

DIVERSIDAD GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE ARROZ DE VENEZUELA CON BASE A LA ESTIMACIÓN DEL COEFICIENTE DE PARENTESCO Y ANÁLISIS CON MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES (SSR)

Iris Pérez-Almeida, Edgar Torres, Luis Angulo y Marco Acevedo

RESUMEN

Se estudiaron las relaciones genéticas entre 19 cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) liberados en Venezuela durante los últimos 26 años, utilizando análisis del pedigrí y marcadores moleculares microsatélites (SSR). El coeficiente de coascendencia entre progenitores de los cruzamientos que originaron estos cultivares varió entre 0 y 24% con promedio de 9%. El coeficiente de parentesco varió entre 7,45 y 56,65% con promedio de 20,09%. El análisis de agrupamiento, utilizando el coeficiente de parentesco como medida de similaridad, indicó que las variedades venezolanas pueden agruparse en ocho grupos. De los 44 marcadores SSR utilizados, 29 resultaron polimórficos para los materiales incluidos en este estudio, produciendo 84 fragmentos polimórficos. Los alelos generados por cada iniciador mostraron 2-6 bandas, con media de 3,1. El análisis de correspondencia múltiple indicó que tres componentes principales explican 59%

de la variación y permiten el agrupamiento de las variedades estudiadas en seis grupos discretos. El análisis molecular es más preciso e informativo que el estudio de parentesco; sin embargo, no discrimina entre identidad por estado o por ascendencia, por lo que algunos individuos pueden ser agrupados aunque no necesariamente el alelo provenga de un ancestro común. Los resultados indican que las variedades de arroz usadas en Venezuela están relativamente emparentadas. El análisis de diversidad genética mostró grupos bastante similares, con $He=0,46958$. Sin embargo, existen materiales bastante divergentes, por lo que el entrecruzamiento y selección en condiciones locales puede contribuir a producir cultivares con mayor potencial de rendimiento y estabilidad, y mejor adaptabilidad a las condiciones de cultivo locales.

Introducción

El conocimiento de la diversidad genética entre cultivares en una región determinada es importante para planificar estrategias de mejoramiento y reducir la vulnerabilidad genética de los cultivos. De acuerdo con Mohammadi y Prasanna (2003), la información acerca de los niveles y patrones de diversidad genética puede ser muy útil en el mejoramiento para analizar

la variabilidad genética entre cultivares, identificar combinaciones de progenitores para crear poblaciones con diversidad máxima, e introducir genes deseables de germoplasma diverso a la base genética disponible. Esta información también es importante en el mejoramiento de híbridos para la formación de grupos o cruzamientos de alta heterosis.

Varios autores señalan que la divergencia genética entre cultivares es generalmente

desconocida y que realizar cruces, así como estudiar sus progenies, viene a ser el único recurso para determinarla. Miranda *et al.* (1988) indican que existen dos formas de evaluar la divergencia genética. Primero, métodos cuantitativos que consisten en realizar los análisis dialélicos propuestos por Griffing (1956), y por Gardner y Eberhart (1966), entre otros. La ventaja de éstos es permitir la evaluación de la divergencia genética en-

tre los progenitores y de sus híbridos, mientras que la desventaja radica en el gran número de cruces a realizar, la dificultad de llevar a cabo los cruzamientos en algunas especies y la necesidad de hacer evaluaciones en diferentes ambientes. Segundo, métodos predictivos que incluyen: a) estudios de caracteres morfológicos o agronómicos, apoyados en técnicas de análisis multivariado, b) marcadores moleculares, y c) análisis del

PALABRAS CLAVE / Arroz de Riego / Coeficiente de Parentesco / Divergencia Genética / Marcadores Moleculares Microsatélites /

Recibido: 24/02/2010. Modificado: 16/06/2011. Aceptado: 17/06/2011.

Iris B. Pérez-Almeida. Ingeniera Agrónoma y Maestría en Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV). Doctora en Biología Molecular de Plantas, Purdue University, EEUU. Investigadora, Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP), Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Dirección: Apartado 4653, Maracay 2101-Aragua, Venezuela. e-mail: iperez@inia.gob.ve

Edgar A. Torres. Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional Experimental de los Llanos Ezequiel Zamora (UNELLEZ), Venezuela. Maestría en Mejoramiento de Plantas, Universidad Nacional de Colombia. Doctor en Genética y Mejoramiento de Plantas, Universidade de São Paulo, Brasil. Fito-mejorador, Programa Arroz, Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, Colombia y Fundación Nacio-

nal del Arroz (Fundarroz), Araure, Venezuela. e-mail: e.a.torres@cgiar.org

Luis Rafael Angulo Graterol. Licenciado en Ciencias Naturales, Universidad Pedagógica Experimental Libertador (UPEL), Venezuela. Maestría en Agronomía, UCV, Venezuela. Consultor, INIA-CENIAP, Venezuela. e-mail: angulo-luis2009@gmail.com

Marco A. Acevedo Barona. Ingeniero Agrónomo y Maestría en Agronomía, UCV, Venezuela. Doctorado en Genética y Mejoramiento Genético de Plantas, Universidade de São Paulo, Brasil. Investigador, Centro de Investigaciones Agrícolas Estado Guárico, INIA, Venezuela. e-mail: ma-acevedo@inia.gob.ve

GENETIC DIVERSITY AMONG VENEZUELAN RICE CULTIVARS BASED ON PARENTAGE COEFFICIENT ESTIMATION AND ANALYSIS USING MICROSATELLITE MOLECULAR MARKERS (SSR)

Iris Pérez-Almeida, Edgar Torres, Luis Angulo and Marco Acevedo

SUMMARY

Genetic relationships among 19 rice (*Oryza sativa* L.) varieties released in Venezuela during the last 26 years were studied using pedigree and microsatellite molecular markers (SSR) analysis. Co-ancestry values among parents used in crosses that originated these cultivars varied between 0 and 24%, with an average of 9%. In turn, the coefficient of parentage between cultivar pairs ranged from 7.45% to 56.65%, with an average of 20.09%. Cluster analysis using the coefficient of parentage as a measure of similarity indicated that Venezuelan varieties can be grouped into eight distinctive sets. It was found that 29 out of 44 SSR markers were polymorphic, originating 84 polymorphic fragments. Alleles generated by each primer showed between 2 and 6 bands, with average of 3.1. Multiple correspondence anal-

yses showed that three eigenvalues explained 59% of variance allowing grouping of the studied varieties in six discrete sets. It was observed that molecular analysis is more precise and informative than pedigree analysis; however, it does not distinguish between identity by descent or identity by state. Therefore, some genotypes could be grouped together even though they do not have a common ancestor. These results show that Venezuelan rice varieties are related. Genetic diversity analysis yields highly similar groups, with $H_e = 0.46958$. Nonetheless, there are largely divergent materials and in consequence intercrossing and selection under local conditions could produce new cultivars with a higher yield potential, higher stability and better adaptability to the local growing conditions.

