

**VALIDACIÓN DE UN MARCADOR MICROSATÉLITE ASOCIADO  
AL GEN *waxy* PARA LA EVALUACIÓN DEL CONTENIDO DE AMILOSA  
EN ACCESIONES DE UN BANCO DE GERMOPLASMA VENEZOLANO**

Erika Arnao, Natalia Labrín, Manuel Ávila, Sarahys Sanz, Yorman Jayaro, Eduardo Graterol e Iván Galindo Castro

**RESUMEN**

El contenido de amilosa (CA) es el principal factor determinante de la calidad del grano de arroz cocido. Los arroces son clasificados según su CA sea bajo, intermedio o alto. En la síntesis de amilosa interviene la enzima GBSS, codificada por el gen *waxy*, ubicado en el cromosoma 6 del arroz. En dicho gen se identificó un microsatélite (SSR) utilizable como marcador molecular para evaluar CA. En este estudio se validó la asociación entre el marcador SSR y CA usando 581 accesiones de arroz de distintos orígenes existentes en el banco de germoplasma de Fundación Danac. Los materiales de arroz fueron sembrados en Calabozo, Guárico, Venezuela, durante los periodos lluvioso y seco, en 2008 y 2009. Se identificaron 11 alelos de entre 100 y 129pb. Cinco de ellos coincidieron con los

reportados para los estándares internacionales Pokhareli, Skybonnet, Bengal, Caloro y Lemont. El alelo 1 fue predominante; ~82% de las accesiones con este alelo presentaron CA intermedio. La varianza en el CA explicada por el microsatélite fue baja (49%) comparada con otros estudios, posiblemente por el uso de germoplasma exótico genéticamente más diverso. Los valores del CA variaron para los distintos alelos y no se asoció un alelo a un determinado CA; sin embargo, los alelos 1 y 3 presentaron mayor frecuencia en las accesiones con CA intermedio, y el alelo 2 en accesiones con baja CA. Aunque la explicación dada por el marcador en el CA no fue alta, puede ser útil en etapas tempranas de programas de mejoramiento para producir arroz con calidad culinaria deseable.

**Introducción**

El arroz (*Oryza sativa* L) es el alimento básico para más

de la mitad de la población mundial, ocupando el segundo lugar en producción después del trigo. La calidad del grano

es una de las características económicamente más importantes del cultivo, por lo que representa unos de los objeti-

vos principales en la producción de arroz en muchas áreas del mundo (Zhou *et al.*, 2003). Está constituida por la

**PALABRAS CLAVE / Arroz / Calidad Culinaria / Contenido de Amilosa / Gen *waxy* / Marcadores Moleculares / Microsatélites / *Oryza sativa* L. /**

Recibido: 15/09/2011. Modificado: 13/08/2012. Aceptado: 28/08/2012.

**Erika Arnao.** Ingeniera Agrónoma, M.Sc. en Agronomía y Doctora en Ciencias Agrícolas, Universidad Central de Venezuela (UCV). Investigadora, Fundación para la Investigación Agrícola Danac (DANAC), Venezuela. Dirección: DANAC, Apartado Postal 182. San Javier -vía Guarataro, Estado Yaracuy, Venezuela. e-mail: erika.arnao@danac.org.ve

**Natalia Labrín.** Ingeniera Agrónoma, Universidad Nacional

Experimental de los Llanos Centrales Rómulo Gallegos. M.Sc. en Agricultura Ecológica, Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza (CATIE). Investigadora, DANAC, Venezuela. e-mail: natalia.labrin@danac.org.ve

**Manuel Ávila.** Ingeniero Agrónomo y M.Sc. en Ciencia y Tecnología de Alimentos, UCV, Venezuela. Investigador, DANAC, Venezuela. e-mail: manuel.avila@danac.org.ve

**Sarahys Sanz.** Técnica Superior Universitario, Instituto Universitario de Tecnología de Yaracuy, Venezuela. Técnica de Investigación, DANAC, Venezuela. e-mail: sarahys.sanz@danac.org.ve

**Yorman Jayaro.** Ingeniero Agrónomo, UCV, Venezuela. Investigador, DANAC, Venezuela. e-mail: yorman.jayaro@danac.org.ve

