

Posgrado en Biotecnología

GENÉTICA DEL CONTENIDO DE ARSÉNICO EN EL GRANO DE ARROZ DEL GERMOPLASMA DE INIA

Tesis para la obtención del título de: “Magister en Biotecnología”

Lic. Cs. Biol. Lucas Mariano Ale Catalin

Orientador: Juan E. Rosas

Co-orientadores: Fernando Pérez De Vida, Melissa Verger

Tribunal: Alexandra Castro, Astrid Agorio y Victoria Bonnecarrere

Noviembre, 2021.

Tabla de contenidos

Agradecimientos.	3
Resumen.	4
1- Introducción.	6
1.1 Importancia del cultivo de arroz.	6
1.2 El cultivo de arroz en Uruguay.	6
1.3 Mejoramiento genético.	7
1.4 El arsénico y el cultivo de arroz.	9
1.5 El arsénico en la inocuidad alimentaria del arroz.	10
1.6 Situación del arsénico en la producción de arroz uruguayo.	11
1.7 Interacción del arsénico con otros elementos.	12
1.8 La inocuidad como objetivo de mejoramiento genético.	12
1.9 Marcadores moleculares como herramientas para el mejoramiento genético.	13
2- Objetivos.	15
2.1 Objetivo General:	15
2.2 Objetivos específicos:	15
3- Materiales y métodos.	16
3.1 Estrategias	16
3.2 Estudio de mapeo asociativo	16
3.2.1 Poblaciones genotipadas y poblaciones de mapeo asociativo.	16
3.2.2 Genotipado.	17
3.2.3 Ensayos de campo.	17
3.2.4 Procesamiento post-cosecha.	18
3.2.5 Determinaciones químicas.	18
3.2.6 Análisis estadístico.	20
3.2.7 Definición de QTL y haplotipos.	21
3.2.8 Correlación entre especies de As.	22
3.3 Análisis de genes candidatos.	23
3.3.1 Búsqueda bibliográfica.	23
3.3.2 Identificación de genes candidatos en el germoplasma de INIA y selección de líneas con combinaciones alélicas.	23
3.3.3 Material vegetal y ensayo de campo.	23
3.3.4 Estimación de efectos de genes candidatos.	24
3.3.5 Estimación de efectos genotípicos para el contenido de iAs y tAs.	24
4- Resultados.	26

4.1 Estudio de mapeo asociativo.....	26
4.2 Marcadores en genes candidatos.....	36
5- Discusión.....	44
6- Conclusión y perspectivas	50
7- Bibliografía.....	51
ANEXO.....	59

Agradecimientos.

A Jörg Feldmann y Andrea Raab del laboratorio TESLA de la University of Graz, quienes a través de su colaboración hicieron posible gran parte de este trabajo.

A Laura Díaz, Mario Villalba, José Vargas y a todo el personal del Programa de Arroz de INIA Treinta y Tres, quienes dedicaron tiempo y trabajo para la selección y procesamiento de muestras analizadas en esta investigación.

A Raquel Huertas y Melissa Verger, que me abrieron las puertas para trabajar en el Departamento de Espectrometría Atómica de Alimentos y Medio Ambiente del Laboratorio Tecnológico del Uruguay. A todo el personal que, durante mi paso por dicho laboratorio me ayudaron y asistieron durante todo el transcurso del trabajo analítico.

A Inés Rebollo, quién me acompañó y ayudó durante largas jornadas de trabajo en el campo.

A la Agencia Nacional de Investigación e Innovación por haber financiado mi beca de maestría a través del Proyecto INNOVAGRO FSA_I_2017_1_141060.

En especial a Juan Rosas, quien como tutor confió en mí durante todo este tiempo, guiándome y apoyándome en cada paso desde el comienzo.

Por último, a mi familia, a mi novia y amigos, por su apoyo incondicional en mi trabajo y en la vida.

Resumen.

Las condiciones de anaerobiosis en el cultivo de arroz irrigado favorecen la disponibilidad y captación de arsénico (As) y su acumulación en el grano. El consumo de As es nocivo para la salud, por lo que asegurar el bajo contenido de As es vital para la inocuidad alimentaria de la producción arroceras. El mejoramiento genético para bajo contenido de As es desafiante debido al alto número de análisis químicos que requiere la selección convencional. Además, bajos contenidos de As pueden asociarse indirectamente a otros elementos nocivos como cadmio (Cd) y plomo (Pb), o benéficos como el selenio (Se). La selección asistida por marcadores moleculares asociados a estas características puede ser una opción para los programas de mejoramiento genético de arroz. Hasta el momento se desconoce si la variabilidad genética asociada al contenido de As en el germoplasma de arroz uruguayo es adecuada para obtener una mejora aplicando selección. Tampoco hay reportes de marcadores moleculares asociados al contenido de As, ni del efecto que puede tener la selección por bajo As en el contenido de Cd, Pb y Se en grano. El objetivo de este trabajo es evaluar la asociación entre el contenido de As en el grano de arroz y marcadores moleculares de tipo *SNP* en germoplasma avanzado de tipo indica (IND) y japónica tropical (JAP) del Programa de Mejoramiento Genético de Arroz de INIA (PMGA). Para ello se utilizaron dos estrategias: 1) mapeo asociativo, analizando la asociación entre *SNP* distribuidos aleatoriamente en todo el genoma y el contenido en grano de As, Cd, Pb y Se; y 2) genes candidatos, estudiando la asociación entre *SNP* ubicados en genes vinculados al transporte y absorción de As. La heredabilidad del contenido de As en los ensayos de mapeo asociativo varió entre 0,24 y 0,63 y 0,29, mientras que en JAP fue de 0,24 y 0,0, en el primer y segundo año de ensayos de campo, respectivamente. Se detectaron 27 *QTL* para contenido de As, 17 *QTL* para contenido de Cd. Los niveles por debajo del umbral de detección y la baja heredabilidad encontrada no permitieron la identificación de *QTL* para contenido de Pb y Se, respectivamente. La interacción *QTL* por ambiente encontrada condiciona la aplicabilidad de selección asistida con los *QTL* detectados, haciendo necesario evaluar su estabilidad en un mayor número de ambientes. La baja correlación genética entre el contenido de los distintos metales sugiere que la selección fenotípica para bajo contenido de As no implicaría selección indirecta de otros metales. Mediante la estrategia con genes candidatos se encontraron asociaciones significativas mantenidas durante los dos años entre el contenido de iAs y los *SNP* intragénicos S2_24567131, S3_431326, S4_31505231 y S10_16037647, correspondientes a los genes OsHAC4, LSI2, OsABCC1 y OsPT8, respectivamente. Esto sugiere que podrían ser utilizados para selección asistida por bajo iAs en el PMGA, requiriéndose para ello una validación en una población de

mayor tamaño y diversidad que la utilizada en este experimento. Los resultados permitieron identificar genotipos promisorios para bajo contenido de iAs, que pueden ser considerados para futuros cruzamientos por el PMGA.

Palabras clave: *Arroz - Arsénico - QTL – GWAS*

1- Introducción.

1.1 Importancia del cultivo de arroz.

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los principales cereales consumidos como alimento a nivel mundial, siendo uno de los componentes predominantes de la dieta básica en numerosas culturas y fuente de alimento para más de la mitad de la población (CGIAR, 2016).

El género *Oryza* consta de unas 20 especies, de las cuáles *Oryza sativa* es la más cultivada en el mundo. Las subespecies principales de *Oryza sativa* son indica (*IND*) y japónica (*JAP*). Las *IND*, con una mayor diversidad que las *JAP*, suelen cultivarse en los trópicos y representan la mayor parte de la producción de arroz en todo el mundo. Las variedades de la subespecie *JAP* se cultivan tanto en ambientes tropicales como templados, y representan aproximadamente el 20% de la producción mundial (Oka H, *et al.*, 1991). Si bien la divergencia entre ambas subespecies aun es un tema de debate, la domesticación del cultivo de arroz tiene su origen en Asia aproximadamente 8500 años atrás (Liu *et al.*, 2007).

El arroz es el segundo cereal más producido en el mundo. A principios de la década de los noventa la producción anual era de 350 millones de toneladas, para finales del siglo XX llegó a alcanzar 410 millones de toneladas anuales, y su producción representa hoy el 30% de la producción mundial de cereales. Su posición en la sociedad ha sido tan relevante, que la Organización de las Naciones Unidas afirmó la necesidad de aumentar la conciencia sobre el papel del arroz en el alivio de la pobreza y la desnutrición y reafirmó la necesidad de enfocar la atención sobre el papel que puede desempeñar el arroz en la seguridad alimentaria y la erradicación de la pobreza a nivel mundial (Gnanamanickam *et al.*, 2002).

1.2 El cultivo de arroz en Uruguay.

En Uruguay la superficie utilizada para la producción arrocería es de aproximadamente 150.000 ha, lo que representa el 10% del territorio dedicado a la agricultura (MGAP, 2019). El rendimiento promedio anual es de 9,4 ton/ha, y su

producción se destina en un 95% al mercado de exportación (ACA, 2018). Durante los últimos años los principales países a los cuáles se destinaron las exportaciones de la producción de arroz uruguayo fueron: México, Brasil, Panamá y Costa Rica (MGAP, 2020). Dichas exportaciones generan ingresos estimados en más de 500 millones de dólares al año para el país, promoviendo unos 30.000 puestos de trabajo. Uruguay se ubica séptimo en el ranking mundial de los países exportadores de arroz (Presidencia ROU, 2021).

A nivel nacional, el arroz se cultiva en un sistema de rotación con tierras para el pastoreo de ganado que normalmente incluye dos años de cultivo de arroz y 3-4 años de pastura. La temporada de arroz se extiende de octubre a abril, en donde octubre es la fecha óptima de siembra, principalmente porque la siembra tardía disminuye la disponibilidad de radiación solar durante la fase reproductiva y aumenta el riesgo de daños por baja temperatura (Donoso & Paredes, 2010). El arroz se desarrolla como un cultivo de secano hasta que se inunda entre los 30 y 35 días después de la emergencia. Más del 90% del área arrocera está plantada con semilla certificada, principalmente con tres variedades de alto rendimiento del Programa de Mejoramiento de arroz de INIA (PMGA): INIA Merín, INIA Olimar e INIA Tacuarí. Las dos primeras pertenecientes a la subespecie *IND* y la última a japónica tropical (*JAP*) (Pittelkow *et al.*, 2016).

1.3 Mejoramiento genético.

En la investigación nacional sobre producción de arroz se distinguen dos áreas principales. Por un lado, el manejo agronómico, que busca identificar y ajustar los factores que optimicen la productividad del cultivo, como la fecha de siembra, el momento de entrada y retiro del agua de riego, la fertilización, etc. Por otra parte, el mejoramiento genético estudia el componente genético en la variabilidad observada (fenotípica), y su interacción con los efectos ambientales y de manejo, con el objetivo de desarrollar nuevos cultivares con comportamiento superior en condiciones productivas. Tradicionalmente la selección por las características deseadas se realiza mediante ensayos de evaluación fenotípica, lo cual requiere múltiples repeticiones de una misma línea en distintos ambientes (años y

localidades) para discriminar entre efectos genéticos y ambientales (Piepho *et al.*, 2008). Existen variables fenotípicas con una alta proporción de la variabilidad explicada por unos pocos genes (herencia simple o mendeliana), mientras que otras características están determinadas por pequeños efectos aditivos y epistáticos de cientos de genes (herencia compleja o cuantitativa). Esta diferencia en la complejidad de la arquitectura genética puede determinar la estrategia utilizada para el mejoramiento de la característica. Algunos caracteres de herencia simple en arroz son la altura de planta (Nagano *et al.*, 2005) y la resistencia al hongo *Pyricularia oryzae* (Jia *et al.*, 2000). Para estos rasgos, el abordaje complementario a la selección fenotípica más usual es la selección asistida por marcadores moleculares (SAM) (Collard and McKill, 2008). La SAM consiste en utilizar marcadores ubicados en regiones cromosómicas estrechamente ligadas a los genes causales para seleccionar las líneas que presenten las variantes alélicas deseadas. La detección de los marcadores moleculares no depende de las condiciones ambientales y puede aplicarse en estado de plántula, lo que permite analizar cientos de muestras en poco tiempo y a bajo costo, haciendo más eficiente la obtención de ganancia genética para la característica seleccionada (Bonnecarrere *et al.*, 2019).

Una estrategia para identificar regiones cromosómicas que puedan contener los genes determinantes del rasgo de interés, y al mismo tiempo determinar si su herencia es simple o compleja en las poblaciones de interés, es el mapeo de loci de rasgos cuantitativos (*quantitative trait loci*, *QTL*). Este es un análisis estadístico en el que se estudia la asociación entre la variable fenotípica medida en los individuos de la población de mapeo y cada marcador molecular a lo largo del genoma de los individuos de dicha población (Miles y Wayne, 2008). Las poblaciones de mapeo pueden tener sus frecuencias alélicas balanceadas, como sucede en poblaciones biparentales (Lander y Botstein, 1989), o no balanceadas producto de diversos niveles de relacionamiento entre individuos como en el mapeo asociativo genómico (del inglés *genome-wide association study*, *GWAS*) (Korte y Farlow, 2013). En *GWAS* pueden utilizarse colecciones genéticamente diversas de bancos de germoplasma (Huang *et al.*, 2010) o poblaciones de programas de mejoramiento (Hamblin *et al.*, 2010; Quero *et al.*, 2018). La cobertura del genoma de arroz por marcadores *SNP* disponible en bases públicas es muy amplia, lo que permite más fácilmente el mapeo de *QTL*. Asimismo, nuevos métodos para la identificación y

determinación de marcadores moleculares como el genotipado por secuenciación (genotyping-by-sequencing, GBS, Elshire *et al.*, 2011) hacen del GWAS una estrategia accesible y adecuada para la detección de regiones genómicas asociadas a rasgos complejos (Song *et al.*, 2018).

Ejemplos de características de herencia compleja en el germoplasma de arroz uruguayo son: rendimiento (Monteverde *et al.*, 2018) y calidad molinera (Quero *et al.*, 2018). Para estos rasgos de herencia compleja la SAM no representa una estrategia eficaz ya que la proporción de la varianza fenotípica explicada por un número limitado de marcadores es muy baja. En su lugar pueden emplearse métodos como la selección genómica (SG), en la que se predicen los efectos de cientos o miles de marcadores distribuidos homogéneamente en todo el genoma, cuya sumatoria permite predecir el comportamiento de cada línea (Meuwissen *et al.*, 2001).

1.4 El arsénico y el cultivo de arroz

La forma predominante de cultivo de arroz llevada a cabo en forma irrigada y manteniendo una lámina de agua durante gran parte del ciclo del cultivo, genera en el suelo condiciones anaeróbicas y reductoras, a diferencia de lo que sucede con cultivos de secano como el trigo y el maíz. La reducción del potencial redox favorece la disponibilidad y captación de arsénico (As) proveniente naturalmente del suelo y de fuentes antropogénicas, y su acumulación en el grano de la planta (Rahman *et al.*, 2007; Norton *et al.*, 2012).

El As es un metaloide presente en la corteza terrestre, que se encuentra en la naturaleza en diversas formas. En general, este se introduce de forma natural o antropogénica en los suelos en estado inorgánico (iAs). Las principales especies de iAs presentes en el grano de arroz son el arsenato As(V) y el arsenito As(III). Bajo inundación, en condiciones anaeróbicas el As(V) puede reducirse rápidamente a As(III), siendo esta última la especie más tóxica entre los compuestos inorgánicos (Guillod-Magnin, 2018). En las raíces de la planta de arroz se forma comúnmente una placa de hierro (Fe) como resultado de la liberación de oxígeno y oxidantes en la rizosfera. El As es secuestrado por la placa de Fe durante el período no inundado,

liberando especies del tipo inorgánico como el As(III), en las condiciones de inundación (Liu *et al.*, 2006).

A pesar de que la dinámica del As en arroz aún no ha sido totalmente caracterizada, se ha demostrado que la absorción de As por la planta no es selectiva (Li *et al.*, 2014). Debido a la similitud de propiedades químicas entre el As(V) y el fosfato, los transportadores de fosfato participan en la absorción de As(V). Por otra parte, los transportadores de sílice y acuaporinas, entre otros, participan en la absorción de As(III), (Ma *et al.*, 2008). La translocación de las especies inorgánicas hacia el grano se produce mayoritariamente mediante el floema (Carey *et al.*, 2010).

En condiciones de arroz irrigado la microflora del suelo puede convertir el iAs a especies metiladas (Reid *et al.* 2017). Se han demostrado variaciones considerables entre distintos suelos sobre la metilación del As, así como en el número de copias y diversidad de genes microbianos asociados a esta función. Sin embargo, la metilación del As en el suelo parece estar más influenciada por las condiciones del suelo como el pH y el nivel de carbono, lo que sugiere una fuerte influencia ambiental en la actividad de los microbios metiladores del As (Zhao *et al.*, 2013). El ácido dimetilarstínico (DMA), como especie de arsénico orgánico así producido, puede ser translocado fácilmente al grano (Carey *et al.* 2010). Se ha reportado una mayor contribución relativa del DMA al contenido en grano de arsénico total (tAs, suma de todas las especies de As tanto orgánicas como inorgánicas) en regiones templadas y subtropicales con respecto a regiones tropicales, aunque las razones que sustentan esta variación son desconocidas (Meharg *et al.* 2009 ;. Zavala *et al.* 2008).

1.5 El arsénico en la inocuidad alimentaria del arroz

La alta exposición a iAs está fuertemente asociada con un mayor riesgo de cáncer y otras enfermedades en humanos, motivo por el cual el iAs es considerado un carcinógeno de grado uno (IARC, 2012). Debido a esto se han establecido internacionalmente niveles máximos aceptados para asegurar la inocuidad alimentaria del arroz. La Unión Europea definió el límite máximo de iAs en arroz blanco pulido en 0,2 mg/kg (EUR-LEX, 2015). MERCOSUR, por su parte,

reglamenta el límite máximo en 0,3 mg/kg de tAs en grano. Si el contenido de tAs supera este límite, se realiza la determinación del contenido de iAs para su evaluación (MERCOSUR/LXXII). Existen varias investigaciones en las que se establecen relaciones significativas ($p < 0,001$) entre las concentraciones de iAs y tAs, pudiendo utilizar esta última como medida de referencia de la primera cuando no se dispone del equipamiento necesario para la determinación de especies (Meharg, 2012; Norton *et al.*, 2012).

1.6 Situación del arsénico en la producción de arroz uruguayo

La inocuidad alimentaria del producto final es de vital importancia para la cadena agroindustrial arroceras, la cual está siendo cada vez más fuertemente regulada, determinando así la posibilidad de acceso a los mercados. Existen algunos mercados objetivo, como por ejemplo Irán, con niveles máximos permitidos más estrictos que las normas internacionales (0,15 mg/kg para tAs), lo que potencialmente puede limitar el acceso del arroz uruguayo a los mismos (ISIRI, 2009). Para el cumplimiento de estos estándares, la mejor estrategia desde el punto de vista productivo y económico es obtener cultivares de arroz con baja acumulación de As en las condiciones de riego habituales en Uruguay. Además, la tendencia es que las normas internacionales establezcan límites cada vez más bajos, lo que hace necesario abordar el problema con estrategias que aseguren a corto, mediano y largo plazo el cumplimiento de estos estándares en la producción nacional de arroz.

