

EVALUACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA DE SUBESPECIES DE ARROZ USANDO MARCADORES MICROSATÉLITALES Y AFLP¹

EVALUATION OF GENETIC DIVERSITY IN RICE SUBSPECIES USING AFLP AND MICROSATELLITE MARKERS¹

Erika Arnao*, Nohelia Rodríguez**, Patricio Hinrinsen***, Yorman Jayaro*, Catalina Ramis**** e Iris Pérez-Almeida**

¹ Trabajo financiado bajo el Proyecto BID-FONACIT II (Subproyecto N° 2004000369).

* Investigadores. Fundación para la Investigación Agrícola DANAC, San Felipe, estado Yaracuy. ** Investigadores. INIA. Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Av. Universidad, vía El Limón. Apdo. 4653. Maracay 2101, estado Aragua. Venezuela. *** Investigador. INIA), Estación La Platina, Chile.

**** Profesora. Universidad Central de Venezuela. Facultad de Agronomía. Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola.

RESUMEN

Los marcadores moleculares representan una herramienta poderosa en la evaluación de la diversidad genética y en la determinación de identidad, especialmente en variedades de base genética estrecha como el arroz. El objetivo de este estudio fue evaluar la diversidad genética de las subespecies de arroz Indica y Japónica, mediante el uso de marcadores microsatélite y AFLP. Para ello, se evaluaron 12 variedades de arroz venezolanas y 12 variedades chilenas pertenecientes a las subespecies Indica y Japonica, respectivamente, con 13 marcadores microsatélites (SSR) y 5 combinaciones de primers AFLP. La presencia (1) y ausencia (0) de bandas para cada SSR y combinación de primers AFLP fue registrada para cada individuo y luego convertidos a matrices de similitud y distancia genética para los SSR y AFLP, respectivamente, a partir de la cual se construyó un cluster por el método UPGMA y se realizó el análisis de coordenadas principales. Con los 13 SSR se obtuvo un total de 70 alelos, siendo el promedio de 5,64 alelos por locus, y el contenido de información polimórfica de 0,60. Mientras que, con las 5 combinaciones de AFLP se generaron 82 bandas, de las cuales 43 (51,8%) resultaron polimórficas. Ambos métodos de agrupamiento clasificaron las variedades en 2 grupos: el primero correspondió a las variedades de la subespecie Japónica (chilenas) y el segundo a la Indica (venezolanas). El grupo Japónica mostró menor diversidad genética que el grupo de Indica, y en general todas las variedades pudieron ser distinguidas. Los resultados sugieren que un pequeño número de marcadores genera suficiente información para estimar diversidad genética entre subespecies de arroz e identificar variedades.

Palabras Clave: AFLP; microsatélite; *Oryza sativa* L.; diversidad genética.

SUMMARY

Molecular markers represent a powerful tool for genetic diversity assessment and identity determination especially in genetic narrow based rice varieties. This study aimed to assess the genetic diversity of Indica and Japonica rice subspecies using SSR molecular markers and AFLPs. We evaluated 12 rice Venezuelan varieties (Indica) and 12 Chilean varieties (Japonica) with 13 microsatellite markers (SSR) and four AFLP primer combinations. Presence (1) and absence (0) of bands for each microsatellite (SSR) and AFLP primer combination were scored for each variety, and then converted into similarity and distance genetic matrix for SSR and AFLP, respectively, to construct a cluster by the UPGMA method. Also a Principal Component Analysis was performed. A total of 70 alleles were obtained from the 13 SSRs, with an average of 5,64 alleles per locus, and a polymorphic information content of 0,60. A total of 82 bands were generated from four AFLPs combinations, from which 43 (51,8%) resulted polymorphic. Both grouping methods classified the varieties in two groups: first one corresponded to the Japonica subspecies varieties (Chilean) and the second to the indica subspecies varieties (Venezuelan). Japonica group showed a higher genetic diversity than the Indica group, and in general all varieties could be differentiated. Our results suggest that a small number of markers can generate enough amount of information useful to estimate genetic diversity between rice subspecies and to identify varieties.

Key Words: AFLPs; microsatellites; *Oryza sativa* L.; genetic diversity.