DIVERSIDADE GENÉTICA ENTRE CULTIVARES DE ARROZ DA VENEZUELA COM BASE NA ESTIMATIVA DO COEFICIENTE DE PARENTESCO E ANÁLISES COM MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES (SSR)

Iris Pérez-Almeida, Edgar Torres, Luis Angulo e Marco Acevedo

RESUMO

Estudaram-se as relações genéticas entre 19 cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.), liberados na Venezuela durante os últimos 26 anos, utilizando análise do pedigree e marcadores moleculares microssatélites (SSR). O coeficiente de co-ascendência entre progenitores dos cruzamentos que originaram estes cultivares variou entre 0% e 24% com média de 9%. O coeficiente de parentesco variou entre 7,45% e 56,65% com média de 20,09%. A análise de agrupamento, utilizando o coeficiente de parentesco como medida de similaridade, indicou que as variedades venezuelanas podem classificar-se em oito grupos. Dos 44 marcadores SSR utilizados, 29 resultaram polimórficos para os materiais incluídos neste estudo, produzindo 84 fragmentos polimórficos. Os alelos gerados por cada iniciador mostraram 2-6 bandas, com média de 3,1. A análise de correspondência múltipla indicou que três componentes principais

explicam 59% da variação e permitem o agrupamento das variedades estudadas em seis grupos discretos. A análise molecular é mais precisa e informativa que o estudo de parentesco; no entanto, não discrimina entre identidade por estado ou por ascendência, pelo qual alguns indivíduos podem ser agrupados mesmo que o alelo não provenha necessariamente de um ancestral comum. Os resultados indicam que as variedades de arroz usadas na Venezuela estão relativamente aparentadas. A análise de diversidade genética mostrou grupos bastante similares, com $H_e = 0,46958$. No entanto, existem materiais bastante divergentes, pelo que o entrecruzamento e seleção em condições locais podem contribuir a produzir cultivares com maior potencial de rendimento e estabilidade, e melhor adaptabilidade às condições de cultivo locais.

pedigrí con base en el coeficiente de parentesco.

En arroz, el análisis de la genealogía ha sido utilizado para medir la diversidad genética y ha permitido comprender la estructura poblacional y planear estrategias para la incorporación de nuevo germoplasma. Dilday (1990), trabajando en arrocetes de EEUU, reportó valores del coeficiente de parentesco (r_{xy}) alto, tanto para las variedades de grano medio 'Calrose' y 'Caloro', como para las variedades de grano largo 'Lebonnet' y 'Lemont' con $r_{xy} = 90\%$

y $r_{xy} = 72\%$, respectivamente. Cuevas-Pérez *et al.* (1992), trabajando con las variedades de arroz de riego de América Latina, encontraron que el coeficiente de parentesco medio dentro de los países varió entre 41% para Costa Rica y 0% en Chile. Los cultivares de Venezuela tuvieron un coeficiente de parentesco promedio de 16% con el resto de Latinoamérica y fueron más similares a las variedades colombianas.

Con el advenimiento de nuevas técnicas para el estudio del genotipo, los marcadores

moleculares han sido incorporados en el análisis de la diversidad genética. Cao y Card (1997) compararon los métodos de pedigrí y RAPD en 26 materiales éliticos recomendados para el estado de Louisiana, EEUU. Estos autores reportan que las distancias genéticas obtenidas por ambos métodos fueron similares y permitieron clasificar los cultivares en grano medio y largo. Sin embargo, las distancias promedio obtenidas por el método del pedigrí fueron significativamente superiores a las estimadas por RAPD para ambos ti-

pos de granos. Además, ambos métodos agruparon a los cultivares estudiados con similar ciclo de maduración o por tipo de grano en el análisis de agrupamiento, concluyendo que el método de RAPD puede ser usado para establecer relación genética en cultivares de arroz cuando se conozca o no el pedigrí de los mismos.

Los microssatélites, un tipo de marcador molecular basado en secuencias repetitivas, han sido utilizados para medir diversidad genética de especies como arroz (*Oryza sativa*) y maíz (*Zea mays*). Reciente-

mente han aparecido informes del uso de microsatélites para analizar la estructura genética de las poblaciones en diversos cultivos, tales como frijol (Blair *et al.*, 2008), maíz (Balestre *et al.*, 2008), caña de azúcar (Parida *et al.*, 2009), algodón (Abdurakhmonov *et al.*, 2008), uva (Cipriani *et al.*, 2008), alfalfa (Badri *et al.*, 2008), y *Brassica napus* (Cheng *et al.*, 2009). En arroz se ha demostrado que los marcadores microsatélites se distribuyen de manera relativamente uniforme por todo el genoma y detectan un alto nivel de diversidad alélica en variedades cultivadas y especies lejanamente relacionadas (McCouch *et al.*, 1997). Los microsatélites o SSR son codominantes, abundantes, de alta reproducibilidad y exhiben un alto grado de variación alélica (Temnykh *et al.*, 2000; 2001).

En Venezuela se ha explorado la diversidad genética a través de microsatélites en algunas variedades de arroz (Angulo *et al.*, 2006; Labrin Sotomayor, 2006; Arnao *et al.*, 2007; Ghneim *et al.*, 2008). Estos estudios evidenciaron la baja diversidad existente en los materiales evaluados. Ghneim *et al.* (2008) concluyeron que los marcadores SSR fueron altamente poderosos para distinguir materiales emparentados y confirmaron que los materiales actualmente utilizados en el país están emparentados entre ellos y aún con cultivares liberados hace más de 20 años, poniendo en evidencia la posible vulnerabilidad genética del sistema.

El objetivo de este trabajo fue estudiar la diversidad genética entre cultivares de arroz de Venezuela utilizando dos métodos; el análisis teórico del pedigrí y marcadores moleculares microsatélites, los cuales fueron comparados.