A nivel nacional la investigación sobre el contenido de As en arroz es incipiente. Los trabajos realizados están enfocados principalmente en la evaluación del efecto de distintas estrategias de manejo del riego en el contenido de iAs en grano, y han encontrado en general niveles por debajo de los límites máximos aceptados en las condiciones productivas de nuestro país. A su vez, han demostrado que la reducción en los niveles de riego en distintas etapas del cultivo, reduce los niveles de iAs acumulados en el grano (Carracelas *et al.*, 2019; Campos *et al.*, en proceso de publicación; Roel *et al.*, 2021).

1.7 Interacción del arsénico con otros elementos

Se han reportado correlaciones significativas entre el contenido de As en grano y el de otros contaminantes como los metales pesados cadmio (Cd) y plomo (Pb), tanto por factores ambientales como genotípicos (Duan *et al.*, 2017). Los cultivares y el manejo del agua de riego juegan un papel esencial sobre las propiedades fisicoquímicas del suelo que influyen en la especiación y solubilidad de estos elementos (Mu *et al.*, 2019). Estos metales producen un riesgo para la salud al generar efectos perjudiciales que afectan órganos como el cerebro, riñones y corazón bajo su exposición, por su presencia en la naturaleza cada vez más significativa debido a la contaminación ambiental (Rana *et al.*, 2018). Por el contrario, algunos elementos pueden generar un efecto positivo en la salud con su absorción. El selenio (Se), es un micronutriente indispensable para la salud de humanos y animales (Liang *et al.*, 2019). Esto hace que el estudio del contenido de As en el grano de arroz deba complementarse con el análisis de otros contaminantes y nutrientes.

1.8 La inocuidad como objetivo de mejoramiento genético

Los principales rasgos objetivo del PMGA son: alto rendimiento, resistencia a enfermedades, calidad molinera y calidad culinaria (Pérez de Vida *et al.*, 2017). A estos objetivos se incorpora recientemente la inocuidad del grano, definida como la baja acumulación de elementos nocivos como As y metales pesados. Hasta el momento se desconoce la variabilidad genética del arroz asociada al As en grano en el germoplasma uruguayo. La evaluación de dicha variabilidad es fundamental para el mejoramiento de esta característica, para determinar si es suficiente en la obtención de ganancia genética, o si sería necesario incorporar nuevo germoplasma que aporte mayor variabilidad (Falconer & Mackay, 1989). Una estrategia para obtener ganancia genética es identificar las líneas con comportamiento superior y utilizarlas en cruzamientos para generar nuevas poblaciones. Para ello es necesario contar con métodos de evaluación y selección adecuados para la característica objetivo.

La selección fenotípica por inocuidad, y específicamente por bajo contenido de iAs mediante análisis químicos, es dificultosa para un programa de mejoramiento o un proyecto de investigación académico, fundamentalmente debido a los recursos y el tiempo con los que generalmente se cuenta para ello en función del gran número de análisis requeridos. La determinación de iAs, realizada comúnmente mediante la técnica de cromatografía líquida de alta presión acoplada a espectrometría de masas con ionización en plasma de acoplamiento inductivo (HPLC-ICP-MS), no es compatible con la cantidad de análisis necesarios para evaluar el gran número de líneas experimentales que es habitual en las etapas tempranas e intermedias de los programas de mejoramiento. Existen investigaciones para la validación de técnicas de *screening* para medir iAs aplicables en el campo con métodos rápidos y de bajo costo, pero hasta el momento no se encuentran disponibles en Uruguay (Bralatei, *et al.*, 2015; Mlangeni *et al.*, 2018; Pasias *et al.*, 2013).

1.9 Marcadores moleculares como herramientas para el mejoramiento genético

Otra alternativa para seleccionar por bajo contenido de As es la SAM, para lo cual deben identificarse los *QTL* y marcadores asociados a este rasgo, así como evaluar su asociación con el contenido de otros metales en el grano para evitar la selección indirecta de elementos no deseados. Una estrategia para identificar marcadores asociados al contenido de As en el germoplasma de un programa de mejoramiento es el (GWAS) (Breseghello & Sorrells, 2006; Schmid & Bennewitz, 2017; Zhu *et al.*, 2008) utilizando poblaciones de germoplasma adaptado localmente. Esto permite identificar los *QTL* que segregan en el germoplasma del programa de mejoramiento, así como identificar genotipos portadores de alelos favorables que pueden ser utilizados como parentales (Spindel *et al.*, 2016).

Existen reportes en la literatura de *QTL* para As en grano de arroz, así como de Cd, Se y Pb (Kuramata *et al.*, 2013; Liu *et al.*, 2019; Syed *et al.*, 2016; Zhang *et al.*, 2008; Norton *et al.*, 2009; Pan *et al.*, 2020; Murugaiyan *et al.*, 2019). Las diferentes investigaciones sugieren que los contenidos de As y Cd puede verse afectados por el genotipo de la planta, por el año de cultivo, así como por la interacción genotipo por año (Kuramata *et al.*, 2013; Norton *et al.*, 2010). También las concentraciones

de tAs, como las de iAs y DMA, son afectadas significativamente tanto por el efecto del genotipo y del año, como por la interacción genotipo por año (Kuramata *et al.*, 2013). Sin embargo, estas asociaciones se encontraron en poblaciones diferentes al germoplasma de arroz uruguayo, por lo que requieren ser validadas en el germoplasma local y en las condiciones ambientales locales (Liao *et al.*, 2001; Sinha *et al.*, 2006). Debido a los efectos de interacción entre *QTL* y trasfondo genético (Holland, 2007), es conveniente que la estimación de los efectos de los *QTL* se realice en el mismo tipo de germoplasma con el que trabaja el programa de mejoramiento.

Este trabajo es el primero en estudiar la variabilidad fenotípica y genotípica del contenido de As en arroz uruguayo, y pretende generar un aporte a la mejora genética convencional para bajo contenido de As convencional y asistida por marcadores moleculares a nivel nacional.

2- Objetivos.

2.1 Objetivo General:

Evaluar la selección asistida por marcadores moleculares tipo *SNP* para contenido de arsénico en grano en el germoplasma avanzado del Programa de Mejoramiento Genético de Arroz de INIA (PMGA).

2.2 Objetivos específicos:

- i. Cuantificar y evaluar el efecto genotípico para el contenido de tAs, iAs, Cd, Se y Pb en grano y sus relaciones.
- ii. Identificar *QTL* y genes candidatos asociados al contenido de tAs, iAs, Cd, Se y Pb en grano y evaluar su utilidad para selección asistida.

3- Materiales y métodos.

3.1 Estrategias

Para la identificación de QTL se utilizó la estrategia de mapeo asociativo, mientras que para la búsqueda de genes candidatos se empleó una estrategia con marcadores tipo *SNP* en genes candidatos segregantes en un grupo seleccionado de líneas avanzadas. Para el objetivo v se utilizó además parte de la población de mapeo asociativo.

Todos los análisis estadísticos y de asociación, se realizaron con el software libre *R*.

3.2 Estudio de mapeo asociativo

3.2.1 Poblaciones genotipadas y poblaciones de mapeo asociativo.

El material vegetal utilizado en este trabajo es parte de las poblaciones de mapeo asociativo utilizadas en el Proyecto Mapeo Asociativo en Arroz (Bonnecarrère *et al.*, 2013), una compuesta por 300 líneas de la subespecie *índica (IND)* y otra por 321 de la subespecie *japónica tropical (JAP)* representando el germoplasma avanzado del PMGA.

Para este estudio de mapeo asociativo se seleccionaron dos poblaciones: una compuesta por 165 líneas de la subespecie *IND* y 207 *JAP* para un primer año de ensayo y otra compuesta por 123 líneas *IND* y 128 *JAP* para un segundo año. Esta elección estuvo determinada por el número de análisis químicos disponibles, y limitantes en la viabilidad de semillas en el segundo año. Las líneas del segundo año están incluidas en el primer año de ensayo.

La selección de estos cultivares se realizó buscando capturar la mayor variabilidad genotípica disponible, para lo que se realizó un análisis de componentes principales (PCA), seleccionando un número similar de líneas dentro de cada subpoblación observada en el gráfico de los dos primeros componentes principales.

3.2.2 Genotipado

Las poblaciones genotipadas se analizaron con marcadores moleculares tipo *SNP* obtenidos por GBS en el Centro de Recursos Biotecnológicos de la Universidad de Cornell en el marco del Proyecto de Mapeo Asociativo en Arroz (Bonnecarrère *et al.*, 2013). Las secuencias fueron alineadas con el genoma de referencia de *Nipponbare*, realizando el llamado de *SNP* de acuerdo a lo descrito en Quero *et al.* (2018). Los datos de *SNP* faltantes se imputaron con el algoritmo FILLIN (Swarts *et al.*, 2014). Se eliminaron los *SNP* con frecuencia del alelo minoritario <1% y/o con datos faltantes > 50%. Esto resultó en 49.589 *SNP* para las líneas *IND* y 28.850 *SNP* para *JAP* (Rosas *et al.*, 2018, Quero *et al.*, 2018)

Para la población de mapeo de este trabajo se llevó a cabo un segundo filtrado de los marcadores moleculares, eliminando todos aquellos que tuvieran una frecuencia del alelo minoritario <5%. En base a esto se utilizaron 46561 *SNP* para las líneas *IND* y 26702 *SNP* para *JAP*.

3.2.3 Ensayos de campo

La población de mapeo fue evaluada en dos ensayos de campo en las zafas 2017/18 (E1) y 2018/19 (E2), en la Unidad Experimental de Paso de la Laguna (Treinta y Tres) de INIA, con un diseño experimental de bloques incompletos aumentados, utilizando como testigo repetido al cultivar INIA Olimar. Las semillas fueron sembradas en almacigueras conducidas en invernadero con riego continuo hasta la etapa de plántula (v5), donde fueron trasplantadas al campo en fajas inundadas. El promedio de semillas de un mismo genotipo sembradas en cada pocillo de almaciguera fue de n=5, raleándose posteriormente a una planta por pocillo. Los bloques aumentados del diseño experimental correspondieron a las almacigueras. En E1 se usaron 7 almacigueras sembradas durante la tercera semana de octubre de 2017 y trasplantadas durante la segunda semana de noviembre de 2017. Para E2 se usaron 6 almacigueras sembradas de a una almaciguera por faja la primera semana de diciembre de 2018 y trasplantadas la cuarta semana de diciembre de 2018.

Se realizó una fertilización basal 6 kg/ha Nitrógeno (N) y 28 kg/ha P_2O_5 . La cobertura de N fue de 77 kg/ha (54 en macollo + 23 en primordio). Para el control de malezas se aplicaron Glifosato (5 l/ha pre-laboreo), Clomazone (0,5 l/ha pre-emergencia), Cyperoff (50 gr), Quinclorac (1 l/ha) y Propanil (3 l/ha).

3.2.4 Procesamiento post-cosecha

Luego de la cosecha y el trillado de los granos, estos fueron procesados en el Laboratorio de Calidad Industrial de Arroz de INIA Treinta y Tres utilizando un molino *Zaccaria PAZ-2/DTA*, con un tiempo de descascarado y pulido de 15 y 60 s, respectivamente.

Con el fin de eliminar completamente el endocarpio de los granos independientemente de las variaciones morfológicas que pudieran existir, y dejando únicamente endospermio para las determinaciones de los compuestos químicos, los tiempos de pulido fueron mayores a los que se utilizan regularmente para análisis de rutina.

Para la obtención de harina de arroz se pesaron 20 gr de grano pulido de cada muestra y se procesaron en un molino *Cyclone Sample Mill BELT DRIVE - MODEL 3010-019*.

3.2.5 Determinaciones químicas

Para las muestras del ensayo E1 se determinó el contenido de tAs en 130 líneas *IND* y 150 *JAP*. 42 líneas *IND* y 79 *JAP* fueron analizadas para Cd, Se y Pb, y 57 líneas *IND* y 34 *JAP* se analizaron especies de As y se midió el contenido de iAs (como As(V)) y arsénico orgánico (como DMA). En las muestras tomadas del ensayo E2 se determinó el contenido de tAs, Cd, Se y Pb para 123 *IND* y 128 *JAP* (todas en común con E1). Para ambos ensayos se utilizó un diseño de bloques aumentados en el que los bloques se definieron por un testigo repetido (INIA Olimar) mientras que las líneas no tuvieron repeticiones.

Las determinaciones de tAs de líneas en el ensayo E1 se realizaron en el Departamento de Espectrometría Atómica de Alimentos y Medio Ambiente del Laboratorio Tecnológico del Uruguay (LATU). Se utilizó la técnica de Espectrometría de Absorción Atómica con Atomización Electrotérmica (GF-AAS) (ISO 15586:2003). La extracción de las especies de As se realizó según el método FDA 4.11 (FDA, 2012). Para ello se diluyó 1 g de muestra de harina de arroz con 15 ml de ácido nítrico 0.28 M y se incubó a 95°C durante 90 minutos (n=2). Luego de enfriada, se agregaron 6,7 g de agua desionizada y se centrifugó a 3000 rpm durante 10 minutos. El sobrenadante se filtró con filtros de nylon de 0.45 µm y se midió el contenido de tAs con un Espectrofotómetro de Absorción Atómica *Perkin Elmer AA 800* con horno de grafito de calentamiento transversal y corrección de fondo por efecto *Zeeman* longitudinal. Los materiales de referencia utilizados fueron: Nist1568b -Harina de Arroz (tAs: 0,285 mg/kg); Fapas 07324 - Arroz pulido (tAs: 0,308 mg/kg) y Fapas 07314 - Arroz integral (tAs: 0,204 mg/kg).

Los análisis de tAs, Cd, Se y Pb en las muestras del ensayo E2 se llevaron a cabo en el *Trace Element Speciation Laboratory (TESLA)* de la *University of Aberdeen* (Reino Unido, Escocia), mediante la técnica de Espectrometría de Masas con Atomización por Plasma Acoplado Inductivamente (ICP - MS). Se utilizó 0,1 g de harina de arroz de cada muestra y se agregó 1 ml de ácido nítrico 70 % para su digestión, dejándolo a temperatura ambiente *overnight*. Se agregaron 2 ml de peróxido de hidrógeno y se realizó digestión total en microondas “*Microwave MARS*” según el siguiente programa: 1) 1600W – 5min – 50 °C; 2) 1600W – 5min – 75 °C; 3) 1600W – 30min – 95 °C. El digesto se diluyó hasta 10 ml con agua desionizada y fue medido en el equipo *Agilent Technologies 8800 ICP-MS Triple Quad ASX-500 Series*. Los materiales de referencia utilizados fueron Nist 1547 - (tAs: 0,062 mg/kg, Cd: 0,0261 mg/kg, Se: 0,120 mg/kg, Pb: 0,869 mg/kg); Nist 1568 b - (tAs: 0,285 mg/kg, Cd: 0,0224 mg/kg, Se: 0,365 mg/kg y Pb: 0,008 mg/kg-valor de referencia-) y Fapas 07314 - Arroz integral (tAs: 0,204 mg/kg).

Se calculó la correlación de *Pearson* entre los valores de tAs obtenidos con GF-AAS en el laboratorio de LATU y los obtenidos con ICP-MS en TESLA.

Las determinaciones de iAs y DMA se realizaron en el laboratorio *TESLA* de la Universidad de Graz (Austria), bajo la misma metodología previamente descripta.

3.2.6 Análisis estadístico.

3.2.6.i Estimación de medias fenotípicas.

Para E1 se ajustó el modelo mixto de ecuación [1]:

$$[1] \quad Y_{ijkl} = \mu + T_i + G_j + F_k + A_l + e_{ijkl}$$

donde: Y_{ijkl} es el contenido de tAs, Cd o Se, μ es el intercepto, T_i es el efecto fijo de la subespecie i , G_j es el efecto fijo del genotipo j , F_k es el efecto aleatorio de la faja k con $N \sim (0, \sigma_F^2)$, A_l es el efecto aleatorio de la almaciguera l con $N \sim (0, \sigma_A^2)$; e_{ijkl} es el efecto residual de cada genotipo j de subespecie i , en la faja k y almaciguera l , con $N \sim (0, \sigma_e^2)$.

Para E2 se ajustó el modelo mixto de ecuación [2]:

$$[2] \quad Y_{ijk} = \mu + T_i + G_j + F_k + e_{ijk}$$

donde: Y_{ijk} es el contenido de tAs, Cd o Se, μ es el intercepto, T_i es el efecto fijo de la subespecie i , G_j es el efecto fijo del genotipo j , F_k es el efecto aleatorio de la faja/almaciguera k con $N \sim (0, \sigma_F^2)$; e_{ijk} es el efecto residual de cada genotipo j de subespecie i en la faja k , con $N \sim (0, \sigma_e^2)$.

Se calculó la correlación entre las medias ajustadas de los diferentes metales para cada año mediante el coeficiente de *Pearson*.

Para cada uno de los ensayos (E1 y E2) se ajustaron los modelos [1] y [2] con el efecto del genotipo modelado como aleatorio con $N \sim (0, \sigma_e^2)$, para la estimación de heredabilidad generalizada (H^2_g) como: $1 - \sigma_G^2 / 2\sigma_F^2$ (Cullis et al., 2006), en donde σ_G^2 es la media al cuadrado del error estándar de la varianza genotípica y $2\sigma_F^2$ es la varianza fenotípica.

3.2.6.ii Mapeo asociativo.

Se realizó un análisis de mapeo asociativo para cada uno de los elementos medidos en cada año y población, estudiando la asociación entre las medias ajustadas de las concentraciones determinadas en grano y los marcadores moleculares de tipo *SNP*.

Se utilizó el modelo lineal mixto que se describe en la siguiente ecuación:

$$[3] \quad Y = X\beta + Zu + e$$

donde: Y es un vector de las medias fenotípicas ajustadas con los modelos de las ecuaciones [1] y [2]; β es un vector de efectos fijos (*SNP* individuales para el escaneo por *GWAS*, y múltiples *SNP* y haplotipos seleccionados para el análisis multilocus); u es un vector de efectos fenotípicos aleatorios con $u \sim N(0, K\sigma_G^2)$; e es un vector de efectos residuales con $e \sim N(0, I\sigma_e^2)$; X y Z son las matrices de incidencia relacionadas a β y u , respectivamente. K es la matriz de relaciones genotípicas (Endelman & Jannink, 2012); σ_G^2 es la varianza genética; I es la matriz identidad; σ_e^2 es la varianza residual.

Se definió el umbral de significancia de las asociaciones *SNP*-fenotipo por el método de número efectivo de test independientes (Li & Ji, 2005).

3.2.7 Definición de *QTL* y haplotipos

Se definió como *QTL* a cada región con al menos 3 *SNP* significativos separados por no más de un millón de pares de bases (Mpb) entre sí y con $r^2 \geq 0,3$. Este umbral de 1Mpb se basa en la caída de desequilibrio de ligamiento promedio reportada para esta población por Quero *et al.* (2018).

