

INVESTIGACIONES

IDENTIFICACIÓN DE VARIETADES CHILENAS DE ARROZ (*Oryza sativa* L.) EVALUACIÓN DEL USO DE PERFILES PROTEICOS Y DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS DE ADN AMPLIFICADOS AL AZAR (RAPD)¹

Identification of Chilean rice (*Oryza sativa* L.) cultivars: evaluation of protein profiles and Random Amplified Polymorphic DNA (RAPD)

Patricio Hinrichsen R.², Cecilia Amigo G.³, Roberto Alvarado A.⁴ y Carlos Muñoz S.²

SUMMARY

Proper cultivar identification is essential for registration and control during seed marketing and for assessing the purity of a seed lot. In the present work, various molecular marker techniques were used to discriminate rice cultivars currently used in Chile. Electrophoretic analysis of seed proteins showed identical profiles for 6 different cultivars, both in non-native (SDS-PAGE) or acidic (A-PAGE) conditions. On the contrary, when direct genomic analysis was performed using randomly amplified polymorphic DNA, cultivars were easily distinguishable. Ten out of 22 tested primers generated DNA polymorphic bands. Bands generated by 4 of these were used to design a protocol for cultivar identification in rice. Additionally, detected polymorphisms were used to make a dendrogram that could estimate the phylogenetic relationships among the cultivars included in this study.

Key words: RAPD, SDS-PAGE, A-PAGE, rice phylogenetics.

INTRODUCCIÓN

Una adecuada metodología de identificación de variedades es necesaria para registrar y controlar la distribución de semillas comerciales y para determinar el nivel de pureza de éstas (Staub y Meglic, 1993). Tradicionalmente, esta identificación se ha basado en las características agronómicas y morfológicas de las plantas. Sin embargo, esto consume tiempo y espacio, y las observaciones pueden ser afectadas por las condiciones agroclimáticas locales. Por esta razón, se han desarrollado procedimientos de identificación basados en otro tipo de marcadores. Por ejemplo, en arroz, se ha usado algunos métodos bioquímicos, como el análisis de las proteínas de la semilla por electroforesis (Aliaga-Morel *et al.*, 1987) o por cromatografía de alta resolución

(HPLC) (Hussain *et al.*, 1989). Los perfiles isoenzimáticos también han sido útiles para la clasificación de germoplasma de arroz (Second, 1982; Glaszmann, 1987). Sin embargo, estas técnicas son, por lo general, difíciles de estandarizar y poseen una baja capacidad discriminatoria.

En los últimos años se han desarrollado una serie de métodos basados en el estudio directo del genoma (Wang y Tanksley, 1989). Uno de estos métodos se basa en la amplificación de fragmentos discretos de ADN mediante la reacción en cadena de una polimerasa termoestable (PCR) (Saiki *et al.*, 1988), usando partidores de amplificación de pequeño tamaño (10-mer), que son elegidos arbitrariamente. Esta técnica, conocida como RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA), es de muy reciente desarrollo (Welsh y McClelland, 1990; Williams *et al.*, 1990). Usando RAPD, es posible identificar variedades, ya que se generan por amplificación (PCR) bandas de ADN "polimórficas", es decir bandas diferentes para cada variedad. Los polimorfismos generados por RAPD resultan de cambios en la región o secuencia del genoma donde se unirá el partidador (p.e. mutaciones puntuales), o cambios que alteran el tamaño o previenen la amplificación exitosa del ADN en estudio (p.e. inserciones,

¹Recepción de originales: 12 de julio de 1995.

Parte del trabajo presentado por el segundo autor para optar al título de Bioquímico de la Facultad de Ciencias Biológicas, Pontificia Universidad Católica de Chile.

Trabajo financiado por la Fundación Fondo de Investigaciones Agropecuarias (FIA), Proyecto N° 012-92.

²Centro Regional de Investigación La Platina (INIA), Casilla 439, Correo 3, Santiago, Chile.

⁴Centro Regional de Investigación Quilimapu (INIA), Casilla 426, Chillán, Chile.

deleciones, inversiones) (Waugh y Powell, 1992). La cantidad de fragmentos de ADN amplificados dependerá de que en el genoma de la variedad analizada se encuentren secuencias complementarias al partidor y en orientación opuesta dentro de una distancia que sea posible amplificar por PCR (200-2500 pb) (Figura 1). Dado su gran potencial y relativa simpleza, este método ha sido ampliamente aplicado para diferenciar individuos en numerosas especies vegetales (Demeke y Adams, 1994), vertebrados (Bielawski, Noack y Pumo, 1995), insectos (Chapco *et al.*, 1992), hongos (Andebrhan y Furtek, 1994) y bacterias (Mäki-vaikama y Karjalainen, 1994). Esta técnica también ha sido aplicada para estudiar diversidad genética, para identificar variedades y para definir relaciones filogenéticas en arroz (Fukuoka, Hosaka y Kamijima, 1992; Ko *et al.*, 1994; Yoshimura, Yoshimura e Iwata, 1992; Yu y Nguyen, 1994).

El objetivo del presente trabajo fue determinar las relaciones filogenéticas existentes entre las variedades de arroz que se cultivan en Chile, presentándose los resultados obtenidos mediante electroforesis ácida (A-PAGE) y electroforesis desnaturante (SDS-PAGE) de las proteínas de semillas, y análisis genómico mediante RAPD.