INTRODUCCIÓN

La colección mundial de germoplasma de arroz silvestre y cultivado ha hecho una gran contribución en el mejoramiento de este cultivo. La especie de arroz, *Oryza sativa* esta compuesta por dos subespecies: Indica y Japónica (Oka, 1998). Indica es una subespecie predominantemente tropical, y Japónica constituye una subespecie de tipo tropical y templado, ampliamente sembrada al este de Asia, norte y sur de América, Australia, Norte mediterráneo de África y Europa, representando alrededor del 20% de la producción mundial de arroz (Mackill, 1995).

El cruce entre diferentes subespecies frecuentemente resulta en problemas de esterilidad en los híbridos y sus progenies, ruptura de los bloques de ligamiento y de combinaciones de genes favorables, y arrastre genético (Ikehashi y Araki, 1986). La reducida recombinación y la distorsión en la segregación resultante de hibridaciones amplias pueden ocasionar dificultad en la selección de recombinantes deseables durante el proceso de mejoramiento, por ello los mejoradores generalmente usan líneas dentro de la misma subespecie o grupo para realizar los cruces.

Gracias al uso de la biotecnología se han abierto mucho más las posibilidades de realizar cruces intra e interespecíficos, y con los marcadores moleculares muchas de las dificultades mencionadas para la hibridación han sido solucionadas. Sin embargo, para la aplicación de selección asistida por marcadores moleculares dentro de una subespecie es importante obtener información de la diversidad genética dentro de las subespecies de arroz (Temnykh *et al.*, 2000). El presente estudio tiene como objetivo evaluar la diversidad genética de las subespecies de arroz Indica y Japónica, mediante el uso de marcadores moleculares del tipo microsatélite y AFLP.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

Se utilizaron 12 variedades de arroz venezolanas pertenecientes a la subespecie Indica y 12 variedades de arroz chilenas subespecie Japónica (Cuadro 1). La evaluación molecular de los 24 materiales con los marcadores SSR y AFLP se llevó a cabo en el Laboratorio de Biotecnología del INIA-Chile y en el Laboratorio de Biología Molecular de Fundación DANAC.

Extracción del ADN

Se realizó siguiendo la metodología de extracción con CTAB (2%) descrita por Dellaporta *et al.* (1983) con

modificaciones menores. La calidad y cantidad del ADN se verificó en geles de agarosa al 0,8% utilizando como referencia ADN del bacteriófago Lambda. La concentración de ADN se ajustó a 25 ng μl^{-1} con agua ultrapura.

CUADRO 1. Variedades de arroz de Chile y Venezuela correspondientes a las subespecies Japónica e Indica, respectivamente.

Variedades chilenas (Japónica)	Variedades venezolanas (Indica)
1. Cristal	13. D-Oryza
2. Oro	14. D-Sativa
3. Quita	15. D-Primera
4. CINIA 609	16. Araure 4
5. CINIA 606	17. Cimarrón
6. CINIA 242	18. Fundarroz PN-1
7. CINIA 669	19. Fonaiaip 1
8. Brillante	20. Fonaiaip 2000
9. Buli	21. Araure 50
10. Perla	22. Palmar
11. Diamante	23. Araure 1
12. Turson	24. Venezuela 21

Evaluación de los SSR

En los 24 materiales de arroz se evaluaron 13 marcadores microsatélites, distribuidos en 11 de los 12 cromosomas del arroz, denominados: RM222, RM541, RM144, RM219, RM551, RM547, RM440, RM11, RM185, RM336, RM415, RM545, RM580. La amplificación del ADN vía reacción en cadena de la polimerasa (PCR) se realizó en un volumen final de 20 μl usando: 2 μl ADN, 2 μl de buffer (10x), 2 μl MgCl_2 (25 mM), 1,3 μl de dNTPs (2,5 mM), 2 μl Primer R y F (5 mM) y 0,5 μl de *Taq* polimerasa.

Los perfiles de temperatura fueron los siguientes: 94 °C por 5 min, seguido por 34 ciclos a 94 °C por 45 seg; 56 °C por 2 min y 72 °C por 15 seg. Finalmente un ciclo de extensión final a 72 °C por 5 min. Los productos amplificados fueron separados por electroforesis en geles de poliacrilamida al 6% y teñidos con nitrato de plata usando el kit Promega (SILVER SEQUENCE™).