Para cada *QTL* de cada elemento, año y población, se seleccionaron los *SNP* para representar a dicho *QTL* mediante un procedimiento de eliminación de variables *backwards* (Derksen & Keselman, 1992). Para ello se ajustando un primer modelo multi-*SNP* para cada *QTL* siguiendo la ecuación [3] en el que β fueron todos los *SNP* significativos de ese *QTL* de acuerdo a los p-valores del análisis de mapeo asociativo. Luego se realizó un ANOVA para ese primer modelo y se descartaron

los *SNP* no significativos (P -valor $>0,001$), llegándose a un modelo multi-*SNP* final en el que todos los *SNP* eran significativos. Para los *QTL* donde más de un *SNP* fueron significativos, se combinaron dichos *SNP* en haplotipos. De esta manera cada *QTL* quedó representado por el marcador *SNP* más significativo de la región o por el haplotipo determinado por la combinación de los *SNP* significativos.

Posteriormente se combinaron todos los *SNP* o haplotipos de todos los *QTL* en un modelo multi-*QTL* siguiendo también el modelo de ecuación [3], donde se evaluaron todos los *QTL* en conjunto por medio de los *SNP* y/o haplotipos seleccionados, y mediante el procedimiento *backwards* se fueron eliminando los *SNP* o haplotipos no significativos en un ANOVA (P -valor $>0,001$). Se obtuvo un modelo multi-*QTL* final en el que todos los *SNP* o haplotipos fueron significativos. Con el coeficiente de determinación (R^2) del modelo multi-*QTL* final se estimó la proporción de la varianza fenotípica explicada (PVE) por todos los *QTL* significativos para cada año y población siguiendo a Beavis (2019). Para tener una aproximación a la interacción *QTL* por ambiente se estimó en forma cruzada la PVE por los *QTL* identificados en un año, en las medias fenotípicas del otro año. También se realizó esta estimación cruzada de la PVE para los *QTL* de cada elemento en las medias fenotípicas de los otros elementos, con el objetivo de evaluar el efecto de un *QTL* identificado para un determinado elemento en el contenido de los otros, también de acuerdo a Beavis (2019).

3.2.8 Correlación entre especies de As.

Se calculó la correlación de *Pearson* entre las diferentes especies de As (DMA, iAs y tAs), y se calculó el porcentaje de iAs y DMA en el contenido de tAs. Esto se realizó en el conjunto de líneas de E1 que fueron procesadas para especiación (n=91).

3.3 Análisis de genes candidatos.

3.3.1 Búsqueda bibliográfica.

Se realizó una revisión sobre genes reportados en la bibliografía, relacionados al contenido de As en la planta de arroz.

3.3.2 Identificación de genes candidatos en el germoplasma de INIA y selección de líneas con combinaciones alélicas.

Se utilizaron los datos de *SNP* de la población genotipada (Rosas *et al.*, 2018), identificando los genes para los cuales se contaba con *SNP* intragénicos en dicha población. En base a las diferentes combinaciones de alelos presentes en cada *SNP*, se realizó la selección de líneas *IND* y *JAP*.

3.3.3 Material vegetal y ensayo de campo

Se utilizaron 32 líneas avanzadas del PGMA de tipo *IND* y *JAP*. Los cultivares fueron seleccionados buscando combinar los alelos de los *SNP* intragénicos en genes candidatos para obtener la mayor cantidad posible de combinaciones alélicas.

Los cultivares seleccionados fueron evaluados en dos ensayos de campo en las zafra 2018/19 (z1) y 2019/20 (z2), en la Unidad Experimental de Paso de la Laguna (Treinta y Tres) de INIA. Se realizó un diseño experimental de bloques completos al azar con tres repeticiones.

La unidad experimental fue una parcela de cuatro hileras de 0,8 x 2,4 m (1,92 m²) sembradas por siembra directa, de la que se cosecharon las dos hileras centrales. Después de su cosecha los granos de arroz fueron enviados al departamento de Cereales, Oleaginosos y Productos derivados del LATU para su procesamiento, y luego al departamento de Espectrometría Atómica de Alimentos y Medio Ambiente del LATU, donde se realizó la determinación de iAs en grano pulido mediante la técnica de HPLC-ICP-MS.

3.3.4 Estimación de efectos de genes candidatos.

Para estudiar el efecto de los marcadores moleculares seleccionados en el contenido de iAs y de tAs y de sus interacciones, se ajustó el modelo de la ecuación [4]:

$$[4] \quad Y_{ijkl} = \mu + SNP1_i + SNP2_j + \dots + SNPN_n + (SNP1 * SNP2)_{ij} + \dots + (SNP1 * SNPN)_{in} + (SNP2 * SNPN_n)_{jn} + (SNP1 * SNP2 * SNPN)_{ijn} + \gamma_l + X\beta_1 + e_{ijnl}$$

donde: Y_{ijkl} es el contenido de iAs o de tAs en grano de las líneas con SNP_{ijn} en el bloque l ; μ es la media general; $SNP1_i$, $SNP2_j$ y $SNPN_n$ son los efectos principales de los alelos i , j y k de los $SNP1$, $SNP2$, hasta $SNPN$ respectivamente; $(SNP1 * SNP2)_{ij}$, $(SNP1 * SNPN)_{in}$, $(SNP2 * SNPN_n)_{jn}$ y $(SNP1 * SNP2 * SNPN)_{ijn}$ son los efectos de las interacciones dobles y triple entre los SNP ; γ_l es el efecto del bloque l ; $X\beta_1$ es la covariable tiempo de pulido y e_{ijkl} es el efecto residual de cada alelo ijk en el bloque l , con $N \sim (0, \sigma_e^2)$.

Con los modelos ajustados se realizó un análisis de varianza (ANOVA). Para aquellos marcadores significativamente asociados con el contenido de iAs y/o tAs, se realizó un análisis bioinformático utilizando las bases de datos *GenBank* (NCBI), *IRRI* (Mansueto *et al.*, 2017), *NSF* (Sakai *et al.*, 2013) y *RAP-DB* (Kawara *et al.*, 2013). Se descargaron las secuencias codificantes de los genes involucrados y se ubicó la posición de cada SNP en la estructura del gen respecto a las regiones codificantes.

3.3.5 Estimación de efectos genotípicos para el contenido de iAs y tAs.

Para estudiar el efecto de los genotipos en el contenido de iAs y de tAs, se ajustó el modelo de la ecuación [6]:

$$[6] \quad Y_{ij} = \mu + G_i + \beta_j + e_{ij}$$

donde: Y_{ik} es el contenido de iAs o de tAs en grano de las líneas con genotipo i en el bloque j ; μ es la media general; G_i es el efecto del genotipo i ; β_j es el efecto del bloque j ; y e_{ij} es el residual del genotipo i en el bloque j , con $N \sim (0, \sigma_e^2)$.

Se realizó un ANOVA para determinar la significancia de los efectos estudiados. Con las medias ajustadas con el modelo de ecuación [5] se calculó la correlación de *Pearson* entre el contenido de iAs y tAs y se generó un ranking de líneas promisorias para bajo contenido de iAs y tAs.

Se calculó la proporción de iAs en función del contenido de tAs.

4- Resultados.

4.1 Estudio de mapeo asociativo

Selección de líneas para el análisis de mapeo asociativo

A partir del análisis de componentes principales en las poblaciones de mapeo analizadas se seleccionaron las líneas para los análisis de mapeo asociativo, representando todos los sectores del gráfico de los dos primeros componentes principales (Figura 1).

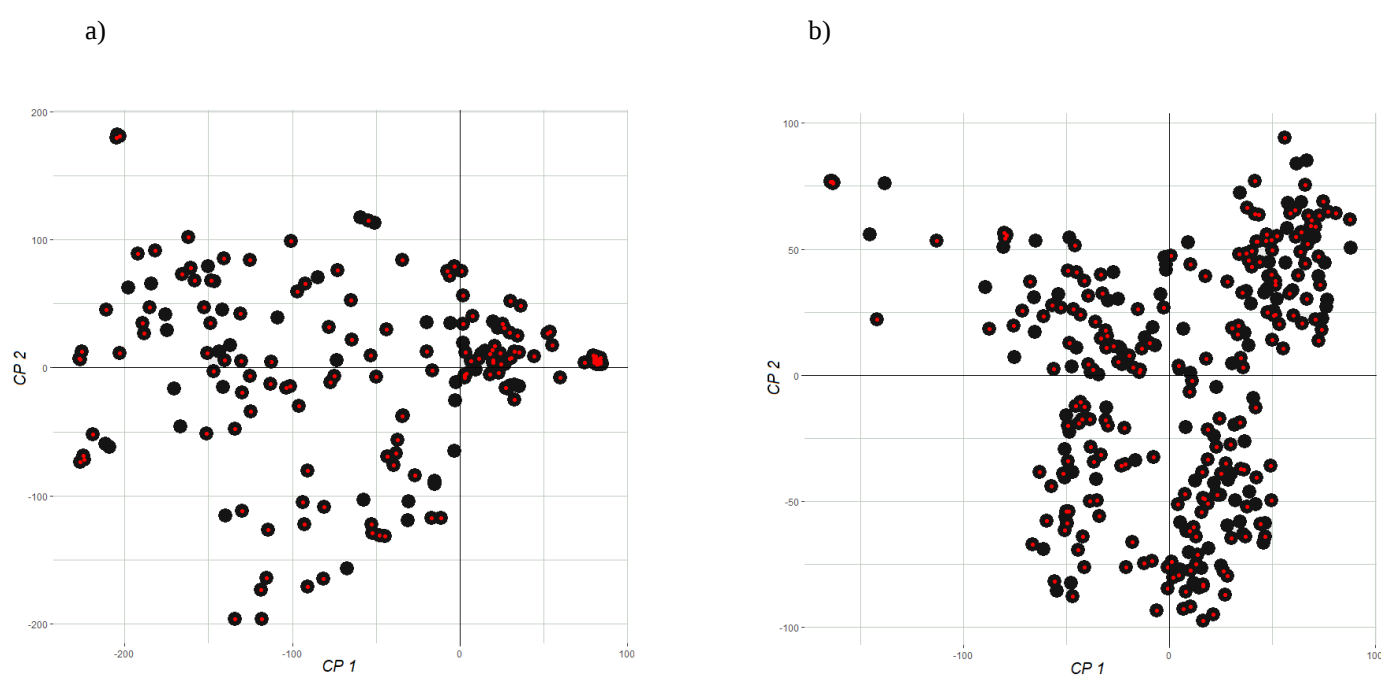


Figura 1. Componentes principales 1 (CP 1) y 2 (CP 2) de variación genotípica para las poblaciones índica (a) y japónica tropical (b) genotipadas. Los puntos en color negro corresponden a las líneas genotipadas en proyectos anteriores y los puntos rojos señalan aquellas líneas seleccionadas para los análisis de mapeo asociativo del presente trabajo.

Evaluación fenotípica

El tiempo de pulido, grado de molienda y contenido de tAs se detalla en la Tabla AI del Anexo.

El elemento con mayor contenido en el grano para todos los ensayos y poblaciones fue el As, del cual la mayor parte correspondió a DMA (Figura 2). Los contenidos en grano de los elementos estudiados variaron de acuerdo con la subespecie y el

ensayo (Figura 2). Se encontraron diferencias significativas entre ensayos para tAs, Se y Pb, con valores mayores en E1 que en E2. El efecto subespecie fue significativo, con valores menores en *JAP*, para tAs (E1), Se (E1), As(V) (E1), DMA(E1) y Cd (E2). El coeficiente de correlación de Pearson entre las determinaciones de tAs en el LATU y en el laboratorio TESLA tuvo un valor de $r=0.9999872$ (p-valor $< 2.2e-16$).

El ensayo E1 presentó mayor heredabilidad que E2 para todos los elementos analizados y en ambas subespecies, a excepción del Cd en las líneas *IND* para las que la H^2 fue mayor en E2 (Figura 3), debido a la mayor varianza residual (ambiental no modelada) en el ensayo E2. La heredabilidad fue más alta en *IND* que en *JAP* para todas las variables estudiadas (Figura 3), debido a la mayor varianza genética en *IND*.

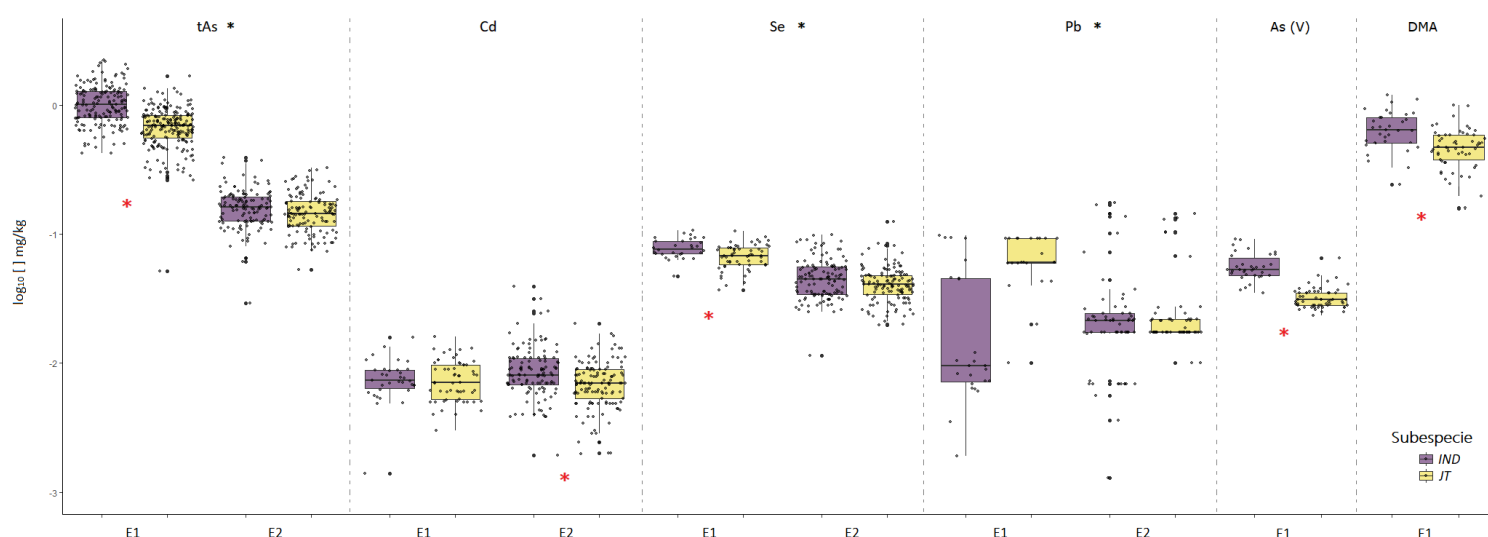


Figura 2. Gráfico de cajas del logaritmo en base 10 del contenido de arsénico total (tAs), cadmio (Cd), selenio (Se), plomo (Pb), arsenato (As(V)) y ácido dimetilarsínico (DMA) ($\log_{10}$ [] mg/kg) en las poblaciones índica (*IND*) y japónica tropical (*JAP*) en los ensayos de campo de la primera evaluación fenotípica en 2017/18 (E1) y la segunda en 2018/19 (E2). Los asteriscos rojos señalan las diferencias significativas entre subespecies y los asteriscos negros señalan las diferencias significativas entre ensayos ($p < 0.05$).

En la subespecie *IND* la única correlación significativa entre ensayos de un mismo elemento fue para Se (Figura 3a). Entre pares de distintos elementos, las correlaciones fueron significativas y positivas entre Pb (E1) y tAs (E1), Pb (E1) y Se (E1 y E2), tAs (E2) y Se (E2); Cd (E2) y Se (E2). Entre Pb (E2) y Se (E2) la correlación fue significativa y negativa. En cuanto a la especiación de As, el As(V) y el DMA correlacionaron positiva y significativamente respecto a tAs y entre sí. Para *JAP* no hubo ninguna correlación significativa entre ensayos para un mismo elemento (Figura 3b). Fueron significativas y positivas las correlaciones entre pares de elementos para tAs (E1) y Pb (E1), Cd (E1) con Se (E1) y Pb (E1), tAs (E2) y Se (E2), Cd (E2) con Se (E2) y Pb (E2). Al igual que en la subespecie *IND*, en la especiación de As, As(V) y DMA correlacionaron positiva y significativamente respecto a tAs y entre sí (Figura 3b).

El porcentaje de iAs respecto al contenido de tAs osciló entre 3-14%, mientras que el DMA representó entre 82-94% del tAs (Figura 4), en ambas subespecies.



Figura 3. Distribuciones (diagonal), heredabilidades (H^2 , margen derecho), gráficos de dispersión (debajo la diagonal) y correlaciones de Pearson (sobre la diagonal) de medias fenotípicas ajustadas para los contenidos de arsénico total (tAs), arsenato (As (V)), ácido dimetilarisínico (DMA), cadmio (Cd), selenio (Se) y plomo (Pb) en mg/kg, para los ensayos de 2017/18 (E1) y 2018/19 (E2) para la población indica (*IND*) (a) y japónica tropical (*JAP*) (b). Para las correlaciones de Pearson entre cada par de elementos se indica el número de genotipos incluidos en cada prueba. Los asteriscos indican el rango de P valor de la correlación (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$). Para As(V) y DMA no se estimó la H^2 por contarse con el análisis de una sola repetición.

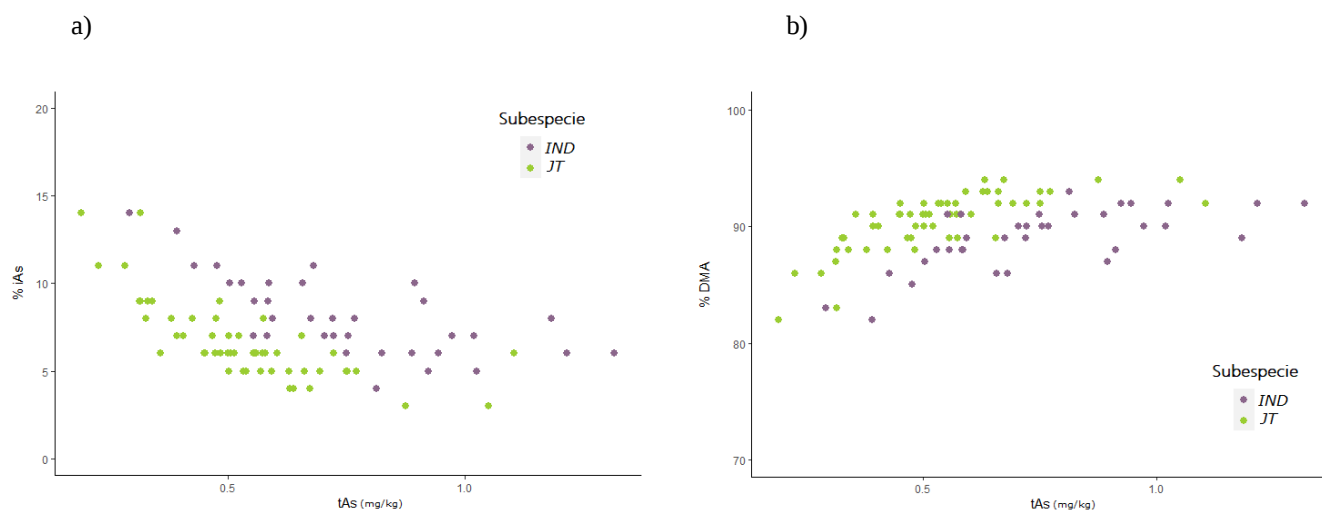


Figura 4. Porcentaje de arsénico inorgánico (iAs) (a) y ácido dimetilarsínico (DMA) (b) en función del contenido de arsénico total (tAs) en la especiación de arsénico (As), para las subespecies indica (*IND*) y japónica tropical (*JAP*).