MATERIALES Y MÉTODOS

Variedades estudiadas

Las variedades fueron obtenidas del Programa de Mejoramiento Genético de Arroz del INIA (Centro Regional de Investigación Quilamapu). Las semillas utilizadas corresponden a la cosecha de la temporada 1993/94. Los progenitores y pedigrí se indican a continuación (Alvarado y Pino, 1982a y b; Anónimo, 1964; Orlando Morales, S.A.G., comunicación personal):

Buli-INIA. Producto de una cruce triple realizada en el CIAT, entre una línea chilena precoz y la variedad Lemont de Estados Unidos. La F1 resultante se cruzó luego con la variedad Diamante-INIA. Cruzamiento: Lemont/Quila 66304//Diamante. La línea Quila corresponde a la cruce Cesariot/Oro, en tanto que Lemont es una variedad de excelente calidad de grano, pero susceptible al frío.

Cristal-INDUS. Producto de una cruce realizada por el programa de mejoramiento de arroz de INDUS, cuyo propietario actual es Arrocería Tucapel. Cruzamiento: Oro/385// (Rexoro Red/D//Rexoro Red/Bozu) L13-1-1-2-2.

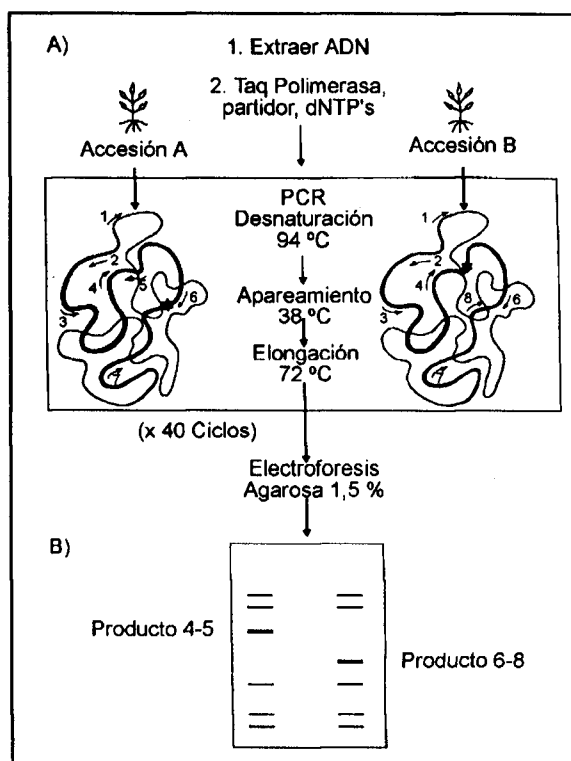


Figura 1. Bases moleculares de los polimorfismos generados en una reacción de RAPD. (a) Los individuos A y B son dos accesiones, ecotipos o variedades de una especie o género, que tienen mínimas diferencias en su genoma. El partidor se une a distintos sitios del genoma, donde la enzima *Taq* polimerasa amplifica fragmentos discretos de ADN. Este proceso se repite en múltiples ciclos de polimerización (PCR). Los sitios de unión del partidor están indicados por flechas numeradas. En el genoma A se amplifica (entre otros) un fragmento entre los sitios 4 y 5. En el genoma B el sitio 5 está modificado (no se une el partidor), en cambio, cerca del sitio 6 existe un nuevo sitio de unión para el partidor, lo que genera una nueva banda de amplificación (posiciones 6 y 8). (b) Separación electroforética de los productos amplificados; se destacan las bandas diferenciales (productos 4-5 y 6-8, respectivamente). Las otras bandas de ADN (productos de amplificación) son resultado de la unión del partidor en otros *loci* del genoma, idénticos para A y B.

Figure 1. Molecular basis for the polymorphisms observed in RAPD reactions. (a) A and B are two accessions, ecotypes or varieties of any species or genus, with minimal differences in their genomes. The primer is anneals to different sites along the genome, and the enzyme *Taq* polymerase elongates discrete DNA fragments. This process is iterated in multiple polymerization cycles (PCR process). Primer binding sites are labeled with arrows. In this case, in A there is an amplified fragment between positions 4 and 5; this fragment is not amplified in the genome B, because of a modification in its sequence that impedes annealing of the primer. However, near the position 6 of the genome B there is a new annealing site, which permits the successful amplification of a new band (6-8). (b) Electrophoretic separation of the amplified DNA fragments; the differentially amplified bands are bold (4-5 and 6-8, respectively). The other shown bands are identical for both genomes, and come from the joining of the primer to other *loci*.

Diamante-INIA. Resultado de la selección efectuada desde F2 de un cruzamiento realizado en Perú. Cruzamiento: Agostano/P6//Blue Rose//RB2/Balilla.

Oro. Producto de la selección de líneas puras del arroz chileno. Fue inscrita por la desaparecida Estación Experimental Huencuecho, del Ministerio de Agricultura.

Perla-INDUS. Producto de una cruce realizada por el programa de mejoramiento de arroz de INDUS. Cruzamiento: Oro/385//Rexoro Red/D//Rexoro Red/Bozu L13-1-1-2-2//Oro.

Quella-INIA. Producto de un cruzamiento entre una línea experimental proveniente de Louissiana y la variedad nacional Oro. Cruzamiento: Rexoro Red/Bozu L 119-1-1/Oro.

