

## 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<sup>1\*</sup>, Nelly Delgado<sup>2</sup> y Luis Angulo-Graterol<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Universidad Central de Venezuela (UCV). Facultad de Agronomía (FAGRO). Apdo. 4579. Maracay 2101A, estado Aragua. Venezuela. <sup>2</sup>Instituto Nacional de Investigaciones Agrícola (INIA). Apdo. 3303, Araure, estado Portuguesa Venezuela. \*Correo electrónico: rvelasquezsalazar@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 copenética 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 copenetic 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.*, 2011a; 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 objetivo, 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 al 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.* (2011b), 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  $\mu\text{l}^{-1}$  ADN; 3,33 mM  $\text{Mg Cl}_2$ ; 0,2  $\mu\text{M}$  de los microsatélites (sentido y antisentido); 0,33  $\mu\text{M}$  dNTP's y 0,033U  $\mu\text{l}^{-1}$  Taq comercial, completando a un volumen final de 15  $\mu\text{l}^{-1}$  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	GCGAAAACACAATGCAAAAA	GCGTTGGTTGGACCTGAC	55
2	RM5	1	(GA)14	113	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA	GCATCCGATCTTGATGG	55
3	RM9	1	(GA)15GT(GA)2	136	GGTGCCATTGCTGCTCCTC	ACGGCCCTCATCACCTTC	55
4	RM14	1	(GA)18	191	CCGAGGAGAGGAGTTTCGAC	GTGCCAATTCCTCGAAAA	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	CCGAACGCCCTAGAAGCGCGTCC	CGGCGAGGTTTGTAAATGGCGG	67
8	RM212	1	(CT)24	136	CCACTTTCAGCTACTACCAG	CACCCATTTGTCTCTCATTATG	55
9	RM220	1	(CT)17	127	GGAAGGTAAGTGTTCACAAC	GAAATGCTTCCACATGTCT	55
10	RM226	1	(AT)38	274	AGCTAAGTCTGGAGAAACC	AAGTAGGATGGGACACAAGCTC	55
11	RM327	1	(CT)18	130	CAAATCCCGACTGCTGTCC	TGGAAAGAGAGACTACAGC	55
12	RM283	1	(GA)18	151	GTCTACATGTACCCTTTGTTGGG	CGGCATGAGAGTCTGTGATG	55
13	RM306	1	(GT)18(AT)8CT(GT)6	155	CAAGGTCAAGAATGCAATGG	GCCACTTAAATCATTGCATC	55
14	RM315	1	(AT)4(GT)10	133	GAGTACTTCTCCGTTTCAC	AGTCAGCTCACTGTGCAGTG	55
15	RM243	1	(CT)18	116	GATCTGCAGACTGCAGTTGC	AGCTGCAACGATGTTGTCC	55
16	RM259	1	(CT)17	162	TGGAGTTTGAGAGGAGGG	CTTGTTCATGGTGCCATGT	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	CGGTTAATGTCATCTGATTGG	TTGAGATCCAGACTGACC	55
21	RM575	1	(AG)24	201	CAATTTCCATAGGCTGCATG	GCTTGGGTTAGCCGACGAC	55
22	RM580	1	(CTT)19	221	GATGAACCGAATTTGCATCC	CACCTCCATGTTTGGCTCC	55
23	RM582	1	(TC)20	231	TCGTGTCGCGATTTGTTCCG	AAATGGCTTACCTGCTGTCTC	55
24	RM6	2	(AG)16	163	GTCCCCTCCACCCAAATC	TCGTACTGTTGGCTGCAC	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	TCCACGTGATCGACACGACGCGG	67
29	RM203	2	(AT)21	203	CCATCCCATTAGCCAAACATTGC	GATTTACCTCGACGCCAACCTG	55
30	RM207	2	(CT)25	118	CCATTCGTGAGAAGATCTGA	CACCTCATCCTCGTAAACGCC	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	ATCTGTTTGCAGGGACAAG	AGTCTAGACGATGCTGTGA	55
33	RM221	2	(TC)4T3C3(TC)(CT)2	192	ACATGTCAGCATGCCACATC	TGCAAGAATCTGACCCCGG	55
37	RM322	2	(CAT)7	112	CAAGCGAAAAATCCCAGCAG	GATGAAAATGGCATTGCCTG	55
38	RM324	2	(CAT)21	175	CTGATCCACACACTTGTGC	GATCCACGTCAGGATCTTC	55
39	RM240	2	(CT)21	132	CCTTAATGGGTAGTGTGCAC	TGTAACCAATTCCTTCCATCC	55
40	RM241	2	(CT)21	132	CCTTAATGGGTAGTGTGCAC	TGTAACCAATTCCTTCCATCC	55
