

Caracterización Molecular de Arroz Rojo Colectado en Huila y Tolima

E. González, J. Vásquez, P. Ruiz, E. Corredor (Fedearroz), L. Fory, A. Mora, J. Silva, M. Duque y Z. Lentini. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Km 17 Vía Cali-Palmira. Tel: 4450000 ext 3399. E-mail: Zaida Lentini (Z.lentini@cgiar.org)

Introducción

La introducción de genes portadores de importantes características agronómicas ha conducido al mejoramiento del arroz. Simultáneamente se ha creado la necesidad de encontrar normas de seguridad para los riesgos asociados con la liberación de cultivos transgénicos en el ambiente. Entre los riesgos más comunes está el escape de genes foráneos del arroz transgénico a cultivos intraespecíficos, interespecíficos y/o a malezas, lo que puede llevar ocasionalmente a la evolución de malezas agresivas o al riesgo de extinción de las especies silvestres. El cruzamiento entre el arroz cultivado *Oryza sativa* L. y sus parientes puede ser esperado dentro del grupo genómico AA, donde se encuentran las especies silvestres de América tropical *Oryza rufipogon*, y *Oryza glumaepatula* (Oka & Chang, 1961; Vaughan & Tomooka, 1999) y el arroz rojo (*Oryza sativa* f. *spontanea*). El principal candidato de esta hibridación es el arroz rojo, maleza ampliamente distribuida en América Latina y con altas tasas de entrecruzamiento con las variedades comerciales. Es necesario caracterizar morfológica, fenológica y genéticamente las poblaciones de arroz rojo presentes en las principales zonas arroceras para evitar y controlar los fenómenos involucrados en su hibridación. Esta caracterización genética se realizó utilizando los marcadores moleculares microsatélites, que son simples secuencias repetidas de ADN y tienen la ventaja que pueden ser detectados por la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), además que presentan una alta variabilidad debido a su codominancia, abundancia en el genoma y elevado nivel de diversidad alélica en razón de sus altas tasas mutacionales (Chase *et al.* 1996). Esta investigación provee bases para evaluar los riesgos potenciales de usar plantas transgénicas en el trópico, describe áreas potenciales de flujo de genes y contribuirá a mejorar los procedimientos de bioseguridad en Colombia.

Objetivos

- Caracterizar genéticamente 158 individuos de arroz colectados en 7 lotes del Huila y Tolima (Saldaña) y algunas especies del género *Oryza*.
- Desarrollar una metodología que permita identificar el flujo genético en poblaciones grandes por medio de microsatélites.

Metodología

Material Vegetal

Para la caracterización genética se seleccionaron 158 individuos de arroz rojo colectados en 7 lotes de arroz en los departamentos de Huila y Tolima (Colombia), seleccionados por su historia de cultivo con las variedades mas importantes comerciales de Colombia. En la caracterización genética de las variedades y especies del género *Oryza* se usaron 8 variedades de arroz comercial: Cica 8, Cimarrón, Fedearroz 2000, Fedearroz Victoria 1, Iniap 12, Oryzica 1, Oryzica Llanos 5 y Palmar; 16 grupos de líneas transgénicas de Cica 8 que llevan el gen RHBV-N para resistencia al virus de la hoja blanca; 4 cruzamientos artificiales entre una línea transgénica y tres variedades comerciales, Iniap 12, Fedearroz 50 y Oryzica 1. Como controles se usaron *Oryza barthii*, *O. rufipogon* y *O. glaberrima*.

Extracción y amplificación de ADN

El ADN se extrajo utilizando el método de McCouch *et al.* (1988). Se utilizaron 50 microsatélites desarrollados por McCouch *et al.* (1997) El ADN genómico fue amplificado mediante PCR. Se separaron los fragmentos de PCR en geles de poliacrilamida al 6% y se visualizaron mediante el método de tinción de plata desarrollado por Promega Corp. (1999).

Caracterización genética

Para la identificación de marcadores específicos para los tipos de arroz fueron seleccionados 50 microsatélites (al menos dos por cromosoma). Estos microsatélites se utilizaron en los ensayos preliminares con las especies del género *Oryza*. Los resultados de este estudio permitieron identificar 24 microsatélites polimórficos para el arroz rojo y así iniciar la caracterización de los 158 individuos de arroz rojo.