**Eduardo Graterol.** Ingeniero Agrónomo y Maestría en Agro-nomía, UCV, Venezuela. Ph.D. en Mejoramiento Genético de

Plantas, University of Wisconsin-Madison, EEUU. Gerente de Investigación y Desarrollo, DANAC, Venezuela. e-mail: eduardo.graterol@danac.org.ve

**Iván Galindo Castro.** Licenciado en Biología, UCV, Venezuela. Doctor en Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Venezuela. Investigador, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Venezuela. e-mail: igalindo@idea.org.ve

## VALIDATION OF A MICROSATELLITE MARKER ASSOCIATED TO THE *waxy* GENE FOR THE AMYLOSE CONTENT ASSESSMENT IN RICE ACCESSIONS OF A VENEZUELAN GERmplasm BANK

Erika Arnao, Natalia Labrín, Manuel Ávila, Sarahys Sanz, Yorman Jayaro, Eduardo Graterol and Iván Galindo Castro

### SUMMARY

*Amylose content (CA) is the main factor influencing the cooking quality of rice grains. Rice is classified as being of low, intermediate or high CA. Amylose synthesis is catalyzed by a starch synthase encoded by the waxy gene, located in chromosome 6 of rice. In that gene, a microsatellite (SSR) was identified to be useful in marker assisted selection for CA. This study validated the association between the SSR marker and CA, using 581 accessions of different origins from the germplasm bank of Fundación Danac. Rice materials were seeded in Calabozo, Guárico, Venezuela, in rainy and dry seasons of 2008 and 2009. Eleven alleles between 100 and 129bp were identified. Five of the identified alleles matched the standard alleles reported for the cultivars Pokhareli, Skybonnet, Bengal, Caloro and Lemont.*

*Allele 1 was the most predominant in the germplasm; ~82% of accessions with it presented intermediate CA. CA variance explained by the microsatellite was low (49%) in comparison to other studies, due possibly to the broad genetic diversity of the tested exotic germplasm. The range of CA values was large for the different alleles and it was not possible to associate the presence of an allele to a particular CA class; nevertheless, alleles 1 and 3 were more frequent in accessions with intermediate CA, whereas allele 2 did in accessions with low CA. Although the statistical association between marker alleles and the phenotypic value of CA was not high, the SSR marker can be useful in early stages of breeding programs designed to produce rice with desirable cooking qualities.*

## VALIDAÇÃO DE UM MARCADOR MICROSATÉLITE ASSOCIADO AO GEN *waxy* PARA A AVALIAÇÃO DO CONTEÚDO DE AMILOSE EM ACESSÕES DE UM BANCO DE GERMOPLASMA VENEZUELANO

Érika Arnao, Natalia Labrín, Manuel Ávila, Sarahys Sanz, Yorman Jayaro, Eduardo Graterol e Iván Galindo Castro

### RESUMO

*O conteúdo de amilose (CA) é o principal fator determinante da qualidade do grão de arroz cozido. Os arrozes são classificados segundo seu CA seja baixo, intermediário ou alto. Na síntese de amilose intervém a enzima GBSS, codificada pelo gene waxy, situado no cromossomo 6 do arroz. Em dito gene se identificou um microssatélite (SSR) utilizável como marcador molecular para avaliar CA. Neste estudo foi validada a associação entre o marcador SSR e CA usando 581 acessões de arroz de distintas origens existentes no banco de germoplasma de Fundação Danac. Os materiais de arroz foram plantados em Calabozo, Guárico, Venezuela, durante os períodos chuvoso e seco, em 2008 e 2009. Identificaram-se 11 alelos de entre 100 e 129pb. Cinco deles coincidiram com os reportados para*

*os padrões internacionais Pokhareli, Skybonnet, Bengal, Caloro e Lemont. O alelo 1 foi predominante; ~82% das acessões com este alelo apresentaram CA intermediário. A variância na CA explicada pelo microssatélite foi baixa (49%) comparada com outros estudos, possivelmente pelo uso de germoplasma exótico geneticamente mais diverso. Os valores do CA variaram para os distintos alelos e não se associou um alelo a um determinado CA; no entanto, os alelos 1 e 3 apresentaram maior frequência nas acessões com CA intermediário, e o alelo 2 em acessões com baixa CA. Ainda que a explicação dada pelo marcador no CA não foi alta, pode ser útil em etapas iniciais de programas de melhoramento para produzir arroz com qualidade culinária desejável.*

calidad de molinería, apariencia del grano, calidad nutricional y calidad de cocción o culinaria, siendo esta última la que define la preferencia del consumidor y determina el precio y la demanda del producto en el mercado (Sabbour, 2009).