Evaluación de los AFLP

El análisis con marcadores AFLP se desarrolló según el protocolo de Vos *et al.* (1995) con pocas modificaciones y constó de los siguientes pasos: digestión del ADN, ligación de los adaptadores, amplificación preselectiva, amplificación selectiva y separación de los fragmentos. Para la digestión del ADN genómico se usó la combinación de las endonucleasas de restricción *EcoRI/MseI*.

Los primers usados para la amplificación preselectiva tenían las siguientes secuencias: *EcoRI* + n: 5' GACTGC GTA CCA ATT C 3' y *MseI* + n: 5' GAT GAG TCC TGA GTA A 3' y los perfiles de temperatura para la amplificación fueron los siguientes: 94 °C por 2 min seguido de 20 ciclos repetitivos de 94 °C por 30 seg, 55 °C por 1 min y 72 °C por 1 min con una extensión final de 75 °C por 5 min. Los productos amplificados fueron diluidos 1/100 para realizar la amplificación selectiva.

En el caso de la amplificación selectiva se usaron 5 combinaciones de primers los cuales tenían la misma secuencia que los usados para la amplificación preselectiva más 3 nucleótidos selectivos: E: AAC y M: GAT; E: AAC y M: GAC; E: ATC y M: GCA; E: AAC y M: GAC y E: AAT y M: GCA. Los perfiles de temperatura en este paso fueron los siguientes: 94 °C por 4 min seguido de 12 ciclos de 94 °C por 30 seg, 65 °C por 30 seg (disminuyendo 0,7 °C por ciclo hasta llegar a 56 °C) y 72 °C por 1 min. Luego 26 ciclos de 94 °C por 30 seg, 56 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min. Finalizando con una extensión de 72 °C por 5 min. La separación de los fragmentos y tinción fue similar a la realizada para los SSR.

Análisis estadístico

Las bandas polimórficas para los marcadores SSR y AFLP fueron genotipadas manualmente como un código binario con "1" para presencia y "0" para ausencia. Las bandas monomórficas no fueron consideradas. Las asociaciones entre las subespecies (Indica y Japónica) fueron evaluadas usando los coeficientes de similitud de Dice y de distancia genética de Nei para los AFLP y SSR, respectivamente. Las matrices fueron sujetas al análisis de cluster empleando el método de agrupamiento por pares no ponderadas usando la media aritmética (UPGMA) proporcionado por el programa NTSYSpc, versión 2,1 (Exeter Software Co., New York).

En el caso de los microsatélites se realizó también el análisis de coordenadas principales, se contabilizó el número de alelos para cada marcador y se determinó el contenido de información polimórfica (PIC) usando la fórmula $1 - \sum p_i^2$, donde p_i corresponde a la frecuencia alélica (Powell *et al.*, 1996).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los 13 SSR generaron un total de 70 alelos, siendo el promedio de 5,64 alelos por locus, y el contenido de información polimórfica de 0,60 (Cuadro 2). Por su parte, las 5 combinaciones de AFLP se generaron 82 bandas, de las cuales 43 (51,8%) resultaron polimórficas.

CUADRO 2. SSR evaluados en los materiales de arroz: nombre, ubicación en el cromosoma, alelos obtenidos y contenido de información polimórfica (PIC).

Nº	Primer	Cromosoma	Alelos	Genotipos	PIC
1	RM 580	1	5	24	0,71
2	RM 545	3	3	24	0,56
3	RM 185	4	1	24	0
4	RM 551	4	7	24	0,75
5	RM 440	5	8	23	0,84
6	RM 541	6	7	20	0,81
7	RM 11	7	3	24	0,7
8	RM 336	7	9	24	0,8
9	RM 547	8	6	22	0,71
10	RM 219	9	4	24	0,58
11	RM 222	10	5	24	0,56
12	RM 144	11	13	22	0,89
13	RM 415	12	1	24	0
Total			72		
Promedio			5,53		0,60

Con ambos marcadores moleculares (SSR y AFLP) se obtuvo suficiente polimorfismo para diferenciar claramente las dos subespecies. La Figura 1 muestra los dendrogramas obtenidos con ambos tipos de marcadores y la Figura 2 el gráfico de coordenadas principales para los SSR. En ambas figuras se aprecia una clara diferenciación de las variedades en dos grupos, correspondientes a cada una de las subespecies.