Análisis electroforético de proteínas de la semilla

Electroforesis de proteínas en geles de poliácridamida-SDS (SDS-PAGE). Para la extracción de proteínas se usó el método descrito por Ng y Bushuk (1987), que consistió en moler una o varias semillas, descartando su cáscara. Se resuspendieron 40 mg de la harina obtenida en 1 ml de tampón de extracción [Tris-HCl 0,063 M (pH 6,8), dodecil sulfato de sodio (SDS) 2%, 2-mercaptoetanol 5%, glicerol 10% y azul de bromofenol 0,01%]. La mezcla se agitó vigorosamente por 1 minuto, lo que se repitió cada 30 minutos; se mantuvo a temperatura ambiente por 2 horas, luego se calentó por 2,5 minutos en agua hirviendo y se enfrió a temperatura ambiente. El sobrenadante de esta suspensión se guardó a 4 °C y se usó como extracto de proteínas.

Las muestras se analizaron por electroforesis vertical discontinua en geles de poliácridamida (PAA) con una relación acrilamida: bis-acrilamida de 30:0,8 y conteniendo 0,1% de SDS (Hames y Rickwood, 1990). Se usó una fase superior concentradora (5% PAA en Tris-HCl 0,4 M pH 6,8) y una fase inferior resolutive (8 ó 12% PAA en Tris-HCl 0,4 M pH 8,8). La polimerización del gel se realizó en presencia de persulfato de amonio (0,05%) y TEMED (10 µl para 16 ml). El tampón de corrida fue Tris-HCl 25 mM (pH 8,4), glicina 192 mM y SDS 0,1%. Se cargaron 10 µl de extracto de proteínas en cada pocillo del gel. Las demás condiciones de la electroforesis (corrida, tinción y decoloración) se realizaron de acuerdo a lo descrito por Hewstone e Hinrichsen (1994).

Electroforesis de proteínas en geles ácidos de poliácridamida (A-PAGE). Para extraer las proteínas, se pesaron 0,25 g de harina de cada variedad, a los que se les agregó 1 ml de HAc (ácido acético) a diferentes concentraciones (0,1; 1; 2; 3; 4 y 5 M), siendo 3 M la concentración que

dio mejor resultado. La mezcla se agitó ocasionalmente y se dejó a temperatura ambiente por 2 horas. Luego se centrifugó (13.000 rpm por 30 min en microfuga) y se separó el sobrenadante sin arrastrar harina. Las extracciones fueron optimizadas con la adición de 2-mercaptoetanol al 1% en la solución de extracción. Para cargar los geles ácidos, el extracto de proteínas se mezcló en relación 1:1 con una solución de sacarosa 40% en tampón lactato de aluminio 8,5 mM (pH 3,1), conteniendo trazas del indicador de migración pironina B. Las electroforesis de PAA en condiciones ácidas se realizaron en medio lactato de aluminio (pH 3,1), de acuerdo al protocolo descrito por Hussain *et al.* (1989), o en medio urea-HAc (pH 2,7) (Hames y Rickwood, 1990).

En A-PAGE, en geles de lactato de aluminio (pH 3,1), las proteínas se separaron en geles de PAA (relación acril-bisacrilamida 30:1,5), compuestos de una fase concentradora (PAA 4,5%) y una resolutive (PAA 10%), en medio lactato 8,5 mM pH 3,1 y glicerol 18%. La polimerización se realizó en frío mediante la adición de ácido ascórbico (0,1%), FeSO₄ (0,002%) y H₂O₂ (0,03%). El tampón de corrida fue lactato pH 3,1.

En A-PAGE, en geles de urea-ácido acético (pH 2,7), se usó la misma solución de acril-bisacrilamida anterior, se prepararon geles al 10% mezclando 2 ml de esta solución más 2 ml de solución B (43,2% HAc, 4% TEMED) y 10 ml de solución C (20 mg de persulfato de amonio en 10 ml de urea 4 M). El tampón de corrida fue HAc 0,9 M. Las muestras para separar en este tipo de gel se resuspendieron desde el precipitado con acetona en urea 2,5 M, HAc 0,9 M, más rojo de pironina al 0,1%.

Las corridas electroforéticas se realizaron a 15 mA, desde el polo (+) al (-). Los geles de lactato se tiñeron con una solución de ácido tricloroacético al 12%, metanol 12% y azul de coomassie R-250 0,05%, mientras que para los geles de urea-HAc se usó metanol:agua: HAc (5:5:1) más azul de coomassie 0,1%.

Amplificación aleatoria de fragmentos polimórficos de ADN (RAPD)

Los análisis se realizaron en ADN extraído de plántulas que tenían entre 10 y 15 días de germinación, lo que se llevó a cabo en cámaras de crecimiento a 27-30 °C, con un fotoperíodo de 16 horas de luz y 8 de oscuridad.

Extracción de ADN de tejido de arroz. Se ensayaron dos métodos de purificación de ADN, uno

basado en el detergente CTAB (bromuro de cetiltrimetilamonio) (Rogers y Bendich, 1988) y otro que usa PEX (etilxantogenato de potasio) (Jhingan, 1992) como agente de extracción diferencial. El método del PEX dio mejores resultados en rendimiento (cerca de 1 mg/g de tejido) y calidad del ADN obtenido. Para este método, se trituraron en mortero 2 plántulas (aproximadamente 0,15 g) de cada variedad, congeladas en hielo seco. El macerado se transfirió a un microtubo de 1,5 ml y se le agregó 50 µl de tampón PEX [PEX 20%, NaCl 1,7 M, EDTA 20 mM y Tris-HCl 0,2 M (pH 8,0)]. Con un vástago de plástico se terminó de macerar el tejido y luego se agregaron 450 µl más de tampón PEX. Esta mezcla se agitó en un vórtex y se incubó por 30 min a 65 °C. Transcurrido este tiempo, se agitó nuevamente y se centrifugó 2 min a 13.000 rpm en microfuga. Se precipitaron los ácidos nucleicos del sobrenadante agregando 2 vol. de etanol 95%: acetato de amonio 7,5 M (6:1); se agitó suavemente por inversión lenta, formándose un precipitado grueso. Se centrifugó a 13.000 rpm por 2 min y el "pellet" obtenido se lavó con etanol 70%. El ADN precipitado, libre de etanol, se resuspendió en 200 µl de TE 0,1X (TE es Tris-HCl 10 mM pH 8,0, EDTA 1 mM), conteniendo RNasa A (10 µg/ml). Para disolver completamente el pellet obtenido, se incubó a 65 °C por 1 hora. Luego se centrifugó brevemente y se separó el sobrenadante que se extrajo 2 veces con 250 µl de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) (Sambrook *et al.*, 1989). Se precipitó el ADN llenando el microtubo con etanol 95%: acetato de amonio 7,5 M (6:1); se lavó el precipitado con etanol 70% y finalmente se resuspendió en 50 µl de TE 0,1X. Las preparaciones de ADN fueron conservadas a 4 °C.