Metodología para identificación de flujo genético

Debido a que las poblaciones de arroz comercial presenta bajas tasas de entrecruzamiento, es necesario desarrollar una metodología que permita identificar molecularmente el flujo de genes en poblaciones grandes. Para ello, se sembraron en invernadero 11 combinaciones de Cica 8: Oryzica Llanos 5 (1:1 1:3 hasta 1:100), las cuales se cosecharon a los 20 días después de la siembra. Se amplificó el ADN utilizando 10 marcadores microsatélites.

Análisis de datos

Para el análisis de los datos se usó el algoritmo de Dice para el cálculo de distancias genéticas entre individuos y el método UPGMA en la elaboración del dendrograma, ambos construidos usando el software NTSYS-PC versión 2.02 (Rohlf, 1997).

Resultados y Discusión

Caracterización genética de algunas variedades y especies de *Oryza*. La tasa promedio de polimorfismo entre Cica 8 y las diferentes variedades osciló desde 48% con Iniap 12, hasta 96% con Palmar. Entre el 85% y 92% de los microsatélites analizados fueron polimórficos entre Cica 8 y las especies *O. rufipogon*, *O. glaberrima* y *O. barthii* (Tabla 1). La accesión de arroz rojo mostró un polimorfismo de 56% respecto a Cica 8. Los resultados indican que no hay polimorfismo entre la variedad de Cica 8 no transgénica y las líneas de Cica 8 transgénicas. En contraste, en cruces artificiales entre Cica 8 transgénica y las variedades seleccionadas el polimorfismo detectado es 30% a 39%, observando la segregación esperada para una generación F1.

	C8	Cm	I-12	Ob	Og	OL5	Pal	Or	Vic	F2000	Ory
Arroz Rojo	56	37	59	88	88	34	75	48	64	55	48
Cica 8		50	48	85	88	52	96	92	68	57	52
Cimarrón			46	84	92	44	89	92	66	52	46
Iniap 12				96	92	60	84	88	46	33	42
<i>O.barthii</i>					57	84	92	92	88	88	92
<i>O.glaberrima</i>						92	67	100	100	92	92
O. Llanos 5							73	85	64	55	23
Palmar								89	75	79	78
<i>O.rufipogon</i>									92	89	96
Victoria 1										40	60
Fedearroz 2000											46

Tabla 1. Tasa Promedio de Polimorfismo Utilizando 31 Microsatélites. Cica 8 (C8); Cimarrón (Cm); Iniap 12 (I-12); *Oryza barthii* (Ob); *Oryza glaberrima* (Og); Oryzica Llanos 5 (OL5); Palmar (Pal); *Oryza rufipogon* (Or); Fedearroz Victoria 1 (Vic); Fedearroz 2000 (F2000); Oryzica 1 (Ory)

Caracterización genética del arroz rojo, variedades y especies silvestres de *Oryza*. El análisis de similitud entre los individuos de arroz rojo usando 6 marcadores produjo un dendrograma formado por 12 grupos (Fig. 1). Algunos individuos de arroz rojo presentaron una alta similitud genética y morfológica en características de grano con las variedades (Cluster amarillo, Fig 1), principalmente individuos colectados de los lotes de Oryzica 1 y Cimarrón. También se observó que al menos un 25% de individuos de todos los lotes, se encuentran en el mismo grupo de las variedades. Algunos individuos colectados del lote de Coprosem presentaron una alta similitud con *O. rufipogon* (Cluster rojo, Fig 1). Las especies *O. barthii* y *O. glaberrima* forman un grupo independiente al igual que *O. glumaepatula* en un grupo unitario. Estas especies tienen una baja similitud con *O. rufipogon* y con las variedades.