La calidad culinaria en arroz está determinada principalmente por la composición del almidón en el grano y especialmente por tres características que son (Juliano, 1985) el contenido de amilosa (CA), la consistencia en gel (CG) y la temperatura de gelatinización (TG). El almidón es el principal componente

del endospermo del grano de arroz y está compuesto de dos tipos de glucopolímeros: la amilosa y la amilopectina, cuyas estructuras se disponen de manera lineal y ramificada, respectivamente. La relación amilosa/amilopectina influye en las propiedades funcionales del grano, incluyendo la estructura y característica del almidón, mientras que la amilosa es determinante para regular la calidad de cocción del arroz. Basado en el CA, los genotipos de arroz son caracterizados en clases de amilosa o tipos de calidad. En este sentido se clasifican (Bergman *et al.*, 2001) en ti-

pos cerosos o *waxy* (0-2%), amilosa muy baja (3-9%), amilosa baja (10-19%), amilosa intermedia (20-24%) y amilosa alta (>24%).

Para la determinación del CA los programas de mejoramiento genético tradicionalmente utilizan un método colorimétrico, que a pesar de ser considerado un método relativamente rápido y reproducible, presenta ciertas limitaciones tales como: a) necesita mucho tiempo cuando se implementa de manera rutinaria, b) requiere de cierto tamaño de muestra para realizar el análisis, c) amerita evaluaciones en diferentes localida-

des debido al efecto ambiental sobre el CA, y d) no permite identificar los individuos heterocigotos (Ayres *et al.*, 1997; Bergman *et al.*, 2001). Adicionalmente, se ha determinado una gran variabilidad en los resultados de laboratorio para determinar el contenido de amilosa en arroz, debido a factores asociados a los propios métodos de cuantificación, lo que dificulta el uso confiable de los datos de caracterización del germoplasma con fines de selección en programas de mejoramiento (Fitzgerald *et al.*, 2009).

El uso de marcadores moleculares asociados al gen *waxy*

para seleccionar arroces con CA deseable en programas de mejoramiento de arroz ofrece importantes ventajas sobre la evaluación colorimétrica. Entre las principales ventajas diversos autores mencionan que la selección puede ser aplicada en cualquier estado de desarrollo de la planta, no está influenciada por el ambiente y se puede hacer selección sin que aún se manifieste el carácter, haciendo posible que el mejoramiento para esta característica sea menos dependiente del azar, más económico, preciso y eficiente (Ayres *et al.*, 1997; Bergman *et al.*, 2001; Rahemi *et al.*, 2007)

La enzima GBSS (del inglés *granule-bound starch synthase*), isoforma responsable de la síntesis de amilosa, es codificada por el gen *waxy* ubicado en el cromosoma 6 del arroz. El CA está determinado principalmente por la varianza alélica de dicho gen, y su expresión se ve afectada por el polimorfismo en un simple nucleótido (G o T) ubicado en la primera posición del sitio de empalme del primer intrón. Es decir, el CA está altamente asociado a la regulación post-transcripcional del gen *waxy*, específicamente con la eficiencia de empalme del primer intrón de este gen (Wang *et al.*, 1995).

En la región no traducida 5' del gen *waxy* fue identificado un microsatélite polimórfico (CT)<sub>n</sub> estrechamente ligado al CA (Bligh *et al.*, 1995). La funcionalidad del microsatélite fue demostrada por Ayres *et al.* (1997), quienes identificaron ocho alelos microsatélites *waxy* los cuales explicaban juntos más del 82% de la variación en el CA de 89 arroces no-*waxy* en los EEUU. Bergman *et al.* (2001) también utilizaron el mismo microsatélite para caracterizar 198 cultivares y líneas mejoradas de arroz, cultivadas en diferentes localidades de los EEUU, explicando 88% de la variación en el CA. Más recientemente, Rahemi *et al.* (2007) evaluaron 72 cultivares de arroz iraníes e identifica-

ron siete alelos *waxy* los cuales explicaron más del 70% de la variación del CA.

En Venezuela, el consumo está orientado principalmente hacia los arroces con CA intermedio (22-27%), por lo que el CA es considerado un parámetro importante de selección desde las primeras etapas del mejoramiento. El análisis del CA rutinariamente empleado se basa en el método colorimétrico y para obtener estimaciones más confiables del CA, generalmente se realizan evaluaciones de las progenies en múltiples años y localidades. A partir del 2004 se comenzó en la Fundación Danac, Venezuela, la evaluación molecular del CA utilizando el marcador microsatélite 484 y 485 para selección en poblaciones segregantes y líneas élites provenientes del Programa de Mejoramiento de Arroz. El objetivo del presente estudio fue validar el marcador microsatélite asociado al gen *waxy* para la determinación del CA en accesiones del banco de germoplasma de arroz de Fundación Danac.

## Materiales y Métodos

### Material vegetal

En Calabozo, estado Guárico, Venezuela (8.814963°N; 67.538640°W), durante los ciclos de lluvias (2008 y 2009) y norte-verano (2008-2009 y 2009-2010), se establecieron ensayos para evaluar dos grupos conformados por 334 y 247 accesiones, respectivamente, provenientes de la colección de germoplasma de arroz de Fundación Danac. El germoplasma evaluado incluyó líneas introducidas de Centros Internacionales, líneas introducidas de programas nacionales de América Latina y líneas mejoradas de Fundación Danac. Cada grupo se evaluó en dos ambientes, uno en el ciclo de lluvia y otro en el ciclo de norte-verano. Ambos ensayos se establecieron bajo un diseño de bloques aumentados de Federer con cinco testigos: D-Sativa, Cimarrón, Fonaiap 1, Fedearroz

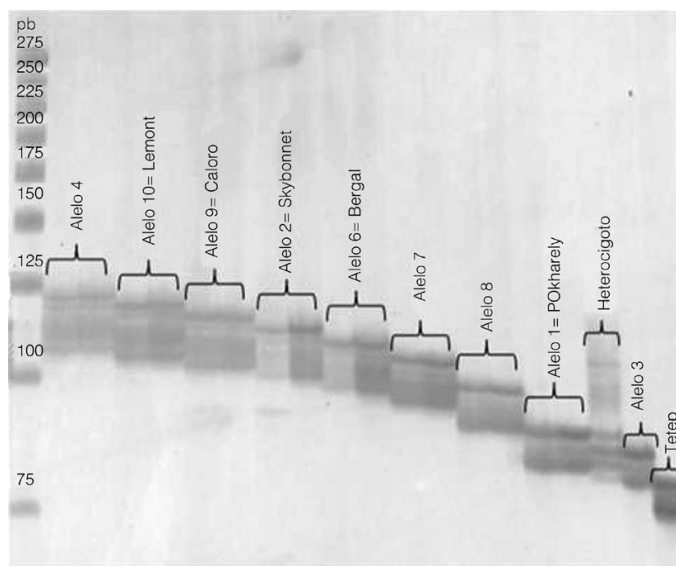


Figura 1. Gel de poliacrilamida donde se observan los diferentes alelos amplificados con el marcador microsatélite 484-485 asociado al gen *waxy*.

2000 y Fedearroz 50. Al momento de la cosecha se tomaron muestras para la evaluación del CA mediante el método colorimétrico. Los cultivares se sembraron en condiciones de umbráculo para la evaluación molecular y el ADN fue extraído quince días después de la siembra.

### Evaluación molecular del CA

**Extracción del ADN.** Discos de hojas jóvenes de plantas de arroz, fueron macerados con N<sub>2</sub> líquido en microtubos de 1,5ml. El ADN fue extraído utilizando el método de Doyle y Doyle (1990). Las concentraciones de los ADN fueron determinadas en geles de agarosa al 0,8% teñidos con SYBR GREEN®, realizando comparaciones con ADN de estándares comerciales de concentración conocida.

Como estándares internacionales se utilizó ADN de las variedades Pokharely, Lemont, Caloro, Tetep, Skybonnet y Bengal, las cuales representan seis de nueve alelos reportados por Ayres *et al.* (1997) y Bergman *et al.* (2001).

**PCR y electroforesis.** Las reacciones de PCR se realizaron en volúmenes totales de 10µl de acuerdo a lo reportado por

Bergman *et al.* (2001). Cada reacción contenía 2,5mM de MgCl<sub>2</sub>, 1X de buffer de PCR (20mM de tris HCl, pH 7,0 y 50mM de KCl), 0,2mM de los cebadores 484 (CTTTGTC-TATCTCAACACAC) y 485 (TTGCAGATGTTCTTCTTGATG), 0,2µM de cada deoxynucleotido dNTPs y 0,1 unidades de Taq polimerasa. Se utilizó un termociclador 2720 de Applied Biosystems (Carlsbad, CA, EEUU) y los perfiles de temperatura fueron los siguientes: un ciclo de desnaturalización inicial a 94°C por 45s, seguido de 37 ciclos de 94°C por 45s, 55°C por 45s y 72°C por 45s. Por último un ciclo de elongación final a 72°C por 5min. Los productos amplificados fueron mezclados con 8µl de buffer de carga (98% formamida, 10mM de EDTA, 0,25de azul de bromofenol y 0,25de xylene cyanol FF). La electroforesis se realizó en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 6% teñidos con nitrato de plata.

### Evaluación fenotípica del CA

La determinación del CA de manera convencional se realizó en el Laboratorio de Calidad de Granos y Semillas de Fundación Danac, median-

te el método de Juliano (1971), en muestras de harina de arroz pulido obtenidas en un molino Cemotec MIII 1090, cernidas por un tamiz malla 100. El CA se obtuvo del promedio de dos observaciones por accesión y fue expresado en porcentaje.

#### Análisis de datos

Los datos obtenidos de la evaluación fenotípica y molecular fueron analizados por ciclo de siembra y por año. Se realizó un análisis de varianza (ANAVAR) y una prueba de medias usando la prueba Student-Newman-Keul. También se realizó un gráfico de cajas (*box-plot*) para visualizar las distribuciones de las frecuencias de las accesiones por cada alelo y mostrar los valores atípicos si los hubiese. Todos los análisis fueron realizados con el software Infostat (Di Rienzo *et al.*, 2011). En los análisis fueron excluidos los individuos heterocigotos o con algún dato faltante. A partir de los datos fenotípicos y moleculares se determinó la frecuencia de accesiones con alelos bajos, intermedio y alto. La definición de intervalos correspondientes al CA se basó en la norma utilizada en el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) para tipificación de amilosa (Martínez y Cuevas, 1989).

#### Resultados y Discusión

El CA fue evaluado tanto molecularmente como fenotípicamente en un total de 581 accesiones (334 para el primer año y 247 para el segundo año), en las cuales amplificaron 11 alelos, con tamaños entre 75 y 125pb (Figura 1). El microsatélite permitió la identificación de seis genotipos heterocigotos. En la Tabla I se observa la tipificación de amilosa y la proporción de accesiones para cada alelo del marcador microsatélite asociado al gen *waxy* del arroz. Los alelos 1, 2, 6 y 3 fueron los de mayor frecuencia con porcentajes de 48,70; 22,72; 11,35 y

TABLA I  
TIPIFICACIÓN DE AMILOSA Y PROPORCIÓN DE ACCESIONES PARA CADA ALELO DE UN MARCADOR MICROSATÉLITE ASOCIADO AL GEN *waxy* DEL ARROZ EN 581 ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA CARACTERIZADAS MOLECULAR Y FENOTÍPICAMENTE EN MUESTRAS TOMADAS DE CAMPO EN 2008 Y 2009, EN CALABOZO, GUÁRICO, VENEZUELA

Alelo	Tipificación de amilosa %			N° de accesiones	Porcentaje %
	Alta	Baja	Intermedia		
1	10,04	7,92	82,04	283	49,22
2	1,16	78,29	20,54	132	22,96
3	8,51	8,51	82,98	47	8,17
4	0,00	100,00	0,00	2	0,35
5	0,00	95,00	5,00	10	1,74
6	0,00	68,94	31,06	66	11,48
7	0,00	93,75	6,25	16	2,78
8	0,00	83,33	16,67	6	1,04
9	8,33	58,33	33,33	6	1,04
10	0,00	83,33	16,67	6	1,04
11	0,00	100,00	0,00	1	0,17
Total general	6,03	37,24	56,73	575	100

8,09%, respectivamente. El 91,82% de las accesiones presentaron algunos de estos cuatro alelos, siendo el alelo 1 el predominante en el germoplasma evaluado. El resto de los alelos presentaron una baja frecuencia (<3%) en la población estudiada. Alrededor del 82% las accesiones con el alelo 1 presentaron niveles de amilosa intermedia, 78% de

las que presentaron el alelo 2 fueron clasificadas en amilosa baja y 82,98% de las accesiones con el alelo 3 presentaron CA intermedia (Tabla I).