Para analizar la calidad y estimar la cantidad del ADN cromosomal purificado, se corrió un gel de agarosa al 0,8% en TAE 1X [242 g Tris base, 57 ml HAc glacial y 100 ml EDTA 0,5M (pH 8,0) por litro de solución stock 50X].

Reacciones de amplificación de ADN genómico (RAPD). La reacción de RAPD se realizó en un microtubo de 500 µl mezclando 2 µl de la preparación de ADN (5 a 100 ng/µl), el partidador elegido en forma aleatoria (2 µl de una solución 10 mM, obtenidos de Operon Technologies Inc, Alameda, CA), la enzima *Taq* polimerasa (0,1-1 µl, 1-5 U/µl, adquirida en Promega), MgCl₂ a una concentración final de entre 2 y 4 mM, 1 µl de una mezcla de los 4 desoxinucleótidos trifosfatos (2,5 mM cada uno), 2 µl de tampón PCR 10X (Tris-HCl 0,1 M pH 8,3, KCl 0,5 M, gelatina 0,1%) y agua esterilizada (csp. 20 µl), cubriéndose con

una gota de aceite mineral. La reacción de PCR se realizó en un termociclador Cetus-Perkin Elmer, usando un programa de ciclos de incubación a diferentes temperaturas compuesto de tres etapas:

- desnaturación inicial del ADN, para lo que se completaron 3 ciclos de 95 °C por 1 min, 37 °C por 1 min y 72 °C por 1 min;
- amplificación de los fragmentos, que se realizó repitiendo 40 ciclos de 94 °C por 30 seg, 38 °C por 30 seg y 72 °C por 1 min; y
- extensión final a 72 °C por 5 min, etapa necesaria para completar las reacciones de amplificación.

Separación de los fragmentos amplificados de ADN. Los productos de amplificación se separaron por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 1,5% en tampón TAE 1X (agarosa Ultrapure de Bio-Rad). La corrida se realizó a 120 V constantes por 2 a 2,5 horas. El ADN se tiñó durante 20-40 minutos en bromuro de etidio (0,1 mg/ml) y se fotografió sobre un transiluminador UV de onda corta. Como estándar de peso molecular se usó ADN de fago Lambda digerido con Hind III (fragmentos de 23,1; 9,4; 6,6; 4,4; 2,3; 2,0 y 0,56 kb).

Lectura y análisis de las bandas de amplificación. Las bandas de ADN consideradas para el análisis fueron aquellas que, además de ser polimórficas, es decir, que estuvieron presente en algunas muestras y ausente en otras, se detectaron claramente, en, a lo menos, dos reacciones independientes. Además de bandas polimórficas es importante detectar bandas idénticas entre distintas muestras, con niveles de amplificación similares, las que sirven como control interno para verificar una eficiencia uniforme de las reacciones de PCR.

Los datos se compilaron como presencia o ausencia de una banda, 1 y 0, respectivamente. La carencia de un dato se representó por 9 (denominación arbitraria). Para este análisis, así como para la representación de los resultados, se utilizó el programa NTSYS-93 versión 1.70 (Rohlf, 1993), generándose una primera matriz triangular usando el índice de Dice (1945), que permite obtener un índice de disimilitud entre cada par posible de accesiones. Para el análisis de grupos se usó el programa "SAHN-clustering" incluido en NTSYS-93 (Sneath y Sokal, 1973), basado en el método UPGMA (Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean), el cual

genera un dendograma que permite visualizar las distancias genéticas entre los accesos analizados. Para efectos de identificación varietal, una distancia genética igual a cero indica que dos muestras son idénticas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Electroforesis de proteínas totales en medio desnaturante (SDS-PAGE)

Los zimogramas de proteínas totales de la semilla mostraron la presencia de más de 20 bandas proteicas. Sin embargo, ellas no permitieron diferenciar una muestra de otra, ya sea que fueran extraídas en presencia de glicerol o urea. El análisis de semillas individuales de las distintas variedades confirmó la uniformidad de los patrones proteicos (figuras 2a y 2b). Las proteínas de alto peso molecular, separadas en geles al 8% de poliacrilamida, tampoco mostraron diferencias entre las variedades analizadas.