En las mediciones de Pb, sólo 29 líneas *IND* (11 de E1 y 18 de E2) y 36 *JAP* (6 de E1 y 30 de E2) tuvieron valores cuantificables de este metal, mientras que el resto de los resultados se encontraron por debajo del límite de detección, por lo que esta variable no fue considerada para el análisis de mapeo asociativo. Asimismo, tampoco se mapeó el contenido de tAs en el ensayo E2 para la población *JAP* debido a la $H^2=0$ encontrada.

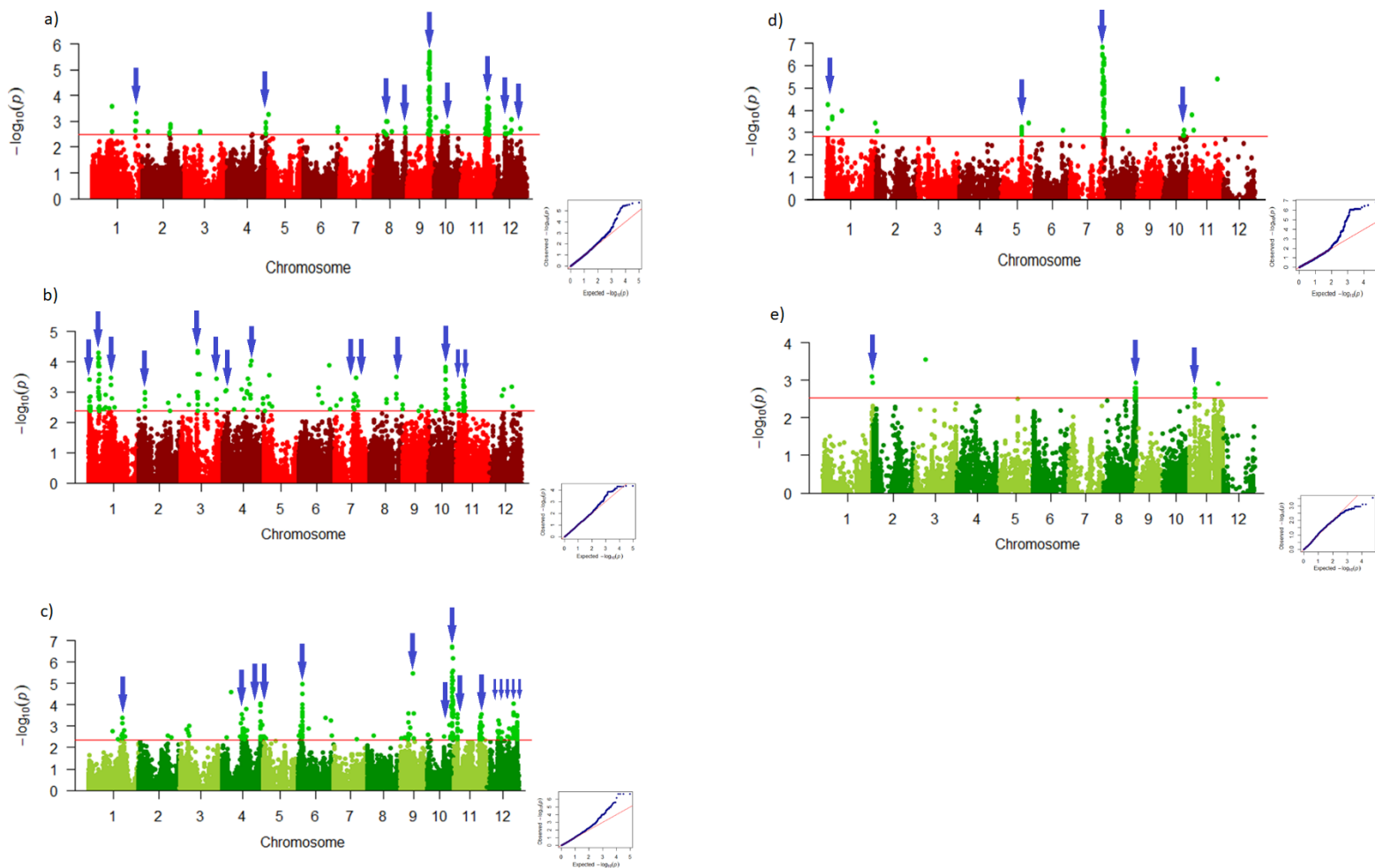


Figura 5. Gráficos Manhattan y cuantil-cuantil mostrando los resultados del análisis de mapeo asociativo para (a) contenido de arsénico total (tAs) en índica (IND) en 2017/18 (E1), (b) contenido de arsénico total (tAs) en índica (IND) en 2018/19 (E2), contenido de cadmio (Cd) en índica (IND) en 2018/19 (E2), contenido de arsénico total (tAs) en japónica (JAP) en 2017/18 (E1), (b) contenido de cadmio (Cd) en japónica (JAP) en 2018/19 (E2). El umbral de significancia para la asociación marcador-fenotipo está indicado por la línea roja. Las flechas azules marcan los *QTL* detectados para cada elemento.

Análisis de mapeo asociativo

El umbral de significancia de las asociaciones se determinó en 2,49 para la subespecie *IND* y en 2,8 para la subespecie *JAP*. En función de esto se identificaron 27 *QTL* asociados al contenido de tAs, 23 en la población *IND* (9 en E1 y 14 en E2) y 4 en *JAP* (todos en E1). 18 *QTL* fueron identificados asociados al contenido de Cd, 15 para *IND* y 3 para *JAP*, todos corresponden a E2 (Figura 5). El *QTL* identificado en el cromosoma 1 de las líneas *JAP* asociado a Cd, se encuentra a menos de 500 Mb un *QTL* para Cd reportado por Liu *et al.* (2019) (Figura 6). El *QTL* identificado en el cromosoma 2 de las líneas *IND* asociado al contenido de tAs en E2, comparte regiones con un *QTL* reportado para tAs por Murugaiyan *et al.* (2019) y otro para contenido de Cd por Zhao *et al.* (2018). El *QTL* identificado en el cromosoma 3 de las líneas *IND* asociado al contenido de tAs, comparte regiones con dos *QTL* reportados para As por Liu *et al.* (2019).

El *QTL* identificado en el cromosoma 4 de las líneas *IND* asociado al contenido de Cd, se situó a menos de 500 Mb de una región con tres *QTL* para Cd, dos de ellos reportados por Zhao *et al.* (2018) y otro por Liu *et al.* (2019). El *QTL* identificado en el cromosoma 5 *JAP* asociado al contenido de tAs, se encuentra a menos de 500 Mb de dos *QTL* reportados por Liu *et al.* (2019) para As, y a la región codificante del gen OsPCS1 (Hayashi *et al.*, 2017), un gen con un papel importante en la reducción de As en el grano. En el cromosoma 7 de *JAP*, se identificó un *QTL* para tAs que comparte una región con un *QTL* reportado para As por Liu *et al.* (2019). También se identificó un *QTL* en *IND* para tAs, que comparte una región con dos *QTL* reportados para As por Zhang *et al.* (2008) y Liu *et al.* (2019), y otro para Cd por Zhao *et al.* (2018). En el cromosoma 8 de *IND*, se identificó un *QTL* para tAs que comparte región con un *QTL* reportado para As por Murugaiyan *et al.* (2019) y otro para Cd por Liu *et al.* (2019). También se identificó un *QTL* para Cd en *JAP*, que comparte región con un *QTL* para Cd reportado por Zhao *et al.* (2018).

En el cromosoma 9 *IND*, se identificó un *QTL* para tAs, que comparte región con 4 *QTL* reportados para As por Murugaiyan *et al.* (2019). También se identificó un *QTL* en *JAP* para Cd, que comparte región con un *QTL* reportado para Cd por Liu *et al.* (2019). A su vez, se identificaron dos *QTL* para Cd, que comparten regiones

con dos *QTL* reportados para Cd por Zhao *et al.* (2018) y Liu *et al.* (2019), respectivamente.

En el cromosoma 11 se detectaron dos *QTL* para tAs en *IND*, que comparten respectivamente, regiones con dos *QTL* para As reportados por Liu *et al.* (2019).

En el cromosoma 12 se detectó un *QTL* para Cd en *IND*, que comparte una región por un *QTL* reportado para Cd por Liu *et al.* (2019).

En la Tabla 2 se muestran los *SNP* y haplotipos seleccionados en cada modelo multilocus para tAs. Las PVE estimadas con los modelos multilocus para cada elemento se muestra en la Tabla 3. La PVE por los *QTL* para los valores fenotípicos de un mismo año en *IND* (Tabla 3) fue mayor a 30%, sin embargo, la PVE cruzadas estimadas con los *QTL* de un año y los valores fenotípicos del otro no superaron en ningún caso 15%. Para *JAP* la PVE de un mismo año fue <20%, y los valores de PVE cruzada fueron <5%. (Tabla 3). El PVE explicado tanto para tAs como para Cd con los *SNP* seleccionados en los modelos multilocus fue mayor en la subespecie *IND* (34% y 43% para tAs en E1 y E2 respectivamente, y 47% para Cd en E2) que en la *JAP* (17% para tAs en E1 y 20% para Cd en E2). Estos valores presentan un rango de moderado a alto en *IND* y de moderado a bajo en *JAP*.

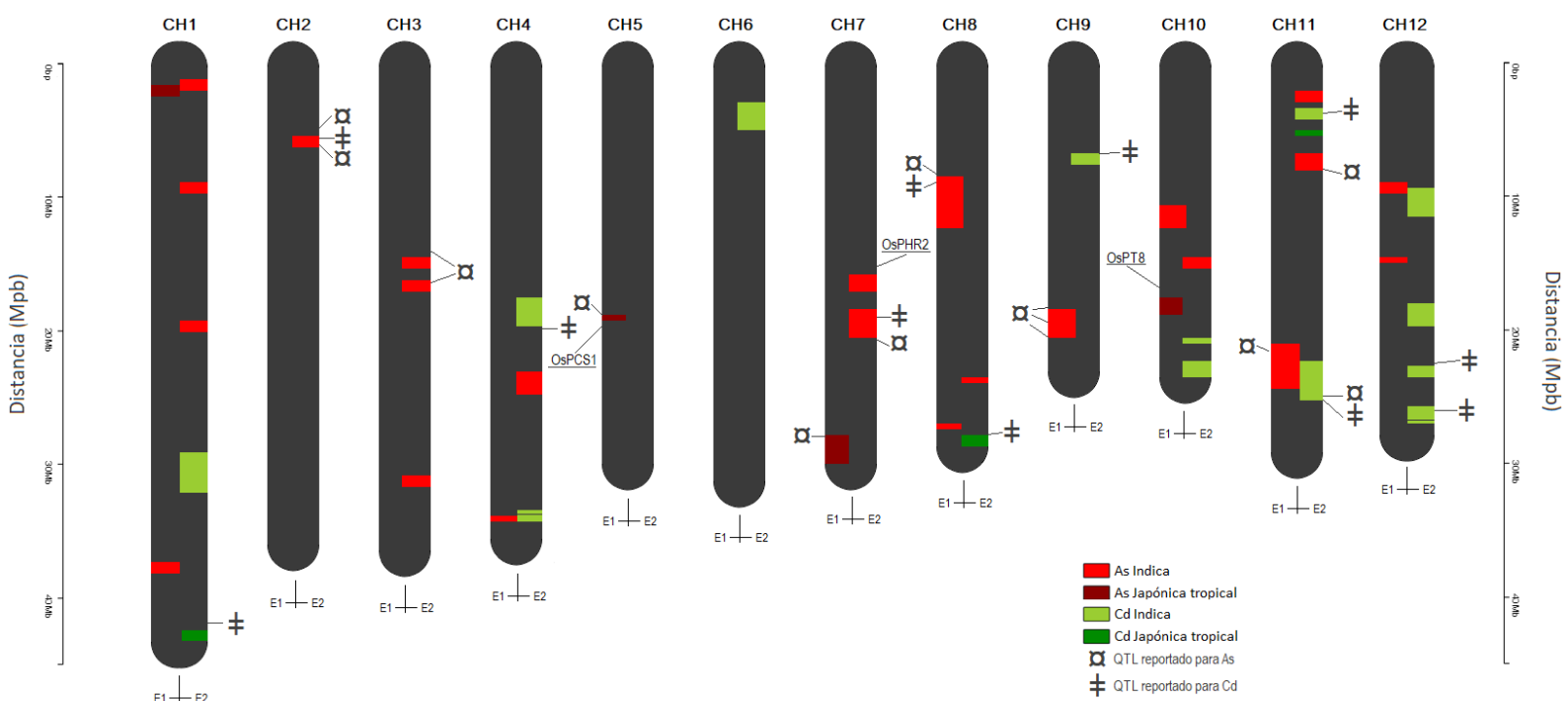


Figura 6. Mapa físico y ubicación de los *QTL* detectados para la concentración en grano de arroz de arsénico total (tAs) y cadmio (Cd) en la población de mapeo. Los *QTL* correspondientes a cada ensayo (E1 y E2) se muestran a la izquierda y a la derecha de cada cromosoma, respectivamente. Se muestran los *QTL* (para As y Cd) que surgen de la revisión bibliográfica y genes candidatos (para As) y sus posiciones físicas reportadas en la bibliografía, que comparten regiones a 500 Mb o menos con *QTL* detectados en este trabajo. La ubicación de los *QTL* identificados en este trabajo corresponde al *SNP* con el p-valor más significativo de las regiones correspondientes.

Tabla 1. *SNP* seleccionados en el modelo conjunto multilocus para la determinación de la proporción de la varianza fenotípica explicada (PVE) por los *QTL* de tAs. Los *SNP* de un mismo *QTL* formando haplotipos se muestran separados por una barra. Se muestra el valor de PVE de cada *SNP* individual.

Año	Tipo	Cromosoma	SNP	PVE
E1	<i>IND</i>	1	S1_37653358	5%
		4	S4_33868575	5%
		8	S8_11054470	7%
		8	S8_26989908	6%
		9	S9_19107492 / S9_19408013	16%
		11	S11_23845567	12%
	<i>JAP</i>	1	S1_1599138	7%
		5	S5_18932654	5%
		7	S7_27898174	13%
E2	<i>IND</i>	1	S1_8986577	12%
		1	S1_1345895	11%
		1	S3_14658182	14%
		2	S4_24473366	10%
		7	S7_16526026	5%
		7	S7_18504277	6%
		10	S10_14683637 / S10_14501488	15%
	<i>JAP</i>	-	-	

Tabla 2. Proporción de la varianza fenotípica explicada (PVE) para tAs y Cd en las poblaciones *IND* y *JAP*, para los ensayos fenotípicos en los que se obtuvieron valores $H^2 > 0$. También se muestran los valores de la PVE de ensayos E1 explicada por los *QTL* identificados en E2 y viceversa, y la PVE cruzada entre tAs y Cd.

<i>IND</i>				<i>JAP</i>		
	tAs E1	tAs E2	Cd E2		tAs E1	Cd E2
tAs E1	34%	5%	12%	tAs E1	17%	3%
tAs E2	3%	43%	13%	Cd E2	1%	20%
Cd E2	8%	4%	47%			

Los gráficos que muestran los efectos de sustitución alélica en el contenido de tAs y Cd para los *QTL* del modelo multilocus final en las poblaciones *IND* y *JAP* analizadas en E1 y E2 se muestran en el ANEXO (Figura AI).

4.2 Marcadores en genes candidatos

Se encontraron 15 genes candidatos para transporte o absorción de especies de As reportados en la bibliografía (Tabla 3).

Tabla 3. Genes candidatos reportados, asociados al transporte y/o absorción de diferentes especies de As en la planta de arroz.

Cromosoma	Gen	Tamaño (pb)	Locus	Función	REFERENCIA
CH 01	P450	2441	Os01g43740	Respuesta a estrés	Chakrabarty <i>et al.</i> , 2009
CH 01	OsGrx_C7	766	Os01G27140	Reductasa	Verma <i>et al.</i> , 2016
CH 01	OsCLT1	8941	Os01g0955700	Transportador CRT	Yang <i>et al.</i> , 2016
CH 02	LSI1	3608	Os02G51110	Acuaporina	Ma <i>et al.</i> , 2008
CH 02	OsHAC1;1	2487	Os02G01220	Arsenato reductasa	Shi <i>et al.</i> , 2016
CH 02	OsGrx_C2.1	1876	Os02G40500	Regulación redox	Verma <i>et al.</i> , 2016
CH 02	OsHAC4	2459	Os02g0157600	Sulfuro transferasa	Xu <i>et al.</i> , 2017
CH 03	LSI2	2724	Os03G01700	Acuaporina	Ma <i>et al.</i> , 2008
CH 04	OsHAC1;2	2656	Os04G17660	Sulfuro transferasa	Shi <i>et al.</i> , 2016
CH 04	OsABCC1	11342	Os04G52900	Detoxificación	Song <i>et al.</i> , 2014
CH 04	OsPT4	2987	Os04G10750	Transporte fosfato	Ye <i>et al.</i> , 2017
CH 05	OsPCS1	2615	Os05g0415200	Fitoquelatina sintasa	Hayashi <i>et al.</i> , 2017
CH 07	OsNRAMP1	4856	Os07g0258400	Bactericida	Tiwari <i>et al.</i> , 2014
CH 07	OsPHR2	5536	Os07G25710	Transporte fosfato	Wu <i>et al.</i> , 2011

Los genes en los que se encontraron *SNP* intragénicos segregantes en las líneas seleccionadas fueron: *LSI2*, *OsABCC1*, *OsPT8*, *OsGrx_C2.1*, *OsHAC4* y *OsHAC1;2* (Tabla 4).

Por medio del análisis bioinformático se determinó que todos los *SNP* evaluados se encontraban en regiones codificantes de cada uno de los genes candidatos seleccionados, respectivamente.

Los *SNP* con efecto significativo en el contenido de iAs fueron: S3_431326 (*LSI2*), S10_16037647 (*OsPT8*), S2_24567131 (*OsGrx_2.1*), y las interacciones: S3_431326 por S10_16037647 y S4_31505231 (*OsABCC1*) por S10_16037647 (Figura 7). También fueron significativos los efectos del ensayo y la subespecie, con valores más bajos de *z1* respecto a *z2* y de *JAP* respecto a *IND* (Figura 8).