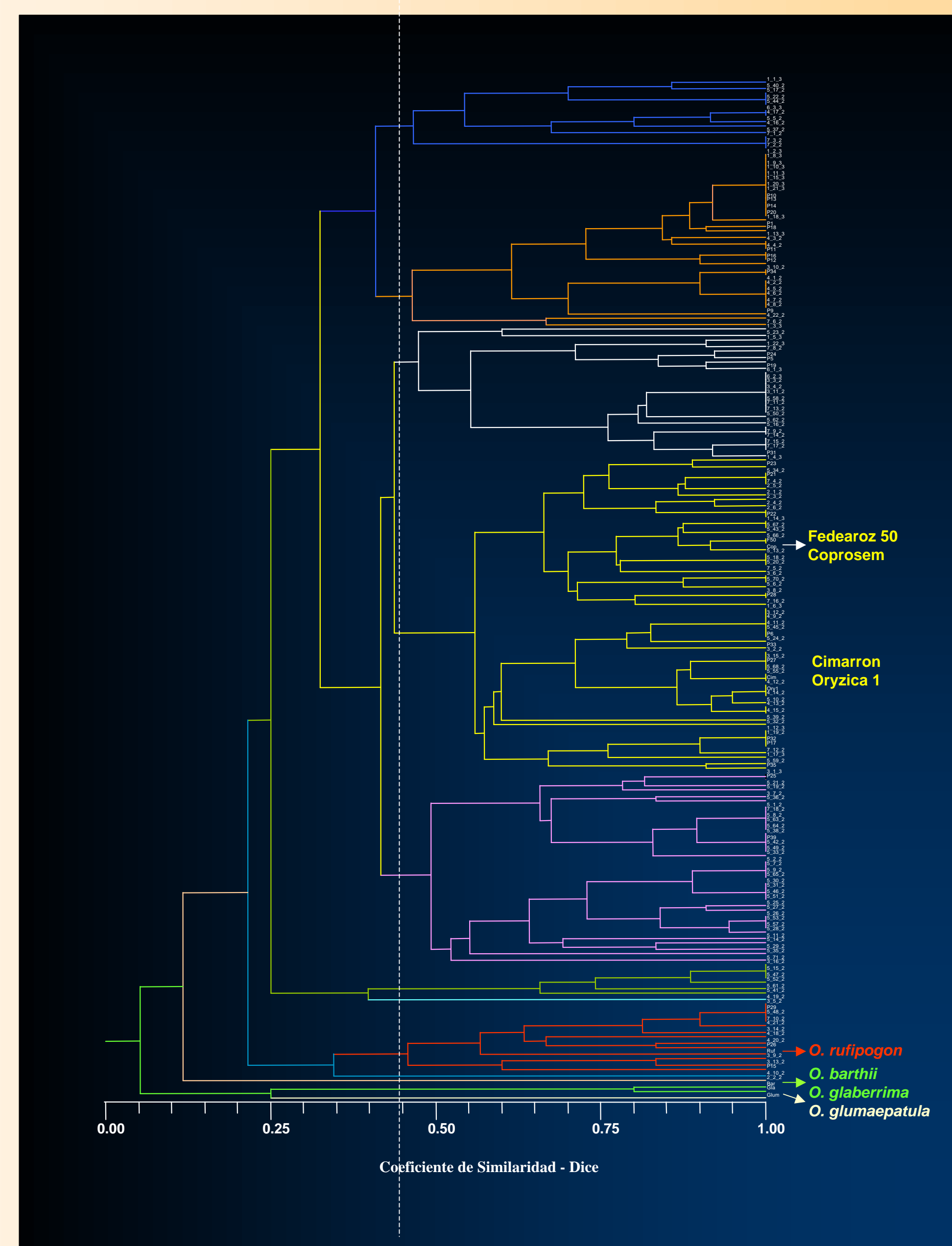


Figura 1. Dendrograma de similitud genética entre 158 individuos de arroz rojo de 7 lotes del Huila y Tolima.