Electroforesis ácida de proteínas (A-PAGE)

A-PAGE en lactato de aluminio (pH 3,1). Se ha descrito que la solubilización de las proteínas del arroz es más efectiva bajo condiciones de pH extremos (pH menor a 3 o mayor a 10) y en presencia de compuestos químicos como polifosfatos o detergentes (Padhye y Salunkhe, 1979). Sin embargo, la separación electroforética realizada de acuerdo a la metodología descrita por Hussain *et al.* (1989) no permitió resolver claramente bandas específicas. Las extracciones con HAc permitieron detectar la presencia de, a lo menos, 5 bandas con un fondo de tinción inespecífica, el que fue eliminado precipitando las proteínas en acetona fría. Sin embargo, en las 6 variedades en estudio se apreciaron las mismas bandas, sin encontrarse diferencias significativas entre ellas (Figura 3).

PAGE en urea-ácido acético (pH 2,7). Hames y Rickwood (1990) describieron un método de separación de las proteínas usando urea y HAc. La ventaja de usar urea como agente denaturante (comparado con SDS), es que actúa a nivel de los puentes de hidrógeno y no afecta la carga intrínseca de las proteínas, por lo que la separación de los polipéptidos se basa en su tamaño y carga. Los mismos extractos obtenidos para geles de lactato fueron analizados en geles de urea y, aunque mostraron bandas nítidas, tampoco hubo diferencias entre las variedades (resultados no presentados).

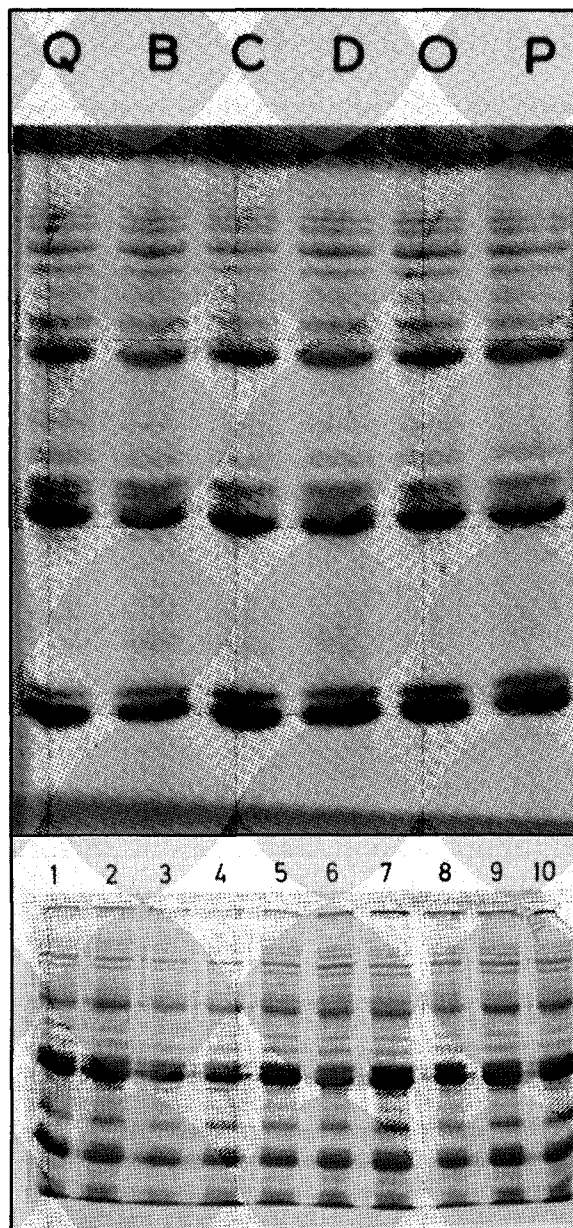


Figura 2. Proteínas de la semilla de arroz separadas mediante electroforesis tipo SDS-PAGE al 10%. (a) Patrones de las variedades Quella-INIA (Q), Buli-INIA (B), Cristal-INDUS (C), Diamante-INIA (D), Oro (O) y Perla-INDUS (P). (b) Análisis de 10 semillas de la variedad Oro, extraídas separadamente.

Figure 2. Rice seed proteins resolved by SDS-PAGE (10%) electrophoresis. (a) Protein profiles from the varieties Quella-INIA (Q), Buli-INIA (B), Cristal-INDUS (C), Diamante-INIA (D), Oro (O) and Perla-INDUS (P). (b) Analysis of 10 individually extracted seeds from the Oro variety.

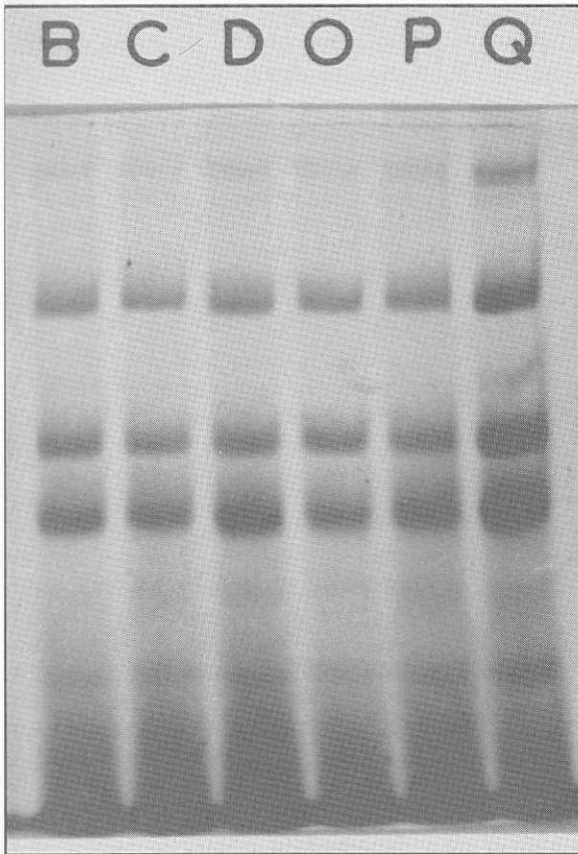


Figura 3. Proteínas de la semilla de arroz separadas mediante electroforesis tipo A-PAGE al 10%. Las variedades son Quella-INIA (Q), Buli-INIA (B), Cristal-INDUS (C), Diamante-INIA (D), Oro (O) y Perla-INDUS (P).