Materiales y Métodos

Para estudiar la diversidad genética entre las variedades comerciales de Venezuela fueron analizadas las genealogías

TABLA I
VARIEDADES DE ARROZ DE RIEGO LIBERADAS EN LOS ÚLTIMOS 29 AÑOS
EN VENEZUELA

Cultivar	Cruzamiento	Año	Θ_{xy}^1
Araure 1	R 930-147-13/COLOMBIA 1	1978	0,00
Ciarllacen 1	IR 665-23-3-1//IR 841-63-5-104-1B/C 46-15	1979	0,11
Araure 2	P 901-22-7-2-3-2-1B/P 918-25-1-4-2-3-1B//P 914-43-8-3-5-2-1B/P 920-7-4-3-3-1-1B	1982	0,15
Araure 3	IR8//5×PETA/BELLE PATNA	1984	0,24
Araure 4	CICA 7//CICA 8/REMADJA	1984	0,07
Cimarrón	CHIANUNG SIPI 611330//IR 34//IR 1563-15-3-3	1988	0,08
Palmar	CICA 7//CICA 8/PELITA I-1	1988	0,08
Fonaiaip 1	P 1386-6-8M-1-3M-1//CAMPONI/TAPURIPA	1993	0,02
Fonaiaip 2	COLOMBIA 1/2×P 1274-6-8M-1-3M-1//P 2060-F4-2-5-2	1993	0,10
Fonaiaip 2000	P 5446-6-3-2//IR 5/INIAP 415//COLOMBIA 1/P 1274-6-8M-1-3M-1/4/P 3059-F4-79-1	2000	0,07
Fundarroz PN-1	P 3084-F4-56-2-2/FARO 37//CT 8154-1-9-2	2000	0,09
Zeta 15	P 3050-F4-52/ORYZICA 1//IR 21015-72-3-3-3-1	2000	0,05
D-Primera	IR 2823-103-5-1//IR 5533-13-1-1//IR 43	2001	0,13
D-Sativa	P 3050-F4-52/ORYZICA 1//IR 21015-72-3-3-3-1	2002	0,05
Fedearroz 50	P 1274-6-8M-1-3M-1/ORYZICA LLANOS 4	2002	0,16
Venezuela 21	CT 8008-16-31-3P-M//CT 9682-2-M-14-1-M-1-3P-M-1/CT 10310-15-3-2P-4-3	2003	0,09
Fedearroz 2000	P 3084-F4-56-2-2/P 3844-F3-19-1-1B-1X//CT 8154-1-9-2	2004	0,07
D-Oryza	P 3084-F4-56-2-2/P 3844-F3-19-1-1B-1X//CT 6096-7-4-4-3-M	2005	0,10
Centauro	ECIA 38-2-4-2-5-6/CT 8222-7-6-2P-1X//FB007-3-1-6-1-M	2006	0,07

de 19 cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.) liberados durante los últimos 29 años (1978-2006; Tabla I). Estos materiales tienen o han tenido áreas cultivadas importantes en el país y sus pedigríes son conocidos. Por el contrario, otros genotipos cuyas ascendencias no eran conocidas, fueron excluidos de este estudio.

La información de la genealogía utilizada en este estudio fue obtenida por consulta en bases de datos. Entre ellas están el Sistema Internacional de Información de Arroz (International Rice Information System, IRIS; www.irri.cgiar.org/IRIS); la base de datos del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT; Martínez *et al.*, 1995); y la publicación sobre registros de cruzamientos realizados por el programa de arroz del Instituto Colombiano Agropecuario (ICA) y el CIAT durante el periodo 1957-1986 (CIAT, 1987).

La información del pedigrí fue utilizada para calcular el coeficiente de parentesco (r_{xy}) para todos los pares de combinaciones de los 19 genotipos. Los supuestos para este tipo de análisis fueron expuestos por St. Martin (1982) y son: a) los ancestros y cul-

tivares son homocigotos y homogéneos, b) genotipos sin ancestrales comunes no están relacionados y el coeficiente de consanguinidad es cero ($F=0$), y c) los progenitores contribuyen igualmente a la progenie. En un sentido general, ésta es una medida de la ascendencia común entre dos genotipos y de la diversidad genómica latente (ICIS, 2011).

Para construir el dendrograma se utilizó como medida de similaridad el coeficiente de parentesco tal como es mencionado por Gopal y Oyama (2005). Los materiales fueron agrupados mediante el uso del método de fusión de los promedios no ponderados (UPMGA).

Extracción de ADN y amplificación de los SSR

Se tomaron muestras de tejidos de hojas jóvenes en plántulas de 15 días de edad de los 19 materiales de arroz incluidos en este estudio (Tabla I) que fueron germinados a partir de semilla genética o de fundación, suministradas por los respectivos programas de mejoramiento para garantizar su pureza genética. En esta etapa del estudio no se dispuso de semilla de la va-

riedad Ciarllacen 1, la cual fue sustituida por su pariente CICA 9.

El ADN se extrajo utilizando la metodología de Zambrano *et al.* (2002). La calidad y cantidad del ADN fueron observadas en gel de agarosa 0,8% teñido con bromuro de etidio, bajo luz UV, comparando con estándares comerciales de concentración conocida.

Para realizar las reacciones de PCR se utilizaron $\sim 20\text{ng}\cdot\mu\text{l}^{-1}$ de ADN; $1,5\mu\text{l}$ de Buffer 10X; $1,5\mu\text{l}$ MgCl_2 (25mM); $2,5\mu\text{l}$ de cada iniciador (2uM); $0,25\mu\text{l}$ dNTPs (20mM) y $0,1\mu\text{l}$ de la Taq Promega ($5\text{U}/\mu\text{l}^{-1}$), para un volumen final de reacción de $15\mu\text{l}$. Se utilizó un termociclador MJ Research PTC-100 durante 34 ciclos a una temperatura de alineación de 55°C .

Se evaluaron 44 microsatélites ubicados en todo el genoma del arroz (Tabla II) y se visualizaron en gel de poliacrilamida 6% con revelado en nitrato de plata, en un digitalizador de imágenes marca BIO-RAD modelo CHEMIDOC, utilizando el programa Quantity One v. 4.2[®] y capturando las imágenes digitalmente. A partir de estas últimas se estimó el peso molecular de los alelos para cada SSR.

TABLA II
INICIADORES MICROSATÉLITES (SSR) UTILIZADOS EN ESTE ESTUDIO

No	SSR	Cromosoma	Nº Alelos	pb	Motivo Repetido	Secuencia sentido	Secuencia antisentido
1	RM237	1	3	126-132	(CT)18	caaatcccactgctgtcc	tgggaagagagcactacagc
2	RM283	1	1	150	(GA)18	gtctactgtaccctgttggg	cgcatgagagctgtgatg
3	RM490	1	3	113-131	(CT)13	atctgcacactgcaaacacc	agcaagcagtgcttfcagag
4	RM174	2	2	241-257	(AGG)7(GA)10	agcgacgccaagacaagtggg	tccacgtcgatgacacgacgg
5	RM250	2	1	140	(CT)17	ggtfcaaaccaagctgatca	gatgaaggcctccacgcag
6	RM279	2	3	118-137	(GA)16	gcgggagaggatctctct	ggctaggagttaacctcgcg
7	RM555	2	2	269-279	(AG)11	ttgatcagccaaaggagac	cagcattgtggcatggatac
8	RM3639	2	2	134-142	(GA)13	catggccaatctagctagc	tgcaactctcaactccaag
9	RM16	3	1	310	(TCG)5(GA)16	cgtagggcagcatctaaa	aacacagcaggtacgcgc
10	RM85	3	3	108-144	(TGG)5(TCT)12	ccaaagatgaacctggattg	gcacaaggtgagcagctcc
11	RM148	3	2	138-148	(TG)12	atacaacattaggatgagctgg	tccttaagggtggtcaatgagc
12	RM203	3	1	260	(AT)21	cctatcccattgccaacattgc	gattfacctcgacccaacctg
13	RM231	3	2	115-132	(CT)16	ccagattatttctgaggtc	cacttgcatagtctgcatg
14	RM545	3	4	238-272	(GA)30	caatgfcagagacccaaaag	ctggcatgtaacgacagtg
15	RM119	4	1	166	(GTC)6	catcccctgctgctgctgctg	cgccggatgtgtggactagcg
16	RM551	4	4	192-221	(AG)18	agcccagactagcatgattg	gaagggcagaaggatcacag
17	RM303	4	1	145	[AC(AT)2-10]9(GT)7(ATGT)6	gcatggccaatattaagg	ggttggaaatagaagttcgg
18	RM13	5	6	125-161	(GA)6-(GA)16	tccaacatggcaagagagag	ggtggcattcgattccag
19	RM122	5	2	264-274	(GA)7A(GA)2A(GA)11	gagtcgatgtaatgtcatcagtc	gaagaggtatcgcttgtggac
20	RM164	5	3	240-325	(GT)16TT(GT)4	tcttggccgtcactgcagatattc	gcagcccaatgctacaattctc
21	RM169	5	3	161-190	(GA)12	tggctgctccgtgggtagctg	tcccgttgccttcatccctcc
22	RM111	6	2	114-116	(GA)9	cacaacctttgagcaccgggtc	acgcctgcagctgatcaccgg
23	RM190	6	3	94-110	(CT)11	ctttgtctatctcaagacac	ttgcagatgttcttctgatg
24	RM204	6	4	83-167	(CT)44	gtgactgactgtgcataggg	gtagccatgctctctgacc
25	RM253	6	1	190	(GA)25	tccttcaagatgcaaaacc	gcattgcatgctgaagcc
26	RM484-485	6	3	86-111	(CT)n	ctttgtctatctcaagacac	ttgcagatgttcttctgatg
27	RM11	7	1	130	(GA)17	tctctcttcccccgatc	atagcgggagaggttag
28	RM134	7	1	105	(CCA)7	acaagggcgcgagaggattccg	gctctccggtgctccgattgg
29	RM234	7	1	160	(CT)25	acagatccaaggccctgg	cacgtgagacaagacggag
30	RM336	7	5	116-172	(CTT)18	cttacagagaaaacggcatcg	gctggtttttcagggttcg
31	RM346	7	2	146-172	(CTT)18	cgagagagcccataactacg	acaagacgacgagggaggac
32	RM25	8	4	138-165	(GA)18	ggaaagaatgatctttcatgg	ctaccataaaacaatgffc
33	RM3855	9	1	160	(GA)25	aatttcttggggaggagagg	agtatccggatcttcccc
34	RM216	10	3	133-149	(CT)18	gcatggccgatgtaaag	tgataaaaaccacagggcca
35	RM222	10	4	225-245	(CT)18	cttaaatggccacatgcg	caaaagctccggccaaaag
36	RM228	10	2	134-152	(CA)6(GA)36	ctggccattagtccttgg	gcttgcggctctgcttac
37	RM239	10	1	148	(AG)5TG(AG)2	tacaaaatgctgggtacccc	acatatggagcccactgtc
38	RM496	10	1	258	(TC)14	gacatgcaacaacgacatc	gctgcggcgtgttatac
39	RM21	11	5	189-241	(GA)18	acagtattccgtagggcacgg	gctccatgaggggtgtagag
40	RM144	11	4	260-313	(ATT)11	tgccctggcgcaaatgtatcc	gctagaggagatcagatgtagtc
41	RM167	11	2	113-117	(GA)16	gatccagcgtgaggaacacgt	agtccgaccacaaggtcggtg
42	RM224	11	3	129-161	(AAG)8(AG)13	atcgatcgatctcagagg	tgctataaaagcattcggg
43	RM270	12	1	106	(GA)13	ggccgttgggtctaaaatc	tgccgagtatcatcgccgag
44	RM309	12	1	140	(GT)13	gtagatcacgcactttctgg	agaagcctccgggtgaag

Promedio de alelos por loci polimórficos= 3,1; índice de diversidad de Nei= 0,466.

Para el análisis de la diversidad genética utilizando marcadores microsatélites se realizó un análisis de correspondencia múltiple. Esta técnica, equivalente al análisis de componentes principales en variables categóricas, es una técnica descriptiva de análisis multivariado que busca identificar estructu-

ras en la población bajo estudio en términos de variables e individuos representados en un espacio tridimensional. Ello permitió determinar la presencia de grupos entre los genotipos estudiados e inferir las relaciones entre los mismos.

El cálculo del coeficiente de parentesco se realizó utilizando

el Módulo TDM_GMS BROWSE de las herramientas bioinformáticas desarrolladas por el International Crop Information System (ICIS; www.icis.cgiar.org/icis/). El dendrograma fue generado utilizando la función *Tree Plot* del programa NTSYS (Rohlf, 1997). El análisis de

correspondencia múltiple (ACM) se realizó utilizando el *Pros Corresp* de SAS (1996).

Resultados y Discusión

El coeficiente de parentesco (r_{xy}) entre las variedades comerciales estuvo entre 0,07 y 0,99 (Tabla III), con varios

TABLA III
VALORES DEL COEFICIENTE DE PARENTESCO (r_{xy}) ENTRE VARIEDADES
COMERCIALES DE ARROZ LIBERADAS EN LOS ÚLTIMOS 29 AÑOS EN VENEZUELA

Genotipo	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19
1	1,00																		
2	0,31	1,00																	
3	0,31	0,48	1,00																
4	0,18	0,20	0,30	1,00															
5	0,16	0,21	0,22	0,19	1,00														
6	0,26	0,34	0,30	0,27	0,15	1,00													
7	0,14	0,19	0,29	0,18	0,11	0,17	1,00												
8	0,18	0,20	0,29	0,40	0,19	0,27	0,17	1,00											
9	0,11	0,12	0,17	0,19	0,10	0,21	0,07	0,19	1,00										
10	0,26	0,44	0,39	0,24	0,20	0,26	0,16	0,23	0,13	1,00									
11	0,19	0,26	0,29	0,17	0,13	0,18	0,16	0,16	0,09	0,19	1,00								
12	0,16	0,21	0,23	0,15	0,11	0,16	0,12	0,14	0,10	0,16	0,53	1,00							
13	0,23	0,26	0,28	0,15	0,11	0,26	0,14	0,15	0,13	0,22	0,20	0,18	1,00						
14	0,26	0,28	0,28	0,20	0,15	0,20	0,14	0,20	0,15	0,22	0,17	0,20	0,16	1,00					
15	0,29	0,30	0,29	0,16	0,12	0,37	0,14	0,16	0,17	0,27	0,14	0,19	0,57	0,16	1,00				
16	0,16	0,20	0,21	0,16	0,10	0,15	0,10	0,16	0,12	0,16	0,11	0,32	0,12	0,37	0,12	1,00			
17	0,17	0,21	0,25	0,17	0,15	0,18	0,12	0,18	0,13	0,19	0,14	0,13	0,14	0,15	0,17	0,11	1,00		
18	0,17	0,20	0,29	0,14	0,11	0,16	0,15	0,16	0,10	0,18	0,16	0,13	0,20	0,17	0,13	0,14	0,12	1,00	
19	0,19	0,26	0,29	0,17	0,13	0,18	0,16	0,16	0,09	0,19	0,99	0,53	0,20	0,17	0,14	0,11	0,14	0,16	1,00

1: D-Oryza, 2: Ciallarcen 1, 3: Araure 3, 4: Araure 4, 5: Fonaiaip 1, 6: Fonaiaip 2, 7: Cimarrón, 8: Palmar, 9: Araure 1, 10: Araure 2, 11: D-Sativa, 12: Venezuela 21, 13: Centauro, 14: Fedearroz 2000, 15: Fedearroz 50, 16: Fundarroz PN1, 17: Fonaiaip 2000, 18: D-Primera, 19: Z-15

cultivares altamente relacionados ($r_{xy} \geq 0,50$) entre sí. De forma general, tres variedades están poco relacionadas con las variedades sembradas en Venezuela como un todo, éstas son Araure 1, Fonaiaip 1 y Cimarrón, las cuales poseen r_{xy} promedio con el grupo de 0,13; 0,15 y 0,15, respectivamente. Entretanto, existen otros materiales que comparten gran parte de sus genes (>50%), entre los que están D-Sativa y Z-15 ($r_{xy} = 0,99$) por ser dos cultivares seleccionados del mismo cruce; Venezuela 21 con D-Sativa ($r_{xy} = 0,53$); Venezuela 21 con Z-15 ($r_{xy} = 0,53$) pues el cruce que originó a las variedades (D-Sativa o Zeta 15) fue progenitor de Venezuela 21; Fedearroz 50 con Centauro ($r_{xy} = 0,57$) dado que Fedearroz 50 es progenitor de Centauro. Existen otras relaciones intermedias del coeficiente de parentesco que varían entre $0,30 \leq r_{xy} < 0,50$, las cuales son Palmar con Araure 4 ($r_{xy} = 0,40$) por tener en común dos progenitores; Cica 7 y Cica 8; y Fedearroz 50 con FONAIAP 2 ($r_{xy} = 0,37$), materiales que comparten genes de germoplasma de secano; Fundarroz PN-1 con Venezuela 21 ($r_{xy} = 0,32$) pue-

to que la primera es progenitora de la segunda.

Tomando como referencia un valor arbitrario de similitud de 0,20 que corresponde al parecido de una familia de medios hermanos, los genotipos estudiados pueden ser separados en ocho grupos distintos (Figura 1): grupo 1 (Oryza, Cica 9, Araure 3, Araure 2, Fonaiaip 2, Centauro, Fedearroz 50, Araure 4 y Palmar), grupo 2 (D-Sativa, Z-15 y Venezuela 21), grupo 3 (Fedearroz 2000 y Fundarroz PN-1), grupo 4 (D-Primera), grupo 5 (Fonaiaip 2000), grupo 6 (Cimarrón), grupo 7 (Fonaiaip 1), y grupo 8 (Araure 1).

Se encontró que 29 de los 44 marcadores SSR seleccionados resultaron polimórficos (Tabla II) produciendo 84 fragmentos polimórficos. Quince SSR (RM11, RM16, RM119, RM134, RM203, RM234, RM239, RM250, RM253, RM270, RM283, RM303, RM309, RM496, RM3855) fueron monomórficos en los materiales incluidos en este estudio. Entre los polimórficos, los alelos generados por cada iniciador fueron de 2 a 6, con media de 3,1.

Algunos de los iniciadores utilizados en este estudio pre-

sentan alelos únicos que permiten la identificación de cultivares, denotando la utilidad de los SSR (Tabla IV). Por ejem-

plo, los alelos 2, 3 y 4 del iniciador RM21 diferencian las variedades Fedearroz 2000, Cimarrón y Fonaiaip 2, respectivamente. Los alelos 2 y 3 del iniciador RM279 son únicos para Fonaiaip 1 y D-Oryza. Igualmente, dos de los iniciadores evaluados presentan alelos únicos para distinguir la variedad Fonaiaip 2000 (alelo 2 del RM169 y alelo 1 del RM222); el alelo 1 del RM174, para Centauro; alelo 2 del RM224 para Fundarroz PN-1; el alelo 1 del RM228 para Fonaiaip 1; el alelo 2 del RM231 para D-Primera y el alelo 1 del RM551 para Araure 3.

El ACM indicó que un 58,75% de la inercia total es explicada por tres componentes. Mientras en el análisis de agrupamiento utilizando estas dimensiones se encontraron seis grupos (Figura 2): grupo I (Fedearroz 50, Fonaiaip 2, Araure 1, Araure2, Araure 3, Araure 4, Centauro y Cica 9), grupo II (Fonaiaip 2000, Cimarrón y D-Primera), grupo III (Zeta 15 y D-Sativa), grupo IV (Fedearroz

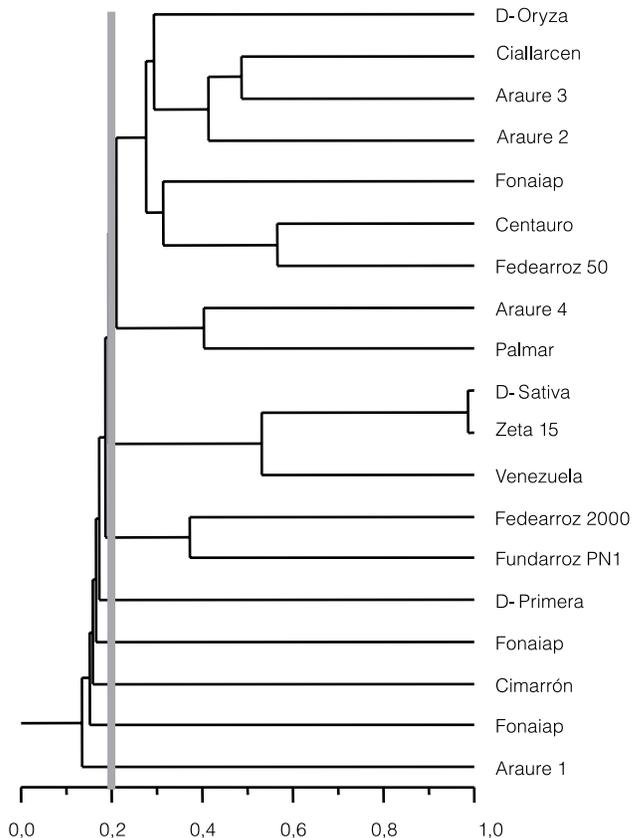


Figura 1. Dendrograma basado en similitud (r_{xy}) entre 19 cultivares de arroz utilizados en Venezuela

2000, Fundarroz PN1 y Venezuela 21), grupo V (D-Oryza y Fonaiaip 1), y grupo VI (Palmar).

En general, hubo poca coincidencia entre el análisis de pedigrí y el análisis de diversidad. El análisis molecular de diversidad agrupó a Fonaiaip 2000, D-Primera y Cimarrón, que formaban grupos individuales, en un solo grupo. Reunió a D-Oryza y Fonaiaip 1 en un grupo y a Fedearroz 50 y a Centauro en otro grupo. Entretanto, Venezuela 21 fue agrupada con Fundarroz PN1, y Araure 1 pasó a formar parte de un gran grupo junto a Araure 2, Araure 3, Araure 4, Palmar, Cica 9 y Fonaiaip 2. El análisis gráfico (Figura 2)

muestra en un espacio tridimensional las interrelaciones entre las 19 variedades comerciales, mostrando su distribución en grupos discretos. En este gráfico cabe notar que, por ejemplo, en el caso de Venezuela 21, aunque fue agrupada junto a Fundarroz PN1, está muy cerca del grupo formado por D-Sativa y Zeta-15. Esta variedad es derivada de un cruzamiento triple que involucra a D-Sativa como el tercer progenitor y Fundarroz PN1 como madre del cruce simple; entonces el análisis del pedigrí indica que teóricamente posee 50% de los genes de D-sativa y la agrupa con ésta; el análisis molecular indica que en realidad esta línea en particular heredó un mayor porcentaje de sus genes de Fundarroz PN1.

Estos resultados muestran que el análisis molecular es más preciso e informativo; sin embargo, no discrimina entre alelos idénticos por descendencia y alelos idénticos por estado, por lo que algunos individuos pueden ser agrupados aunque no necesariamente estén emparentados. Por otra parte, los microsatélites representan alelos neutrales que teóricamente no están

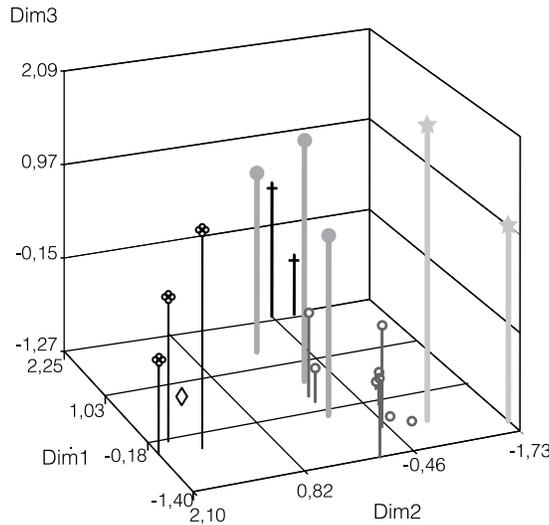


Figura 2. Resultado gráfico del análisis de correspondencia múltiple de las variedades estudiadas a partir de 44 SSR. Araure 1, Fonaiaip 2, Araure 4, Araure 3, Cica 9, Araure 2, Fedearroz 50 y Centauro conforman un mismo grupo (barra con círculo lleno); Fonaiaip 2000, Cimarrón, y D-Primera se ubican en un segundo grupo (barra con triángulos); Zeta 15 y D-Sativa en el mismo grupo 3 (barra con cruces); Fonaiaip1 y D-Oryza en el grupo 4 (barra con estrellas); Fedearroz 2000, Fundarroz PN1 y Venezuela 21 en el grupo 5 (barra con círculos vacíos); y Palmar conforma el grupo 6 (barra con rombo).

sometidos a procesos de selección, por lo que estos grupos no tendrían relación con la adaptación de los materiales.

El análisis gráfico es muy informativo pues permite observar la relación entre los grupos; por ejemplo, el grupo formado por D-Sativa y Zeta 15 está en una posición opuesta al grupo formado por Fonaiaip 2000, Cimarrón y D-Primera.

Los resultados obtenidos confirman que los cultivares

utilizados en Venezuela poseen una base genética estrecha. La diversidad genética disponible en el germoplasma estudiado y las estrategias para su uso vienen siendo discutidas entre los fitomejoradores del cultivo arroz en el país. Un estudio previo realizado por Acevedo *et al.* (2007) indica que la base genética del germoplasma de arroz es estrecha, dado que cinco ancestrales están presentes en todas las variedades y contribuyen con 52% del conjunto génico, y 16 ancestrales tienen una contribución genética acumulada de 80%, lo que es confirmado por los resultados del presente estudio. El coeficiente de parentesco promedio obtenido entre

el conjunto de variedades como un todo fue de $r_{xy} = 0,20$, superior al mostrado por Cuevas-Pérez *et al.* (1992), indicando que el parentesco entre las variedades comerciales ha aumentado desde esa fecha al presente. Los resultados del análisis de pedigrí fueron confirmados con el análisis molecular de diversidad, el cual mostró que existen varios genotipos que comparten gran parte de sus genes.

Los estudios de estructura genética de las variedades de arroz de Venezuela utilizando marcadores moleculares han confirmado los resultados del análisis teórico. El primer estudio (Angulo *et al.*, 2006) abarcó 12 cultivares y generó cuatro grupos en el análisis de agrupamiento UPGMA, 50% de loci polimórficos, 1,76 alelos promedio por locus y un índice de diversidad de Nei de 0,166 evidenciando poca diversidad existente en los materiales evaluados. También se realizó un estudio en líneas élites de arroz venezolanos a través de cinco combinaciones de marcadores AFLP (Arnao *et al.*, 2008), donde se registraron 220 bandas desde 25 a 300pb, de las que 60 (27,27%) resultaron polimórficas, con un promedio de 12 bandas por combinación; en el análisis de agrupamiento se identificaron cinco grupos a una distancia de 0,50 unidades ultramétricas. Este último estudio incluyó arroces cultivados y arroces rojos. El primer grupo quedó conformado sólo por arroces rojos; los grupos restantes estuvieron constituidos tanto por variedades como por líneas experimentales avanzadas del cultivo. Las combinaciones AFLP permitieron la diferenciación de todos los materiales, observándose asociación entre los agrupamientos generados y la constitución genética de los genotipos. El trabajo corroboró la utilidad de los AFLP como herramienta para discriminar entre individuos altamente emparentados. Un informe más reciente (Ghneim *et al.*, 2008), incluyó 11 materiales cultivados bajo riego en el país así como siete arroces silvestres y sus cruzamientos, para un total de 18 materiales. Los SSR fueron altamente poderosos para distinguir genéticamente entre materiales genéticamente cercanos, y se validó su uso en la caracterización molecular de accesiones; el estudio confirmó que los materiales que están bajo cultivo actualmente en el país están emparentados entre ellos y aún con variedades producidos hace 20 años, lo cual denota la vulnerabilidad genética del sistema.

El presente estudio reunió 19

TABLA IV
INICIADORES EVALUADOS QUE PRESENTARON ALELOS ÚNICOS PARA LA IDENTIFICACIÓN DE VARIEDADES EN LOS 19 GENOTIPOS DE ARROZ ESTUDIADOS

Iniciador	Alelo	pb	Variedad
RM21	Alelo 2	236	Fedearroz 2000
	Alelo 3	228	Cimarrón
	Alelo 4	220	Fonaiaip 2
RM169	Alelo 2	176	Fonaiaip 2000
RM174	Alelo 1	257	Centauro
RM222	Alelo 1	245	Fonaiaip 2000
RM224	Alelo 2	156	Fundarroz PN1
RM228	Alelo 1	152	Fonaiaip 1
RM231	Alelo 2	115	D-Primera
RM279	Alelo 2	131	Fonaiaip 1
	Alelo 3	118	D-Oryza
RM551	Alelo 1	221	Araure 3

materiales, 16 generados en el país y tres en Colombia, aunque todos se encuentran o se han encontrado bajo siembra en Venezuela durante los últimos 26 años o más. Se analizó a profundidad la estructura genética de tales variedades de arroz, utilizando el coeficiente de parentesco y el análisis genético empleando 44 marcadores moleculares SSR, lo cual ha permitido obtener una visión más detallada de la situación actual. El análisis de diversidad genética mostró grupos bastante similares, con $He = 0,46958$.

Los temas de la vulnerabilidad genética en los cultivos y la base genética estrecha que impide mayores ganancias por selección, deben ser analizados cuidadosamente. Según lo discuten Rajaran *et al.* (2002) el objetivo principal en el mejoramiento de una determinada especie debe ser incorporar diversidad genética para resistencia a enfermedades e insectos y combinarla con homogeneidad para aquellos caracteres agronómicos y morfológicos que confieren altos rendimientos, adaptabilidad y estabilidad. Esto indica que, aunque la uniformidad genética no necesariamente conduce a epidemias inmediatas, es deseable tener un conjunto génico más diverso entre los cultivares en uso. De esta forma, genes de resistencia originados de progenitores diversos introgresados en los cultivares élites podrían ofrecer mayor protección contra apariciones inesperadas de plagas. Sin embargo, es fundamental mantener varias características, tales como arquitectura de la planta, resistencia a vuelco, tipo de grano y varios caracteres relacionados con calidad de grano, que estén relacionadas con la adaptación de las variedades a las condiciones de cultivo, la capacidad de rendimiento y la aceptación de los cultivares por los productores; aunque esto necesariamente implique una menor diversidad genética.

