



Centro Internacional de Agricultura Tropical
Desde 1967 *Ciencia para cultivar el cambio*

Estado actual de la biotecnología en el mejoramiento genético de arroz en el CIAT

12 Mayo de 2018

Maria Fernanda Alvarez
Mejoradora Molecular -HIAAL

m.f.alvarez@cgiar.org



El CIAT es un Centro de Investigación de CGIAR

Objetivos del programa de mejoramiento genético de arroz CIAT

- Aumento del potencial de rendimiento
- Tolerancia o resistencia al estrés biótico (Piricularia y VHB)
- Tolerancia al estrés abiótico (altas temperaturas nocturnas, baja luz, sequía y uso eficiente de nitrógeno)
- Buena calidad molinera y culinaria

Programa de mejoramiento de arroz

Rasgos

- Caracterización del rasgo.
- Métodos de evaluación fenotípica.
- Caracterización de poblaciones.
- **Validación de genes.**

Genes y marcadores moleculares

- **Mapeo de QTL**
- **Validación de QTL**
- **Asociación amplia del genoma**
- **Identificación de marcadores funcionales**

Desarrollo básico de germoplasma

- Mejoramiento convencional
- **Retro-cruzamientos asistidos**
- **Selección asistida por marcadores**
- Selección recurrente
- **Selección genómica**
- **Evaluación de diversidad y estructura en poblaciones**

Mejoramiento elite

- Líneas trópico y templado
- FLAR, CIRAD-CIAT
- Híbridos -HIAAL;
- MET- NARS

Identificación de donantes de:

- Tolerancia a estrés abiótico
- Resistencia a enfermedades

Desarrollo de :

- Poblaciones para mapeo genético –mejoramiento.
- **Marcadores moleculares.**
- Software

- Líneas de introgresión
- Población de selección recurrente .
- **Población de entrenamiento para selección genómica.**
- Líneas parentales mejoradas .

Líneas parentales, líneas avanzadas e híbridos:

- Potencial de rendimiento
- Calidad molinera-culinaria
- Resistencia o tolerancia a estrés biótico
- Tolerancia estrés abiótico.

Método/
tecnología

Resultados

Herramientas para el mejoramiento genético

Selección

Selección genómica

Marcadores moleculares

Selección asistida, SAM

Retro-cruzamientos asistidos, RAM

Estudios de diversidad
y estructura de
población

Transformación genética

Mutación

Edición

CRISPR-cas9

TALENs

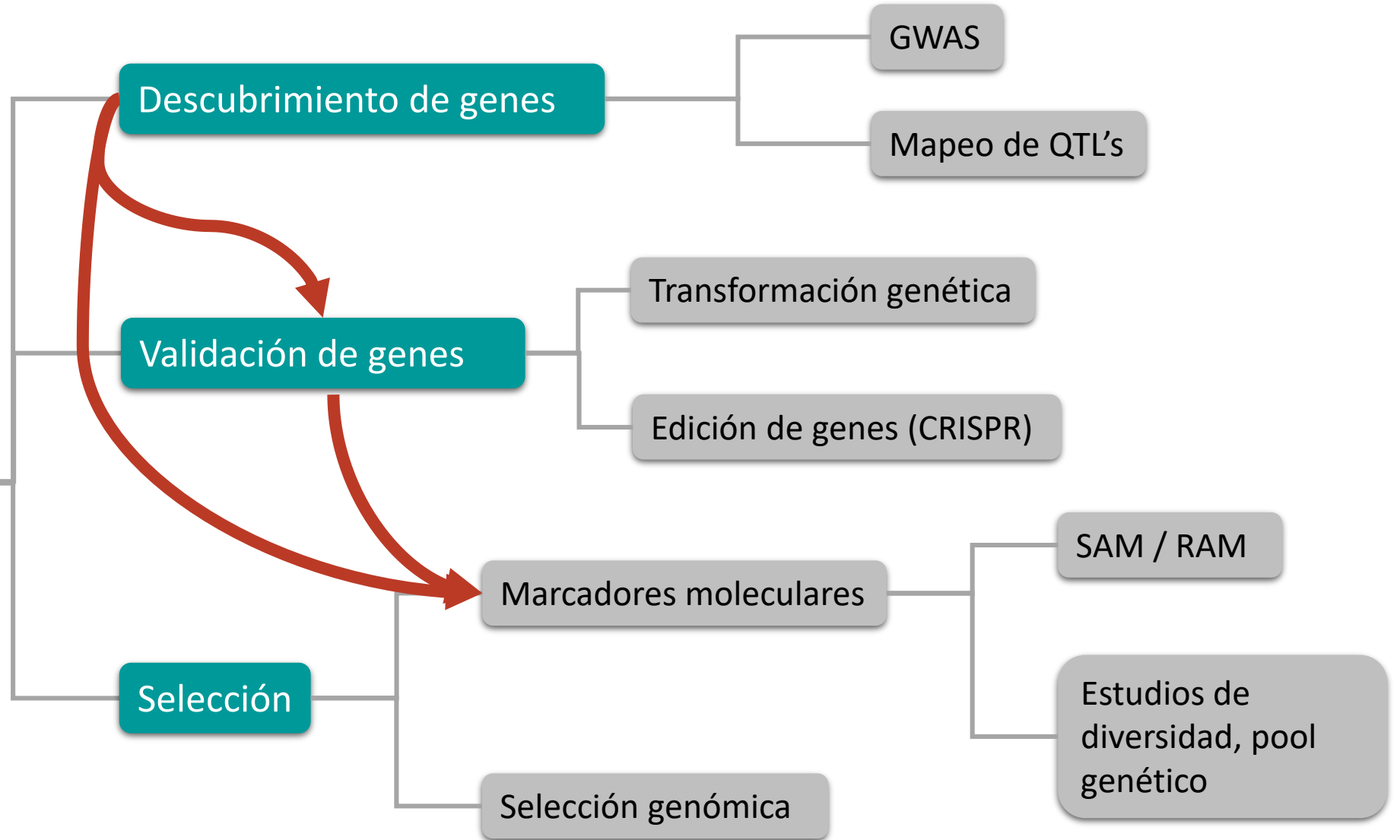
Zinc fingers

Agentes
mutagénicos

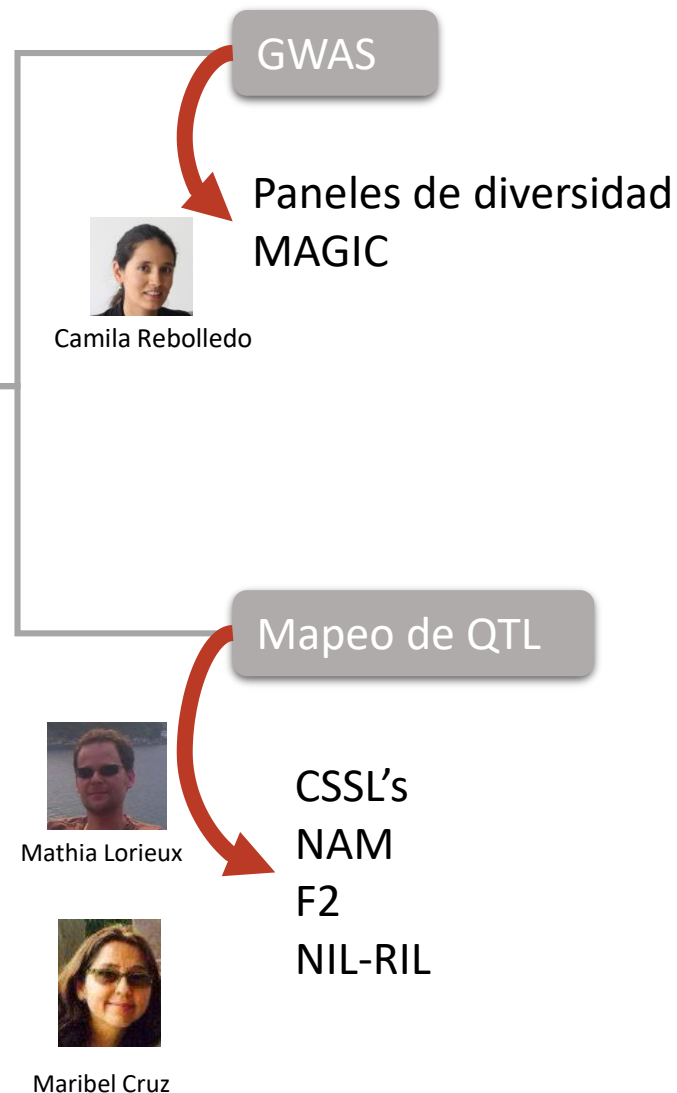
Físicos

Químicos

Desarrollo de herramientas biotecnológicas en CIAT



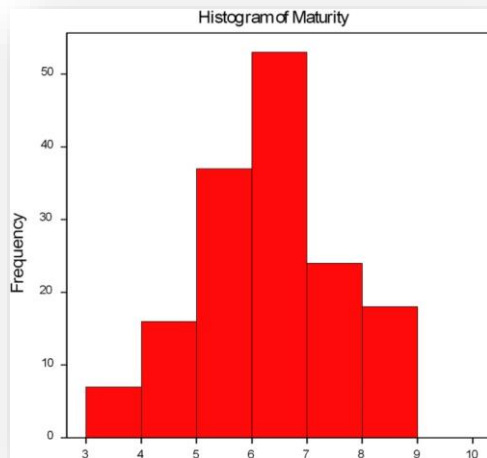
Descubrimiento de genes



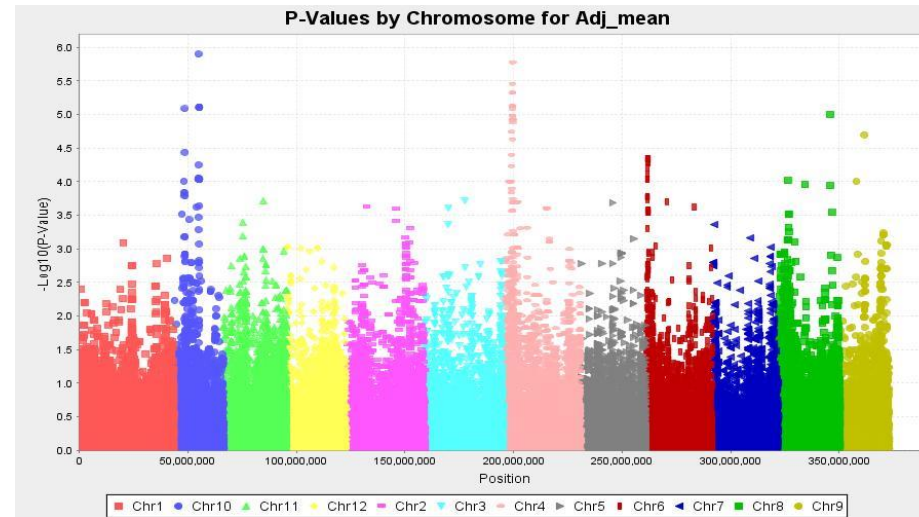
- Rendimiento potencial
- Vigor inicial
- Tolerancia a estrés hídrico en fase vegetativa
- Tolerancia a baja Luz en fase de maduración
- Tolerancia a altas temperaturas nocturnas
- Reservas de carbohidratos
- Arquitectura de panícula
- Contenido de amilosa
- Virus de la hoja blanca (VHB)
- **Caracteres secundarios de polinización cruzada**