41	RM250	2	(CT)17	153	GGTTCAAACCAAGCTGATCA	GATGAAGGCCCTTCCACGCAG	55
42	RM450	2	(AG)17	143	AAACCCACAGTAGTACGCCCGG	TCCATCCACATCTCCCTCTC	55
43	RM498	2	(CA)10	213	AATCTGGCCCTGCTCTTTTC	TCCTAGGGTGAAGAAAAGGGG	55
44	RM525	2	(AAG)12	131	GGCCCGTCCAAGAAATATTG	CCGTGAGACAGAATCCTTACG	55
45	RM526	2	(TAAT)5	240	CCCAGCAATACGTCCCTAG	ACCTGGTCATGACAAAGGAGG	55
46	RM550	2	(CCT)8	231	CTGAGCTCTGGTCCGAAGTC	GGTGGTGAAGAACACAGGAAG	55
47	RM555	2	(AG)11	223	TTGGATCAGCCAAAGGAGAC	CAGCATTGTGGCATGGATAC	55
48	RM561	2	(GA)11	190	GAGCTGTTTTGGACTACGGC	GAGTAGCTTTCTCCACACCCC	55
49	RM7	3	(GA)19	180	TTCCCATGAAGTCTCTCG	CCTCCCATCAITTCGTTGTT	55
50	RM16	3	(TCG)5(GA)16	181	CGTAGGGCCAGCATCTAAA	AACACAGCAGGTACGGCCG	55
51	RM114	3	(GA)7	209	CAGGGACGAATCGTCGCCGGAG	TTGGCCCCCTTGAGGTTGTCGG	55
52	RM186	3	(CGG)5	124	TCCTCCATCTCCTCCGCTCCC	GGCGTGGTGGCCCTTCTTCGTC	61
53	RM200	3	(GA)16	122	CGTAGGGAATTTGGATTGA	CGATGAGCAGGTATCGATGAGAAG	55
54	RM231	3	(CT)16	182	CCAGATTATTTCTGAGGTC	CACTTGCATAGTTCTGCATTG	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 TTGGGAGGTTTGTAG	55
60	RM532	3	(CA)9	180	TCTATAATGTAGCCCCCCCCC	TTTTCAGGGGCTTCTACCAAC	55
61	RM545	3	(GA)30	226	CAATGGCAGAGACCCCAAAAG	CTGGCATGTAACGCACAGTGG	55
62	RM554	3	(GA)14	259	GTTTCGTCGCTCTCTCGTCTC	CCCAAAAATCTGTGCCTCTC	55
63	RM569	3	(CT)16	175	GACATTCTCGTTGCTCCTC	TGTCCTCCTCTAAAACCCCTCC	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	CTCGTATCGCCATCGCCATCG	TCGAGCCATCGCTGGATGGAGG	67
65	RM261	4	C9(CT)8	125	CTACTTCTCCCTTGTGTCG	TGTACCATCGCCAAATCTCC	55
66	RM185	4	(AGG)9	197	AGTTGTTGGAGGGAGAAAGGCC	AGGAGCGAGCGCGATGTCCTC	61
67	RM317	4	(GC)4(GT)18	155	CATACTTACCAGTTCACCGCC	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	GAAGCCGTCGTAAGTTACC	GTTTCTACCTGATCGCGAC	55
71	RM252	4	(CT)19	216	TTCGCTGACGTGATAGGTTG	ATGACTTGATCCCGAGAACG	55
72	RM518	4	(TC)15	171	CTCTTCACTCACTCACCATGG	ATCCATCTGGAGCAAGCAAC	55
73	RM551	4	(AG)18	192	AGCCAGACTAGCATGATTG	GAAGCGGAGAAAGGATCACAG	55
74	RM13	5	(GA)6-(GA)16	141	TCCAAACATGGCAAGAGAGAG	GGTGGCATTTCGATTCCAG	55
75	RM26	5	(GA)15	112	GAGTCGACGAGCGGCAGA	CTGCGAGCGACGGTAACA	55
76	RM31	5	(GA)15	140	GATCAGGATCCACTGGAGCT	AAGTCCATTACTCTCCCTCCC	55
77	RM164	5	(GT)16TT(GT)4	246	TCTTGCCCGTCACTGCAGATATCC	GCAGCCCTAATGCTACAATCTTC	55
78	RM169	5	(GA)12	167	TGGCTGGCTCCGTGGTAGCTG	TCCCGTTGCCGTTTCCCTCC	67
79	RM173	5	(GA)9	186	CTTACCCTGCGATCCCCCCTC	CCATGAGGAGGAGCGGGCGATC	67
80	RM178	5	(GA)5(AG)8	117	TCGCGTAAAGATAAGCGGCGC	GATCACCGTTCCTCCGCTCG	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	CGACCCTAGGGTTTCTCTCC	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	TCGGGCTTCTTCCCTCGTCGACG	CCCGCTGCAGAGGAAAGCAGCC	55
88	RM190	6	(CT)11	124	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	TTGCAGATGTTCTTCTCTGATG	55
89	RM204	6	(CT)44	169	GTGACTGACTTGGTTCATAGGG	GCTAGCCATGCTCTCGTACC	55
90	RM225	6	(CT)18	140	TGCCCATATGGTCTGGATG	GAAAGTGGATCAGGAAGGC	55
91	RM238	6	(CT)15	147	GATGGAAGCACCGTGCACCTA	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	GAGCGTCTTGTTAAAAACCG	AGTAGGGTATCACGCATCCG	55
95	RM2	7	(GA)1	150	ACGTGTCACCGCTTCCTC	ATGTCCGGGATCTCATCG	55
96	RM10	7	(GA)15	159	TTGTCAAGAGAGGGCATCG	CAGAAATGGAAATGGGTCC	55
97	RM11	7	(GA)17	140	TCTCCTCTTCCCCCGATC	ATAGCGGGCGAGGCTTAG	55
98	RM51	7	(GA)13	142	TCTCGATTCAATGTCTCCGG	CTACGTCATCATCGTCTCCCG	55
99	RM134	7	(CCA)7	93	ACAAGCCCGGAGAGGATCCG	GCTCTCCGGTGGCTCCGATTGG	55