Para contenido de tAs no se encontró un efecto significativo de ninguno de los marcadores moleculares. Sí tuvo un efecto significativo el año y el tipo de cultivar, siendo más bajos en las líneas *JAP* respecto a las *IND* y en *z2* respecto a *z1* (Figura 9).

Tabla 4. Líneas y variedades seleccionadas y evaluadas en los ensayos z1 y z2 para estimación de efectos genotípicos y de genes candidatos. Se muestran los genes candidatos analizados con sus *SNP* intragénicos correspondientes.

LÍNEA	Subespecie	GEN						
		<i>LSI2</i>	<i>OsABCC1</i>		<i>OsPT8</i>		<i>OsHAC4</i>	<i>OsGrx_2.1</i>
		<i>SNP1</i>	<i>SNP1</i>	<i>SNP2</i>	<i>SNP1</i>	<i>SNP2</i>	<i>SNP1</i>	<i>SNP1</i>
		S3_431326	S4_31505231	S4_31506890	S10_16037647	S10_16038003	S2_3142214	S2_24567131
El Paso 144	IND	G	G	T	T	T	G	T
INIA_Merín	IND	G	G	T	C	C	G	TC
INIA_Olimar	IND	G	G	T	T	T	A	T
SLF_09_246	IND	C	G	T	C	C	A	T
SLF_10_199	IND	C	G	T	C	C	A	T
SLF_10_240	IND	G	G	T	T	T	A	T
SLF_10_400	IND	G	G	T	T	T	A	T
SLI_09_12	IND	C	T	C	T	T	A	T
SLI_09_157	IND	C	G	T	T	T	A	T
SLI_09_190	IND	G	G	T	C	C	A	T
SLI_09_193	IND	G	G	T	T	T	A	T
SLI_09_197	IND	C	G	T	C	C	G	T
SLI_09_20	IND	G	G	T	C	C	G	T
SLI_09_204	IND	G	T	C	C	C	G	T
SLI_10_021	IND	C	T	C	C	C	A	T
SLI_10_024	IND	G	T	C	T	T	A	T
SLI_10_034	IND	G	T	C	T	T	G	T
JAP_8691	JAP	C	G	T	C	C	A	T
JAP_9137	JAP	C	G	T	C	C	G	T
JAP_9172	JAP	C	G	T	C	C	A	T
JAP_9239	JAP	C	G	T	C	C	G	C
JAP_9292	JAP	C	G	T	C	C	G	C
JAP_9355	JAP	C	G	T	C	C	A	C
JAP_9356	JAP	C	G	T	C	C	G	T
JAP_9429	JAP	C	G	T	C	C	A	C
JAP_9460	JAP	C	G	T	C	C	A	C
JAP_9462	JAP	C	G	T	C	C	G	C
JAP_9498	JAP	C	G	T	C	C	A	C
JAP_9499	JAP	C	G	T	C	C	A	C
JAP_9661	JAP	C	G	T	C	C	A	T
Parao	JAP	C	G	T	C	C	A	T
INIA_Tacuari	JAP	C	G	T	C	C	G	T

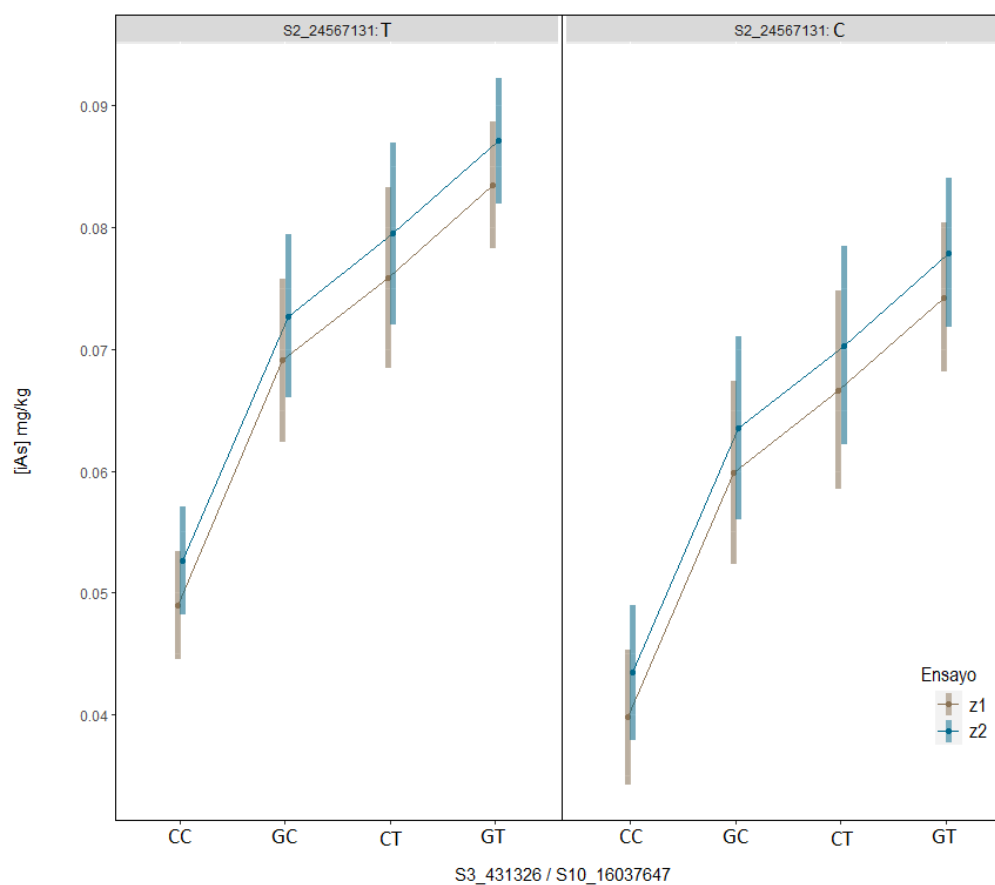


Figura 7. Efecto de marcadores moleculares en los genes candidatos LSI2 (SNP S3_431326), OsPT8 (SNP S10_16037647) y OsGrx_2.1 (SNP S2_24567131) sobre el contenido de arsénico inorgánico (iAs) en grano ([iAs] mg/kg). Se muestran los efectos de sustitución alélica de los 3 SNP más relevantes en el contenido de iAs en los ensayos realizados en 2018/19 (z1) y 2019/20 (z2).

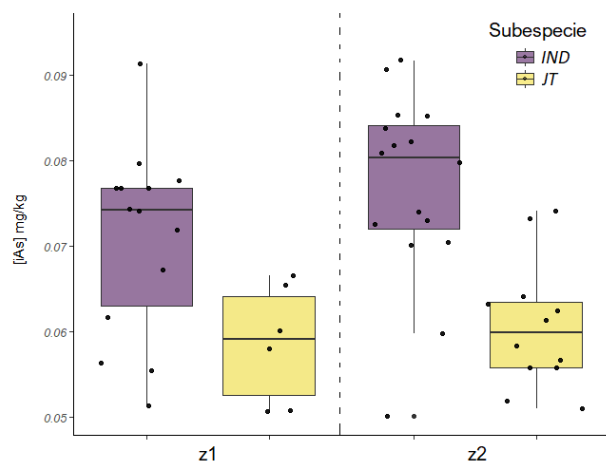


Figura 8. Contenido de arsénico inorgánico (iAs) en grano en genotipos índica (*IND*) y japónica tropical (*JAP*) en los ensayos realizados en 2018/19 (z1) y 2019/20 (z2)

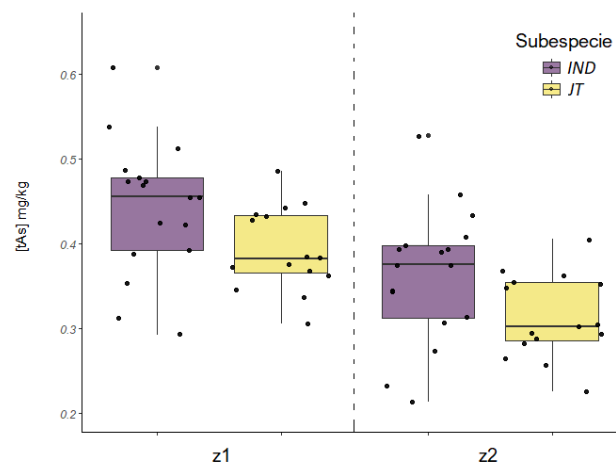


Figura 9. Contenido de arsénico total (tAs) en grano en genotipos índica (*IND*) y japónica tropical (*JAP*) en los ensayos realizados en 2018/19 (z1) y 2019/20 (z2)

Estimación de efectos genotípicos para el contenido de iAs y tAs.

Las heredabilidades de iAs en el ensayo z1 fueron 0,92 (*IND*) y 0,71 (*JAP*) y en z2 0,89 (*IND*) y 0,90 (*JAP*). Para tAs sólo el efecto año fue significativo y las heredabilidades en z1 fueron 0,34 (*IND*) y 0,21 (*JAP*) y en z2 0,00 (*IND*) y 0,12 (*JAP*). En ambos ensayos los valores del contenido de iAs fueron significativamente mayores en *IND* (media 0,071 mg/kg) que en *JAP* (media 0,054 mg/kg) (Figura 10). También fueron significativos los efectos del tiempo de pulido del grano y el año. La diferencia entre subespecies no fue significativa para contenido de tAs. Sólo se encontró una correlación genética significativa entre el contenido de iAs y de tAs en z2 en materiales *JAP*. Para el contenido de tAs el año de ensayo fue el único efecto significativo ($p < 0,05$), con valores de tAs menores en z2 respecto a z1 (Figura 10). La correlación de Pearson entre el porcentaje de iAs y el contenido de tAs fue de 0.36 y significativa ($p < 0,05$) (Figura 10).

De las 13 líneas con menor contenido de iAs según la prueba de Tukey, tres fueron índica y el resto japónica tropical (Figura 12). Las líneas con mejor comportamiento para contenido de iAs mantuvieron bajos niveles en ambos ensayos. La interacción genotipo por año encontrada se debió principalmente al comportamiento de las variedades INIA Merín y Parao, que tuvieron valores bajos de iAs en z1 y altos en z2.



Figura 10. Distribución y correlación de las medias fenotípicas ajustadas del contenido de arsénico inorgánico (iAs) y arsénico total (tAs) (en mg/kg), para (a) subespecie indica (*IND*) en el ensayo z1, (b) *IND* en ensayo z2, (c) japónica tropical (*JAP*) en el ensayo z1, y (d) *JAP* en ensayo z2. En las diagonales de cada panel se muestra la distribución de las medias fenotípicas, en el recuadro fuera de la diagonal inferior se muestra el gráfico de dispersión de iAs en función de tAs, y en el recuadro fuera de la diagonal superior se muestra la correlación de Pearson entre iAs y tAs para cada ensayo y subespecie. Los asteriscos indican el rango de P valor de la correlación (* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$).

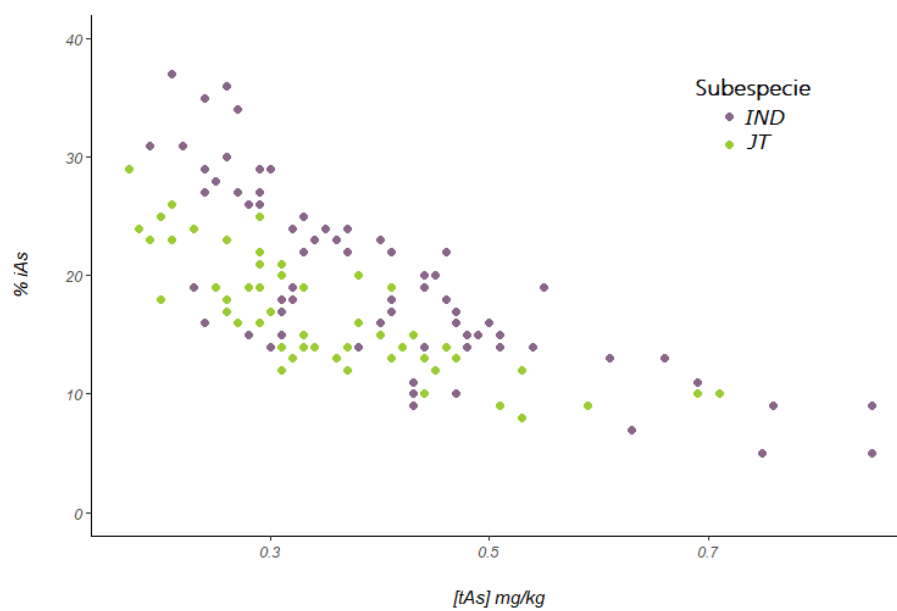


Figura 11. Proporción de arsénico inorgánico (iAs) en función del contenido de arsénico total (tAs) en la especiación de arsénico (As), para las subespecies índica (*IND*) y japónica tropical (*JAP*).

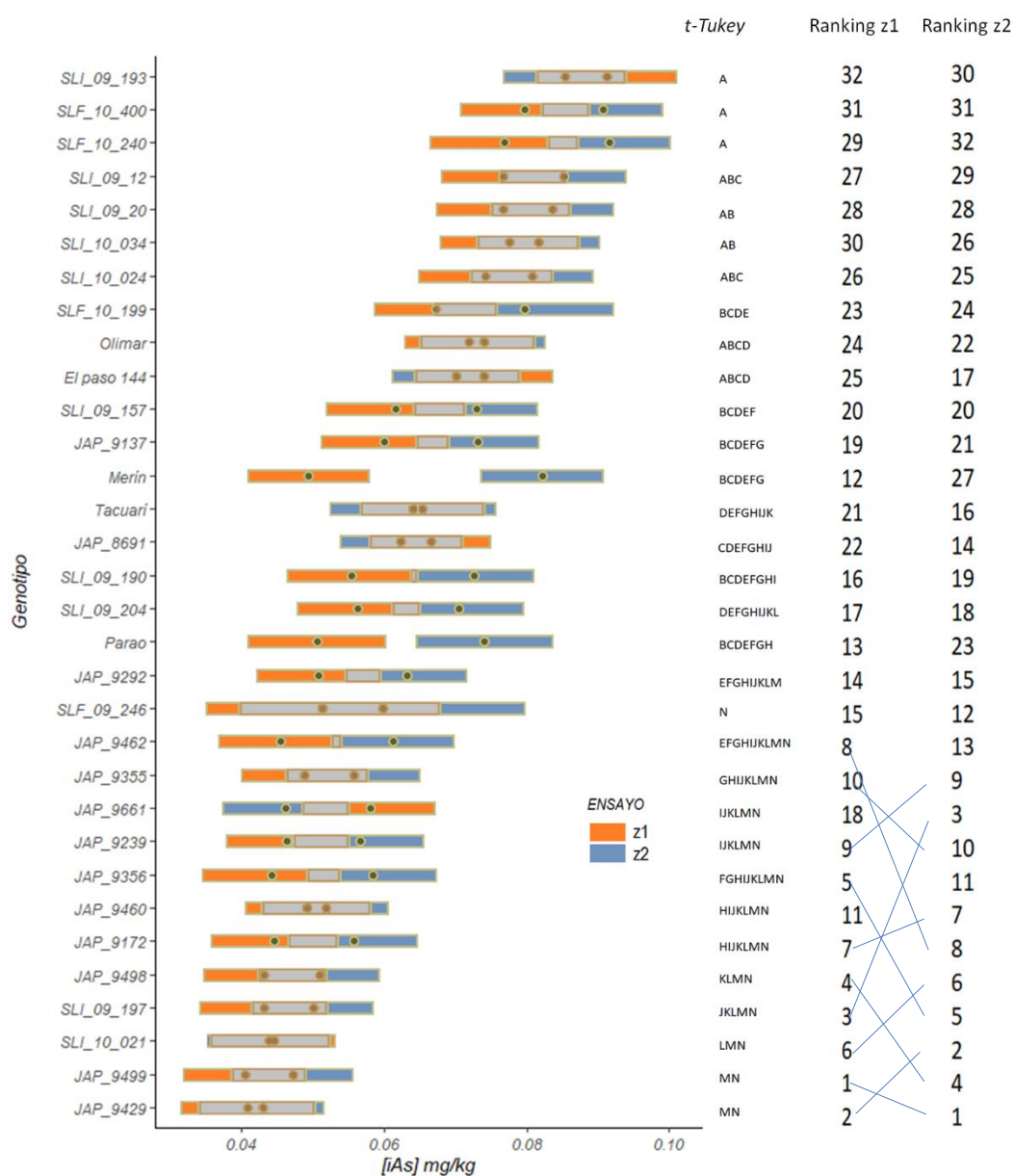


Figura 12. Ranking de cultivares y efecto del genotipo en el contenido de arsénico inorgánico (iAs) de las líneas evaluadas. Las diferencias entre genotipos fueron significativas ($p < 0,05$), y las agrupaciones obtenidas mediante el test de Tukey se muestran con letras mayúsculas a la derecha del gráfico. Las columnas de ranking z1 y z2, muestran la posición de cada línea en cada ensayo de acuerdo al contenido de iAs, con orden ascendente del 1 a 32. Las líneas azules conectan los primeros diez cultivares que se repitieron como los mejores para bajo contenido de iAs durante los dos años.

5- Discusión

Evaluación de subespecies y contenido de elementos químicos

Las diferencias significativas entre subespecies *IND* y *JAP* para tAs, Se, DMA y As(V) en E1, y de Cd en E2 concuerdan con la bibliografía donde se reporta que la subespecie *IND* tiene mayor acumulación de elementos como metales pesados y otros compuestos tóxicos que la *JAP*. En un trabajo realizado por Jiang *et al.* (2012) donde utilizaron 216 genotipos de diferentes variedades de arroz mostraron que las variedades de la subespecie *IND* contenían valores más altos de contenido de As y Pb respecto a las variedades de la subespecie *japónica*. Estos resultados también concuerdan con los de Liu *et al.* (2005), donde demuestran en un estudio de la variación del contenido de Cd entre diferentes cultivares, que aquellos pertenecientes a la subespecie *japónica* acumulaban valores más bajos de este metal en comparación con las de la subespecie *IND*.

A pesar de la alta variabilidad entre en el contenido de los diferentes compuestos cuantificados, en todos los casos el contenido de iAs como el de Cd, Se y Pb estuvo por debajo de los límites establecidos para el consumo humano y regulados por los organismos internacionales. Los niveles de iAs determinados fueron similares a los obtenidos por Campos *et al.* (en proceso de publicación), donde evaluaron diferentes tipos de riego y su efecto en el contenido de iAs en arroz uruguayo, y Roel *et al.* (2021) donde se evaluó el contenido de iAs a nivel nacional en condiciones productivas. A su vez, este trabajo determinó también el contenido de DMA obtenido durante la especiación de As. Estos resultados demuestran que el principal componente de As presente en los granos de arroz de las poblaciones y condiciones estudiadas es el DMA, acompañado de una pequeña proporción de iAs, que aun para valores altos de tAs, en ningún caso supera el valor de 0.11mg/kg. Este comportamiento de las contribuciones de iAs y DMA en el contenido de tAs en los granos de arroz concuerda con los reportes de diversos trabajos publicados (Carey, M. *et al.*, 2019; Farías *et al.*, 2014; Yamily *et al.*, 2007), y en una investigación que caracterizaba específicamente los cultivos de Estados Unidos (Williams *et al.*, 2005). Un estudio realizado por Meharg *et al.* (2009), muestra como en las zonas templadas hay una mayor proporción de DMA que en otras regiones. En dicho trabajo demostró que el iAs dominaba cuando la suma en grano de las especies de As era <0.1mg/kg, pero con DMA predominando en contenidos

de tAs en grano más altos. En el mismo sentido, este trabajo encontró una relación directa entre el contenido de tAs y la proporción de éste que es iAs.