- **Caracteres secundarios de polinización cruzada**
- Resistencia a VHB
- Arquitectura de panícula

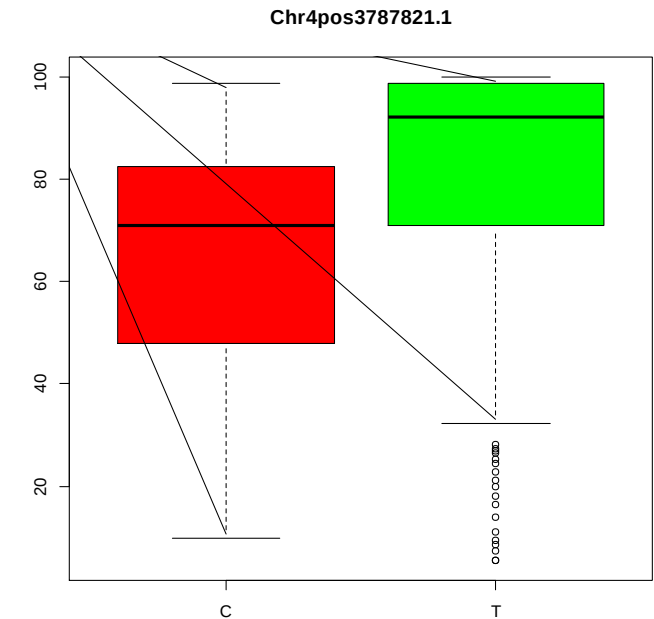
- Se prueban poblaciones diversas evaluando una gran cantidad de genotipos y alelos mediante el uso de modelos mixtos lineales



Fenotipado de la población



Marcadores SNP distribuidos en el genoma



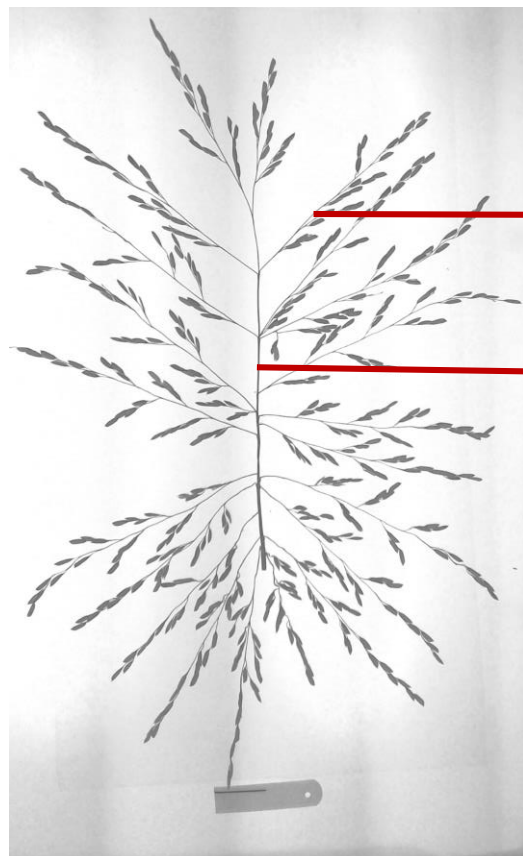
SNP con diferencia significativa

Asociación estadística basada en el **desequilibrio de ligamiento LD**

- Arquitectura de panícula (componentes de rendimiento)



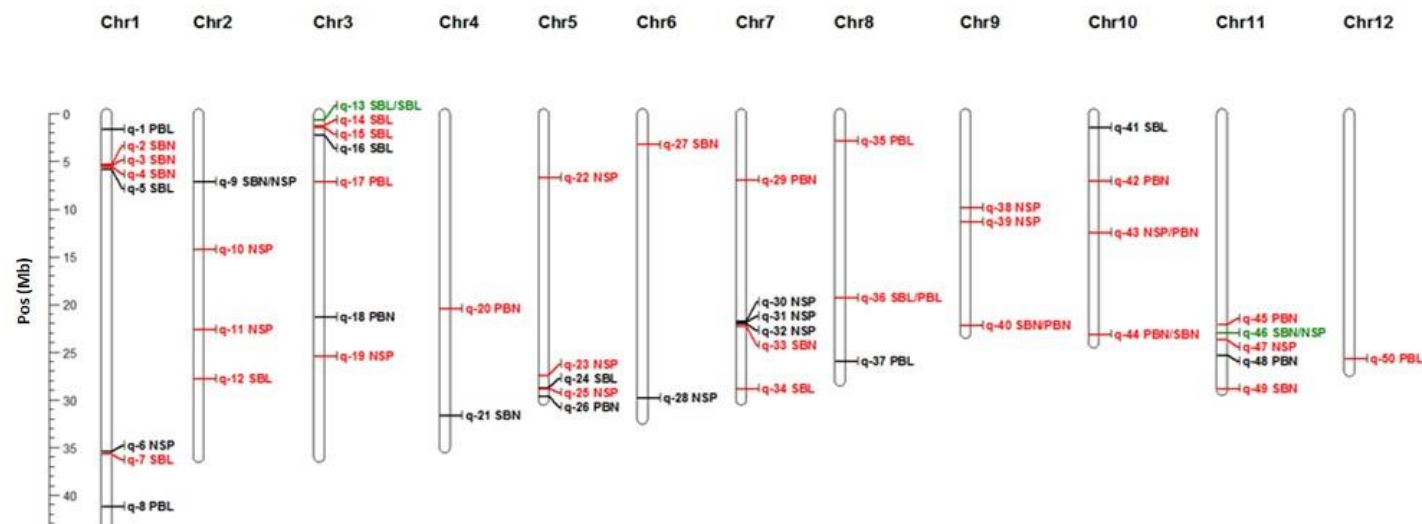
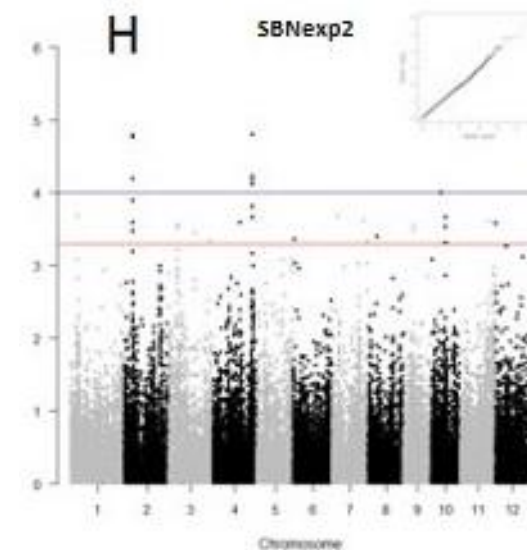
Camila Rebolledo



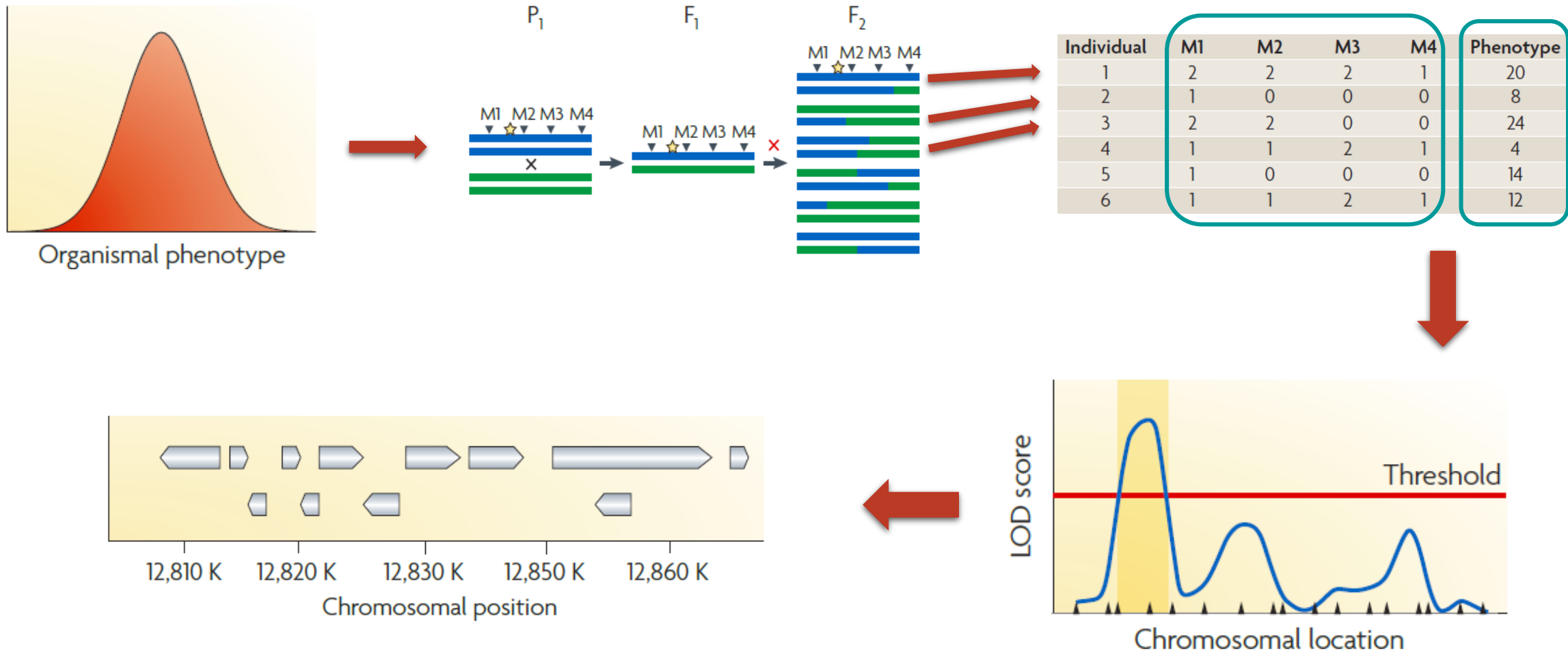
florecillas por panícula (17 SNP)