100	RM70	7	(ATT)33	170	GTGGACTTCATTTCAACTCG	GATGTATAAGATAGTCCCG	55
101	RM3743	7	(GA)17	180	TAGCCTTGTTCCATCCATCC	CTTCTCCCTCTCCTCCTTCC	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	TCCTTGTAATCTGGTCCC	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	CGGGTGGTCCCGAGGATCTTG	55
109	RM149	8	(AT)10	253	GCTGACCACCAACCTAGGCCG	GTTGGAAGCCCTTCCCTCGTAACACG	55
110	RM210	8	(CT)23	140	TCACATTCGGTGGCATTG	CGAGGATGGTTGTCACTTG	55
111	RM223	8	(CT)25	165	GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC	GAAGGCAAGCTTTGGCACTG	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	GTTGATTTGCGCCAAAGGGC	55
115	RM160	9	(GAA)23	131	AGCTAGCAGCTATAGCTTAGCTG GAGATCG	TCTCATCGCCATGGAGGCCCTC	55
116	RM201	9	(CT)17	158	CTCGTTTATTACCTACAGTACC	CTACCTCCCTTTCTAGACCATA	55
117	RM205	9	(CT)25	122	CTGGTTCTGTATGGAGCAG	CTGGCCCTTACAGTTTCAGTG	55
118	RM215	9	(CT)16	148	CAAAATGGAGCAGCAAGAGC	TGAGCACCTCTTCTCTGTAG	55
119	RM219	9	(CT)17	202	CGTCGGATGATGTAAGCCT	CATATCGCATTCGCCCTG	55
120	RM285	9	(GA)12	205	CTGTGGGCCCAATATGTAC	GGCGGTGACATGGAGAAAG	55
121	RM316	9	(GT)-8(TG)9(TTTG) 4(TG)4	192	CTAGTTGGCATAACGATGGC	ACGCTTATATGTTACGTCAAC	55
122	RM409	9	(AGC)8	96	CCGTCTCTTGC TAGGGATTC	GGGGTGTCTTTCCTTCTCTG	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	CTCCAGGAAACACGCTCTTTC	55
126	RM184	10	(CA)7	219	ATCCCAATTCGCCAAAACCGGCC	TGACACTTGGAGAGCGGTGTGG	55
127	RM216	10	(CT)18	146	GCATGGCCGATGGTAAAG	TGATAAAAACCCACACGGCCA	55
128	RM222	10	(CT)18	213	CTTAAATGGCCACATGCG	CAAAGCTTCGGCCAAAAG	55
129	RM228	10	(CA)6(GA)36	154	CTGGCCATTAGTCTCTTG	GCTTGGCGCTCTGCTTAC	55
130	RM311	10	(GT)3(GTAT)8(GT)5	179	TGGTAGTATAGGTACTAAACAT	TCCTATACACATACAAAACATAC	55
131	RM239	10	(AG)5TG(AG)2	144	TACAAAATGCTGGGTACCCC	ACATATGGGACCCACCTGTC	55
132	RM258	10	(GA)21(GGA)3	148	TGCTGTATGTAGCTCGCACCC	TGGCCCTTAAAAGCTGTCCG	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	GAGAGGAGGAAGGGAGGGCGGC	CTGCCATGGCAGAGAGAGGGGCC	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	AGTCCGACCCACAAGGTGCGTTGTC	55
139	RM187	11	(AT)29(GT)7	146	CCAAGGAAAAGATGCGACAATTG	GTGGACGCTTATATTATGGG	55
140	RM202	11	(CT)30	189	CAGATTGGAGATGAAGTCCTCC	CCAGCAAAGCATGTCAATGTA	55
141	RM209	11	(CT)18	134	ATATGAGTTGCTGCTCGCG	CAACTTGCATCCTCCCTCC	55
142	RM224	11	(AAG)8(AG)13	157	ATCGATCGATCTTCACGAGG	TGCTATAAAAAGGCATTCGGG	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	TGCCCTGTATTTTCTTCTCTC	GGTGATCCTTTCCCAATTTCA	55
146	RM6869	12	(TGG)8	126	GAGCTCCTTGTAGTGACCCCG	ATCAGCCTGCCAGCTTC	61
147	RM235	12	(CT)24	124	AGAAGCTAGGGCTAACGAAC	TCACCTGGTCAGCCTCTTTC	55
148	RM309	12	(GT)13	169	GATAGTACGCAACCTTTCTG	AGAAGGCCTCCGGTGAAG	55
149	RM247	12	(CT)16	131	TAGTGCCGATCGATGAACG	CATATGGTTTTGACAAAAGCG	55
150	RM519	12	(AAG)8	122	AGAGAGCCCTAAATTTCCG	AGGTACGCTCACCTGTGGAC	55
151	RM453	12	(TC)10	178	GGCATCTCTCTCCCTTATCG	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 ZB con un 23,18%, seguido por CB con un 20,53%; hallando el menor número de microsatélites polimórficos en los cruces DS y ZV, 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 ZB, 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 DZ 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 CB, 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 ZV, 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.