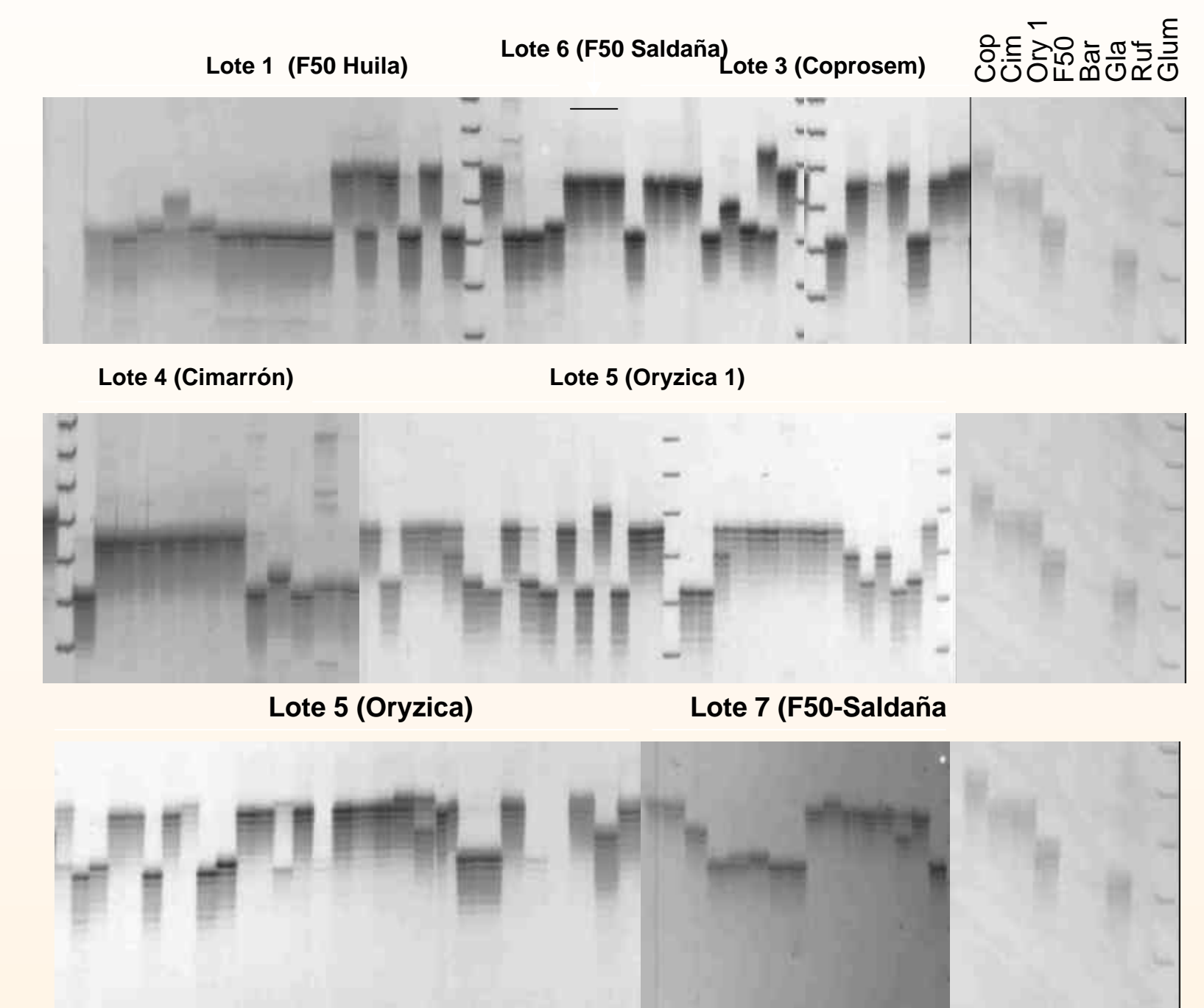


Figura 2. Patrones registrados de arroz rojo con el microsatélite RM 222.

Identificación de flujo genético en poblaciones grandes

Mediante la estandarización de un protocolo utilizando las variedades Cica 8: Oryzica Llanos 5 fue posible identificar hasta un 2% de tasa de entrecruzamiento artificial con los microsatélites RM211, RM212 RM220 y RM240 (Fig 3).