Figure 3. Rice seed proteins resolved by A-PAGE (10%) electrophoresis. Protein profiles are from varieties Quella-INIA (Q), Buli-INIA (B), Cristal-INDUS (C), Diamante-INIA (D), Oro (O) and Perla-INDUS (P).

Amplificación aleatoria de fragmentos de ADN polimórficos (RAPD) de arroz

El uso de RAPD tiene la ventaja de ser técnicamente simple, de no requerir información de la secuencia de ADN con la que se está trabajando, de que el protocolo es rápido y fácil de llevar a cabo y de usar fluorescencia en lugar de radioactividad para revelar las bandas de ADN (Waugh y Powell, 1992). Además, se requiere una mínima cantidad de ADN si se le compara con otras metodologías de análisis genómico como RFLP, ya que usualmente 5-25 ng de ADN por reacción son suficientes para obtener un buen resultado.

Optimización de las condiciones de la reacción.

La amplificación de ADN por PCR está influenciada, entre otros factores, por la concentración de Mg^{2+} . Se ha demostrado que su óptimo depen-

de tanto del genoma en estudio como del partidor usado (Park y Kohel, 1994). Por esta razón, se hicieron pruebas con distintos partidores usando distintas concentraciones de Mg^{2+} , determinándose en todos los casos una concentración óptima cercana a 3 mM (resultados no presentados).

Determinación de partidores polimórficos para *O. sativa*. Los 25 partidores ensayados mostraron bandas de amplificación, en número variable y con tamaños que fluctuaron entre los 200 y 3.000 pares de bases (bp). De estos 25 partidores, 10 mostraron bandas polimórficas reproducibles (Cuadro 1). Como un ejemplo, se muestran los productos de amplificación usando el partidor OPX-09 (Figura 4). La proporción de partidores que generaron bandas polimórficas (cercana al 40%) fue inferior a otras especies, e incluso fue menor a los valores señalados para arroz (Fukuoka, Hosaka y Kamijima, 1992; Ko *et al.*, 1994); esto se podría deber a que las variedades estudiadas en este caso tienen un importante grado de parentesco, ya que casi todas ellas tienen en su pedigrí a la variedad Oro. Además, el número de muestras fue pequeño ($n = 6$), lo que también disminuye la probabilidad de encontrar polimorfismos.

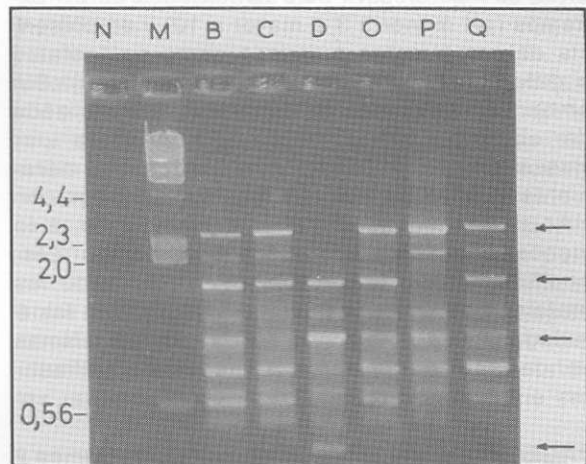


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1,5% de los fragmentos amplificados mediante RAPD, usando el partidor OPX-09. El primer carril (N) es una reacción que no contiene ADN, el carril M corresponde al estándar de peso molecular Lambda/Hind III (tamaños en kb indicados a la izquierda), y los otros carriles corresponden a las variedades Buli-INIA (B), Cristal-INDUS (C), Diamante-INIA (D), Oro (O), Perla-INDUS (P) y Quella-INIA (Q). Las flechas indican algunas bandas polimórficas.

Figure 4. Agarose gel electrophoresis at 1.5% of the DNA fragments amplified through RAPD, using the primer OPX-09. Lane N is a control reaction without DNA; lane M is Lambda/Hind III (fragment sizes in kb indicated to the left); the other lanes are varieties Buli-INIA (B), Cristal-INDUS (C), Diamante-INIA (D), Oro (O), Perla-INDUS (P) and Quella-INIA (Q). Polymorphic bands are indicated by arrows.

CUADRO 1. Polimorfismos detectados entre variedades de arroz usando RAPD

TABLE 1. Polymorphisms detected in rice cultivars using RAPD

Partidor	Tamaño ¹	Buli-INIA	Cristal-INDUS	Diamante-INIA	Oro	Perla-INDUS	Quella-INIA
OPX-03	1.530	+	+	+	+	-	+
	1.430	-	-	-	-	-	+
	820	+	+	+	+	+	+
	550	+	+	+	+	+	+
OPO-05	530	+	-	+	-	-	-
	420	-	+	-	+	+	+
	370	+	-	+	-	-	-
	340	+	-	-	+	+	+
OPX-18	300	+	-	+	-	-	-
	1.370	+	+	-	+	+	+
OPW-16	1.160	+	+	-	+	+	+
	1.040	-	+	+	+	+	+
OPX-09	750	-	-	+	-	-	-
	640	-	+	-	-	+	-
	545	-	-	+	-	-	-
	2.680	+	+	-	+	+	+
OPX-05	1.740	+	+	+	+	-	-
	500	+	+	-	+	-	+
	300	-	-	+	-	-	-
	1.475	-	+	-	-	+	-
OPI-17	650	+	+	+	-	-	-
	590	+	+	-	+	+	+
	290	-	+	-	-	+	-
	260	-	+	-	-	+	-
OPX-04	470	-	-	-	-	+	-
	2.080	+	-	-	-	-	-
OPX-12	1.120	-	+	-	-	-	-
	600	+	-	+	-	-	-
OPW-15	350	-	-	+	-	-	-
	465	-	+	-	-	-	-

¹Tamaño del fragmento en pares de bases.