Debido a que la planta de arroz no tiene la capacidad de metilar el iAs para formar especies como el DMA, se han realizado diversas investigaciones acerca de los microorganismos capaces de metilar el As, demostrando que estos son los responsables de la presencia de especies metiladas de As en grano (Jia *et al.*, 2013; Lomax *et al.*, 2011; Di *et al.*, 2019; Reid *et al.*, 2017; Afroz *et al.*, 2019; Chen *et al.*, 2019). En base a esto, sería de gran interés estudiar la microbiota presente en el cultivo de arroz en condiciones productivas, y analizar su capacidad de metilación para determinar el rol de estos microorganismos en el contenido de tAs en grano en los cultivares y condiciones ambientales locales. Este puede ser un componente clave para la reducción del tAs en el arroz uruguayo, que mejoraría aún más las condiciones de inocuidad de la producción.

Si bien la varianza fenotípica del contenido de tAs puede ser atribuible a diferencias genéticas entre las líneas evaluadas, este elemento se vio fuertemente afectado por el ambiente y por la interacción de éste con el genotipo.

A su vez la H^2 fue más alta en la población *IND* respecto a la *JAP*. Estos resultados pueden ser comparables a los presentados por Campbell *et al.* (2020), donde se propone que las diferencias de heredabilidad obtenidas entre las subespecies se deben en gran medida a la pérdida de variabilidad genética que ha tenido la subespecie *JAP* frente a *IND* desde la domesticación del cultivo, y a un aumento de los efectos ambientales en lugar de una pérdida de variación fenotípica.

La importante interacción genotipo por ambiente evidenciada en los ensayos E1 y E2 para todos los elementos, se alinea con los resultados obtenidos por Duan *et al.* (2017), donde realizaron dos ensayos con 471 cultivares en el sur de China, y determinaron que el efecto del genotipo sobre el contenido de As y Cd, fue de 38% y 31%, y de 30% y 48% para cada uno de los elementos en cada ensayo, respectivamente. Encontraron a su vez que los efectos de genotipo, ambiente, e interacción genotipo por ambiente fueron significativos para el contenido de As y Cd en el grano.

La ausencia de correlaciones entre tAs y Cd tanto en E1 como en E2, así como la muy baja concentración de Pb y Se, sugiere que el control genético es diferente para cada uno de estos elementos, por lo que, al realizar selección fenotípica basada en

el contenido de tAs en grano, no existiría un problema de selección indirecta respecto a estos metales.

Mapeo de QTL

El 75% de los *QTL* identificados pertenecen a la subespecie *IND*. En las poblaciones analizadas el mayor número de *SNP* obtenidos por GBS puede deberse a que el llamado de *SNP* se realizó sobre el genoma de referencia de Nipponbare, de subespecie *JAP*. Sin embargo, esto coincide con varios estudios de diversidad genotípica que reportan mayor diversidad en *IND* que en *JAP* (Thomson *et al.* 2007, Cerioli *et al.* 2022). Esta mayor variabilidad genotípica también se refleja en algunos trabajos en una mayor cantidad de *QTL* detectados en *IND*. Campbell *et al.* (2020) encontraron que la subespecie *IND* exhibía aproximadamente un 12,6% más de diversidad de expresión génica en comparación con *JAP*, y que esta última, contiene en general, una diversidad genética menor en relación a la subespecie *IND*. Esta diferencia en la diversidad genética entre *IND* y *JAP*, junto con las diferencias en H^2 de los rasgos estudiados, puede explicar las diferencias en número de *QTL* detectados en ambas poblaciones en el presente trabajo.

Del total de los 45 *QTL* detectados, 16 co-localizan con *QTL* para As y Cd reportados previamente (Liu *et al.*, 2019; Murugaiyan *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2018; Zhang *et al.*, 2008). El *QTL* para tAs identificado en el cromosoma 5 de *JAP* se encuentra en una región adyacente a la región codificante del gen OsPCS1 (Hayashi *et al.*, 2017), un gen con un papel importante en la reducción de As en el grano. Por lo tanto, se confirma la presencia de 29 nuevos *QTL* para tAs ($n=18$) y Cd ($n=11$) presentes en el germoplasma del PMGA, que hasta el momento no han sido reportados. No se pudo realizar un mapeo para Pb, debido a que los datos para este metal estuvieron en su gran mayoría por debajo del límite de detección durante los análisis químicos. Tampoco se realizó mapeo asociativo para Se ya que la variación fenotípica observada de su contenido en grano fue adjudicada completamente al efecto del ambiente ($H^2=0$), lo que invalidaría cualquier análisis de identificación de *QTL*.

El PVE para tAs por cada *QTL* individualmente, con una variación de entre 5% y 15%, tuvo valores algo menores a los reportados en trabajos como los de Kuramata

et al. (2013) y Zhang *et al.* (2008), en donde los valores oscilaron entre 12% y 25%, y entre 18% y 35% en dos ensayos consecutivos, respectivamente. Esto puede deberse a una sobreestimación en las publicaciones mencionadas, por tratarse de resultados obtenidos de poblaciones biparentales con recombinación cromosómica y número de marcadores menores a los de este trabajo.

Las PVE de un ensayo explicadas por los *QTL* identificados en el otro ensayo fueron bajas, indicando una importante interacción entre *QTL* y ambiente. La PVE de un determinado metal explicada por los *QTL* identificados para los otros metales no superó en ningún caso el 13%, lo que sugiere que la selección asistida para uno de los rasgos no acarrearía una ganancia genética importante en los demás. Estas últimas observaciones acerca de los diferentes controles genéticos que puede existir entre diferentes elementos a nivel de *QTL* y sobre la existencia de interacción entre *QTL* por ambiente, también fueron reportadas por Norton *et al.* (2012) en un trabajo realizado para la identificación de *QTL* asociados tanto para As y Cd, como para variedad de elementos como zinc y hierro, entre otros.

Los *QTL* identificados de un ensayo explican una alta proporción de la varianza fenotípica de tAs y Cd de ese mismo año ($20\% < PVE < 47\%$). Si esta alta PVE se mantuviera a lo largo de los diferentes ensayos, sería sugestiva de que aplicar selección asistida con los *SNP* de los respectivos *QTL* permitiría una buena ganancia genética. Sin embargo, esos mismos *QTL* explican muy poco de la varianza fenotípica (baja PVE entre diferentes ensayos) de años diferentes al que fueron identificados, lo que genera una limitante a la aplicabilidad de selección asistida con dichos marcadores. La magnitud de la interacción entre *QTL* por ambiente encontrada, hace necesario un estudio más exhaustivo de la misma, por ejemplo, caracterizando las variables ambientales (riego, tipo de suelo, pH, condiciones redox, microbiota, etc.) que se asocian a la detección de cada *QTL*.

Este trabajo pone en evidencia la importancia del efecto ambiental en los caracteres estudiados, así como su interacción con los efectos genéticos y genotípicos. Para futuros experimentos sería deseable lograr un mayor control del efecto ambiental, para lo cual se sugiere tanto la realización de ensayos de campo con mayor número de repeticiones, como la realización de experimentos en condiciones ambientales y micro ambientales controladas (por ejemplo, en invernáculo usando macetas con suelo homogéneo). Asimismo, el estudio de la interacción genotipo por ambiente

requeriría evaluar estos rasgos en un número mayor de ambientes, por ejemplo, abarcando más años, sitios y/o manejos agronómicos.

Evaluación de marcadores moleculares en genes candidatos

Al igual que en el estudio de mapeo asociativo, la subespecie *IND* presentó valores más altos de tAs que la subespecie *JAP*, tanto en z1 como en z2. El no haber detectado ningún efecto significativo de los marcadores estudiados sobre el contenido de tAs, junto a los bajos valores de H^2 obtenidos, refuerzan la idea del fuerte rol ambiental en el contenido de tAs, y hace más complejo determinar asociaciones entre el contenido de tAs y factores genéticos.

Los marcadores evaluados tuvieron un efecto significativo y consistente sobre el contenido de iAs en ambos ensayos, en cuatro de los cinco genes candidatos seleccionados. El efecto significativo que tuvieron los genes *OsPT8*, *LSI2*, *OsABCC1* y *OsGrx_2.1*, concuerda con los reportes de los mismos y su asociación al contenido de iAs en la planta (Wang *et al.*, 2016; Ma *et al.*, 2008; Song *et al.*, 2014; Verma *et al.*, 2016). Estos genes segregantes en el germoplasma de INIA podrían ser utilizados para selección asistida por bajo iAs en el PMGA, requiriéndose para ello una validación en una población de mayor tamaño y diversidad que la utilizada en este experimento.

Si bien hubo una diferencia significativa entre un ensayo y otro, con valores más bajos en z1 respecto a z2, los efectos alélicos de los *SNP* fueron constantes en ambos ensayos, lo que sugiere su baja interacción con el ambiente.

Los ensayos z1 y z2 fueron balanceados y con un adecuado número de repeticiones, permitiendo una estimación robusta y confiable de la heredabilidad de iAs y tAs. La mayor H^2 de iAs con respecto a la de tAs, sugiere que la ganancia genética para el contenido de iAs en grano tanto mediante selección fenotípica como asistida por marcadores moleculares, sería mayor que para el contenido de tAs.

El genotipo también tuvo un efecto significativo en el contenido de iAs, el cual en general no se vio afectado por el ambiente para los ensayos realizados. Se encontró una moderada pero significativa interacción entre genotipo y año. Al comparar el

ranking de líneas evaluadas entre un año y otro las mejores y peores líneas para bajo contenido de iAs se mantuvieron constantes en z1 y z2. Esto permitió determinar genotipos promisorios para bajo contenido de iAs, que pueden ser considerados para futuros cruzamientos por el PMGA para el objetivo de mejorar la inocuidad del grano.

El efecto en el contenido de iAs por el tiempo de pulido del grano, muestra que este podría ser un factor a considerar a futuro en el manejo agronómico post-cosecha, como una herramienta más, que ayudaría en la reducción del iAs.

6- Conclusión y perspectivas

En base a los análisis realizados, los resultados han demostrado que el germoplasma de arroz uruguayo, en las condiciones estudiadas, se caracteriza por presentar un bajo contenido de iAs en grano. Esto representa una ventaja para la producción nacional en lo que respecta a la inocuidad alimentaria.

La variabilidad genética asociada al contenido de As encontrada permitió detectar marcadores moleculares asociados a bajo contenido de este elemento, que al no repetirse en diferentes años de ensayo, deberían estudiarse en mayor profundidad, para mejorar aún más esta característica, y permitieran hacer frente a situaciones adversas e inusuales en las cuáles este contaminante pudiera generar un problema a nivel productivo. Los resultados de un mapeo de mayor precisión, así como los genes evaluados en el ensayo de genes candidatos, podrían ser utilizados como objetivo en edición génica, y confirmar así sus efectos.

Implementar métodos alternativos como la técnica de *screening* para la medición de arsénico en campo, es una opción de bajo costo y veloz para implementar selección para bajo contenido de iAs en los programas de mejoramiento de arroz nacionales en el futuro.

El efecto ambiental sobre las variaciones en el contenido de As encontradas en este trabajo sugiere que el estudio de la microbiota de los suelos en los cultivos de arroz y asociada al contenido de As, debe ser considerada y estudiada en profundidad a futuro, ya que el conocimiento de la misma puede generar una herramienta para mitigar los efectos tóxicos del As tanto a nivel nacional como internacional.

7- Bibliografía

- Afroz, H., Su, S., Carey, M., Meharg, A. A., & Meharg, C. (2019). Inhibition of Microbial Methylation via arsM in the Rhizosphere: Arsenic Speciation in the Soil to Plant Continuum. *Environmental Science and Technology*, 53(7), 3451–3463. <https://doi.org/10.1021/acs.est.8b07008>
- Arroz (2017). (en línea). Serie técnica 233 INIA. Agosto 2017. Recuperado de <http://www.inia.uy/Publicaciones/Documentos%20compartidos/ST233.pdf>
- Asociación Cultivadores de Arroz (2018). “Perspectivas para Zafra 2017-18”. Recuperado de <http://www.aca.com.uy/service/perspectivas-para-zafra-2017-18>
- Beavis, W. D. (2019). QTL analyses: power, precision, and accuracy. In *Molecular dissection of complex traits* (pp. 145-162). CRC press.
- Bonnecarrere, V., Garaycochea, S., Gutierrez, L., Rosas, J., Berberian, N., Fernández, S., Martinez, S., Perez, F., Blanco, P., (2013). Avances de resultados del proyecto mapeo asociativo para la identificación de marcadores asociados a rendimiento, calidad y resistencia a enfermedades. *Serie Actividades de Difusión, Resultados Experimentales 2012-13*. 713 22–24.
- Bonnecarrere, V., Rosas, J., & Ferraro, B. (2019). Economic impact of marker-assisted selection and rapid generation advance on breeding programs. *Euphytica*, 215(12), 1–11. <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2529-8>
- Bralatei, E., Lacan, S., Krupp, E. M., & Feldmann, J. (2015). Detection of Inorganic Arsenic in Rice Using a Field Test Kit: A Screening Method. *Analytical Chemistry*, 87(22), 11271–11276. <https://doi.org/10.1021/acs.analchem.5b02386>
- Breseghele, F. and Sorrells, M.E. (2006), Association Analysis as a Strategy for Improvement of Quantitative Traits in Plants. *Crop Sci.*, 46: 1323-1330. <https://doi.org/10.2135/cropsci2005.09-0305>
- Campbell, M. T., Campbell, M. T., Du, Q., Liu, K., Sharma, S., Sharma, S., Zhang, C., & Walia, H. (2020). Characterization of the transcriptional divergence between the subspecies of cultivated rice (*Oryza sativa*). *BMC Genomics*, 21(1), 1–16. <https://doi.org/10.1186/s12864-020-06786-6>
- Carey, A. M., Scheckel, K. G., Lombi, E., Newville, M., Choi, Y., Norton, G. J., Charnock, J. M., Feldmann, J., Price, A. H., & Meharg, A. A. (2010). Grain unloading of arsenic species in rice. *Plant Physiology*, 152(1), 309–319. <https://doi.org/10.1104/pp.109.146126>
- Carey, M., Meharg, C., Williams, P., Marwa, E., Jiujin, X., Farias, J. G., De Silva, P. M. C. S., Signes-Pastor, A., Lu, Y., Nicoloso, F. T., Savage, L., Campbell, K., Elliott, C., Adomako, E., Green, A. J., Moreno-Jiménez, E., Carbonell-Barrachina, Á. A., Triwardhani, E. A., Pandiangan, F. I., ... Meharg, A. A. (2020). Global Sourcing of Low-Inorganic Arsenic Rice Grain. *Exposure and Health*, 12(4), 711–719. <https://doi.org/10.1007/s12403-019-00330-y>
- Carracelas, G., Hornbuckle, J., Verger, M., Huertas, R., Riccetto, S., Campos, F., & Roel, A. (2019). Irrigation management and variety effects on rice grain arsenic levels in Uruguay. *Journal of Agriculture and Food Research*, 1(November), 100008. <https://doi.org/10.1016/j.jafr.2019.100008>
- Cerlioli, T., Hernandez, C. O., Angira, B., McCouch, S. R., Robbins, K. R., & Famoso, A. N. (2022). Development and validation of an optimized marker set for genomic selection in southern US rice breeding programs. *The Plant Genome*, e20219.
- CGIAR (2016). The global staple. Recuperado de <http://ricepedia.org/rice-as-food/the-global-staple-rice-consumers>. Consultado 02 de diciembre 2020

- Chakrabarty, D., Trivedi, P. K., Misra, P., Tiwari, M., Shri, M., Shukla, D., Kumar, S., Rai, A., Pandey, A., Nigam, D., Tripathi, R. D., & Tuli, R. (2009). Comparative transcriptome analysis of arsenate and arsenite stresses in rice seedlings. *Chemosphere*, 74(5), 688–702. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2008.09.082>
- Chen, C., Li, L., Huang, K., Zhang, J., Xie, W. Y., Lu, Y., Dong, X., & Zhao, F. J. (2019). Sulfate-reducing bacteria and methanogens are involved in arsenic methylation and demethylation in paddy soils. *ISME Journal*, 13(10), 2523–2535. <https://doi.org/10.1038/s41396-019-0451-7>
- Collard, B.C., Mackill D.J. (2008). Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Philos Trans R Soc Lond Ser B Biol Sci*. 2008;363:557–572. doi: 10.1098/rstb.2007.2170.
- Comisión Europea. (2015). 1881/2006 En Cuanto Al Contenido Máximo De Arsénico Inorgánico En Los Productos Alimenticios. *Diario Oficial de La Unión Europea*, 2015(5), 1993–1995. <http://eur-lex.europa.eu/legal-content/ES/TXT/PDF/?uri=CELEX:32015R1006&from=EN>
- Derksen, S. A., & Keselman, H. J. (1992). Backward, forward and stepwise automated subset selection algorithms: Frequency of obtaining authentic and noise variables. *British Journal of Mathematical and Statistical Psychology*, 45, 265–282.
- Di, X., Beesley, L., Zhang, Z., Zhi, S., Jia, Y., & Ding, Y. (2019). Microbial arsenic methylation in soil and uptake and metabolism of methylated arsenic in plants: A review. *International Journal of Environmental Research and Public Health*, 16(24), 1–13. <https://doi.org/10.3390/ijerph16245012>
- Duan, G., Shao, G., Tang, Z., Chen, H., Wang, B., Tang, Z., Yang, Y., Liu, Y., & Zhao, F. J. (2017). Genotypic and Environmental Variations in Grain Cadmium and Arsenic Concentrations Among a Panel of High Yielding Rice Cultivars. *Rice*, 10(1). <https://doi.org/10.1186/s12284-017-0149-2>
- Elshire, R. J., Glaubitz, J. C., Sun, Q., Poland, J. A., Kawamoto, K., Buckler, E. S., & Mitchell, S. E. (2011). A robust, simple genotyping-by-sequencing (GBS) approach for high diversity species. *PLoS ONE*, 6(5), 1–10. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019379>
- Endelman, J. B., & Jannink, J. L. (2012). Shrinkage estimation of the realized relationship matrix. *G3: Genes, Genomes, Genetics*, 2(11), 1405–1413. <https://doi.org/10.1534/g3.112.004259>
- Falconer D., Mackay TFC. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th ed. Harlow: Longman Scientific & Technical; 1989. 438 p. ISBN: 0-582-016428
- Fariás, S. S., Londonio, A., Quintero, C., Befani, R., Soro, M., & Smichowski, P. (2015). On-line speciation and quantification of four arsenical species in rice samples collected in Argentina using a HPLC-HG-AFS coupling. *Microchemical Journal*, 120, 34–39. <https://doi.org/10.1016/j.microc.2014.12.010>
- Food and Feed-Maximum limit of heavy metals. 1 st ed. Islamic Republic of Iran: Institute of Standards and Industrial Research (ISIRI), 2009.
- Gnanamanickam, S., Kavitha, P. V., Babujee, L., & Brindha Priyadarisini, V. (2002). Biological Control of Rice Diseases. In *Biological Control of Crop Diseases*. <https://doi.org/10.1201/9780203910955.ch2>
- Guillod-Magnin, R., Brüscheweiler, B. J., Aubert, R., & Haldimann, M. (2018). Arsenic species in rice and rice-based products consumed by toddlers in Switzerland. *Food Additives and Contaminants - Part A Chemistry, Analysis, Control, Exposure and Risk Assessment*, 35(6), 1164–1178. <https://doi.org/10.1080/19440049.2018.1440641>