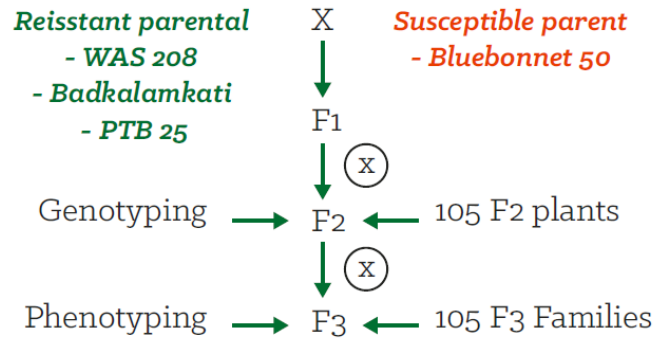
Longitud (11SNP) y numero(11SNP) de ramificaciones 2^{ria}

Longitud (7SNP) y numero (10SNP) de ramificaciones 1^{ria}

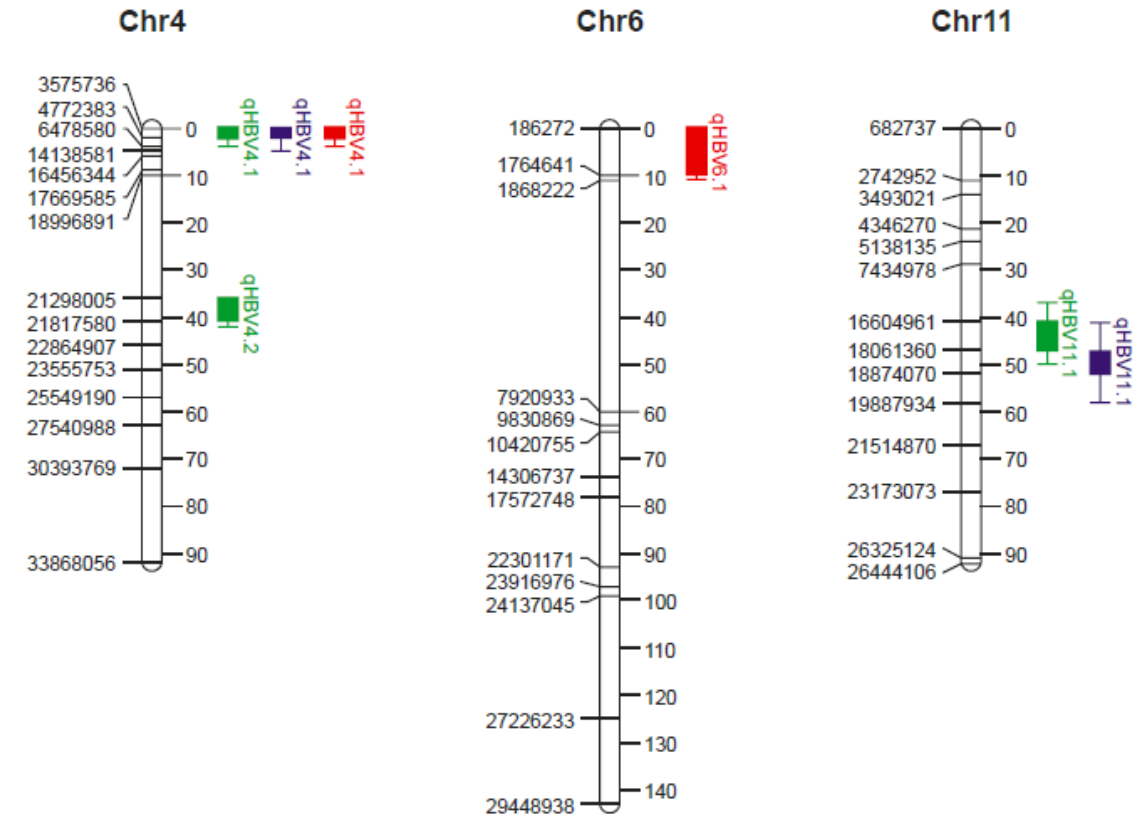


- Se buscan genes responsables de una característica o marcadores asociados a un fenotipo determinado en una población bi-parental.





Metodología cuantitativa –severidad



- Tres fuentes de Resistencia
- Tres familias F₂ –F₃
- 11 QTL en cromosoma 4,6 y 11



Paul Chavarriaga

Sandra Valdez

Validación de genes

Mutación

Transformación genética

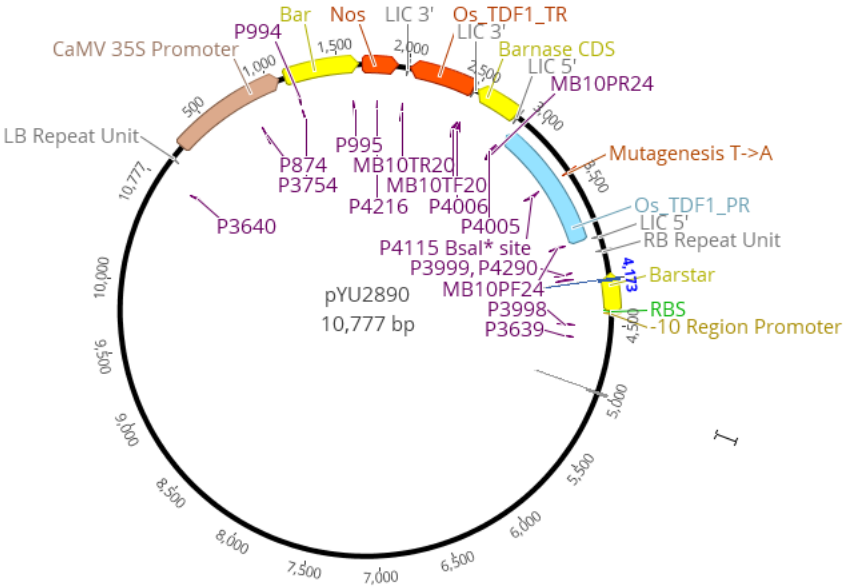
Edición de genes (CRISPR)

- Expresión sito específica – de genes reporteros (*barnase*, *GFP*, *Gus*)
- **Sobreexpresión de *TDF1*- *barnasa***

- Hoja caída (prueba concepto)
- **Gino-esterilidad *AE1***
- **Andro-esterilidad *TDF1***
- VHB
- Número de granos (*Gn1a*)
- Resistencia a striga

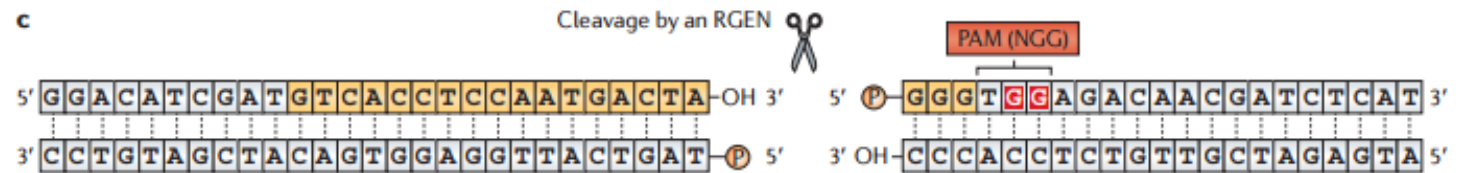
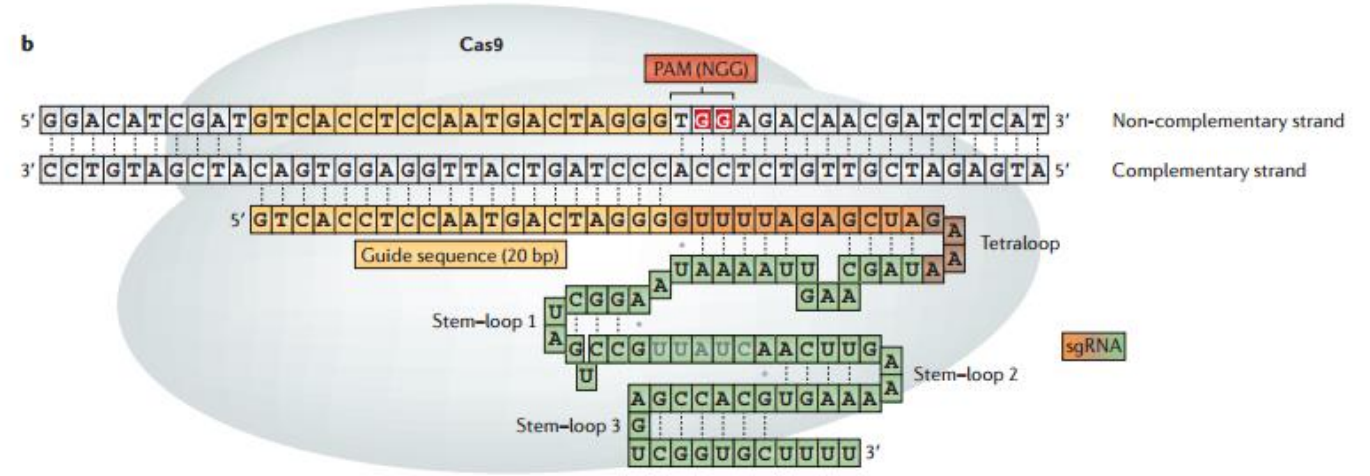
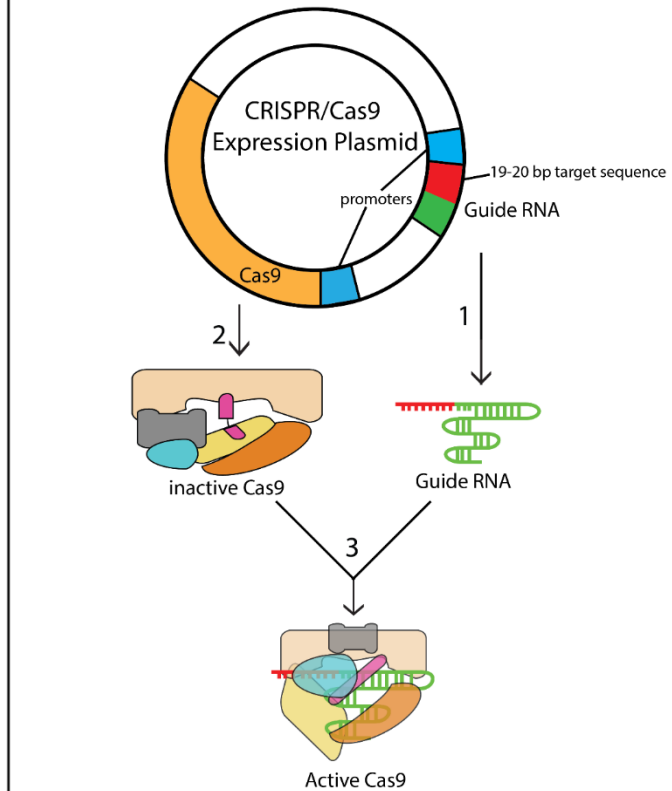
Validación del gen TDF1 de maíz en arroz