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,

Cuadro 2. Porcentaje de microsatélites (SSR) polimórficos entre los cruces 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 (SSR) 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
<b>Total</b>	<b>35</b>	<b>100</b>	<b>19</b>	<b>100</b>	<b>31</b>	<b>100</b>	<b>7</b>	<b>100</b>

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

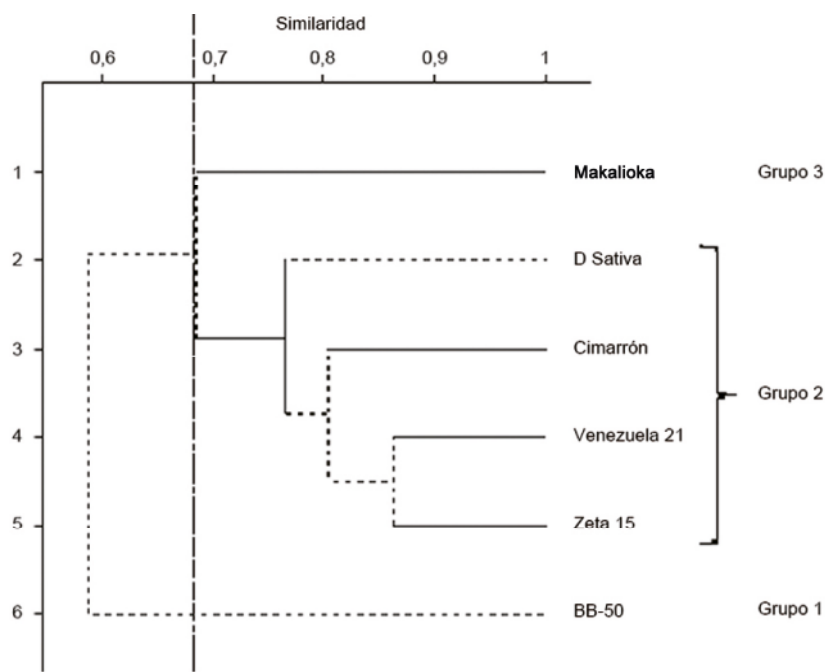


Figura. Dendrograma del análisis de agrupamiento UPGMA para seis cultivares de arroz, distancia genética de Dice.

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 radica 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 al 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.

### 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

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 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.

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.

FLAR (Fondo Latinoamericano de Arroz de Riego). 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.

INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas). 2005. Programa de arroz. Disponible en: [www.inia.gob.ve](http://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.