- Hamblin, M.T., Close, T.J., Bhat, P.R., Chao, S., Kling, J.G., Abraham, K.J., Blake, T., Brooks, W.S., Cooper, B., Griffey, C.A., Hayes, P.M. Population structure and linkage disequilibrium in US barley germplasm: implications for association mapping. *Crop Science*. 2010 Mar;50(2):556-66.
- Hamblin, M. T., Buckler, E. S., & Jannink, J. L. (2011). Population genetics of genomics-based crop improvement methods. *Trends in Genetics*, 27(3), 98–106. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2010.12.003>
- Hayashi, S., Kuramata, M., Abe, T., Takagi, H., Ozawa, K., & Ishikawa, S. (2017). Phytochelatin synthase OsPCS1 plays a crucial role in reducing arsenic levels in rice grains. *Plant Journal*, 91(5), 840–848. <https://doi.org/10.1111/tpj.13612>
- Holland, J. B. (2007). Genetic architecture of complex traits in plants. *Current Opinion in Plant Biology*, 10(2), 156–161. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2007.01.003>
- Huang, X., Sang, T., Zhao, Q., Feng, Q., Zhao, Y., Li, C., Zhu, C., Lu, T., Zhang, Z., Li, M., Fan, D. Genome-wide association studies of 14 agronomic traits in rice landraces. *Nature genetics*. 2010 Nov;42(11):961-7. International Agency for Research on Cancer (IARC). (2012). Arsenic and Arsenic Compounds Monograph. IARC MONOGRAPHS ON THE EVALUATION OF CARCINOGENIC Risks Humans, 100C, 41–93. monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol100C/mono100C-6.pdf
- Jia, Y., McAdams, S. A., Bryan, G. T., Hershey, H. P., & Valent, B. (2000). Direct interaction of resistance gene and avirulence gene products confers rice blast resistance. *The EMBO Journal*, 19(15), 4004–4014. <https://doi.org/https://doi.org/10.1093/emboj/19.15.4004>
- Jia, Y., Huang, H., Zhong, M., Wang, F. H., Zhang, L. M., & Zhu, Y. G. (2013). Microbial arsenic methylation in soil and rice rhizosphere. *Environmental Science and Technology*, 47(7), 3141–3148. <https://doi.org/10.1021/es303649v>
- Jian, F. M., Yamaji, N., Mitani, N., Xu, X. Y., Su, Y. H., McGrath, S. P., & Zhao, F. J. (2008). Transporters of arsenite in rice and their role in arsenic accumulation in rice grain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 105(29), 9931–9935. <https://doi.org/10.1073/pnas.0802361105>
- Kawahara, Y., de la Bastide, M., Hamilton, J. P., Kanamori, H., McCombie, W. R., Ouyang, S., Schwartz, D. C., Tanaka, T., Wu, J., Zhou, S., Childs, K. L., Davidson, R. M., Lin, H., Quesada-Ocampo, L., Vaillancourt, B., Sakai, H., Lee, S. S., Kim, J., Numa, H., ... Matsumoto, T. (2013). Improvement of the *oryza sativa* nipponbare reference genome using next generation sequence and optical map data. *Rice*, 6(1), 3–10. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-6-4>
- Korte, A., Farlow, A. The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant methods*. 2013 Dec;9(1):1-9.
- Kuramata, M., Abe, T., Kawasaki, A., Ebana, K., Shibaya, T., Yano, M., & Ishikawa, S. (2013). Genetic diversity of arsenic accumulation in rice and QTL analysis of methylated arsenic in rice grains. *Rice*, 6(1), 1–10. <https://doi.org/10.1186/1939-8433-6-1>
- Lander, E.S., Botstein, D. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics*. 1989 Jan 1;121(1):185-99.
- Li, J. & Ji, L. (2005). Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix. *Heredity* 95, 221–227. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800717>
- Liang, Y., Su, Y., Li, L., Huang, X., Panhwar, F. H., Zheng, T., Tang, Z., Ei, H. H., Farooq, M. U., Zeng, R., Zhang, Y., Ye, X., Jia, X., Zheng, L., & Zhu, J. (2019). Quick selenium accumulation in the selenium-rich rice and its physiological responses in changing selenium environments. *BMC*

- Plant Biology, 19(1), 1–11. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-2163-6>Liao, C.Y., *et al.* "Effects of genetic background and environment on QTLs and epistasis for rice (*Oryza sativa* L.) panicle number." Theoretical and Applied Genetics 103.1 (2001): 104–111.
- Liu, J., Zhu, Q., Zhang, Z., Xu, J., Yang, J., & Wong, M. H. (2005). Variations in cadmium accumulation among rice cultivars and types and the selection of cultivars for reducing cadmium in the diet. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 85(1), 147–153. <https://doi.org/10.1002/jsfa.1973>
- Liu, W. J., Zhu, Y. G., Hu, Y., Williams, P. N., Gault, A. G., Meharg, A. A., Charnock, J. M., & Smith, F. A. (2006). Arsenic sequestration in iron plaque, its accumulation and speciation in mature rice plants (*Oryza Sativa* L.). *Environmental Science and Technology*, 40(18), 5730–5736. <https://doi.org/10.1021/es060800v>
- Liu, L., Lee, G.-A., Jiang, L., & Zhang, J. (2007). Evidence for the early beginning (c. 9000 cal. BP) of rice domestication in China: a response. *The Holocene*, 17(8), 1059–1068. <https://doi.org/10.1177/0959683607085121>
- Liu, X., Chen, S., Chen, M., Zheng, G., Peng, Y., Shi, X., Qin, P., Xu, X. and Teng, S. (2019). Association Study Reveals Genetic Loci Responsible for Arsenic, Cadmium and Lead Accumulation in Rice Grain in Contaminated Farmlands. *Front. Plant Sci.* 10:61. doi:10.3389/fpls.2019.00061
- Lomax, C., Liu, W. J., Wu, L., Xue, K., Xiong, J., Zhou, J., McGrath, S. P., Meharg, A. A., Miller, A. J., & Zhao, F. J. (2012). Methylated arsenic species in plants originate from soil microorganisms. *New Phytologist*, 193(3), 665–672. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03956.x>
- Mansueto, *et al.* Rice SNP-seek database update: new SNPs, indels, and queries. *Nucl. Acids Res.* (2017) 45 (D1): D1075–D1081. doi: 10.1093/nar/gkw1135 This paper describes new features and datasets added to SNP-Seek in 2015–2017 as well as software and database updates.
- Meharg, A. A., Williams, P. N., Adomako, E., Lawgali, Y. Y., Deacon, C., Villada, A., Cambell, R. C. J., Sun, G., Zhu, Y. G., Feldmann, J., Raab, A., Zhao, F. J., Islam, R., Hossain, S., & Yanai, J. (2009). Geographical variation in total and inorganic arsenic content of polished (white) rice. *Environmental Science and Technology*, 43(5), 1612–1617. <https://doi.org/10.1021/es802612a>
- Meharg, A. A. & Zhao, F.-J. *Arsenic & Rice*, London: Springer (2012).
- MERCOSUR. (2011). Reglamento Técnico MERCOSUR sobre límites máximos de contaminantes inorgánicos en alimentos. 1, 1–18. http://www.puntofocal.gov.ar/doc/r_gmc_12-11.pdf
- Meuwissen THE, Hayes BJ, Goddard ME. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*. 2001;157(4):1819–29. Doi: 10.1093/genetics/157.4.1819
- MGAP. (2019). “Anuario Estadístico de DIEA 2019”. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. <https://descargas.mgap.gub.uy/DIEA/Anuarios/Anuario2019/Anuario2019.pdf>
- MGAP. (2020). “Anuario OPYPA 2020”. Ministerio de Ganadería Agricultura y Pesca. Análisis sectorial y cadenas productivas, Temas de política, Estudios. <https://descargas.mgap.gub.uy/OPYPA/Anuarios/anuario2020/anuario2020.pdf>
- Miles, C. & Wayne, M. (2008). Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Education* 1(1):208
- Mlangeni, A. T., Vecchi, V., Norton, G. J., Raab, A., Krupp, E. M., & Feldmann, J. (2018). Comparison of on-site field measured inorganic arsenic in rice with laboratory measurements using a field

- deployable method: Method validation. *Food Chemistry*, 263(October 2017), 180–185.
<https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2018.04.133>
- Monteverde, E., Rosas, J. E., Blanco, P., Pérez de Vida, F., Bonnacarrère, V., Quero, G., Gutierrez, L., & McCouch, S. (2018). Multienvironment models increase prediction accuracy of complex traits in advanced breeding lines of rice. *Crop Science*, 58(4), 1519–1530.
<https://doi.org/10.2135/cropsci2017.09.0564>
- Mu, T., Wu, T., Zhou, T., Li, Z., Ouyang, Y., Jiang, J., Zhu, D., Hou, J., Wang, Z., Luo, Y., Christie, P., & Wu, L. (2019). Geographical variation in arsenic, cadmium, and lead of soils and rice in the major rice producing regions of China. *Science of the Total Environment*, 677, 373–381.
<https://doi.org/10.1016/j.scitotenv.2019.04.337>
- Murugaiyan, V., Ali, J., Mahender, A., Aslam, U. M., Jewel, Z. A., Pang, Y., Marfori-Nazarea, C. M., Wu, L. B., Frei, M., & Li, Z. (2019). Mapping of genomic regions associated with arsenic toxicity stress in a backcross breeding populations of rice (*Oryza sativa* L.). *Rice*, 12(1).
<https://doi.org/10.1186/s12284-019-0321-y>
- Nagano, H., Onishi, K., Ogasawara, M., Horiuchi, Y., & Sano, Y. (2005). Genealogy of the “Green Revolution” gene in rice. *Genes & Genetic Systems*, 80(5), 351–356.
<https://doi.org/10.1266/ggs.80.351>
- National Center for Biotechnology Information (NCBI)[Internet]. Bethesda (MD): National Library of Medicine (US), National Center for Biotechnology Information; [1988] – [cited 2020 Nov 20]. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>
- Norton, G. J., Deacon, C. M., Xiong, L., Huang, S., Meharg, A. A., & Price, A. H. (2010). Genetic mapping of the rice ionome in leaves and grain: Identification of QTLs for 17 elements including arsenic, cadmium, iron and selenium. *Plant and Soil*, 329(1), 139–153.
<https://doi.org/10.1007/s11104-009-0141-8>
- Norton, G. J., Pinson, S. R. M., Alexander, J., McKay, S., Hansen, H., Duan, G. L., Rafiqul Islam, M., Islam, S., Stroud, J. L., Zhao, F. J., McGrath, S. P., Zhu, Y. G., Lahner, B., Yakubova, E., Gueriot, M., Lou, Tarpley, L., Eizenga, G. C., Salt, D. E., Meharg, A. A., & Price, A. H. (2012). Variation in grain arsenic assessed in a diverse panel of rice (*Oryza sativa*) grown in multiple sites. *New Phytologist*, 193(3), 650–664. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2011.03983.x>
- Norton, G. J., Duan, G. L., Lei, M., Zhu, Y. G., Meharg, A. A., & Price, A. H. (2012). Identification of quantitative trait loci for rice grain element composition on an arsenic impacted soil: Influence of flowering time on genetic loci. *Annals of Applied Biology*, 161(1), 46–56.
<https://doi.org/10.1111/j.1744-7348.2012.00549.x>
- Oka, H. I. (1991). Genetic diversity of wild and cultivated rice. *Biotechnology in Agriculture.*, 6, 55–81. <http://europepmc.org/abstract/AGR/IND93055409>
- Pan, X., Li, Y., Liu, W., Liu, S., Min, J., Xiong, H., Dong, Z., Duan, Y., Yu, Y., & Li, X. (2020). QTL mapping and candidate gene analysis of cadmium accumulation in polished rice by genome-wide association study. *Scientific Reports*, 10(1), 1–11. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-68742-4>
- Pasias, I. N., Thomaidis, N. S., & Piperaki, E. A. (2013). Determination of total arsenic, total inorganic arsenic and inorganic arsenic species in rice and rice flour by electrothermal atomic absorption spectrometry. *Microchemical Journal*, 108, 1–6.
<https://doi.org/10.1016/j.microc.2012.11.008>
- Piepho, H. P., Möhring, J., Melchinger, A. E., & Büchse, A. (2008). BLUP for phenotypic selection in plant breeding and variety testing. *Euphytica*, 161(1), 209–228. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9449-8>

- Pérez de Vida, F., Blanco, P., Molina, F. (2017). "INIA Merín: nuevo cultivar de arroz de alta productividad y resistencia a *Pyricularia*". Arroz (en línea). Montevideo (Uruguay): Asociación de Cultivadores de Arroz. Julio 2017. Recuperado de <http://www.aca.com.uy/revista-no-90#.XOwanYhKjIU>
- Pérez de Vida, F., Mesones Hernández, M. (2017). "Análisis de crecimiento en nuevos cultivares: respuesta a densidad y fertilización nitrogenada en INIA Merín y SLI09197".
- Pittelkow, C. M., Zorrilla, G., Terra, J., Riccetto, S., Macedo, I., Bonilla, C., & Roel, A. (2016). Sustainability of rice intensification in Uruguay from 1993 to 2013. *Global Food Security*, 9, 10–18. <https://doi.org/10.1016/j.gfs.2016.05.003>
- Presidencia de la República Oriental del Uruguay. (2021). "Uruguay es el 7º exportador mundial del Arroz: te invitamos a conocer su ruta". Consultado 28 de junio 2021. Disponible en <https://www.gub.uy/ministerio-turismo/comunicacion/noticias/uruguay-es-7o-exportador-mundial-del-arroz-te-invita-mos-conocer-su-ruta>.
- Quero, G., Gutiérrez, L., Monteverde, E., Blanco, P., Pérez de Vida, F., Rosas, J., Fernández, S., Garaycochea, S., McCouch, S., Berberian, N., Simondi, S., & Bonnacarrère, V. (2018). Genome-Wide Association Study Using Historical Breeding Populations Discovers Genomic Regions Involved in High-Quality Rice. *The Plant Genome*, 11(3), 170076. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.08.0076>
- Rahman, M. A., Hasegawa, H., Rahman, M. M., Rahman, M. A., & Miah, M. A. M. (2007). Accumulation of arsenic in tissues of rice plant (*Oryza sativa* L.) and its distribution in fractions of rice grain. *Chemosphere*, 69(6), 942–948. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2007.05.044>
- Rana, M. N., Tangpong, J., & Rahman, M. M. (2018). Toxicodynamics of Lead, Cadmium, Mercury and Arsenic- induced kidney toxicity and treatment strategy: A mini review. *Toxicology Reports*, 5(May 2017), 704–713. <https://doi.org/10.1016/j.toxrep.2018.05.012>
- Reid, M. C., Maillard, J., Bagnoud, A., Falquet, L., Le Vo, P., & Bernier-Latmani, R. (2017). Arsenic Methylation Dynamics in a Rice Paddy Soil Anaerobic Enrichment Culture. *Environmental Science and Technology*, 51(18), 10546–10554. <https://doi.org/10.1021/acs.est.7b02970>
- Roel, A., Campos, F., Verger, M., Huertas, R., & Carracelas, G. (2021). Regional variability of arsenic content in Uruguayan polished rice. *Chemosphere*, 132426. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2021.132426>
- Rosas, J. E., Martínez, S., Blanco, P., Pérez de Vida, F., Bonnacarrère, V., Mosquera, G., Cruz, M., Garaycochea, S., Monteverde, E., McCouch, S., Germán, S., Jannink, J., & Gutiérrez, L. (2018). Resistance to Multiple Temperate and Tropical Stem and Sheath Diseases of Rice. *The Plant Genome*, 11(1), 170029. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2017.03.0029>
- RStudio Team (2021). RStudio: Integrated Development for R. RStudio, PBC, Boston, MA URL <http://www.rstudio.com/>.
- Sakai, H., Lee, S. S., Tanaka, T., Numa, H., Kim, J., Kawahara, Y., Wakimoto, H., Yang, C. C., Iwamoto, M., Abe, T., Yamada, Y., Muto, A., Inokuchi, H., Ikemura, T., Matsumoto, T., Sakaki, T., & Itoh, T. (2013). Rice annotation project database (RAP-DB): An integrative and interactive database for rice genomics. *Plant and Cell Physiology*, 54(2). <https://doi.org/10.1093/pcp/pcs183>
- Schmid, M., & Bennewitz, J. (2017). Invited review: Genome-wide association analysis for quantitative traits in livestock - A selective review of statistical models and experimental designs. *Archives Animal Breeding*, 60(3), 335–346. <https://doi.org/10.5194/aab-60-335-2017>