Promotor	Gen	Terminator	Plantas de una copia	Plantas de copia multiple
Os TDF1	barnase CDS	Os TDF1	3	18
Os EA1	barnase CDS	Os TDF1	17	10
Os TDF1	Gus	Os TDF1	5	18
Os EA1	Gus	Os EA1	8	10
Osms 1	barnase CDS	Osms 1	22	25
Os EA1	GFP	Os EA1	5	16
Os_EA1	barnase CDS	Os_EA1	8	4



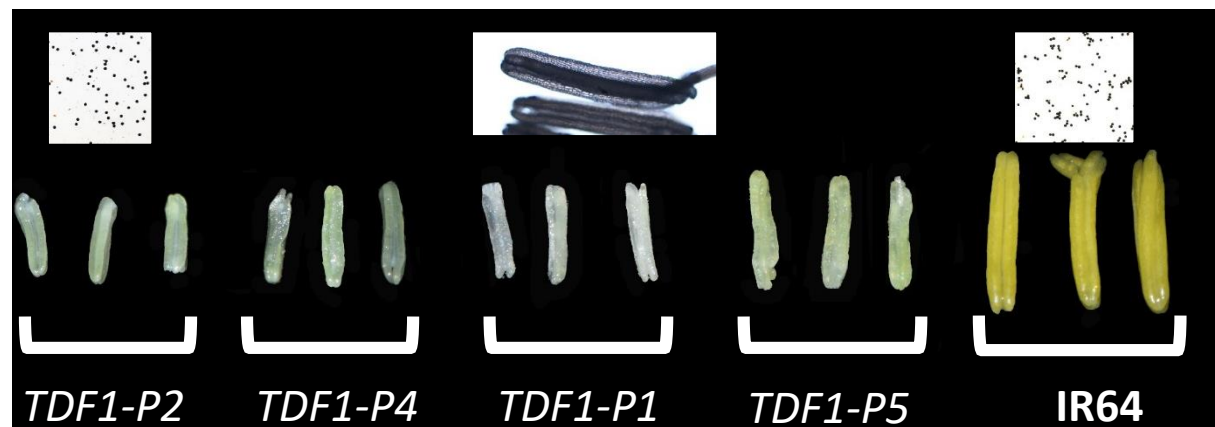
- Conocimiento del gen a editar
- Secuencias PAM dentro del gen
- Llevar a cabo transformación para insertar el plásmido CRISPR-CAS9

Engineered CRISPR/Cas9 System



Kim and Kim, nature reviews 2014

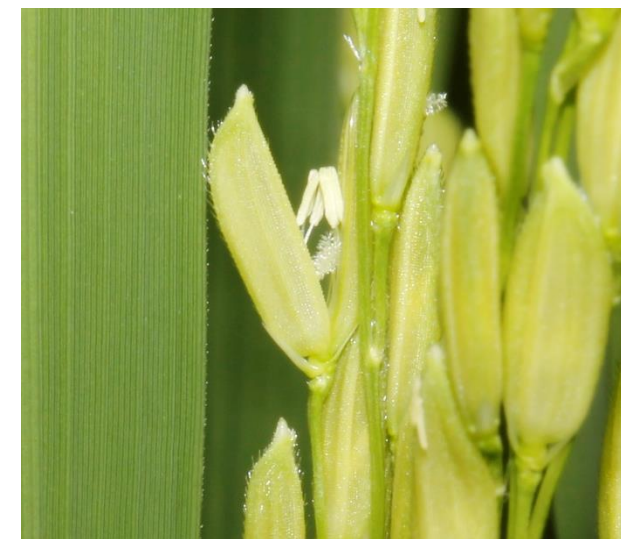
Edición de genes (CRISPR)

[illegible]

Para la planta P2 el 90 % del polen es estéril

Para las plantas P4, P5, P1 are 100% del polen es estéril

Andro-esterilidad *TDF1*



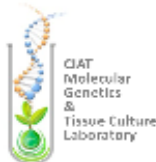
TDF1 (tapetum difereciation 1)

Selección

Marcadores moleculares



C. Quintero #0026



SAM / RAM

- SAM /RAM de Pi9 y Pi40
- SAM/RAM genes de componentes de rendimiento Gn1a
- SAM/RAM QTL's de arquitectura de raíz
- **Conversión asistida RAM, de líneas B a líneas A (híbridos)**

Estudios de diversidad y estructura

- Diversidad genética progenitores de híbridos
- Estructura de población de progenitores de híbridos

Control de calidad y huella genética

- Estudios para variedades de LAC
- Parentales de híbridos
- Pureza de semilla híbrida

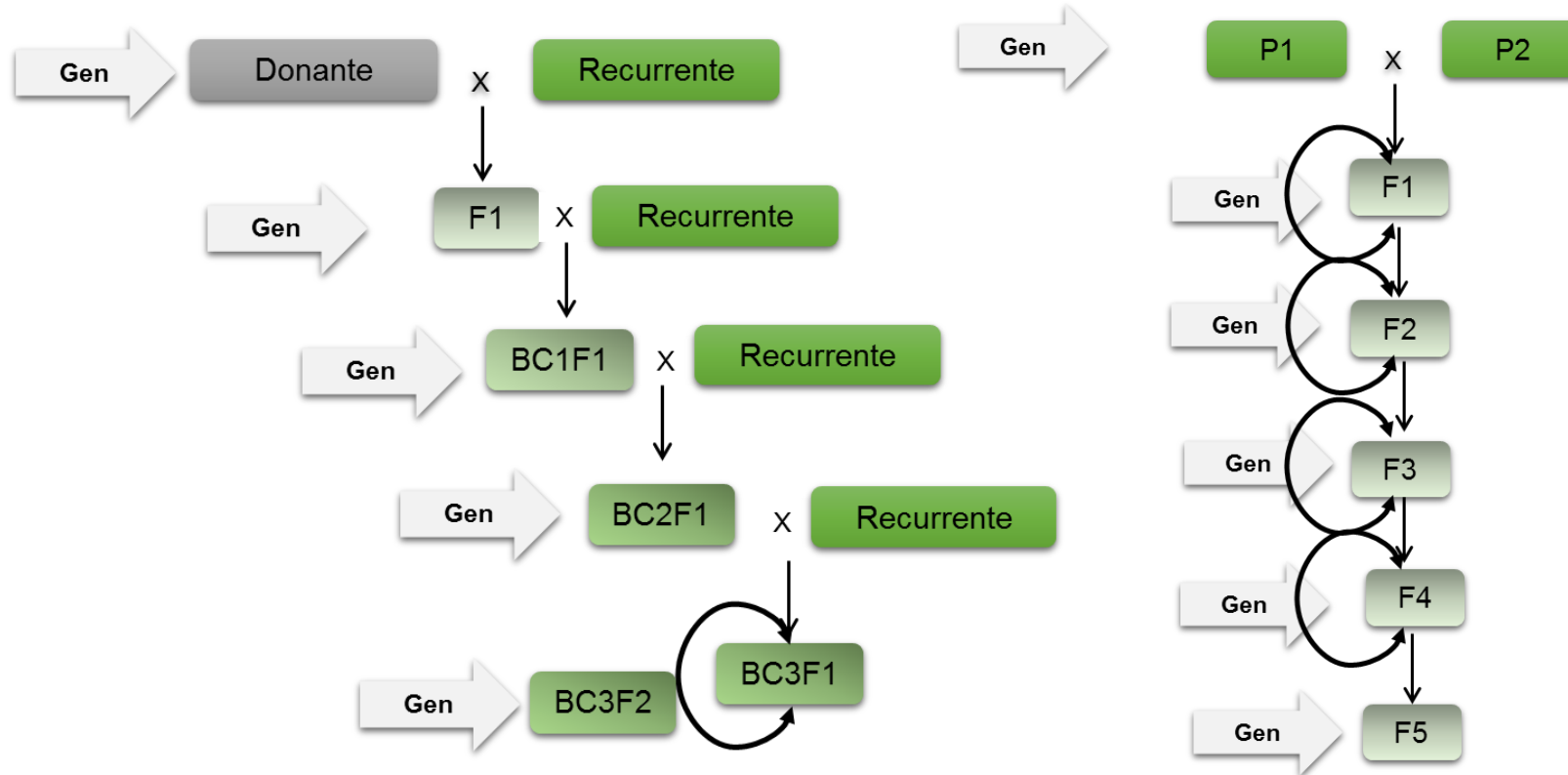
Selección genómica



Cecile Grenier

- Predicción en poblaciones de selección recurrente para altura de planta, días a floración y rendimiento

- Selección indirecta de fenotipos de acuerdo a la presencia/ausencia o no de marcadores moleculares asociados con el rasgo de interés.