Identificación varietal. De acuerdo a los datos obtenidos, se propone un sistema de identificación de variedades chilenas de arroz basado en la presencia o ausencia de bandas polimórficas, de acuerdo a un esquema basado en 8 partidores (Cuadro 2). Este esquema se puede simplificar, ya que usando sólo 4 partidores (OPI-17, OPW-16, OPX-03 y OPX-09) es posible discriminar las 6 variedades en estudio. Sin embargo, aún no se determina la reproducibilidad de estos polimorfismos para semillas individuales de cada una de las variedades. En este sentido, un antecedente interesante se encuentra en el trabajo de Ko *et al.* (1994), quienes no encontraron diferencias significativas en los patrones de RAPD al analizar individualmente 12 semillas de la variedad australiana Kulu.

Estimación de distancias genéticas. Usando el índice de disimilitud de Dice (1945), se generó un dendograma de acuerdo a las bandas de poli-

morfismo detectadas, que permitió estimar las distancias genéticas entre las variedades (Figura 5). Este dendograma está basado en un número relativamente pequeño de polimorfismos ($n < 30$), por lo que podría tener imprecisiones. El dendograma sugiere que existen dos grupos: el primero integrado por las variedades Diamante-INIA (cruzamiento peruano con progenitores de origen italiano y norteamericano) y Buli-INIA, que tiene a Diamante-INIA entre sus progenitores (50%) y a Oro (12,5%), y un segundo grupo en que están Cristal-INDUS, Oro, Perla-INDUS, y Quella-INIA. Cristal-INDUS es en este grupo el que presenta un mayor grado de divergencia, lo que se suponía *a priori* por su gran polimorfismo; esta variedad tiene un 50% de aporte de una línea de Louisiana, y un 25% aportado por Oro. Todas las variedades de este grupo tienen entre los progenitor es que conforman su pedigrí a la variedad Oro, sin embargo, las variedades Oro y Quella-INIA conforman un subgrupo, indicando

una mayor cercanía genética de ellas; de hecho, Oro aporta un 50% de la información genética de Quella-INIA. En el caso de Perla-INDUS, a pesar de ser más cercana a Oro (esta variedad aporta un 68,75% de su dotación genética), es probable que los progenitores 385 y D (desconocido), que no participan en Quella-INIA, hagan que esta variedad no se incluya en el subgrupo de Oro y Quella-INIA.

CUADRO 2. Partidores utilizados para la identificación de variedades chilenas de arroz usando RAPD

TABLE 2. Primers used for the identification of Chilean rice cultivars using RAPD

Variedad	Bandas presentes ¹	Bandas ausentes
Buli-INIA	OPX-04/2080 OPO-05/530 OPO-05/370 OPO-05/340	OPW-16/1040
Cristal-INDUS	OPX-04/1120 OPW-15/460	OPX-03/820 OPX-03/550
Diamante-INIA	OPW-16/750 OPW-16/540 OPX-09/300	OPX-18/1370 OPX-18/1160 OPX-09/2680 OPX-05/590
Oro	OPI-17/470	OPX-03/1430
Perla-INDUS	OPW-16/640	OPX-03/1530 OPX-09/1740
Quella-INIA	OPX-03/1430	OPI-17/470

¹Para la nomenclatura de las bandas, se indica el nombre del partidor (serie y número), seguido del tamaño estimado de la banda en bp; por ejemplo, OPW-16/1040 es una banda de 1040 bp amplificada con el partidor OPW-16.

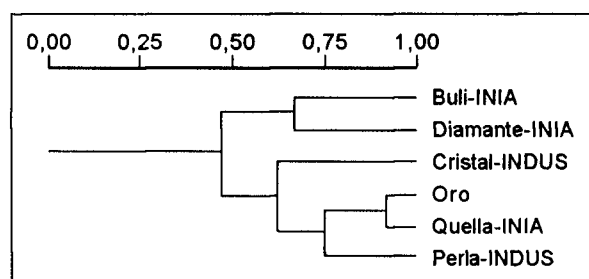


Figura 5. Dendograma construido a partir de la matriz de disimilitud generada con los polimorfismos detectados por RAPD.

Figure 5. Dendogram designed on the basis of the dissimilarity matrix, generated in the polymorphisms detected by RAPD.

En el marco de un programa de mejoramiento genético, los marcadores tienen a lo menos 3 potenciales aplicaciones: (i) en la elección de progenitores para un cruzamiento, se puede pre-seleccionar materiales genéticamente similares o diferentes, de acuerdo a los objetivos de la cruce; (ii) en base a estos polimorfismos se pueden construir "mapas genéticos" sobre la base de poblaciones planificadas de acuerdo al carácter de interés, y en estos mapas identificar marcadores moleculares asociados a esas características (genes de resistencia a enfermedades o problemas de origen metabólico como la "panza blanca", o factores abióticos como tolerancia a frío). A futuro, estos marcadores podrían ser de uso rutinario en el análisis de segregantes, con el consecuente ahorro en tiempo requerido para generar una nueva variedad; y (iii) estos marcadores serán la herramienta de elección para realizar "fingerprinting" de variedades comerciales, lo que será imprescindible para registrar la propiedad del material genético.