En el dendrograma generado con la distancia genética de Nei se aprecia que la máxima distancia entre las variedades Japónica es de aproximadamente 0,57, mientras que para las variedades Indica este valor es cercano a 0,90, lo cual indica una mayor diversidad dentro de las variedades de esta última subespecie. Este hecho coincide con estudios previos (Mackill *et al.*, 1995; Zhang *et al.*, 1992). Aguirre *et al.* (2005), hacen referencia a la alta homogeneidad genética de las variedades chilenas de arroz, debido a un reducido número de progenitores (5 a 6) con un amplio aporte en el genoma de las mismas.

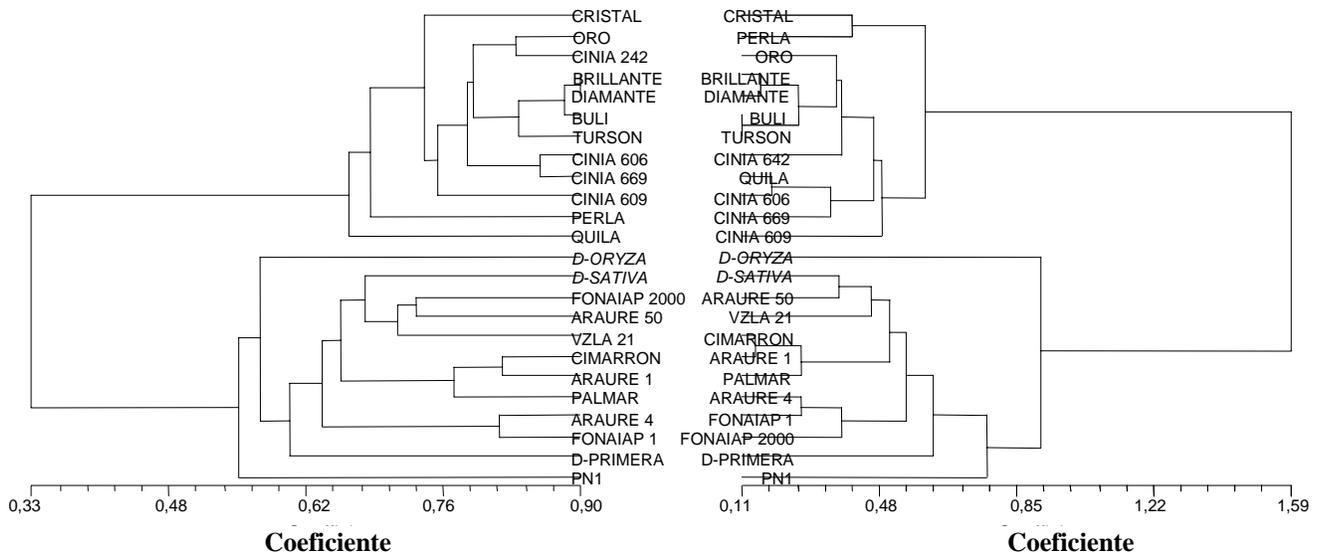


FIGURA 1. Dendrogramas obtenidos con los marcadores AFLP y SSR, utilizando el coeficiente de similitud de Dice y de distancia genética de Nei, respectivamente.

Las variedades Indica liberadas en Venezuela presentan una mayor diversidad respecto al número de progenitores que intervienen en su constitución. El Cuadro 3 presenta los progenitores con un aporte mayor al 3% del genoma de algunas de las variedades incluidas en el estudio, elaborado a partir de la genealogía de las variedades obtenidas en la base de datos International Rice Information System, IRIS (IRRI, 2006). Aún cuando la mayor parte de los progenitores provienen de Asia, parecen aportar una mayor diversidad, tal como le reflejan las Figuras 1 y 2.