- Shi, S., Wang, T., Chen, Z., Tang, Z., Wu, Z., Salt, D. E., Chao, D. Y., & Zhao, F. J. (2016). OsHAC1;1 and OsHAC1;2 function as arsenate reductases and regulate arsenic accumulation. *Plant Physiology*, 172(3), 1708–1719. <https://doi.org/10.1104/pp.16.01332>
- Sinha, H., Nicholson, B. P., Steinmetz, L. M., & McCusker, J. H. (2006). Complex genetic interactions in a quantitative trait locus. *PLoS Genetics*, 2(2), 140–147. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0020013>
- Song, A., Li, P., Fan, F., Li, Z., & Liang, Y. (2014). The effect of silicon on photosynthesis and expression of its relevant genes in rice (*Oryza sativa* L.) under high-zinc stress. *PLoS ONE*, 9(11), 1–21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0113782>
- Song, S., Tian, D., Zhang, Z., Hu, S., & Yu, J. (2018). Rice Genomics: over the Past Two Decades and into the Future. *Genomics, Proteomics & Bioinformatics*, 16(6), 397–404. <https://doi.org/https://doi.org/10.1016/j.gpb.2019.01.001>
- Spindel, J.E., Begum, H., Akdemir, D., Collard, B., Redoña, E., Jannink, J.L., McCouch, S. Genome-wide prediction models that incorporate de novo GWAS are a powerful new tool for tropical rice improvement. *Heredity*. 2016 Apr;116(4):395-408.
- Swarts, K., Li, H., Romero Navarro, J. A., An, D., Romy, M. C., Hearne, S., Acharya, C., Glaubitz, J. C., Mitchell, S., Elshire, R. J., Buckler, E. S., & Bradbury, P. J. (2014). Novel Methods to Optimize Genotypic Imputation for Low-Coverage, Next-Generation Sequence Data in Crop Plants. *The Plant Genome*, 7(3), 1–12. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2014.05.0023>
- Syed, M. A., Iftekharruddaula, K. M., Mian, M. A. K., Rasul, M. G., Rahmam, G. K. M. M., Panaullah, G. M., G. Lauren, J., Duxbury, J. M., & Biswas, P. S. (2016). Main effect QTLs associated with arsenic phyto-toxicity tolerance at seedling stage in rice (*Oryza sativa* L.). *Euphytica*, 209(3), 805–814. <https://doi.org/10.1007/s10681-016-1683-5>
- Thomson, M. J., Septiningsih, E. M., Suwardjo, F., Santoso, T. J., Silitonga, T. S., & McCouch, S. R. (2007). Genetic diversity analysis of traditional and improved Indonesian rice (*Oryza sativa* L.) germplasm using microsatellite markers. *Theoretical and Applied Genetics*, 114(3), 559–568.
- Tiwari, M., Sharma, D., Dwivedi, S., Singh, M., Tripathi, R. D., & Trivedi, P. K. (2014). Expression in *Arabidopsis* and cellular localization reveal involvement of rice NRAMP, OsNRAMP1, in arsenic transport and tolerance. *Plant, Cell and Environment*, 37(1), 140–152. <https://doi.org/10.1111/pce.12138>
- Verma, P. K., Verma, S., Pande, V., Mallick, S., Tripathi, R. D., Dhankher, O. P., & Chakrabarty, D. (2016). Overexpression of rice glutaredoxin OsGrx_C7 and OsGrx_C2.1 reduces intracellular arsenic accumulation and increases tolerance in *arabidopsis thaliana*. *Frontiers in Plant Science*, 7(JUNE2016), 1–18. <https://doi.org/10.3389/fpls.2016.00740>
- Wang, P., Zhang, W., Mao, C., Xu, G., & Zhao, F. J. (2016). The role of OsPT8 in arsenate uptake and varietal difference in arsenate tolerance in rice. *Journal of Experimental Botany*, 67(21), 6051–6059. <https://doi.org/10.1093/jxb/erw362>
- Williams, P. N., Price, A. H., Raab, A., Hossain, S. A., Feldmann, J., & Meharg, A. A. (2005). Variation in arsenic speciation and concentration in paddy rice related to dietary exposure. *Environmental Science and Technology*, 39(15), 5531–5540. <https://doi.org/10.1021/es0502324>
- Wu, Z., Ren, H., Mcgrath, S. P., Wu, P., & Zhao, F. J. (2011). Investigating the contribution of the phosphate transport pathway to arsenic accumulation in rice. *Plant Physiology*, 157(1), 498–508. <https://doi.org/10.1104/pp.111.178921>

- Yang, J., Gao, M. X., Hu, H., Ding, X. M., Lin, H. W., Wang, L., Xu, J. M., Mao, C. Z., Zhao, F. J., & Wu, Z. C. (2016). OsCLT1, a CRT-like transporter 1, is required for glutathione homeostasis and arsenic tolerance in rice. *The New Phytologist*, 211(2), 658–670. <https://doi.org/10.1111/nph.13908>
- Ye, X. X., Sun, B., & Yin, Y. L. (2012). Variation of As concentration between soil types and rice genotypes and the selection of cultivars for reducing As in the diet. *Chemosphere*, 87(4), 384–389. <https://doi.org/10.1016/j.chemosphere.2011.12.028>
- Ye, Y., Li, P., Xu, T., Zeng, L., Cheng, D., Yang, M., Luo, J., & Lian, X. (2017). Ospt4 contributes to arsenate uptake and transport in rice. *Frontiers in Plant Science*, 8(December), 1–12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.02197>
- Zavala, Y. J., Gerads, R., Gürleyük, H., & Duxbury, J. M. (2008). Arsenic in rice: II. Arsenic speciation in USA grain and implications for human health. *Environmental Science and Technology*, 42(10), 3861–3866. <https://doi.org/10.1021/es702748q>
- Zhang, J., Zhu, Y. G., Zeng, D. L., Cheng, W. Da, Qian, Q., & Duan, G. L. (2008). Mapping quantitative trait loci associated with arsenic accumulation in rice (*Oryza sativa*). *New Phytologist*, 177(2), 350–356. <https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2007.02267.x>
- Zhao, F. J., Harris, E., Yan, J., Ma, J., Wu, L., Liu, W., McGrath, S. P., Zhou, J., & Zhu, Y. G. (2013). Arsenic methylation in soils and its relationship with microbial arsM abundance and diversity, and As speciation in rice. *Environmental Science and Technology*, 47(13), 7147–7154. <https://doi.org/10.1021/es304977m>
- Zhu, C., Gore, M., Buckler, E. S., & Yu, J. (2008). Status and Prospects of Association Mapping in Plants. *The Plant Genome*, 1(1), 5–20. <https://doi.org/10.3835/plantgenome2008.02.0089>

ANEXO

Tabla AI. Datos de procesamiento del grano en las muestras utilizadas en los ensayos z1 y z2 para análisis de marcadores *SNP* en genes candidatos.

z1					
línea	rep	Tiempo de pulido	°Molienda	iAs	tAs
JAP_9460	1	115	105	0.057	0.44
JAP_9292	1	110	100	0.053	0.37
JAP_9356	1	105	101	0.052	0.37
JAP_9429	1	105	100	0.047	0.34
SLI_09_197	1	105	98	0.043	0.28
SLI_09_190	1	105	103	0.061	0.32
El_Paso_144	1	105	98	0.072	0.49
JAP_9498	1	115	98	0.042	0.32
SLF_10_400	1	112	97	0.078	0.32
INIA_Olimar	1	115	106	0.082	0.37
JAP_9137	1	110	100	0.061	0.47
JAP_9355	1	120	101	0.047	0.51
SLF_09_246	1	160	97	0.039	0.75
JAP_8691	1	115	98	0.070	0.69
INIA_Merin	1	110	102	0.049	0.47
SLF_10_240	1	105	108	0.073	0.51
SLI_10_021	1	108	110	0.048	0.43
SLF_10_199	1	115	101	0.072	0.48
JAP_9239	1	115	97	0.047	0.31
SLI_09_157	1	105	98	0.060	0.44
JAP_9462	1	115	99	0.044	0.27
Parao	1	115	110	0.050	0.33
JAP_9499	1	120	103	0.037	0.31
SLI_10_024	1	105	98	0.078	0.51
INIA_Tacuari	1	120	100	0.058	0.42
SLI_09_204	1	125	98	0.054	0.31
JAP_9661	1	130	103	0.063	0.43
JAP_9172	1	115	102	0.046	0.51
SLI_09_20	1	110	110	0.074	0.85
SLI_09_12	1	110	100	0.074	0.69
SLI_10_034	1	105	98	0.080	0.47
SLI_09_193	1	103	97	0.089	0.45
Parao	2	90	101	0.060	0.40
SLF_10_240	2	90	98	0.092	0.40
JAP_9429	2	105	98	0.042	0.31
SLF_09_246	2	180	97	0.037	0.43
JAP_9172	2	105	102	0.048	0.25
SLI_09_204	2	120	98	0.057	0.32

JAP_9356	2	100	101	0.045	0.29
SLI_09_20	2	100	105	0.087	0.44
JAP_9137	2	110	98	0.064	0.31
SLI_09_197	2	115	98	0.048	0.31
JAP_9499	2	110	98	0.046	0.44
INIA_Olimar	2	100	101	0.068	0.48
JAP_9355	2	102	98	0.055	0.59
SLI_09_157	2	100	97	0.072	0.76
SLI_09_193	2	100	98	0.103	0.46
El_Paso_144	2	100	97	0.085	0.66
SLI_10_034	2	100	97	0.084	0.36
INIA_Tacuari	2	110	97	0.075	0.38
SLI_09_12	2	115	102	0.083	0.44
SLF_10_400	2	105	102	0.087	0.37
SLF_10_199	2	125	98	0.062	0.40
JAP_9239	2	130	98	0.044	0.26
JAP_8691	2	120	102	0.064	0.33
INIA_Merin	2	120	101	0.052	0.38
JAP_9462	2	115	99	0.049	0.21
JAP_9661	2	135	97	0.046	0.26
SLI_09_190	2	110	100	0.056	0.31
JAP_9292	2	115	98	0.052	0.37
JAP_9498	2	125	107	0.044	0.43
SLI_10_021	2	115	110	0.045	0.43
JAP_9460	2	110	98	0.045	0.36
SLI_10_024	2	105	106	0.078	0.50

z2					
línea	rep	Tiempo de pulido	°Molienda	As inorgánico	As total
JAP 9356	2	130	100	0.047	0.26
JAP 9356	3	130	97	0.064	0.46
JAP 9239	2	130	99	0.054	0.21
JAP 9239	3	132	99	0.053	0.41
JAP 9172	2	134	105	0.056	0.23
JAP 9172	3	125	98	0.050	0.30
SLI 09-12	2	125	97	0.083	0.29
SLI 09-12	3	130	99	0.083	0.24
Merín	2	110	97	0.085	0.35
Merín	3	115	101	0.083	0.33
JAP 9355	2	132	98	0.054	0.31
JAP 9355	3	135	95	0.050	0.17

JAP 9460	2	128	104	0.054	0.28
JAP 9460	3	128	104	0.045	0.53
Olimar	2	110	103	0.073	0.47
Olimar	3	113	105	0.079	0.34
SLF 09-246	2	180	103	0.039	0.24
SLF 09-246	3	190	97	0.046	0.85
JAP 9429	2	125	104	0.046	0.37
JAP 9429	3	128	106	0.036	0.20
SLI 10-024	2	125	108	0.083	0.46
SLI 10-024	3	120	105	0.077	0.26
JAP 9661	2	125	95	0.044	0.19
JAP 9661	3	130	98	0.044	0.18
Tacuarí	2	148	102	0.054	0.45
Tacuarí	3	148	100	0.059	0.38
SLI 09-193	2	125	105	0.091	0.27
SLI 09-193	3	120	104	0.078	0.21
SLF 10-199	2	150	96	0.072	0.41
SLF 10-199	3	155	106	0.070	0.25
SLI 09-197	2	120	107	0.043	0.23
SLI 09-197	3	115	95	0.058	0.19
JAP 8691	2	120	99	0.061	0.26
JAP 8691	3	125	107	0.062	0.29
SLF 10-400	2	120	106	0.087	0.30
SLF 10-400	3	120	106	0.094	0.26
SLF 10-240	2	120	107	0.105	0.55
SLF 10-240	3	120	106	0.078	0.26
JAP 9499	2	120	97	0.049	0.20
JAP 9499	3	120	98	0.045	0.36
JAP 9137	2	120	101	0.073	0.29
JAP 9137	3	120	101	0.073	0.71
SLI 09-157	2	120	97	0.073	0.28
SLI 09-157	3	130	100	0.070	0.41
SLI 09-20	2	120	105	0.091	0.41
SLI 09-20	3	120	105	0.076	0.29
SLI 09-190	2	115	95	0.069	0.24
SLI 09-190	3	120	101	0.077	0.54
JAP 9292	2	120	101	0.064	0.29
JAP 9292	3	120	95	0.062	0.31
Parao	2	105	107	0.078	0.41

Parao	3	100	107	0.079	0.41
SLI 09-204	2	135	105	0.065	0.24
SLI 09-204	3	130	99	0.069	0.22
SLI 10-021	2	128	107	0.044	0.63
SLI 10-021	3	120	95	0.041	0.30
SLI 10-034	2	128	104	0.082	0.61
SLI 10-034	3	120	104	0.079	0.29
JAP 9462	2	120	107	0.061	0.32
JAP 9462	3	117	102	0.062	0.53
El paso 144	2	110	100	0.072	0.27
El paso 144	3	110	99	0.073	0.33
JAP 9498	2	120	98	0.054	0.29
JAP 9498	3	122	96	0.047	0.33

Tabla AII. *QTL* identificados para tAs, Cd y Se en las poblaciones de mapeo.

Chromosome	As				Cd				Se			
	position (Mpb)	size (Mpb)	type	year	position (Mpb)	size (Mpb)	type	year	position (Mpb)	size (Mpb)	type	year
1	1,59:1,74	0,15	JAP	2018	29,30:31,62	2,32	IND	2019	5,97:7,12	1,15	JAP	2019
	1,25:1,64	0,39	IND	2019								
	8,80:9,32	0,52	IND	2019	42,56:43,21	0,65	JAP	2019	42,56:43,21	0,65		2019
	19,46:19,84	0,38	IND	2019								
	37,54:37,65	0,11	IND	2018								
2	5,30:5,69	0,39	IND	2019	-				6,81:7,02	0,21	JAP	2019
3	14,51:14,88	0,37	IND	2019		-				-		
	16,43:16,59	0,16	IND	2019								
	30,98:31,21	0,23	IND	2019								
4					17,48:19,48	2,0	IND	2019	31,85:31,86		IND	2019
	23,33:24,47	1,14	IND	2019	33,66:33,68	0,02	IND	2019				
	33,84:33,86	0,02	IND	2018	33,84:33,87	0,03	IND	2019				
5	18,93:19,08	0,15	JAP	2018	-				-			
6	-				2,83:4,42	1,59	IND	2019	5,64:6,37	0,73	JAP	2019
									24,33:24,61	0,28	JAP	2019
7	15,85:16,52	0,67	IND	2019		-			16,12:16,85	0,73	IND	2019
	18,50:20,09	1,59	IND	2019								
	27,83:29,64	1,81	JAP	2018								
8	8,44:11,72	3,28	IND	2018	27,82:28,39	0,57	JAP	2019		-		
	23,38:23,59	0,21	IND	2019								
	26,97:27,07	0,1	IND	2018								
9	18,27:20,37	2,1	IND	2018	6,67:7,09	0,42	IND	2019	-			
10	10,70:11,84	1,14	IND	2018	20,34:20,35	0,01	IND	2019	17,24:17,61	0,37	JAP	2019
	14,49:14,77	0,28	IND	2019								
	17,21:18,38	1,17	JAP	2018	22,21:22,83	0,62	IND	2019				
11	2,13:2,53	0,4	IND	2019	3,37:3,81	0,44	IND	2019	25,42:25,98	0,56	IND	2019
	6,92:7,72	0,8	IND	2019	22,42:24,92	2,5	IND	2019				
	20,9:23,98	3,8	IND	2018	4,81:4,82	0,01	JAP	2019				
12	IND				9,37:10,95	1,58	IND	2019		-		
	8,89:9,18	0,29		2018	17,93:19,33	1,4	IND	2019				
					22,53:22,96	0,43	IND	2019				
					25,51:26,24	0,73	IND	2019				
	14,21:14,48	0,27	IND	2018	26,28:26,41	0,13	IND	2019				

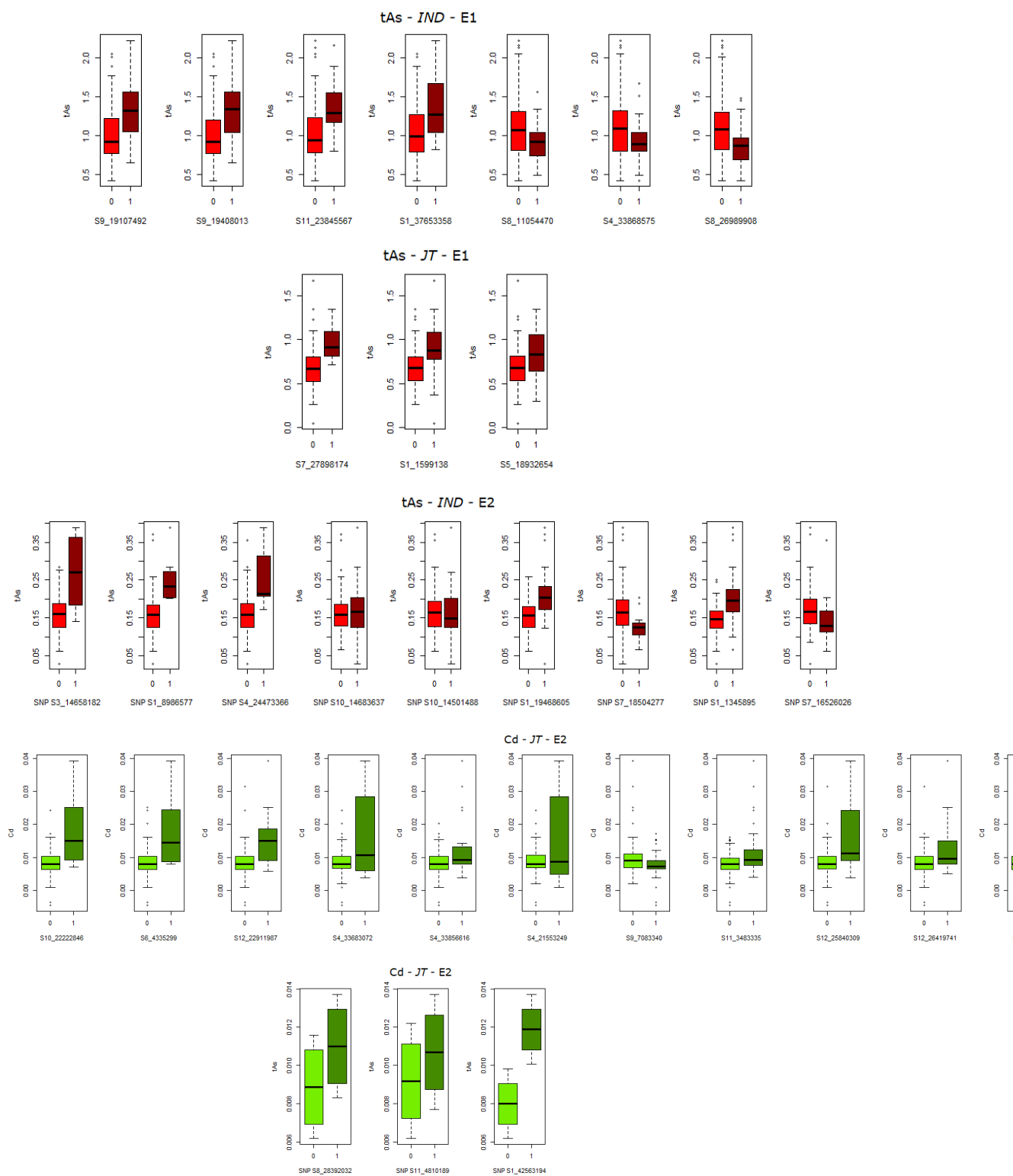


Figura A1. Gráficos de cajas de las medias ajustadas del contenido de arsénico total (tAs) y cadmio (Cd) en las poblaciones indica (*IND*) y japónica tropical (*JAP*) analizadas en E1 y E2, para los *QTL* del modelo multi-locus final. Los *QTL* están representados por el *SNP* y/o haplotipo más significativo de cada región con sus dos alelos (0 y 1).