.*). *Theor. Appl. Genet.* 113:1171-1183. 2006

Biselli, C. et al. Improvement of marker-based predictability of Apparent Amylose Content in japonica rice through GBBSI allele mining. *Rice.* 7:1-18. 2014

Dobo, M. et al. Polymorphism in the GBSS gene affects amylase content in US and European rice germplasm. *Journal of Cereal Science.* 52:450-456. 2010

Little, R. R. et al. Differential effect of dilute alkali on 25 varieties of milled white rice. *Cereal chem.*, 35:111-126. 1958

Livore, A. Calidad Industrial y Culinaria del Arroz. *Revista IDIA XXI.* 6:187-195. 2004

Juliano, B.O. A simplified assay for milled rice amylose. *Cereal Science Today*, 16: 334-338.1971.

1. Lic. en Biotecnología, (M.Sc.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). Ruta Prov. 39 Km. 143.5. Concepción del Uruguay, Entre Ríos. Argentina. CP (3260). Email: colazo.jose@inta.gob.ar.
2. Lic. en Ciencias Aplicadas, (M.Sc.) Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).
3. Ingeniero Agrónomo, (Ph.D.). Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA).