

Diversidad genética de genotipos de arroz resistentes y susceptibles al daño mecánico producido por el insecto sogata

Genetic diversity of resistance and sensitive rice genotypes to sogata mechanical damage

Rosalía Velásquez^{1*}, Nelly Delgado² y Luis Angulo-Graterol¹

¹Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Agronomía (FAGRO). Apdo. 4579. Maracay 2101A, estado Aragua. Venezuela.

²Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA). Apdo. 3303, Araure, estado Portuguesa Venezuela.

*Correos electrónicos: rvelasquezsalazar@gmail.com, delgado.nelly@gmail.com, anguloluis2009@gmail.com

RESUMEN

La familia Delphacidae es un grupo de insectos que producen daños de importancia en los cereales. Por ello, se estudió la diversidad genética entre seis genotipos de arroz (*Oryza sativa* L.), con diferentes comportamientos de resistencia y susceptibilidad al daño mecánico producido por sogata (*Tagosodes orizicolus*), por medio de marcadores moleculares microsatélites SSR, distribuidos en los doce cromosomas del arroz. Se utilizaron 151 SSR para el análisis de agrupamiento UPGMA y distancia Dice. En el análisis, se conformaron tres grupos diferenciados con una correlación cofenética de 0,87; el primero constituido por Bluebonnet 50; en el segundo grupo: D-Sativa, Cimarrón, Venezuela 21 y Zeta 15, y el último grupo por Makalioka. Los coeficientes de similitud de los grupos fueron 0,55; 0,74 y 0,66 para cada una de las agrupaciones. Se observó claramente la separación en la formación de los grupos entre Makalioka y Bluebonnet 50, como genotipos resistente y susceptible, respectivamente. El análisis molecular reflejó una variabilidad genética estrecha para los genotipos evaluados. En la determinación del polimorfismo entre progenitores contrastantes para el daño mecánico de sogata, el mayor porcentaje fue observado entre los cultivares Zeta 15 y Bluebonnet 50 con un 23,18%, seguido por Cimarrón y Bluebonnet 50 con 20,53%, y el menor porcentaje para D-Sativa y Venezuela 21; y Zeta 15 y Venezuela 21; para un 12,58% y 4,64%, respectivamente. Estos resultados serán empleados en la identificación y asociación entre SSR, con características relacionadas al daño mecánico por sogata.

Palabras clave: *Oryza sativa* L., *Tagosodes orizicolus*, análisis de agrupamiento, marcadores moleculares, microsatélites.

ABSTRACT

The Delphacidae family is a group of insects that cause significant damage in cereals. Genetic diversity among six genotypes of rice (*Oryza sativa* L.), with different behaviors for resistance and susceptibility to mechanical damage from sogata (*Tagosodes orizicolus*) was studied by molecular SSR microsatellite markers, distributed in the twelve rice chromosomes. 151 SSR were used for UPGMA clustering analysis and Dice distance. In the discriminant analysis, three groups were formed with cophenetic correlation of 0.87, the first constituted by Bluebonnet 50; in the second group were D-Sativa, Cimarron, Venezuela 21 and Zeta 15; and in the last group was Makalioka. Similarity coefficients of the groups were 0.55, 0.74 and 0.66 for each of the clusters. Clear separation was observed in the formation of groups between Makalioka and Bluebonnet 50 as resistant and susceptible genotypes, respectively. Molecular analysis showed a close genetic variability for genotypes. In determining the polymorphism between contrasting parents for mechanical sogata damage, the highest percentage 23.18% was observed between Zeta 15 and Bluebonnet 50 cultivars, followed by Cimarron and Bluebonnet 50 with 20.53%, and the lowest percentage for D-Sativa and Venezuela 21, and Venezuela 21 and Zeta 15, with 12.58% and 4.64%, respectively. These results will be used in the identification and association between SSR and characteristics related to mechanical sogata damage.

Key words: *Oryza sativa* L., *Tagosodes orizicolus*, clustering analysis, microsatellite, molecular markers.

INTRODUCCIÓN

La familia Delphacidae es un grupo de insectos considerados plagas que producen estragos de importancia en los cereales (arroz, maíz, trigo, sorgo, entre otros) a nivel mundial. Estas pérdidas son ocasionadas durante la puesta, alimentación o transmisión de diferentes fitopatógenos (Vivas y Astudillo, 2008; Remes, 2001). *Tagosodes orizicolus* pertenece a esta familia de insectos, la cual puede ocasionar dos tipos de daños, uno llamado “daño directo o mecánico” que causa pequeñas incisiones en el tejido foliar a fin de alimentarse u ovipositar; y otro, trasmisor del virus de la hoja blanca (VHB) en arroz o daño indirecto (Vivas y Astudillo, 2008; Jennigs *et al.*, 1981).

En los distintos programas de mejoramiento genético a nivel nacional e internacional, se han venido utilizando los marcadores moleculares como una alternativa confiable y precisa de selección de genotipos promisorios (Pérez-Almeida *et al.*, 2011; Arnao *et al.*, 2007; Triana *et al.*, 2004; McCough *et al.*, 1997). El uso de estos marcadores ha brindado un gran apoyo para la identificación de loci cuantitativos (QTL) para la resistencia a insectos y patógenos; además de la selección de genotipos o materiales deseables agronómicamente.

En el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), se han realizado estudios preliminares de asociación entre los marcadores de ADN, tipo RAPD y la resistencia a *T. orizicolus* en las líneas de arroz desarrolladas en los programas de mejoramiento de Colombia, con el objeto de facilitar la selección de genotipos resistentes (Picca *et al.*, 2004; Triana *et al.*, 2004).

El presente trabajo de investigación tuvo como objetivos, estudiar la diversidad genética entre los genotipos de arroz resistentes y susceptibles al daño mecánico provocados por sogata, empleando marcadores moleculares microsatélites, al tiempo de determinar el polimorfismo entre genotipos de arroz resistentes y susceptibles.

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue conducido en el Laboratorio de Genética Molecular (LGM) del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola (CIBA) de la

Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía (FAGRO), Maracay.