Las variedades D-Sativa, Fonaiaip 1, Fedearroz 2000 y Fedearroz 50 presentaron el alelo 1, mientras que la variedad Cimarrón presentó el alelo 3, siendo clasificadas dichas variedades en la clase de ami-

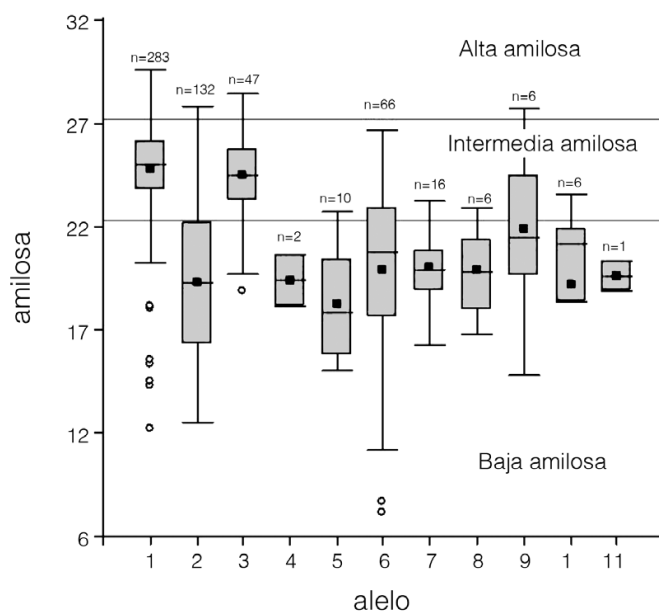


Figura 2. Gráfico de cajas para la variable contenido de amilosa en los distintos alelos obtenidos en accesiones de arroz con el marcador microsatélite asociado al gen *waxy*.

losa intermedia. Cabe destacar que los programas de mejoramiento de arroz hacen selección para esta clase de amilosa, acorde a la preferencia del consumidor venezolano. Los alelos 1, 2, 6, 9 y 10 identificados en las accesiones evaluadas coincidieron con alelos reportados para los estándares internacionales Pokhareli, Skybonnet, Bengal, Caloro y Lemont, respectivamente. Ayres *et al.* (1997) distinguieron los alelos de estos cultivares internacionales en termino de longitud de las repeticiones CT presentes en la región 5' del gen, encontrando que los cultivares Bengal y Caloro presentaron las repeticiones (CT)<sub>18</sub> y (CT)<sub>19</sub>, y estuvieron asociadas a bajo CA, mientras que los cultivares Lemont y Skybonnet con la repetición (CT)<sub>20</sub> estuvieron asociados a CA intermedio. En el presente estudio se detectaron alelos identificados previamente en germoplasma de arroz de EEUU, pero la clase fenotípica del contenido de amilosa predominante en cada alelo no siempre coincidió. La falta de asociación en los niveles de amilosa de algunos alelos, en comparación con otros estudios, puede ser atribuida a las variaciones existentes entre laboratorios tanto en el método de determinación de amilosa como en su tipificación (Fitzgerald *et al.*, 2009). Por lo anterior, es recomendable que los programas de mejoramiento genético asistidos por técnicas moleculares incorporen en los ensayos materiales de referencia, como arroces con intervalos de CA deseables y no deseables, de acuerdo con los hábitos preferenciales locales.