Se pueden usar en diferentes esquemas de selección y en diferentes tipos de poblaciones, para introgresar un solo gen o regiones del genoma asociadas a una característica o varias características

SAM, Selección asistida por marcadores

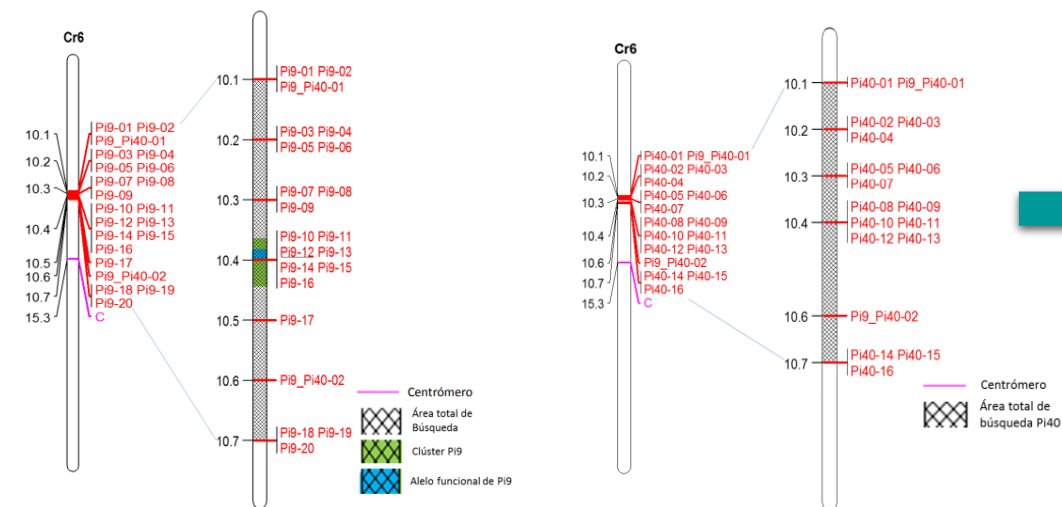
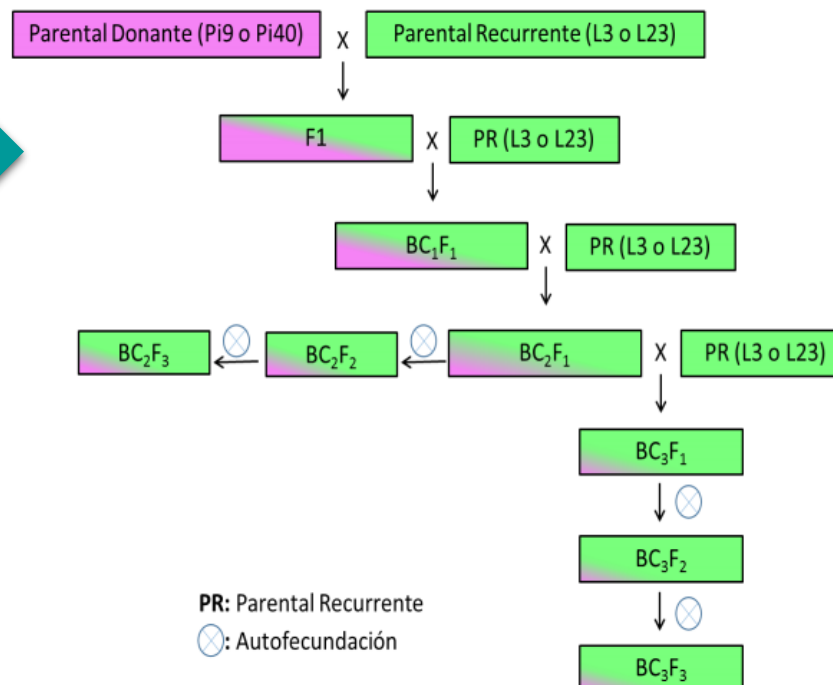


Tabla 3. Porcentaje de recuperación de alelos del parental recurrente, en las cuatro poblaciones en proceso de mejoramiento.

Generación	Tamaño Población	ID Planta Seleccionada	Porcentaje de alelos del padre recurrente
Población L3_Pi9			
BC1F1	120	CT25128	69
BC2F1	77	CT25130	92
BC3F1	100	K1	95
Población L23_Pi9			
BC1F1	84	CT25138	74
BC2F1	117	CT25737	97
BC2F2	144	J32	100
Población L3_Pi40			
BC1F1	118	CT25174	67
BC2F1	124	H273	91
BC3F1	140	L10	100
Población L23_Pi40			
BC1F1	119	CT25175	67
BC2F1	122	H176	92
BC3F1	54	L140	100

Introgresión de Pi 9 y Pi 40 en líneas de altillanura



PR: Parental Recurrente

⊗: Autofecundación



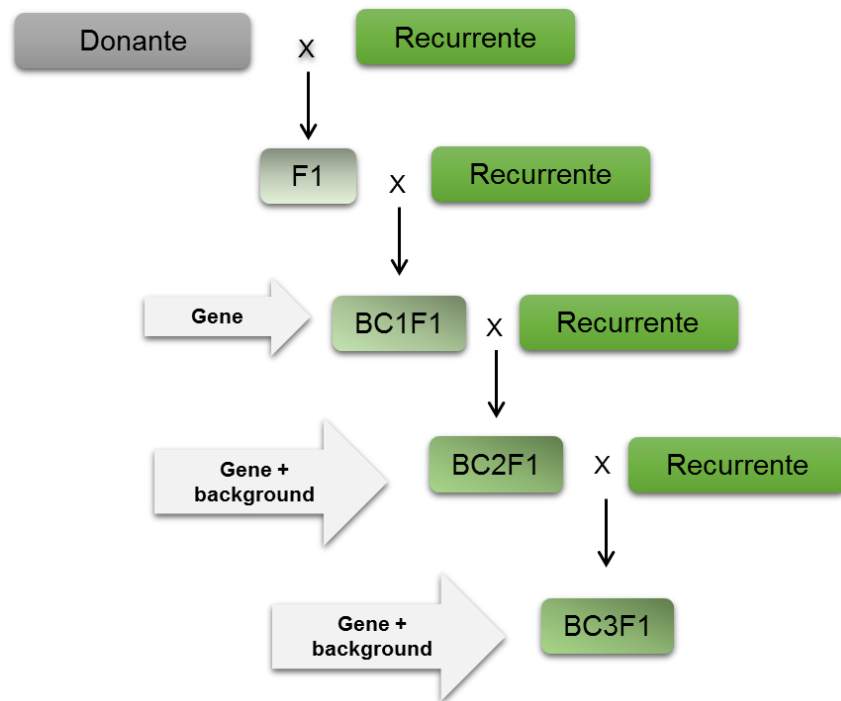
Paola Mosquera



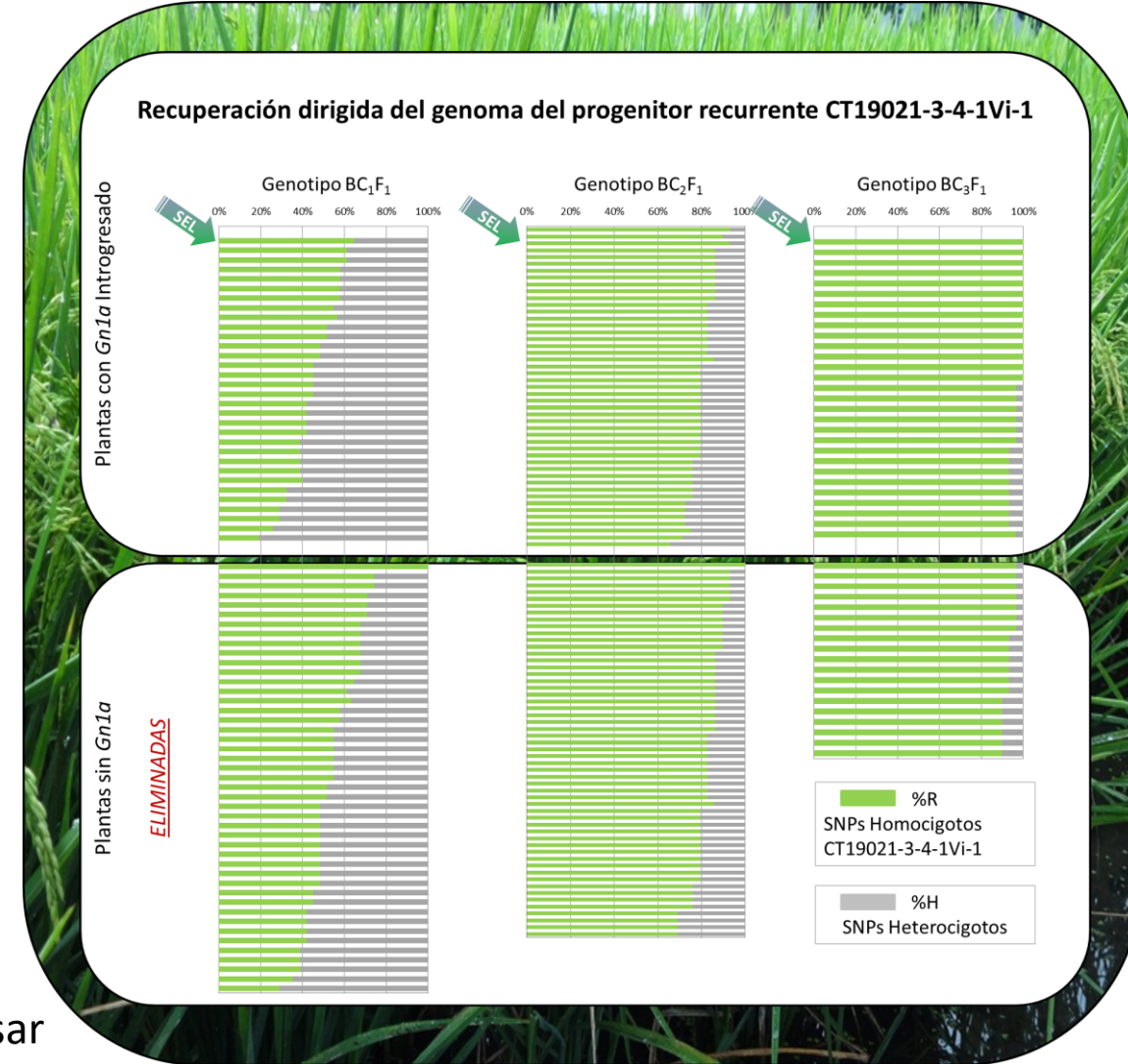
Alexander Silva (0036)