En el dendrograma generado a partir del coeficiente de similitud de Nei puede apreciarse que 2 grupos de variedades conformados por Araure 4 y Fonaiaip 1 en uno, y Cimarrón, Araure 1 y Palmar en otro, muestran las mayores similitudes. Este grupo de variedades, se caracteriza por recibir un aporte importante de los progenitores Cina, Latisail y Dee Geo Woo Gen, el cual supera en conjunto el 25% de la constitución genómica de dichas variedades (Cuadro 3).

Este aporte se debe a que dichas variedades son a su vez progenitoras de IR8, cultivar emblema de la revolución verde que fue ampliamente utilizado en cruza-mientos a escala mundial, luego de su impacto a partir de la década de 1970.

La variedad Fundarroz PN1 posee un menor aporte de estos progenitores (Cuadro 3), lo cual pudiese ser una causa de su menor similitud respecto al resto de las variedades. Este hecho pareciera ser un indicio de que las variedades tradicionales venezolanas o con mayor tiempo en el mercado poseen un considerable aporte de los progenitores de IR8, mientras que variedades más recientes pudiesen haber disminuido la contribución de esta fuente, debido a la incorporación de nuevos proge-nitores. No obstante, son necesarios estudios de la genealogía de las variedades recientes para confirmar este hecho.

Dos marcadores SSR resultaron ideales para dife-renciar las 2 subespecies, ya que los cultivares Indica presentaron alelos que estaban ausentes en los culti-vares Japónicas y viceversa.

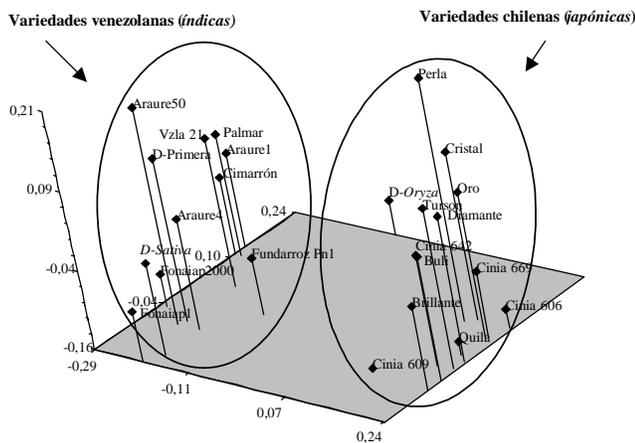


FIGURA 2. Coordenadas principales obtenidas con los 13 marcadores microsátélites. El círculo de la izquierda corresponde a las variedades Indica (venezolanas) y el círculo de la derecha a las variedades Japónica (chilenas).

CUADRO 3. Aporte de los principales progenitores a algunas variedades de arroz Indica.

Progenitores	Cimarrón	Araure 1	Palmar	Araure 4	Fonaiap 1	Fundarroz PN1	Origen
Cina	16,41	6,25	10,94	17,19	7,42	5,91	Indonesia
Latisail	16,41	6,25	10,94	20,31	7,42	6,10	India
Dee Geo Woo Gen	9,38	12,50	14,06	14,06	12,50	9,86	Taiwan
Tadukan	18,75	–	12,50	12,50	–	3,52	Filipinas
Ai Jiao Gen	12,50	–	–	–	–	–	Taiwan
TKM6	6,25	–	–	–	–	–	India
IR 1737	6,25	–	–	–	–	–	IRRI, Filipinas
IR 1561	6,25	–	–	–	–	–	IRRI, Filipinas
Gampai-15	6,25	–	–	–	–	–	Tailandia
IR 12	–	25,00	12,50	12,50	9,38	4,10	IRRI, Filipinas
Rexoro	–	6,25	–	–	–	–	Estados Unidos
Fortuna	–	6,25	–	–	–	–	?
Palmira 105	–	12,50	–	–	–	–	Costa Rica
Takao Iku 18	–	25,00	6,25	6,25	3,13	4,10	Taiwan
Tetep	–	–	6,25	6,25	6,25	–	Vietnam
Napal	–	–	6,25	6,25	3,13	4,10	?
Syntha	–	–	12,50	–	–	–	?
Tangkai Rotan	–	–	6,25	–	–	–	Malasia
Bayang	–	–	–	3,13	–	–	Indonesia
SML 80-5	–	–	–	–	12,50	–	Surinam
SML 81-A	–	–	–	–	12,50	–	Surinam
SML 1010	–	–	–	–	12,50	–	Surinam
Apura	–	–	–	–	6,25	–	Surinam
B5580A	–	–	–	–	–	3,13	Estados Unidos
Tox 494	–	–	–	–	–	6,25	Nigeria
Suakoko	–	–	–	–	–	3,13	Liberia