En los análisis de la varianza, el coeficiente de determinación ( $R^2$ ) fue de 0,49, lo que significa que sólo el 49% de la variación del CA podría ser el resultado de la diferencia en los alelos del gen *waxy*. Este valor fue bajo en comparación con estudios previos, que señalan una proporción de la variación del CA mayor al 80% (Ayres *et al.*, 1997; Bergman *et al.*, 2001). Sin embar-

go, Bergman *et al.* (2003), trabajando en germoplasma exótico de arroz, obtuvieron un 68% de la variación en el CA explicada por el marcador. Estas diferencias en cuanto a la proporción de la variación del CA explicada por el marcador posiblemente se deben a que los estudios realizados por Ayres *et al.* (1997) y Bergman *et al.* (2001) fueron enfocados en un grupo de accesiones con base genéticamente estrecha, provenientes del germoplasma de mejoramiento de los EEUU, mientras que el estudio de Bergman *et al.* (2003) y el presente contienen materiales de orígenes diversos con una mayor diversidad genética, lo cual se reflejó en la identificación de alelos *waxy* no identificados previamente.

En el presente estudio no fue posible asociar completamente un alelo a una única clase de amilosa. En el gráfico de cajas (Figura 2) se observa que hubo una amplia dispersión en la distribución de los datos en el CA para cada uno de los alelos; sin embargo, los alelos 1 y 3 fueron los que más concentraron genotipos en la clase de amilosa intermedia y el alelo 2 en la clase baja amilosa. Se observaron valores atípicos para los alelos 1 y 6. Resultados similares fueron obtenidos por Chen *et al.* (2008), quienes encontraron que los alelos del locus *waxy* identificados como CT<sub>17</sub>, CT<sub>18</sub> y CT<sub>19</sub> estuvieron asociados a CA baja e intermedia, mientras que en la mayoría del germoplasma de EEUU esos alelos se encontraron sólo en cultivares con baja amilosa (Ayres *et al.*, 1997; Bergman *et al.*, 2001). Este hecho ha sido común en estudios realizados con el microsatélite ligado al gen *waxy* (CT), ya que a pesar de que el marcador microsatélite ha sido útil para selección asistida, es simplemente un marcador muy estrechamente ligado al gen, más no es el gen en sí mismo. Es por ello que variedades con el mismo número de repeticiones (CT) pueden tener diferentes contenidos de amilosa y variedades con diferentes números

de repetición tienen CA similares (Ayres *et al.*, 1997).

La mayoría de los estudios realizados utilizando el marcador microsatélite asociado al gen *waxy* han revelado la limitación de éste en la discriminación de genotipos, particularmente con amilosa baja e intermedia. Es por ello que más recientemente se han utilizado marcadores del tipo SNP (del inglés *single nucleotide polymorphism*), especialmente un SNP denominado C-T, ubicado en el sitio de empalme del primer intrón (Wang *et al.*, 1995) y otros dos identificados en los exones 6 y 10 del gen *waxy*, los cuales mediante la identificación de haplotipos han permitido discriminar entre accesiones de arroz con amilosa baja e intermedia dentro de la misma clase microsatélite (Larkin and Park, 2003; Jayamani *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2008). Varios estudios en los que han utilizado haplotipos obtenidos con marcadores SNP han logrado explicar más del 85% de la variación en el CA y una buena discriminación entre los tipos con contenido bajo, intermedio y alto de amilosa (Chen *et al.*, 2008; Dobo *et al.*, 2010). Al parecer, los marcadores del tipo SNP resultan ser más adecuados para la selección de líneas con CA deseables en los programas de mejoramiento, sin importar la fuente del germoplasma utilizado. Sin embargo, considerando que los costos de implementación de los SNP son considerablemente superiores al de los microsatélites, especialmente cuando se desarrollan metodologías para su evaluación a pequeña escala, no se debería descartar la utilización del microsatélite asociado al gen *waxy* en programas de selección asistida. Este marcador permite seguir la presencia de alelos favorables en progenies provenientes de cruces, en los cuales los alelos de los progenitores han sido previamente identificados. De esta forma se podrían descartar plántulas homocigotas para alelos no favorables en generaciones tempranas (F<sub>2</sub>

o F<sub>3</sub>), con lo que se disminuye la cantidad de familias a evaluar y se aumenta la eficiencia de la selección para esta característica.

## Conclusión

El marcador microsatélite asociado al gen *waxy* explicó una baja proporción de la variación en el CA en accesiones del banco de germoplasma de Fundación Danac. Sin embargo, se identificaron alelos que presentaron una alta asociación con CA deseable, por lo que el marcador pudiera ser utilizado en programas de selección asistida para identificar líneas de arroz en etapas tempranas del mejoramiento.