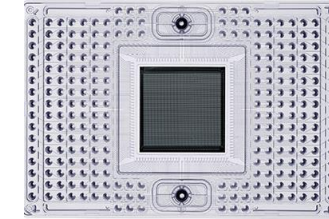
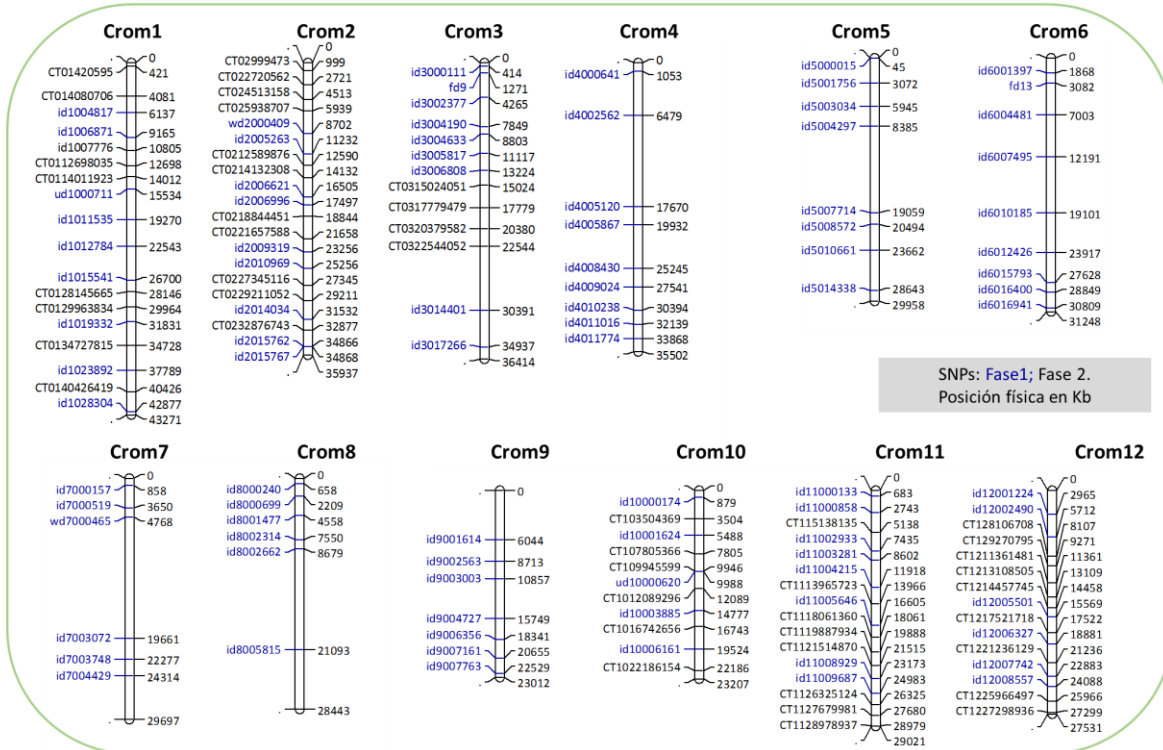
- Marcador molecular co-dominante para Pi9 y Pi40
- 4 poblaciones, dos Pi9, dos Pi40
- Introgresión de la Resistencia con SAM y RAM, con evaluación agronómica
- Recuperación de 95- 100% del fondo genético

- Tener SNP distribuidos a lo largo del genoma para RAM

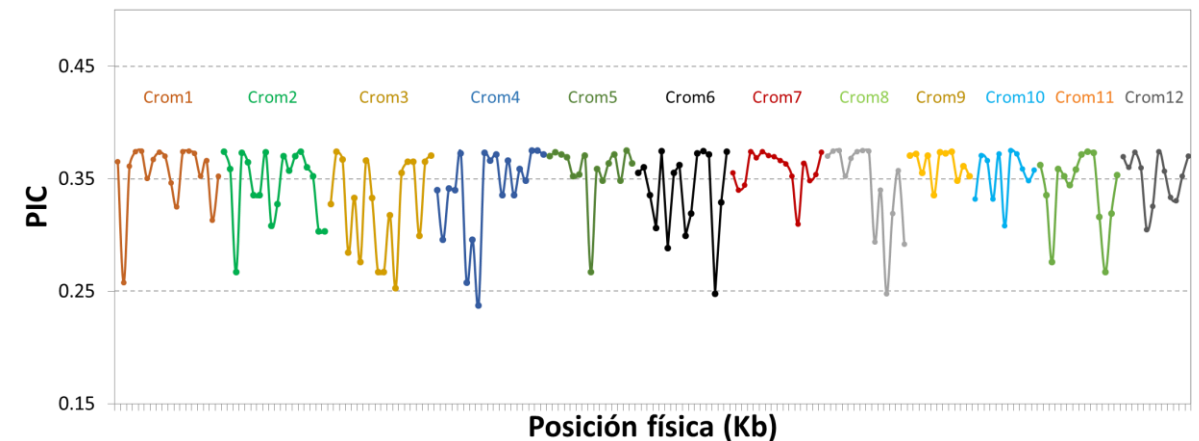


Limpieza de fondo genético en retro-cruzamientos para introgresar una característica particular .



Distribución de SNPs en el genoma del Arroz

C. Quintero

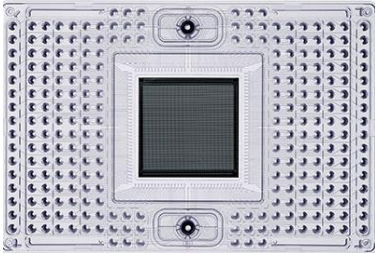
Capacidad informativa alta del arreglo de SNPs

Aplicación práctica de información de marcadores SNP reportada enfocada a genotipos Indica de LAC.

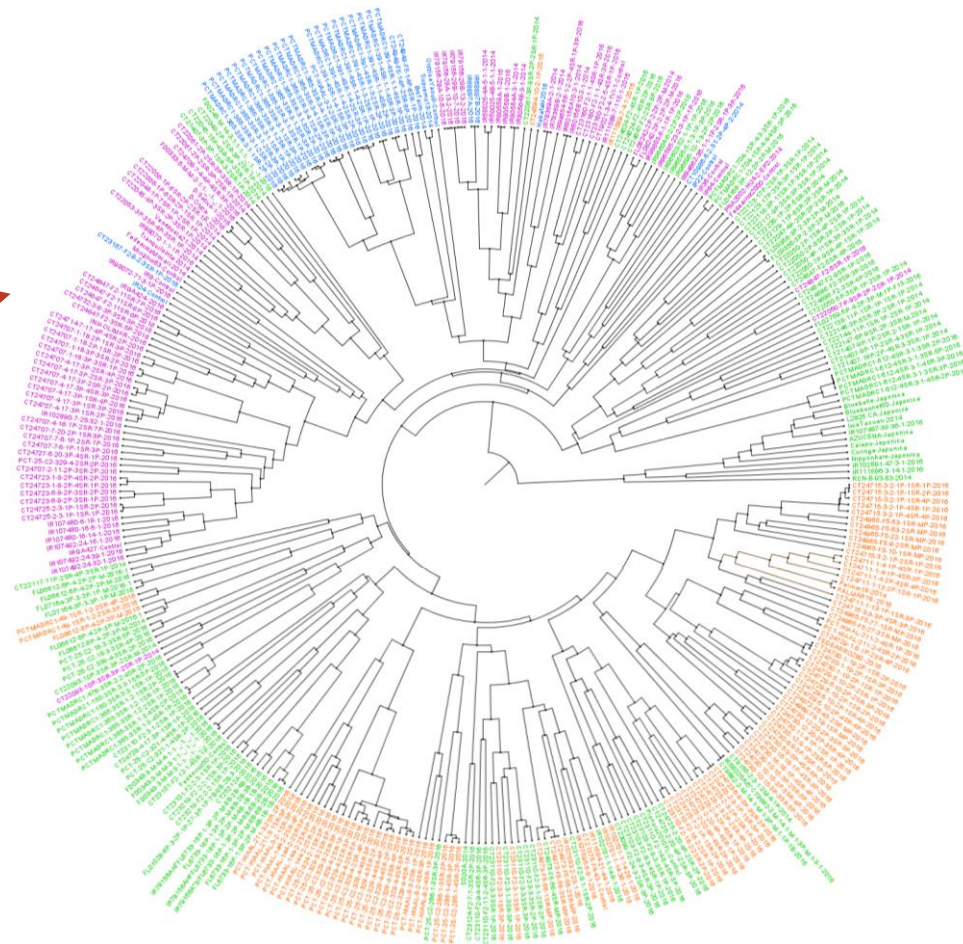
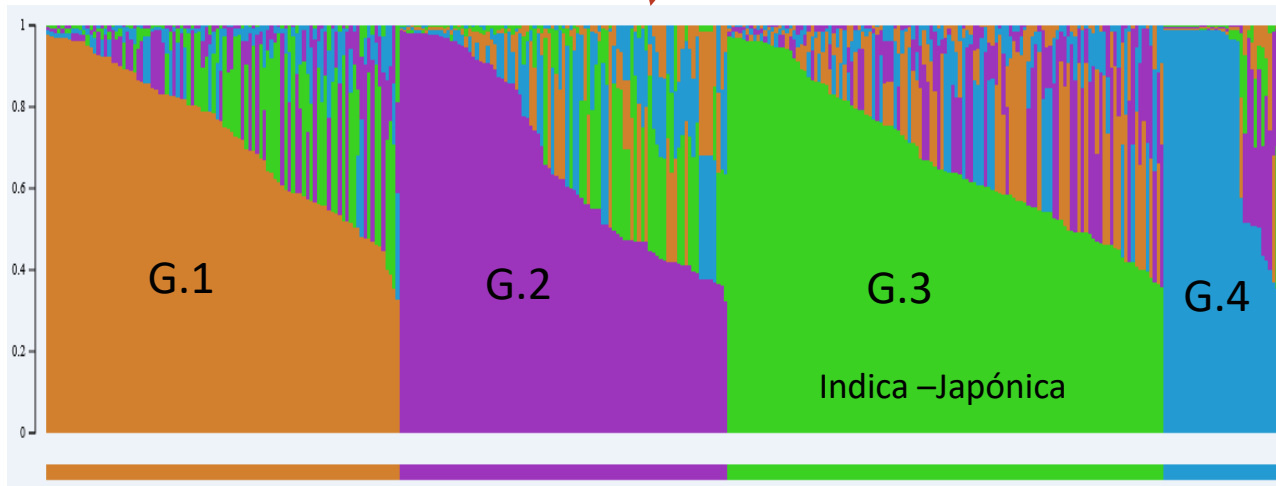
- 180 marcadores SNP distribuidos en el genoma
- Alta capacidad informativa – PIC

Estudios de diversidad y estructura

- Se utilizan para evaluar la diversidad de los programas de mejoramiento y diseñar cruzamientos de acuerdo a las agrupaciones en cuenta estructura y distancia genética.