Con la finalidad de identificar los alelos entre los materiales resistentes y susceptibles al daño mecánico producido por sogata. Se realizaron cruzamientos entre cultivares de arroz resistentes del daño mecánico: Cimarrón, Z-15 y D-sativa; y cultivares susceptibles: Venezuela-21 y BlueBonnet-50 (testigo susceptible). Además, se utilizó el cultivar Makalioka como testigo resistente (INIA, 2005; Álvarez *et al.*, 2000). Los cruces fueron: Cimarrón x Bluebonnet 50 (CB); Zeta 15 x Bluebonnet 50 (ZB); Zeta 15 x Venezuela 21 (ZV) y D-Sativa x Venezuela 21 (DV).

Estos cruces fueron realizados en el campo experimental del Instituto de Genética durante el año 2010, de acuerdo al método simplificado para cruzamientos en arroz, FLAR (1996). La evaluación del polimorfismo entre los progenitores, se realizó mediante el uso de 151 marcadores microsatélites, distribuidos a lo largo de los doce cromosomas del genoma del arroz (Cuadro 1).

El ADN de cada progenitor se obtuvo siguiendo los pasos de la metodología descrita por Risterucci *et al.* (2000) y modificado por Pérez-Almeida *et al.* (2011), como se detalla a continuación: en tubos de 30 ml se colocaron 0,5 g del tejido macerado y se agregó 5 ml del tampón de extracción (100 mM Tris-HCl pH 8.0, 1,4M NaCl, 20 mM EDTA, 2% CTAB, 1% polietileno-glicol y 0,5% de sulfito de sodio), precalentado a 74 °C. Se aplicó vortex por 3 seg. Los tubos fueron incubados a 74 °C durante 20 min, se les aplicó vortex por 10 seg y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 5 ml de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo y se agitaron por inversión 50 veces, para ser centrifugados a 10.000 rpm durante 15 min.

Las condiciones de amplificación por PCR utilizada fueron descritas por Arnao *et al.* (2003), con algunas modificaciones del LGM del CIBA. Se evaluaron 151 microsatélites distribuidos en todo el genoma del arroz, la mezcla de reacción para la amplificación estuvo constituida por 1,33 ng μl^{-1} ADN, 3,33 mM MgCl_2 , 0,2 μM de los microsatélites (sentido y antisentido), 0,33 μM dNTP's y 0,033U μl^{-1} Taq comercial, completando a un volumen final de 15 μl^{-1} con Buffer1X.

Cuadro 1. Marcadores microsatélites empleados en la evaluación molecular para la determinación del polimorfismo de las variedades de arroz.

| N° | SSR | C | Motivo repetitivo | Pb | Secuencia del Indicador | | T |
|----|--------|---|--------------------|-----|-------------------------|------------------------|----|
| | | | | | Sentido | Antisentido | |
| 1 | RM1 | 1 | (GA)26 | 113 | GCGAAACACAATGCAAAA | GCGTTGGTTGGACCTGAC | 55 |
| 2 | RM5 | 1 | (GA)14 | 113 | TGCAACTTCTAGCTGCTCGA | GCATCCGATCTTGATGG | 55 |
| 3 | RM9 | 1 | (GA)15GT(GA)2 | 136 | GGTGCCATTGTCGTCCTC | ACGGCCCTCATCACCTTC | 55 |
| 4 | RM14 | 1 | (GA)18 | 191 | CCGAGGAGAGGAGTTCCGAC | GTGCCAATTTCCCTCGAAAA | 55 |
| 5 | RM23 | 1 | (GA)15 | 145 | CATTGGAGTGGAGGCTGG | GTCAGGCTTCTGCCATTCTC | 55 |
| 6 | RM1117 | 1 | (AG)12 | 143 | TTCCGGTACCTCTGACATC | ACCAGAACTTCTGTAGCGC | 55 |
| 7 | RM125 | 1 | (CT)13 | 185 | CCGAACGCCCTAGAAGCGGTCC | CGCGAGGTTTGTAAATGGCGG | 67 |
| 8 | RM212 | 1 | (CT)24 | 136 | CCACTTTCAGCTACTACCAG | CACCCATTTGTCTCTCATTATG | 55 |
| 9 | RM220 | 1 | (CT)17 | 127 | GGAAGGTAAGTGTTCACAAC | GAAATGCTTCCCACATGTCT | 55 |
| 10 | RM226 | 1 | (AT)38 | 274 | AGCTAAGTCTGGAGAAAACC | AAGTAGGATGGGACACAAGCTC | 55 |
| 11 | RM327 | 1 | (CT)18 | 130 | CAAATCCCGACTGCTGTCC | TGGAAAGAGAGCACTACAGC | 55 |
| 12 | RM283 | 1 | (GA)18 | 151 | GTCTACATGTACCCCTTGTGGG | CGGCATGAGAGTCTGTGATG | 55 |
| 13 | RM306 | 1 | (GT)18(AT)8CT(GT)6 | 155 | CAAGGTCGAAGAATGCAATGG | GCCACTTAAATCATTGCATC | 55 |
| 14 | RM315 | 1 | (AT)4(GT)10 | 133 | GAGTACTTCTCCGTTTCAC | AGTCAGTCACTGTGCAGTG | 55 |
| 15 | RM243 | 1 | (CT)18 | 116 | GATCTGCAGACTGCAGTTGC | AGCTGCAACGATGTTGTCC | 55 |
| 16 | RM259 | 1 | (CT)17 | 162 | TGGAGTTTGAGAGGAGGG | CTTGTGCATGGTGCCATGT | 55 |
| 17 | RM490 | 1 | (CT)13 | 101 | ATCTGAACACTGCAAAACACC | AGCAAGCAGTGCTTTCAGAG | 55 |
| 18 | RM499 | 1 | (TA)22 | 116 | TACCAAAACACCAACACTGCG | ACTCGCAGTATCCAAGTGTAG | 55 |
| 19 | RM543 | 1 | (GCG)10 | 98 | CTGCTGCAGACTCTSCTGCG | AAATATTACCCATCCCCCCC | 55 |
| 20 | RM572 | 1 | (TC)14 | 159 | CGGTTAATGTATCTGATTGG | TTGAGATCCAGACTGACC | 55 |
| 21 | RM575 | 1 | (AG)24 | 201 | CAATTTCCATAGGCTGCATG | GCTTGGGTTAGCGACGAC | 55 |
| 22 | RM580 | 1 | (CTT)19 | 221 | GATGAACCGAATTTGCATCC | CACCTCCATGTTTGGCTCC | 55 |
| 23 | RM582 | 1 | (TC)20 | 231 | TCGTGTGCCGATTTGTTCCG | AAATGGCTTACCTGCTGTCTC | 55 |
| 24 | RM6 | 2 | (AG)16 | 163 | GTCCCCTCCACCCAATTC | TCGTCTACTGTTGGCTGCAC | 55 |
| 25 | RM8 | 2 | (GA)14C(GA)2 | 252 | CACGTGGCGTAAATACACGT | GGCCAAAACCCCTAACCCCTG | 55 |
| 26 | RM29 | 2 | (GA)7 | 250 | CAGGACCCACCTGTCTATAC | AACGTTGGTCATATCGGTGG | 55 |
| 27 | RM53 | 2 | (GA)14 | 182 | ACGTCTCGACGCATCAATGG | CACAAGAACTTCCCTCGGTAC | 55 |
| 28 | RM174 | 2 | (AGG)7(GA)10 | 208 | AGCGACGCCAAGACAAGTCGGG | TCCACGTGATCGACACGACGG | 67 |
| 29 | RM203 | 2 | (AT)21 | 203 | CCATCCCATTAGCCAAACATTGC | GATTTACCTCGACGCCAACCTG | 55 |
| 30 | RM207 | 2 | (CT)25 | 118 | CCATTCGTGAGAAGATCTGA | CACCTCATCTCGTAAACGCC | 55 |

C: cromosoma; pb: pares de bases.

./... continúa

./... continuación Cuadro 1.

| N° | SSR | C | Motivo repetitivo | pb | Secuencia del indicador | | T |
|----|-------|---|--------------------|-----|-------------------------|--------------------------|----|
| | | | | | Sentido | Antisentido | |
| 31 | RM211 | 2 | (TC)3A(TC)18 | 161 | CCGATCTCATCAACCAACTG | CTTACGAGGATCTCAAAGG | 55 |
| 32 | RM213 | 2 | (CT)17 | 139 | ATCTGTTTGCAGGGGACAAG | AGTCTAGACGATGTCGTGA | 55 |
| 33 | RM221 | 2 | (TC)4T3C3(TC)(CT)2 | 192 | ACATGTCAGCATGCCACATC | TGCAAGAATCTGACCCCGG | 55 |
| 37 | RM322 | 2 | (CAT)7 | 112 | CAAGCGAAAAATCCCAGCAG | GATGAAACTGGCATTGCCTG | 55 |
| 38 | RM324 | 2 | (CAT)21 | 175 | CTGATCCACAGACTTGTGC | GATCCACGTCAGGATCTTC | 55 |
| 39 | RM240 | 2 | (CT)21 | 132 | CCTTAATGGGTAGTGTGCAC | TGTAACCAATCCCTCCATCC | 55 |
| 40 | RM241 | 2 | (CT)21 | 132 | CCTTAATGGGTAGTGTGCAC | TGTAACCAATCCCTCCATCC | 55 |
| 41 | RM250 | 2 | (CT)17 | 153 | GGTTCAAACCAAGCTGATCA | GATGAAAGGCCTCCACGCAG | 55 |
| 42 | RM450 | 2 | (AG)17 | 143 | AAACCACAGTAGTACGCCCGG | TCCATCCACATCTCCCTCTC | 55 |
| 43 | RM498 | 2 | (CA)10 | 213 | AATCTGGCCCTGCTCTTTTC | TCCTAGGGTGAAGAAAGGGG | 55 |
| 44 | RM525 | 2 | (AAG)12 | 131 | GGCCCGTCCAAGAAATATTG | CGGTGAGACAGAATCCTTACG | 55 |
| 45 | RM526 | 2 | (TAAT)5 | 240 | CCCAGAATACGTCCCTAG | ACCTGGTCATGACAAAGGAGG | 55 |
| 46 | RM550 | 2 | (CCT)8 | 231 | CTGAGCTCTGGTCCGAAGTC | GGTGGTGAAGAACAAGGAAG | 55 |
| 47 | RM555 | 2 | (AG)11 | 223 | TTGGATCAGCCAAAGGAGAC | CAGCATTGTGGCATGGATAC | 55 |
| 48 | RM561 | 2 | (GA)11 | 190 | GAGCTGTTTGGACTACGGC | GAGTAGCTTTCGCCACCCCC | 55 |
| 49 | RM7 | 3 | (GA)19 | 180 | TTCCCATGAAGTCTCTCG | CCTCCCATCAITTCGTTGTT | 55 |
| 50 | RM16 | 3 | (TCG)5(GA)16 | 181 | CGCTAGGGCAGCATCTAAA | AACACAGCAGGTACGGCGC | 55 |
| 51 | RM114 | 3 | (GA)7 | 209 | CAGGGACGAATCGTCGCCGGAG | TTGGCCCCCTTGAGGTGTCCGG | 55 |
| 52 | RM186 | 3 | (CGG)5 | 124 | TCCTCCATCTCCCGCTCCC | GGCGTGGTGGCCCTTCTTCGTC | 61 |
| 53 | RM200 | 3 | (GA)16 | 122 | CGCTAGGGAATTTGGATTGA | CGATGAGCAGGTATCGATGAGAAG | 55 |
| 54 | RM231 | 3 | (CT)16 | 182 | CCAGATTATTTCTGAGGTC | CACTTGACATAGTTCTGCATTG | 55 |
| 55 | RM232 | 3 | (CT)24 | 158 | CCGGTATCCTTCGATATTGC | CCGACTTTTCCCTCCTGACC | 55 |
| 56 | RM282 | 3 | (GA)15 | 136 | CTGTGTGAAAAGGCTGCAC | CAGTCTGTGTTGCAGCAAG | 55 |
| 57 | RM251 | 3 | (CT)29 | 147 | GAATGGCAATGGCGCTAG | ATGCGGTTCAAGATTCCGATC | 55 |
| 58 | RM489 | 3 | (ATA)8 | 271 | ACTTGAGACGATCGGACACC | TCACCCATGGATGTTGTCAG | 55 |
| 59 | RM523 | 3 | (TC)14 | 148 | AAGGCATTGCAGCTAGAAGC | GCAC TTGGGAGGTTTGTCTAG | 55 |
| 60 | RM532 | 3 | (CA)9 | 180 | TCTATAATGTAGCCCCCCCCC | TTTCAGGGGCTTCTACCAAC | 55 |
| 61 | RM545 | 3 | (GA)30 | 226 | CAATGGCAGAGACCCCAAAAG | CTGGCATGTAACGACAGTGG | 55 |
| 62 | RM554 | 3 | (GA)14 | 259 | GTTCCGCTCTCTCGTCTC | CCCAAAAATCTGTCCTCTC | 55 |
| 63 | RM569 | 3 | (CT)16 | 175 | GACATTCTCGTTCCTCCTC | TGTCCTCTTAAAACCCCTCC | 55 |

C.: cromosoma; pb.: pares de bases.

./... continúa

./... continuación Cuadro 1.

| N° | SSR | C | Motivo repetitivo | pb | Secuencia del Indicador | | T |
|----|-------|---|-------------------|-----|--------------------------|------------------------|----|
| | | | | | Sentido | Antisentido | |
| 64 | RM142 | 4 | (CGG)7 | 240 | CTCGCTATCGCCATCGCCATCG | TCGAGCCATCGCTGGATGGAGG | 67 |
| 65 | RM261 | 4 | C9(CT)8 | 125 | CTACTTCTCCCTTGTGTGG | TGTACCATCGCCAAATCTCC | 55 |
| 66 | RM185 | 4 | (AGG)9 | 197 | AGTTGTTGGGAGGAGAAAGGCC | AGGAGCGAGCGCGATGTCCTC | 61 |
| 67 | RM317 | 4 | (GC)4(GT)18 | 155 | CATACCTACCAGTTCACCGCC | CTGGAGAGTGCAGCTAGTTGA | 55 |
| 68 | RM335 | 4 | (CTT)25 | 104 | GTACACACCCACATCGAGAAG | GCTCTATGCGAGTATCCATGG | 55 |
| 69 | RM349 | 4 | (GA)16 | 136 | TTGCCATTGCGTGGAGGCG | GTCCATCATCCCTATGTCG | 55 |
| 70 | RM273 | 4 | (GA)11 | 207 | GAAAGCCGTCGTGAAGTTACC | GTTTCTACTGATCGCGAC | 55 |
| 71 | RM252 | 4 | (CT)19 | 216 | TTCGCTGACGTGATAGGTTG | ATGACTTGATCCCGAGAACG | 55 |
| 72 | RM518 | 4 | (TC)15 | 171 | CTCTTCACTCACTCACCCATGG | ATCCATCTGGAGCAAGCAAC | 55 |
| 73 | RM551 | 4 | (AG)18 | 192 | AGCCAGACTAGCATGATTG | GAAGCGAGAAAGGATCACAG | 55 |
| 74 | RM13 | 5 | (GA)6-(GA)16 | 141 | TCCAAACATGGCAAGAGAGAG | GGTGGCATTTCGATTCACG | 55 |
| 75 | RM26 | 5 | (GA)15 | 112 | GAGTCGACGAGCGGCAGA | CTGGAGCGACGGTAACA | 55 |
| 76 | RM31 | 5 | (GA)15 | 140 | GATCAGGATCCACTGGAGCT | AAGTCCATTACTCTCCTCCC | 55 |
| 77 | RM164 | 5 | (GT)16TT(GT)4 | 246 | TCTTGCCCGTCACTGCAGATATCC | GCAGCCCATAGCTACAATCTTC | 55 |
| 78 | RM169 | 5 | (GA)12 | 167 | TGGCTGGCTCCGTGGTAGCTG | TCCCGTTGCCGTTTATCCCTCC | 67 |
| 79 | RM173 | 5 | (GA)9 | 186 | CTTACC TC GCGATCCCCCCTC | CCATGAGGAGGAGCGGGCGATC | 67 |
| 80 | RM178 | 5 | (GA)5(AG)8 | 117 | TCGCGTAAAAGATAAGCGGCGC | GATCACCGTTCCTCCGCTGC | 67 |
| 81 | RM208 | 5 | (CT)17 | 173 | TCTGCAAGCCTTGTCTGATG | TAAGTCGATCATTGTGGACC | 55 |
| 82 | RM541 | 5 | (TC)16 | 158 | TATAACCGACCTCAGTGCCC | CCTTACTCCCATGCCATGAG | 55 |
| 83 | RM563 | 5 | (CCT)6 | 185 | CGACCCTAGGGTTTCTCC | CTCGACGTCGTGGAAAGC | 55 |
| 84 | RM3 | 6 | (GA)2GG(GA)25 | 145 | ACACTGTAGCGGCCACTG | CCTCCACTGCTCCACATCTT | 55 |
| 85 | RM30 | 6 | (AG)9(GA)12 | 105 | GGTTAGGCATCGTCACGG | TCACCTCACACACGACACG | 55 |
| 86 | RM400 | 6 | (ATA)63 | 321 | ACACCAGGCTACCCAAACTC | CGGAGAGATCTGACATGTGG | 55 |
| 87 | RM170 | 6 | (CCT)7 | 121 | TCGGCTTCTTCCCTCGTCGACG | CCCCTTGCAGAGGAAGCAGCC | 55 |
| 88 | RM190 | 6 | (CT)11 | 124 | CTTTGTCTATCTCAAGACAC | TTGCAGATGTTCTTCTCTGATG | 55 |
| 89 | RM204 | 6 | (CT)44 | 169 | GTGACTGACTTGGTCATAGGG | GCTAGCCATGCTCTCGTACC | 55 |
| 90 | RM225 | 6 | (CT)18 | 140 | TGCCCATATGGTCTGGATG | GAAAGTGGATCAGGAAGGC | 55 |
| 91 | RM238 | 6 | (CT)15 | 147 | GATGGAAAAGCACGTGACTA | ACAGGCAATCCGTAGACTCG | 55 |
| 92 | RM527 | 6 | (GA)17 | 233 | GGCTCGATCTAGAAAATCCG | TTGCACAGGTTGCGATAGAG | 55 |
| 93 | RM528 | 6 | (AGAT)9 | 232 | GGCATCCAATTTTACCCCTC | AAATGGAGCATGGAGGTCAC | 55 |

C: cromosoma; pb: pares de bases.

./... continúa

./... continuación Cuadro 1.

| N° | SSR | C | Motivo repetitivo | pb | Secuencia del Indicador | | T |
|-----|--------|---|-----------------------------|-----|------------------------------------|---------------------------|----|
| | | | | | Sentido | Antisentido | |
| 94 | RM539 | 6 | (TAT)21 | 272 | GAGCGTCTTGTAAAAACCG | AGTAGGGTATCACGCATCCG | 55 |
| 95 | RM2 | 7 | (GA)1 | 150 | ACGTGTACCCGCTCCCTC | ATGTCCGGGATCTCATCG | 55 |
| 96 | RM10 | 7 | (GA)15 | 159 | TTGTCAAGAGGAGGCATCG | CAGAAATGGAAATGGGTCC | 55 |
| 97 | RM11 | 7 | (GA)17 | 140 | TCCTCTTCCCCCGATC | ATAGCGGGCGAGGCTTAG | 55 |
| 98 | RM51 | 7 | (GA)13 | 142 | TCCTGATCAATGTCTCCGG | CTACGTCATCATCGTCTTCCC | 55 |
| 99 | RM134 | 7 | (CCA)7 | 93 | ACAAGCCCGGAGAGGATCCG | GCTCTCCGGTGGTCCGATTGG | 55 |
| 100 | RM70 | 7 | (ATT)33 | 170 | GTGGACTTCATTTCAACTCG | GATGATAAGATAGTCCC | 55 |
| 101 | RM3743 | 7 | (GA)17 | 180 | TAGCCTTGTCCATCCATCC | CTTCTCCCTCTCCCTTCC | 55 |
| 102 | RM5420 | 7 | (TC)16 | 127 | CCTGATCTCAACACACACGC | GAAGTCTTGTTCGCGGTATG | 55 |
| 103 | RM214 | 7 | (CT)14 | 112 | CTGATGATAGAAACCTCTTCTC | AAGAACAGCTGACTTCACAA | 55 |
| 104 | RM248 | 7 | (CT)25 | 102 | TCCTTGTGAAATCTGGTCCC | GTAGCCTAGCATGGTGCATG | 55 |
| 105 | RM542 | 7 | (CT)22 | 113 | TGAATCAAGCCCCCTCACTAC | CTGCAACGAGTAAGGCAGAG | 55 |
| 106 | RM15 | 8 | (CGT)6(CGG)5 | 0 | CACGACGACGACGAGCAGCAGC | GCTCGAGGGAGAGCGACCTGCC | 61 |
| 107 | RM44 | 8 | (GA)16 | 99 | ACGGGCAATCCGAACAACC | TCGGAAAAACCTACCCTACC | 55 |
| 108 | RM137 | 8 | (CT)7 | 218 | GACATCGCCACCAGCCACCAC | CGGGTGTCCCGAGGATCTTG | 55 |
| 109 | RM149 | 8 | (AT)10 | 253 | GCTGACCAACGAACCTAGGCCG | GTTGGAAGCCTTTCCTCGTAACACG | 55 |
| 110 | RM210 | 8 | (CT)23 | 140 | TCACATTCGGTGGCATTG | CGAGGATGGTTGTCACTTG | 55 |
| 111 | RM223 | 8 | (CT)25 | 165 | GAGTAGCTTGGGCTGAAAC | GAAAGCAAGCTTGGCACTG | 55 |
| 112 | RM230 | 8 | (AGG)4(GA)9A(AG)13 | 257 | GCCAGACCGTGGATGTTCC | CACCGCAGTCACTTTTCAAG | 55 |
| 113 | RM310 | 8 | (GT)19 | 105 | CCAAAAACATTTAAAATATCATG | GCTTGTGGTCAATACCATTCC | 55 |
| 114 | RM256 | 8 | (CT)21 | 127 | GACAGGGAGTGATTGAAGGC | GTTGATTCGCCAAAGGGC | 55 |
| 115 | RM160 | 9 | (GAA)23 | 131 | AGCTAGCAGCTATAGCTTAGCTG GAGATCG | TCTCATCGCCATGGAGGCCCTC | 55 |
| 116 | RM201 | 9 | (CT)17 | 158 | CTCGTTTATTACCTACAGTACC | CTACCTCCTTTCTAGACCCGATA | 55 |
| 117 | RM205 | 9 | (CT)25 | 122 | CTGGTTCTGTATGGGAGCAG | CTGGCCCTTACAGTTTCAGTG | 55 |
| 118 | RM215 | 9 | (CT)16 | 148 | CAAAATGGAGCAGCAAGAGC | TGAGCACCTCTTCTCTGTAG | 55 |
| 119 | RM219 | 9 | (CT)17 | 202 | CGTCGGATGATGTAAAGCCT | CATATCGGCATTCGCCCTG | 55 |
| 120 | RM285 | 9 | (GA)12 | 205 | CTGTGGGCCCAATATGTCCAC | GGCGGTGACATGGAGAAAG | 55 |
| 121 | RM316 | 9 | (GT)-8(TG)9(TTTG) 4(TG)4 | 192 | CTAGTTGGGCATACGATGGC | ACGCTTATATGTTACGTCAAC | 55 |
| 122 | RM409 | 9 | (AGC)8 | 96 | CCGTCTCTTGC TAGGGATTCC | GGGGTGTCTTGTCTTCTCTG | 55 |
| 123 | RM242 | 9 | (CT)26 | 225 | GGCCAAACGTGTGTATGTCTC | TATATGCCAAAGACGGATGGG | 55 |

C: cromosoma; pb: pares de bases.

./... continúa

./... continuación Cuadro 1.

| N° | SSR | C | Motivo repetitivo | pb | Secuencia del Indicador | | T |
|-----|--------|----|--------------------|-----|-------------------------|------------------------------|----|
| | | | | | Sentido | Antisentido | |
| 124 | RM245 | 9 | (CT)14 | 150 | ATGCCGCCAGTGAATAGC | CTGAGAAATCCAATTATCTGGGG | 55 |
| 125 | RM566 | 9 | (AG)15 | 239 | ACCCAACTACGATCAGCTCG | CTCCAGGAACACGCTCTTTC | 55 |
| 126 | RM184 | 10 | (CA)7 | 219 | ATCCCAATCGCCAAAACCGGCC | TGACACTTGGAGAGCGGTGTGG | 55 |
| 127 | RM216 | 10 | (CT)18 | 146 | GCATGGCCGATGGTAAAG | TGATAAAAACCCACACGGCCA | 55 |
| 128 | RM222 | 10 | (CT)18 | 213 | CTTAAATGGGCCACATGCG | CAAAGCTTCGGGCCAAAAG | 55 |
| 129 | RM228 | 10 | (CA)6(GA)36 | 154 | CTGGCCATTAGTCCTTGG | GCTTGGGCTCTGCTTAC | 55 |
| 130 | RM311 | 10 | (GT)3(GTAT)8(GT)5 | 179 | TGGTAGTATAGGTACTAAACAT | TCCATACACATACAAAACATAC | 55 |
| 131 | RM239 | 10 | (AG)5TG(AG)2 | 144 | TACAAAATGCTGGGTACCCC | ACATATGGGACCCACCTGTC | 55 |
| 132 | RM258 | 10 | (GA)21(GGA)3 | 148 | TGCTGTATGTAGCTCGCACCC | TGGCCCTTAAAGCTGTCCG | 55 |
| 133 | RM4 | 11 | (GA)16 | 159 | TTGACGAGGTCAGCACTGAC | AGGGTGTATCCGACTCATCG | 55 |
| 134 | RM21 | 11 | (GA)18 | 157 | ACAGTATCCGTAGGCACGG | GCTCCATGAGGGTGGTAGAG | 55 |
| 135 | RM139 | 11 | (CT)5 | 386 | GAGAGGGAGGAAGGGAGGGCGG | CTGCCATGGCAGAGAAAGGGCC | 55 |
| 136 | RM144 | 11 | (ATT)11 | 237 | TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC | GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATG | 55 |
| 137 | RM332 | 11 | (CTT)5-12(CTT)14 | 183 | GCGAAGGCGAAGGTGAAG | GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTGCATC | 55 |
| 138 | RM167 | 11 | (GA)16 | 128 | GATCCAGCGTGAGGAACACGT | AGTCCGACCAACAAGGTGCGTTGTC | 55 |
| 139 | RM187 | 11 | (AT)29(GT)7 | 146 | CCAAGGAAAGATGCGACAATTG | GTGGACGCTTATATTATGGG | 55 |
| 140 | RM202 | 11 | (CT)30 | 189 | CAGATTGGAGATGAAGTCCTCC | CCAGCAAAGCATGTCAATGTA | 55 |
| 141 | RM209 | 11 | (CT)18 | 134 | ATATGAGTTGCTGTCTGCG | CAACTTGCATCCTCCCTCC | 55 |
| 142 | RM224 | 11 | (AAG)8(AG)13 | 157 | ATCGATCGATCTTCCAGAGG | TGCTATAAAAAGGCATTCGGGG | 55 |
| 143 | RM229 | 11 | (TC)11(CT)5C3(CT)5 | 116 | CACTCACACGAAACGACTGAC | CGCAGGTTCTTGTGAAATGT | 55 |
| 144 | RM254 | 11 | (TC)6ATT(CT)11 | 165 | AGCCCCGAATAAATCCACCT | CTGGAGGAGCATTGGTAGC | 55 |
| 145 | RM12 | 12 | (GA)21 | 184 | TGCCCTGTATTCTTCTCTC | GGTGATCCTTTCCCAATTTCA | 55 |
| 146 | RM6869 | 12 | (TGG)8 | 126 | GAGCTCCTTGTAGTGACCCCG | ATCAGCCTCGCCAGCTTC | 61 |
| 147 | RM235 | 12 | (CT)24 | 124 | AGAAGCTAGGGCTAACGAAC | TCACCTGGTCAGCCTCTTTC | 55 |
| 148 | RM309 | 12 | (GT)13 | 169 | GTAGATCAGCACTTTCTGCG | AGAAGGCCTCCGGTGAAG | 55 |
| 149 | RM247 | 12 | (CT)16 | 131 | TAGTGCCGATCGATGAACG | CATATGGTTTTGACAAAAGCG | 55 |
| 150 | RM519 | 12 | (AAG)8 | 122 | AGAGAGCCCCTAAATTTCCG | AGGTACGCTCACCTGTGGAC | 55 |
| 151 | RM453 | 12 | (TC)10 | 178 | CGCATCTCTCTCCCTTATCG | CTCTCCTCCTCGTTGTCGTC | 55 |

C: cromosoma; pb: pares de bases.

./... continúa

Se utilizó un termociclador BIO-RAD PTC-200 durante 34 ciclos a una temperatura de desnaturalización 94 °C, alineación de 50-67 °C y extensión 72 °C. La visualización de los perfiles electroforéticos fue en geles de poliacrilamida 6% con revelado en nitrato de plata, descrito por Arnao *et al.* (2003). Las imágenes fueron capturadas en un digitalizador de imágenes marca BIORAD modelo CHEMIDOC, utilizando el programa QuantityOne v. 4.2®.

Con el perfil electroforético obtenido del ADN de cada uno de los materiales evaluados en los geles de poliacrilamida y con cada microsatélite, se generó una matriz de presencia (**p** = 1) y ausencia (**a** = 0). La matriz obtenida con todos los marcadores fue analizada con el programa estadístico PAST versión 1.42 (Hammer *et al.*, 2001) mediante análisis multivariado de conglomerados jerárquicos. Este análisis generó un árbol de clasificación jerárquica ascendente, utilizando el análisis de agrupamiento UPGMA y la distancia de Dice. Se determinó el porcentaje de SSR polimórfico para cada uno de los cruces.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De los 151 microsatélites (SSR) evaluados para identificar el polimorfismo entre los parentales, se encontró que el mayor porcentaje de microsatélites polimórficos fue observado en el cruce entre los cultivares Zeta 15 y Bluebonnet 50 con un 23,18%, seguido por Cimarrón y Bluebonnet 50 con un 20,53%; hallando el menor número

de microsatélites polimórficos en los cruces de D-Sativa x Venezuela 21, Zeta 15 x Venezuela 21, con un 12,58% y un 4,64%, respectivamente (Cuadro 2). Estos resultados corroboran los encontrados por Acevedo *et al.* (2007) al señalar la estrecha base genética que presentan los Bancos de germoplasmas del país.

La mayoría de los microsatélites utilizados mostraron la presencia de dos alelos bien diferenciados entre los parentales y distribuidos a lo largo de todo el genoma. En el Cuadro 3, se pudo determinar que entre Zeta 15 y Bluebonnet 50, se encontró que el 25,71% (9) de los SSR polimórficos, se ubican en el cromosoma 2, seguido con un 14,29% (5) de los microsatélites ubicados en el cromosoma 3.

Por otro lado, entre D-sativa y Venezuela 21 se localizaron 19 microsatélites polimórficos, donde el 21,06% (4) de los SSR se encuentran en el cromosoma 2 y el 15,78% (3) de los marcadores se hallaron en los cromosomas 6 y 9. Este bajo polimorfismo encontrado entre estos progenitores, posiblemente sea debido a que ambas variedades presentan un ancestro común, ya que ambas provienen del CIAT y el FLAR, tal como lo registra Pieters *et al.* (2011). Mientras que para Cimarrón y Bluebonnet 50, se identificó que el 19,36% de los SSR se ubicaron en el cromosoma 2, seguido por un 12,9% de los marcadores ubicados en los cromosomas 1, 3 y 9. Entre los parentales Zeta 15 y Venezuela 21, se apreció que el 42,85% de los microsatélites evaluados, se ubicaron en el cromosoma 2, el resto de los marcadores ubicado en los cromosomas 1, 4, 6 y 9.

Cuadro 2. Porcentaje de microsatélites (SSR) polimórficos entre los cruce realizados.

| Cruce | Progenitores | Nº SSR polimórficos | % SSR polimórficos |
|-------|--------------------------|---------------------|--------------------|
| 1 | Zeta 15 x BlueBonnet-50 | 35 | 23,18 |
| 2 | D-Sativa x Venezuela 21 | 19 | 12,58 |
| 3 | Cimarrón x BlueBonnet-50 | 31 | 20,53 |
| 4 | Zeta 15 x Venezuela 21 | 7 | 4,64 |

Cuadro 3. Número y porcentaje de microsatélites polimórficos entre los progenitores utilizados en los cruces y su distribución por cromosoma.

| Nº cromosoma | Z15/BB50 | | Vzla21/Dsat | | Cimarrón/BB50 | | Z15/Vzla 21 | |
|--------------|-----------|------------|-------------|------------|---------------|------------|-------------|------------|
| | Nº SSR | % SSR | Nº SSR | % SSR | Nº SSR | % SSR | Nº SSR | % SSR |
| 1 | 3 | 8,57 | 1 | 5,26 | 4 | 12,9 | 1 | 14,28 |
| 2 | 9 | 25,71 | 4 | 21,06 | 6 | 19,36 | 3 | 42,85 |
| 3 | 5 | 14,29 | 1 | 5,26 | 4 | 12,9 | 0 | 0 |
| 4 | 1 | 2,85 | 1 | 5,26 | 2 | 6,45 | 1 | 14,28 |
| 5 | 1 | 2,85 | 1 | 5,26 | 2 | 6,45 | 0 | 0 |
| 6 | 1 | 2,85 | 3 | 15,78 | 0 | 0 | 1 | 14,28 |
| 7 | 3 | 8,57 | 1 | 5,26 | 2 | 6,45 | 0 | 0 |
| 8 | 1 | 2,85 | 1 | 5,26 | 1 | 3,23 | 0 | 0 |
| 9 | 3 | 8,57 | 3 | 15,78 | 4 | 12,9 | 1 | 14,28 |
| 10 | 1 | 2,85 | 0 | 0 | 1 | 3,23 | 0 | 0 |
| 11 | 4 | 11,43 | 2 | 10,53 | 3 | 9,67 | 0 | 0 |
| 12 | 3 | 8,57 | 1 | 5,26 | 2 | 6,45 | 0 | 0 |
| Total | 35 | 100 | 19 | 100 | 31 | 100 | 7 | 100 |

Z15= Zeta 15; BB-50= BlueBonnet-50; Vzla21= Venezuela 21; Dsat= D-Sativa.

El polimorfismo encontrado entre los materiales y los testigos de resistencia y susceptibilidad, Makalioka y Bluebonnet 50, respectivamente, permitió determinar el grado de disimilitud existente entre ellos.

El análisis de agrupamiento UPGMA con distancia Dice, generó tres grupos (ver Figura) y una correlación cofenética de 0,87 para este estudio intraespecífico. El primer grupo constituido por Bluebonnet 50; el segundo grupo por D-Sativa, Cimarrón, Venezuela 21 y Zeta 15 y el último grupo por Makalioka. Los coeficientes de similitud de los grupos fueron 0,55; 0,74 y 0,66, respectivamente.

Se observó, claramente la separación en la formación de los grupos para las diferencias entre resistencia y susceptibilidad, específicamente para Makalioka y Bluebonnet 50. Dichos genotipos, se

ubicaron en dos grupos distintos con una distancia genética de 0,55; y por ello, las variedades comerciales venezolanas quedaron clasificadas en un mismo grupo, lo que confirma la estrecha variabilidad genética entre ellos. (Angulo *et al.*, 2006; Arnao *et al.*, 2007, Arnao *et al.*, 2008; Pérez-Almeida *et al.*, 2011a; 2011b).

La importancia de este estudio radicó en que se demostró la asociación entre microsatélites y resistencia al daño mecánico por sogata, al igual que la encontrada por Tohme (2010) quien identificó los microsatélites asociados a la resistencia a hoja blanca y el daño mecánico a sogata, mencionando que los mismos, se ubicaban en la mayoría de los casos en los cromosomas 4, 5 y 7; sin embargo, en este trabajo, se observó la presencia de al menos un marcador polimórfico en esos cromosomas.

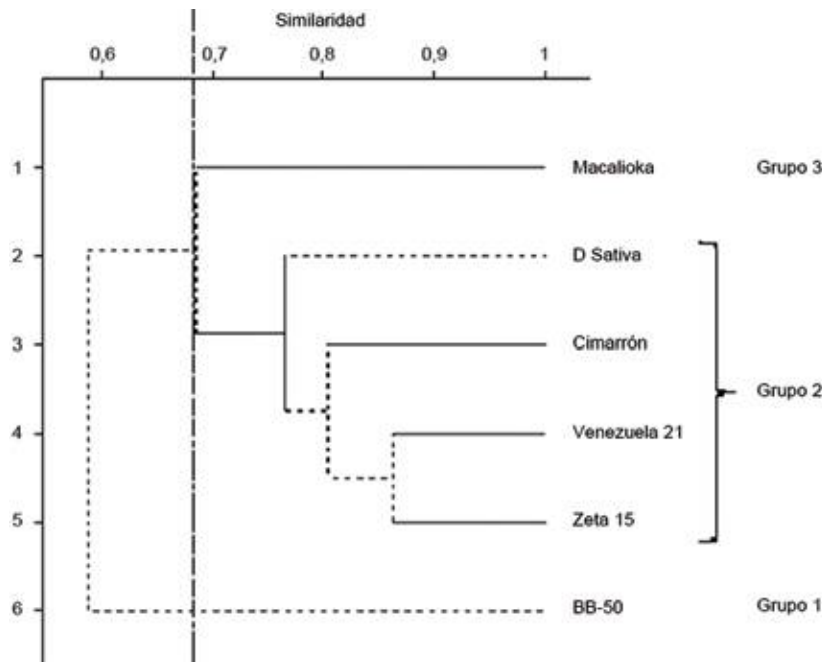


Figura. Dendrograma del análisis de agrupamiento UPGMA para seis cultivares de arroz, distancia genética de Dice.