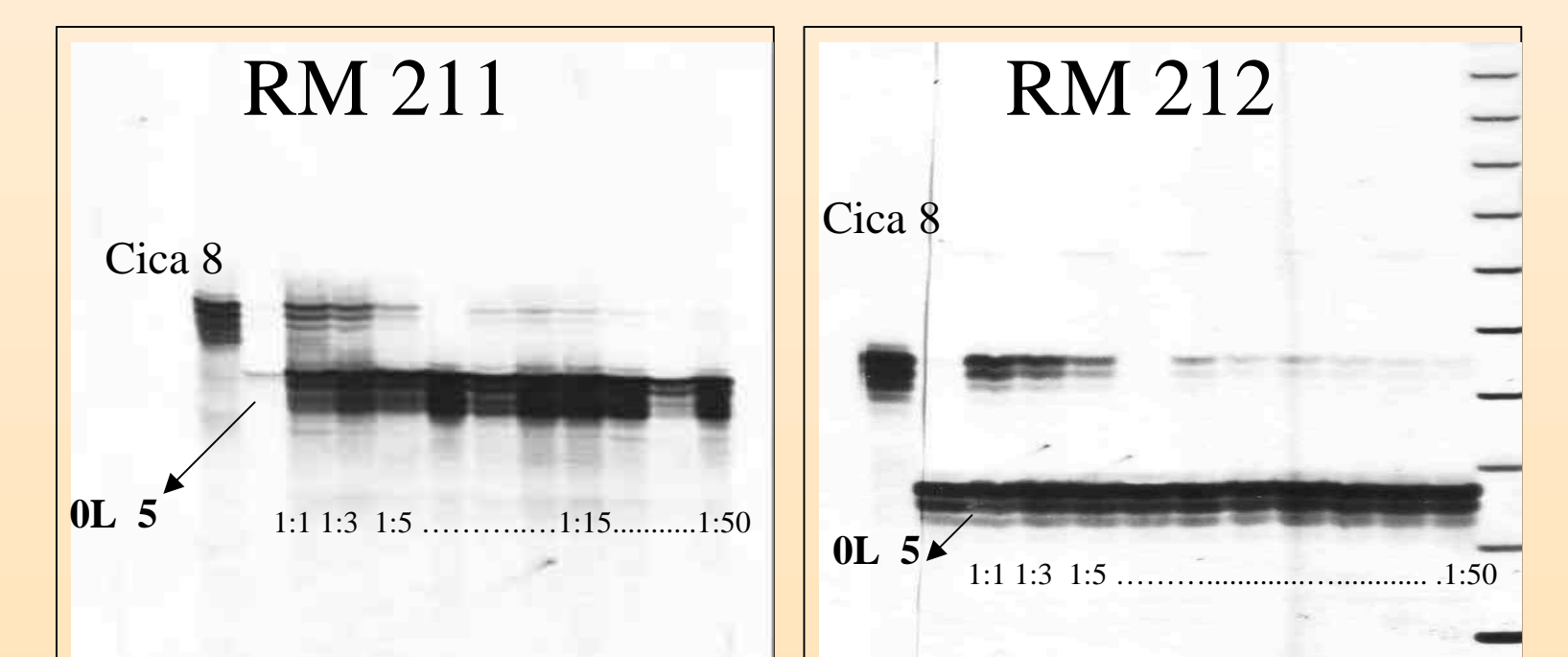


Figura 3. Amplificación mediante microsatélites de las variedades Cica:Oryzica Llanos 5 en proporciones de 1:1, 1:3 hasta 1:50.

La metodología implementada en este trabajo provee herramientas fundamentales en la evaluación de flujo de genes desde poblaciones de arroz transgénico y no transgénico hacia poblaciones de especies silvestres de arroz y de arroz rojo, contribuyendo en el mejoramiento de las normas de bioseguridad en Colombia.

Conclusiones

- Se identificaron microsatélites específicos que permiten distinguir las variedades, el arroz rojo y las especies silvestres. Su utilización permitirá monitorear el flujo y la introgresión de genes entre estas poblaciones.
- Con los marcadores analizados no se detectaron cambios en el genoma de la variedad transgénica de Cica 8 respecto a la no transgénica, sugiriendo que la introducción del gen de la N-proteína no generó cambios substanciales en estas regiones de microsatélites.
- Se detectó una alta diversidad en la población de arroz rojo estudiada. Si bien como era esperar los individuos de arroz rojo presentaron una mayor similitud con las variedades, algunos biotipos fueron genéticamente similares a *O. rufipogon*.
- Hasta el momento, se tiene una metodología que permite detectar una tasa de entrecruzamiento del 2% mediante el uso de microsatélites polimórficos y específicos.

Referencias

- Chase, M., R. Kesseli & K. Bawa. 1996. Microsatellite markers for population and conservation genetics of tropical trees. *American Journal of Botany* 83: 51-57.
- McCouch, S. R., G. Koehler, Z. Y. Wang G. S., Khush, W. R. Coffman & S. D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theoretical Applied of Genetics* 76 : 815-829.
- McCouch S.R., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y.G. Cho, N. Huang, T. Ishii & M. Blair. 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology* 35: 89-99.
- Oka, H.I. & W.T. Chang. 1961. Hybrid swarms between wild and cultivated rice species, *Oryza perennis* and *O. sativa*. *Evolution* 15: 418-430.
- Promega Corporation. 1999. Technical Manual: SILVER SEQUENCE™ DNA Sequencing System. 19 p.
- Rohlf, F. 1997. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System versión 2.02.Rohlf, F. 1997. NTSYS-PC. Numerical Taxonomy and Multivariate Analysis System ver 2.02.
- Vaughan, D.A. & Tomooka. 1999. Varietal Differentiation and Evolution. Wild rice in Venezuela. *Rice Genetics Newsletter* 16: 15-17.