Tipo de Línea	IB9	id1001624	id100871	id1007776	id1009687	id1208557	id2010969	id2014034	id3000111	id3002377	id4000841	id4003562	id4003120	id4009867	id4009024	id4011774	id5000015	id5007556	id5003934	id5000297	id5007714	id5010661	id5014338	id6007495	id6012426	id6011941	id70000157	id70000519	id8000240	id8000262	id90001614	id10000620	id10000465
A	AA	AA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
B	AA	AA	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG	GG
R	GG	GG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
R	GG	GG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
R	GG	GG	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA	AA
H	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG
H	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG	AG



HIAAL

N=344 individuos
89 SNPs
K=4

Control de calidad y huella genética

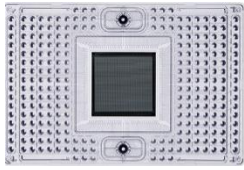
• Selección de semillas

• Germinación

• Extracción de ADN

• Selección de marcadores polimórficos entre línea A y línea R

• Evaluación con marcadores



• Semilla 100% heterocigota para los alelos de los parentales

	id1004402	id1004407	id1004479	id1004330	id1004418	id1004342	id1004420	id1004376	id1004424	id1004433	id1005049	id1004384	id1004447	id1005136
	G:G	T:T	C:C	C:C	G:G	T:T	T:T	C:C	A:A	G:G	C:C	G:G	T:T	G:G
2)	A:A	C:C	T:T	T:T	A:A	C:C	A:A	T:T	G:G	A:A	T:T	T:T	G:G	A:A
	G:A	T:C	C:T	C:T	A:G	T:C	A:T	C:T	G:A	G:A	T:C	G:T	G:T	A:G
	G:A	T:C	C:T	C:T	A:G	T:C	A:T	C:T	G:A	G:A	T:C	G:T	G:T	A:G
	G:A	T:C	C:T	C:T	A:G	T:C	A:T	C:T	G:A	G:A	T:C	G:T	G:T	A:G
	G:A	T:C	C:T	C:T	A:G	T:C	A:T	C:T	G:A	G:A	T:C	G:T	G:T	A:G

Estado	Híbrido	Madre	Padre
Contaminado	3	0	0
Segregación	5	0	5
Puro	8	1	8

Tipo de Línea	fd9	id10001624	id1006871	id1007776	id1009687	id12008557	id2010969	id2014034	id3000111	id3002377	id4000641	id4002562	id4005120	id4005867	id4009024	id4011774	id5000015	id5001756	id5003034	id5004297	id5007714	id5010661	id5014338	id6007495	id6012426	id6016941	id7000157	id7000519	id8000240	id8002662	id9001614	ud10000620	wd7000465
A	A:A	A:A	G:G	G:G	G:G	G:G	C:C	G:G	A:C	C:G	A:A	G:G	T:T	A:A	A:A	A:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:G	A:C	G:G	T:T	A:A	G:G	T:T	C:C	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A
B	A:A	A:A	G:G	G:G	G:G	G:G	C:C	G:G	C:G	G:G	A:A	G:G	T:T	A:A	A:A	G:G	G:G	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A	G:G	T:T	A:A	G:G	T:T	C:C	A:A	A:A	G:G	A:A	A:A
R	G:G	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C	G:G	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	C:C	G:G	A:A	G:G	G:G
R	G:G	G:G	A:A	A:A	A:A	A:A	A:A	A:A	A:A	C:C	G:G	A:A	A:A	G:G	C:C	A:A	C:C	G:G	G:G	A:A	G:G	C:C	A:A	A:A	T:T	A:A	A:A	A:A	C:C	G:G	A:A	G:G	G:G
H	A:G	A:G	A:G	A:G	A:G	A:G	A:C	A:G	A:C	C:G	A:G	A:G	A:T	A:G	A:C	A:G	C:G	A:G	A:G	A:G	A:G	A:C	A:G	A:T	A:T	A:G	A:T	A:C	A:C	A:G	A:G	A:G	A:G
H	A:G	A:G	A:G	A:G	A:G	A:G	A:C	A:G	A:C	C:G	A:G	A:G	A:T	A:G	A:C	A:G	C:G	A:G	A:G	A:G	A:G	A:C	A:G	A:T	A:T	A:G	A:T	A:C	A:C	A:G	A:G	A:G	A:G

HIAAL

- Permite realizar un proceso de mejoramiento de caracteres cuantitativos usando datos de marcadores moleculares ampliamente distribuidos en el genoma, sin necesidad de identificar QTL's para los caracteres de interés.
- Se realiza una selección basándose en **el valor genómico del individuo** – calculado a partir de los marcadores moleculares



	0	9856	19712	29568	39424	49280	59136	68992	78848																																			
		39406: 2082419	39407: 2082420	39408: 2082456	39409: 2082461	39410: 2104972	39411: 2104999	39412: 2105072	39413: 2121963	39414: 2121981	39415: 2121990	39416: 2122002	39417: 2122028	39418: 2122029	39419: 2122030	39420: 2122043	39421: 2122044	39422: 2122074	39423: 2122078	39424: 2122083	39425: 2122089	39426: 2122662	39427: 2122668	39428: 2122670	39429: 2122681	39430: 2131452	39431: 2131600	39432: 2131603	39433: 2131815	39434: 2131990	39435: 2131996	39436: 2132022	39437: 2157169	39438: 2157182	39439: 2157991	39440: 2162954	39441: 2167780	39442: 2177293	39443: 2177417	39444: 2177419	39445: 2187975	39446: 2187998	39447: 2188055	39448: 2188294
K1		N	N	N	N	Y	K	C	A	R	A	G	S	M	N	N	N	N	N	N	N	G	G	C	A	A	A	A	A	G	T	A	T	N	T	A	N	N	N	A	T	T	G	
K10		W	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K100		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K101		N	N	N	N	C	G	C	G	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K102		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K103		N	N	N	N	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K104		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K105		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K106		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K107		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K108		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K109		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K11		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K111		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K112		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K114		W	W	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K115		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K116		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K118		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K12		T	A	K	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K120		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K121		W	W	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K122		T	A	T	N	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K123		W	W	K	A	C	G	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K124		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K125		T	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K126		T	A	T	A	T	T	G	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K127		W	A	T	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		
K128		T	A	K	A	Y	K	S	R	R	R	K	S	P	M	T	G	A	C	T	C	R	R	M	A	A	A	A	C	G	T	A	T	R	T	A	A	T	A	T	T	G		

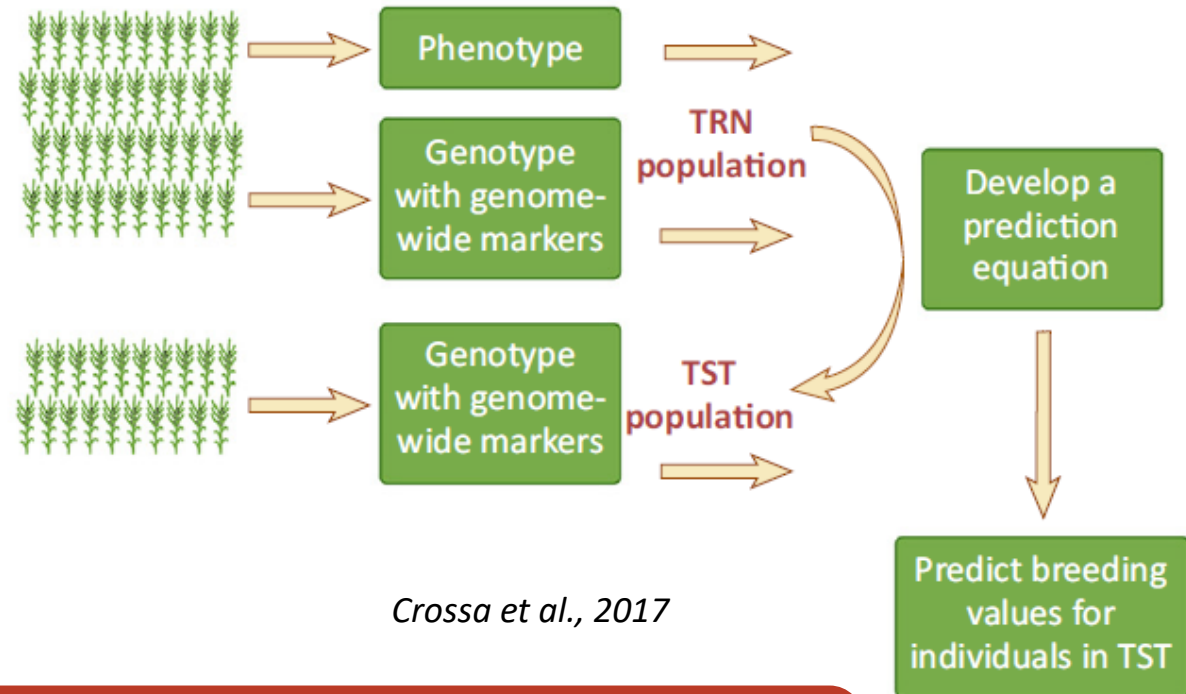
1. Población de entrenamiento (TRN)
 - Genotípica
 - Fenotípica
2. Población de prueba (TST)
 - Genotípica

Uso de modelos de predicción :