CONCLUSIONES

La aplicabilidad de marcadores moleculares microsatélites representa una herramienta confiable en el estudio de la diversidad genética del arroz. El análisis de diversidad genética entre los cultivares de arroz mostró grupos con variabilidad genética estrecha. En el análisis de agrupamiento se evidenció la separación entre genotipos resistentes, de los susceptibles al daño mecánico por sogata.

La estrategia de marcadores moleculares microsatélites permitió identificar el polimorfismo entre los cruzamientos de genotipo de arroz resistentes y susceptibles. Este estudio puede ser la base para futuros trabajos de mapeo genético, grupos de ligamientos y asociación de microsatélites con características fenotípicas, relacionadas al daño mecánico por sogata.

LITERATURA CITADA

- los cultivares de arroz de riego liberados en Venezuela. *Agronomía Trop.* 57(3):197-204.
- Álvarez R., C. Gamboa, M. Triana, M. Duque y J. Silva. 2000. Mecanismo de resistencia a *Tagasodesorizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae) de tipo antibiótico y no preferencia en algunas líneas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Investigación Agrícola* N° 5:1-12.
- Angulo L., C. Ramis, M. Perdomo e I. Pérez-Almeida. 2006. Estudio de la Base Genética de las variedades de arroz de Venezuela a través de microsatélites. Trabajo presentado en el IX Congreso Latinoamericano de Botánica. Santo Domingo-República Dominicana.
- Arnao E., A. Vegas, Z. Gutiérrez y C. Marín. 2003. Estandarización de la técnica de PCR para la caracterización genética de una población Venezolana de *Pyricularia grisea*. *Fitopatol. Venez.* 16:3-7.
- Acevedo M., E. Torres, O. Moreno, R. Álvarez, O. Torres, W. Castrillo, G. Torrealba, E. Reyes, M. Salazar y M. Navas. 2007. Base genética de
- Arnao E., N. Rodríguez, P. Hinrinsen, Y. Jayaro, C. Ramis e I. Pérez-Almeida. 2007. Evaluación de la diversidad genética de subespecies de

- arroz usando marcadores microsatélites y AFLP. *Agronomía Trop.* 57(1):45-50.
- Arnao E., Y. Jayaro, P. Hinrinsen, C. Ramis, C. Marín e I. Pérez-Almeida. 2008. Marcadores AFLP en la evaluación de la diversidad genética de variedades y líneas élites de arroz en Venezuela. *Interciencia.* 33(5):359-364.
- Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego (FLAR). 1996. Un método simplificado para cruzamientos en arroz. Manual Técnico. CIAT, Colombia. 35 p.
- Hammer, O., D. A. Harper and P. D. Ryan. 2001. Past Paleontological Statistics Software Package for Education of Data Analysis. Versión 1.42. *Paleontología Electrónica.* 4:1-9.
- Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). 2005. Programa de arroz. Disponible en: www.inia.gob.ve. [Jul. 15, 2005].
- Jennings P. R., W. R. Coffman y H. Kauffman. 1981. Mejoramiento de Arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. 237 p.
- McCough S., X. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y. Xu, Y. Cho, N. Huamg, T. Ishii and M. Blair. 1997. Microsatellites marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology.* 35:89-99.
- Pérez-Almeida I., E. Torres, L. Angulo y M. Acevedo. 2011a. Diversidad genética entre cultivares de arroz de Venezuela con base a la estimación del coeficiente de parentesco y análisis con marcadores moleculares microsatélites (SSR). *Interciencia.* 36(7):545-551.
- Pérez-Almeida I., L. Angulo, G. Osorio, C. Ramis, A. Bedoya, R. Figueroa-Ruiz, S. Molina e I. Diógenes. 2011b. Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro.* 23(1):27-34.
- Picca A. M., N. Helguera, A. Salomón y A. Carrera. 2004. Marcadores Moleculares en Biotecnología y Mejoramiento Genético Vegetal. Editores Echenique, V., C. Rubinstein y L. Mogridki. Ediciones INTA. Argentina. 462 p.
- Pieters A., E. Graterol, E. Reyes, R. Álvarez y A. González. 2011. Cincuenta años de mejoramiento de arroz en Venezuela. ¿Que se ha logrado? *Interciencia.* 36(12):943-948.
- Remes M. 2001. *Tagosodes orizicolus* (Muir, 1926) vector del virus de la hoja blanca del arroz (HBV) en la República Argentina (Homoptera-Delphacidae). *Rev. Fac. Agronomía La Plata.* 104(2):151-156.
- Risterucci A., L. Grivet, J. Goran, I. Pieretti, M. Flamet and C. Lanaud. 2000. A high-density linkage map of *Theobroma cacao* L. *Theoretical and Applied Genetics.* 101:948-955.
- Triana M., I. Lozano, L. Calvert, R. Meneses y C. Martínez. 2004. Marcadores moleculares asociados con la resistencia a *Tagosodes orizicolus* (Muir). Disponible en línea: <http://www.CIAT.cgiar.org>. [Jul. 20, 2005].
- Tohme J. 2010. Las perspectivas desde la genómica hacia la reconstrucción del genoma del arroz. XI Conferencia Internacional del Arroz. CIAT. Cali-Colombia. Resúmenes. 45 p.
- Vivas C. L. y D. Astudillo. 2008. Enfermedades virales transmitidas por la familia Delphacidae con énfasis en el insecto sogata (*Tagosodes orizicolus*). *INIA Hoy.* 1:1-19.