Nota: Los aportes de cada progenitor se presentan en porcentajes. Se muestran en la tabla sólo aquellos progenitores con un aporte mayor al 3 % del genoma de las variedades.

El marcador RM222 presentó 5 alelos en los 24 materiales de arroz de los cuales uno estuvo presente en todos los Japonica y ausentes en los Indica. Con el marcador RM219 se visualizaron 5 alelos, de los cuales 2 fueron exclusivos de las variedades Japonica y dos de las Indica.

Algunos de los SSR presentaron alelos únicos que permitieron la identificación de variedades. Por ejemplo, los alelos 4 y 5 del SSR 222 diferenciaron las variedades Cimarrón y Fonaiap 2000, respectivamente.

El Cuadro 4 muestra la información de los alelos de algunos SSR que fueron específicos para algunas de las variedades.

En el caso de los AFLP sólo las combinaciones de primers selectivos: E: AAC y M: GAT, y E: AAT y M: GCA presentaron alelos diferenciales para las subespecies. Ninguna de las combinaciones presentó alelos únicos para las variedades.

CUADRO 4. SSR evaluados en los materiales de arroz que presentaron alelos únicos para la identificación de variedades.

Marcador	Alelo	Pb	Variedad
RM222	Alelo 4	235	Cimarrón
	Alelo 5	240	Fonaiap 2000
RM551	Alelo 2	248	Oro
	Alelo 5	230	Diamante
RM547	Alelo 7	245	D-Primera
	Alelo 5	173	Perla
RM219	Alelo 5	254	Fundarroz-PN1
	Alelo 6	250	D-Primera
RM440	Alelo 5	145	PN1
	Alelo 7	130	D-Primera
RM336	Alelo 3	200	Quila
	Alelo 7	245	D-Primera
	Alelo 8	140	Araure 50
RM580	Alelo 3	210	D-Oryza

BIBLIOGRAFÍA

- Aguirre, C., R. Alvarado y P. Hinrichsen. 2005. Identificación de cultivares y líneas de mejoramiento de arroz de Chile mediante amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP). *Agricultura Técnica (Chile)* 65(4):356-369.
- Dellaporta, S., T. Wood and T. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version ii. *Plant Mol. Rep.* 1:19-21
- Ikehashi H., and H. H. Araki. 1986. Genetics of F1 sterility in rice. **In:** *Rice genetics*. International Rice Research Institute, los Baños, The Philippines. p. 119-132
- International Rice Research Institute. (Revisado 29 noviembre 2006). International Rice Information System IRIS [En línea] <http://www.iris.irri.org/>
- Mackill, D. J. 1995. Classifying japonica rice cultivars with RAPD markers. *Crop Sci.* 35:889-894.
- Oka, H. I. 1988. Origin of cultivated rice. Elsevier, Tokyo.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey and A. Fafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding* 2:225-238.
- Temnykh, S., W. D. Park, N. Ayres, S. Cartinhour, N. Hauck, L. Lipovich, Y. G. Cho, T. Ishii and S. R. Mccouch. 2000. Mapping and one organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100:697-712.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reijans, T. Van De Lee, M. Hornes, A. Fritjers, J. Pot, J. Peleman, M. Kuiper and M. Zabeau. 1995. AFLP: a new concept to ADN fingerprintin. *Nucleic Acids Res.* 23:4 407-4 414.
- Zhang, Q. F., M. A. S. Maroof, T. Y. Lu and B. Z. Shen. 1992. Genetic diversity and differentiation of Indica and Japonica rice detected by RFLP analysis. *Theor. Appl. Genet.* 83:495-499.