REFERENCIAS

- Abdurakhmonov IY, Kohel RJ, Yu JZ, Pepper AE, Abdullaev AA, Kushanov FN, Salakhutdinov IB, Buriev ZT, Saha S, Scheffler BE, Jenkins JN, Abdulkarimov A (2008) Molecular diversity and association mapping of fiber quality traits in exotic *G. hirsutum* L. germplasm. *Genomics* 92: 478-87.
- Acevedo M, Torres E, Moreno O, Álvarez R, Torres O, Castrillo W, Torrealba G, Reyes E, Salazar M, Navas M (2007) Base genética de los cultivares de arroz de riego liberados en Venezuela. *Agron. Trop.* 57: 197-204.
- Angulo L., Ramis C., Arnao E, Perdomo M, Pérez-Almeida I (2006) Estudio de la base genética de la variedades de arroz de Venezuela a través de microsatélites. Resúmenes IX Congreso Latinoamericano de Botánica. Santo Domingo, República Dominicana, p. 173.
- Arnao E, Rodríguez N, Hinrichsen P, Jayaro Y, Ramis C, Pérez-Almeida I (2007) Evaluación de la diversidad genética de subespecies de arroz usando marcadores microsatélites y AFLP. *Agron. Trop.* 57: 45-50.
- Arnao E, Jayaro Y, Hinrichsen P., Ramis C, Marin C, Pérez-Almeida I (2008) Marcadores AFLP en la evaluación de la diversidad genética de variedades y líneas élites de arroz en Venezuela. *Interciencia* 35: 359-364.
- Balestre M, Von Pinho RG, Souza JC, Lima JL (2008) Comparison of maize similarity and dissimilarity genetic coefficients based on microsatellite markers. *Genet. Mol. Res.* 7: 695-705.
- Badri M, Zitoun A, Ilahi H, Huguet T, Aouani ME (2008) Morphological and microsatellite diversity associated with ecological factors in natural populations of *Medicago laciniosa* Mill. (Fabaceae). *J. Genet.* 87: 241-255.
- Blair MW, Buendía HF, Giraldo MC, Métais I, Peltier D (2008) Characterization of AT-rich microsatellites in common bean (*Phaseolus vulgaris* L.). *Theor. Appl. Genet.* 118: 91-103.
- Cao D, Card J (1997) Pedigree and RAPD-based DNA analysis of commercial U.S. rice cultivars. *Crop Sci.* 37: 1630-1635.
- Cheng X, Xu J, Xia S, Gu J, Yang Y, Fu J, Qian X, Zhang S, Wu J, Liu K (2009) Development and genetic mapping of microsatellite markers from genome survey sequences in *Brassica napus*. *Theor. Appl. Genet.* 118: 1121-1131.
- Cipriani G, Marrazzo MT, Di Gaspero G, Pfeiffer A, Morgante M, Testolin R (2008) A set of microsatellite markers with long core repeat optimized for grape (*Vitis* spp.) genotyping. *BMC Plant Biol.* 8: 127.
- CIAT (1987) *Registro de Cruzamientos Realizados por los Programas de Arroz de ICA y del CIAT (1957-1986)*. Instituto Colombiano Agropecuario / Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali, Colombia. 177 pp.
- Cuevas Pérez F, Guimarães E, Berrio L, González D (1992) Genetic base of irrigated rice in Latin America and the Caribbean 1971 to 1989. *Crop Sci.* 23: 944-949.
- Dilday R (1990) Contribution of ancestral lines in the development of new cultivars of rice. *Crop Sci.* 30: 905-911.
- Gardner CO, Eberhard SA (1966) Analysis and interpretation of the variety cross diallel and related populations. *Biometrics* 22: 439-452.
- Ghneim-Herrera T, Posso D, Pérez-Almeida I, Torrealba G, Pieters A, Martínez CP, Tohme J (2008) Assessment of genetic diversity in Venezuelan rice cultivars using simple sequence repeats markers. *Elect. J. Biotechnol.* (edición especial REDBIO 2007) Vol. 11 No. 5.
- Gopal J, Oyama K (2005) Genetic base of Indian Potato selections as revealed by pedigree analysis. *Euphytica* 142: 23-31.
- Griffing B (1956) Concept of general and specific combining ability in relation to diallel crossing system. *Aust. J. Biol. Sci.* 9: 435-493.
- ICIS (2011) International Crop Information System. www.icis.cgiar.org/icis/
- Labrin Sotomayor NY (2007) *Estudio de la Resistencia en Variedades de Arroz (Oryza sativa L.) Venezolanas al Virus de la Hoja Blanca*. Tesis. CATIE. Costa Rica. 83 pp.
- Martínez CP, Cuevas-Pérez F (Comps.) (1995) *Registro de cruzamientos de arroz PI a P5617 y CT5618 a CT13800. Cruzamientos realizados por Programa de Arroz del Ministerio de Agricultura de Colombia (1957 a 1962)*. Programas de Arroz del ICA y del CIAT (1962 a 1995). Publicación CIAT N° 244. Cali, Colombia. 313 pp.
- McCouch SR, Chen X, Panaud O, Temnykh S, Xu Y, Cho YG, Huang N, Ishii T, Blair M (1997) Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol Biol.* 35: 89-99.
- Miranda JEC, Cruz CD, Costa CP (1988) Predição do comportamento de híbridos de pimentão (*Capsicum annuum*) pela divergência genética dos progenitores. *Rev. Bras. Genét.* 40: 929-937.
- Mohammadi SA, Prasanna M (2003) Analysis of genetic diversity in crop plants- Salient statistical tools and considerations. *Crop Sci.* 43: 1235-1248.
- Parida SK, Kalia SK, Kaul S, Datta V, Hemaprabha G, Selvi A, Pandit A, Singh A, Gaikwad K, Sharma TR, Srivastava PS, Singh NK, Mohapatra T (2009) Informative genomic microsatellite markers for efficient genotyping applications in sugarcane. *Theor. Appl. Genet.* 118: 327-338.
- Rajaran S; Bourlaug NE, Van Guinkel M (2002) CIMMYT International Wheat Breeding. En Curtis BC, Rajaran S, Gomez H (Eds.) *Bread Wheat: Improvement and Production*. FAO. Roma, Italia. pp. 103-118.
- Rohlf FJ (1997) NTSYS-PC. Numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 2.00. Users Guide. Exeter software, Setauket, NY, EEUU.
- SAS (1988) SAS/STAT Software. User's Guide, Release 6.04. SAS Institute Inc. Cary, NC, EEUU. 1028 pp.
- St. Martin SK (1982) Effective population size for soybean improvement program in maturity groups 00 to IV. *Crop Sci.* 22: 151-152.
- Temnykh S, DeCleck G, Lukashova A, Lipovich L, Cartinhour S, McCouch S (2001) Computational and experimental analysis of microsatellites in rice (*Oryza sativa* L.): Frequency, length variation, transposon associations, and genetic marker potential. *Genome Res.* 11: 1441-1452.
- Temnykh S, Park WD, Ayres N, Cartinhour S, Hauck N, Lipovich L., Cho YG, Ishii T, McCouch SR (2000) Mapping and genome organization of microsatellite sequences in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 100: 697-712.
- Zambrano A, Demey J, Martínez G, Fuenmayor F, Gutiérrez Z, Saldaña G, Torrealba M (2002) Método rápido, económico y confiable de minipreparación de ADN para amplificaciones por RAPD en bancos de germoplasma. *Agron. Trop.* 52: 235-243.