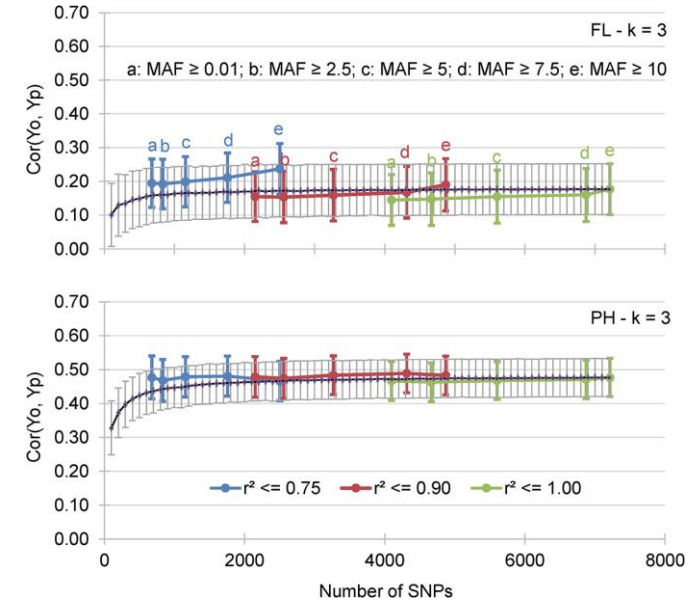
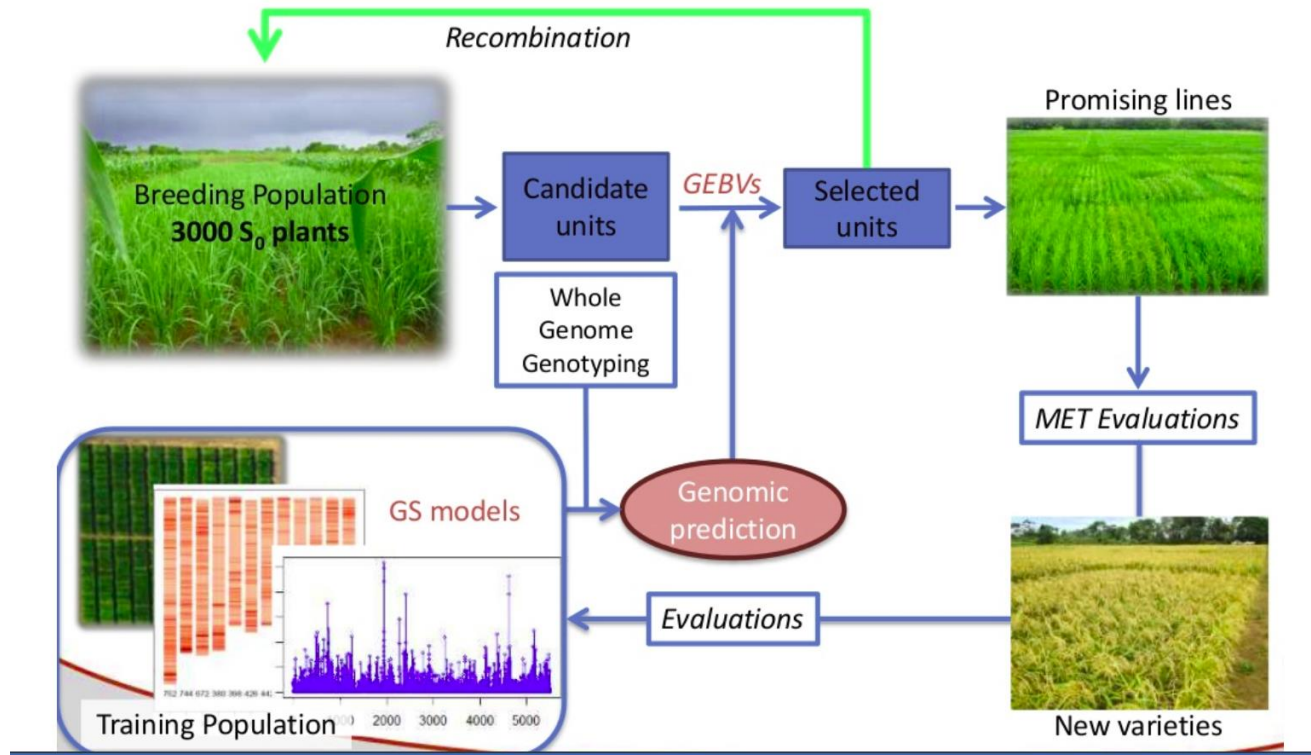
- Modelos lineares (GBLUP, RR-BLUP)
- Algoritmos de aprendizaje automático y redes neuronales.

Hace una selección sin necesidad de tener un previo conocimiento de la asociación entre el marcador y el rasgo de interés.

(A) TRN and TST populations in genomic selection

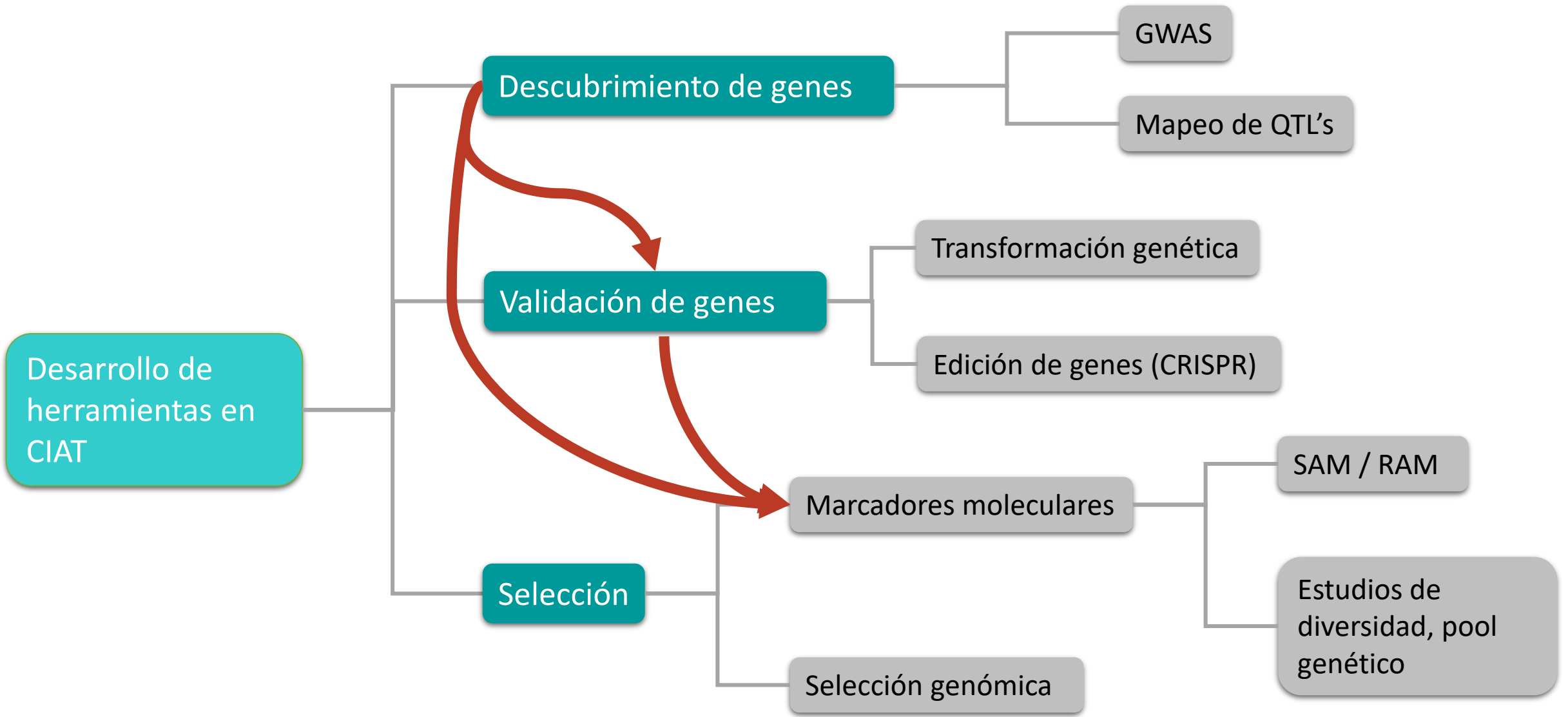


Crossa et al., 2017



Grenier et al., 2016

- Población de entrenamiento
- Prueba de cinco modelos diferentes para estimar la predicción genómica (tres frecuentitas, dos Bayesianos)
- Tres parámetros LD
- Cinco MAF



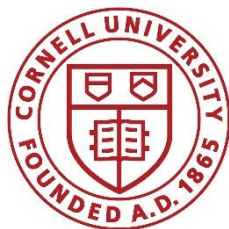
- El programa de mejoramiento de arroz desarrolla diferentes herramientas de la biotecnología estratégicas para acelerar la ganancia genética en los caracteres mas importantes para la sostenibilidad del cultivo de arroz en América Latina y el Caribe



Cecile Grenier, Mejoramiento
Mathias Lorieux, Genética
Camila Rebolledo, Fisiología
Michael Selvaraj, Fisiología
Gloria Mosquera, Patología
Paul Chavarriaga, Transformación
Sandra Valdes, Edición de genes
Maria F. Alvarez, Mejoramiento
Maribel Cruz, Mejoramiento

Alexander Silva, SAM
James Carabali, Mejoramiento
Jaime Borrero, Mejoramiento
Yolima Ospina, Mejoramiento
Constanza Quintero, SAM
Ishitani Manabu, genómica
Fernando Correa, Lider Arroz
Eduardo Graterol, Director FLAR
Joe Tohme, Director Agbio





¡Gracias!



NOS ENORGULLECE
HABER CELEBRADO 50 AÑOS
DE INVESTIGACIÓN AGRÍCOLA
PARA EL DESARROLLO

Centro Internacional de Agricultura Tropical - CIAT

Sede Principal y Oficina Regional
para Suramérica y el Caribe

+57 2 445 0000

Km 17 Recta Cali-Palmira
A.A. 6713, Cali, Colombia

✉ ciat@cgiar.org

🌐 ciat.cgiar.org



El CIAT es un Centro de Investigación de CGIAR