## REFERENCIAS

- Ayres NM, McClung AM, Larkin PD, Bligh HFJ, Jones CA, Park WD (1997) Microsatellites and a single-nucleotide polymorphism differentiate apparent amylose classes in an extended pedigree of US rice germoplasm. *Theor. Appl. Genet.* 94: 773-781.
- Bergman CJ, Delgado JT, McClung AM, Fjellstrom RG (2001) An improved method for using a microsatellite in the rice *waxy* gene to determine amylose class. *Cereal Chem.* 78: 257-260.
- Bergman CJ, Fjellstrom RG, McClung AM (2003) Association between amylose content and a microsatellite marker across exotic rice germoplasm. *Advances in rice genetics*. Krush GS, ed. Brar DS, ed. Hardy B, ed. Los Baños (Philippines). International Rice Research Institute. pp. 307-308
- Bligh HF, Till RI, Jones CA (1995) A microsatellite sequence closely linked to the *waxy* gene of *Oryza sativa*. *Euphytica* 86: 83-85.
- Chen MH, Bergman C, Pison S, Fjellstrom R (2008) *Waxy* gene haplotypes: association with apparent amylose content and the effect by the environment in an international rice germoplasm collection. *J. Cereal Sci.* 47: 536-545.
- Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo CW (2011) InfoStat versión 2011. Grupo InfoStat. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. [www.infostat.com.ar](http://www.infostat.com.ar)
- Dobo M, Ayres N, Walker G, Park W (2010) Polymorphism in the GBSS gene affects amylose content in US and European rice

germoplasm. *J. Cereal Sci.* 52: 450-456.

- Doyle JJ, Doyle JL (1990) Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Phytochem. Bull.* 19: 11-15.
- Fitzgerald MA, Bergman CJ, Resurreccion AP, Möller J, Jimenez R, Reinke R, Martin M, Blanco P, Molina F, Chen MH, Kuri V, Romero MV, Habibi F, Umamoto T, Jongdee, S, Graterol E, Reddy KR, Bassinello PZ, Sivakami R, Rani N, Das S, Wang YJ, Indrasari, SD, Ramli A, Ahmad R, Dipti SS, Xie L, Lang NT, Singh P, Toro DC, Tavasoli F, Mestres C (2009) *Addressing the Dilemmas of Measuring Amylose in Rice*. Cereal Chemistry. American Association of Cereal Chemists. HighBeam Research. [www.highbeam.com](http://www.highbeam.com) (Cons. 11/08/2011).
- Jayamani P, Negrão, Brites C, Oliveira MM (2007) Potential of *waxy* gene microsatellite and single-nucleotide polymorphisms to develop *japonica* varieties with desired amylose level in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Cereal Sci.* 46: 178-186.
- Juliano BO (1971) A simplified assay for milled-rice amylose. *Cereal Sci. Today* 16: 334-340.
- Juliano BO (1985) *Rice Chemistry and Technology*. 2ª ed. American Association of Cereal Chemists. Saint Paul, MN, EEUU.
- Larkin PD, Park WD (2003) Association of *waxy* gene single nucleotide polymorphisms with starch characteristics in rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Breed.* 12: 335-339.
- Martínez C, Cuevas F (1989) *Evaluación de la Calidad Culinaria y Molinera del Arroz. Guía de Estudio*. 3ª ed. Centro Internacional de Agricultura Tropical. Colombia. 75 pp.
- Sabouri H (2009) QTL detection of rice grain quality traits by microsatellite markers using an *indica* rice (*Oryza sativa* L.) combination. *J. Genet.* 88: 81-85.
- Rahemi MR, Kazemitabar SK, Momeni A, Ebadi AA (2007) Evaluation of genetic diversity by using link maker for amylose content of some Iranian local rice cultivars. *Asian J. Plant Sci.* 6: 874-877.
- Wang NY, Zheng FQ, Shen GZ, Gao JP, Snustad DP (1995) The amylose content in rice endosperm is related to the post-transcriptional regulation of the *waxy* gene. *Plant J.* 7: 613-622.
- Zhou PH, Tan YF, Hee YQ, Xu CG, Zhang Q (2003) Simultaneous improvement for four quality traits of Zhenshan 97, an elite parent of hybrid rice, by molecular marker-assisted selection. *Theor. Appl. Genet.* 106: 326-331.