CONCLUSIONES

El análisis de los perfiles proteicos de semillas de variedades chilenas de arroz, usando electroforesis en condiciones desnaturantes (SDS-PAGE) o en condiciones ácidas (A-PAGE), mostró que no existen diferencias intervarietales a este nivel. Por el contrario, un esquema analítico basado en el análisis de fragmentos de amplificación de ADN genómico con partidores aleatorios (RAPD) sí permitió discriminar entre las 6 muestras en estudio. Se identificó un mínimo de 4 partidores que permiten diferenciar entre estas variedades (OPI-17, OPW-16, OPX-03 y OPX-09). Asimismo, el análisis de un dendograma construido a partir de estos polimorfismos permitió definir las relaciones filogenéticas entre estas variedades, existiendo dos grupos genéticos: uno constituido por las variedades Diamante-INIA y Buli-INIA y el otro por las variedades Cristal-INDUS, Oro, Perla-INDUS y Quella-INIA. Aunque el método RAPD es de mayor costo que una electroforesis de proteínas, fue el único que dio resultados reproducibles y representativos, en un lapso de tiempo razonable, por lo que se recomienda como método para la identificación varietal en arroz.

RESUMEN

Una adecuada identificación varietal es necesaria para registrar y controlar la distribución de semillas comerciales y para determinar el nivel de pureza de éstas. En este trabajo se evaluaron diversas técnicas que utilizan marcadores moleculares para discriminar las variedades de arroz utilizadas en Chile. El análisis electroforético de proteínas de la semilla mostró perfiles idénticos para 6 variedades estudiadas, tanto en medio desnaturalante (SDS-PAGE) como en medio ácido (A-PAGE). Por el contrario, al analizar directamente el genoma, aplicando una técnica que utiliza la amplificación mediante la reacción en cadena de una polimerasa (PCR) de fragmentos

polimórficos de ADN, utilizando partidores de amplificación elegidos al azar (RAPD), fue posible identificar fácilmente las variedades analizadas. De 22 partidores ensayados, 10 generaron bandas de ADN polimórficas. Las bandas generadas por 4 de éstos, fueron usadas para diseñar un protocolo de identificación varietal. Adicionalmente, los polimorfismos detectados permitieron construir un dendograma para estimar las relaciones filogenéticas existentes entre las variedades estudiadas.

Palabras claves: RAPD, SDS-PAGE, A-PAGE, arroz, relaciones filogenéticas.

LITERATURA CITADA

- ALIAGA-MOREL, J.R., CULIANEZ-MACIA, F.A., CLEMENTE-MARÍN, G. and PRIMO-YUFERA, E. 1987. Differentiation of rice varieties by electrophoresis of embryo protein. *Theoretical Applied Genetics* 74: 224-232.
- ALVARADO, R. y PINO, A. 1982a. Arroz Quella-INIA. *Agricultura Técnica (Chile)* 42(3): 251.
- ALVARADO, R. y PINO, A. 1982b. Arroz Diamante-INIA. *Agricultura Técnica (Chile)* 42(3): 253.
- ANDEBRHAN, T. and FURTEK, D.B. 1994. Random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis of *Crinipellis pernicios-a* isolates from different hosts. *Plant Pathology* 43: 1.020-1.027.
- ANÓNIMO. 1964. Semilla de arroz. Variedad de arroz Oro. Facultad de Agronomía, Universidad de Concepción. Chillán, Chile. 8 p.
- BIELAWSKI, J.P., NOACK, K. and PUMO, D.E. 1995. Reproducible amplification of RAPD markers from vertebrate DNA. *BioTechniques* 18: 856-890.
- CHAPCO, W., ASHTON, N.W., MARTEL, R.K.B. and ANTONISHYN, N. 1992. A feasibility study of the use of random amplified polymorphic DNA in the population genetics and systematics of grasshoppers. *Genome* 35: 569-574.
- DEMEKE, T. and ADAMS, R.P. 1994. The use of PCR-RAPD analysis in plant taxonomy and evolution. En: H.G. Griffin and A.M. Griffin (ed.). *PCR technology. Current innovations.* CRC Press. p.: 179-191.
- DICE, L.R. 1945. Measures of the amount of ecological association between species. *Ecology* 26: 297-302.
- FUKUOKA, S., HOSAKA, K. and KAMIJIMA, O. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Japanese Journal Genetics* 67: 243-252.
- GLASZMANN, J.C. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theoretical Applied Genetics* 74: 21-30.
- HAMES, B.D. and RICKWOOD, D. 1990. Gel electrophoresis of proteins, a practical approach. 2ª edición, Oxford University Press.
- HEWSTONE, N. e HINRICHSEN, P. 1994. Composición de subunidades de gluteninas de alto peso molecular de trigos chilenos de pan. *Agricultura Técnica (Chile)* 54: 211-218.
- HUSSAIN, A., SCANLON, M.G., JULIANO, B.O. and BUSHUK, W. 1989. Discrimination of rice cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chemistry* 66: 353-356.
- JHINGAN, A.K. 1992. A Novel technology for DNA isolation. *Methods Molecular Cellular Biology* 3: 15-22.
- KO, H.L., COWAN, D.C., HENRY, R.J., GRAHAM, G.C., BLAKENEY, A.B. and LEWIN, L.G. 1994. Random amplified polymorphic DNA analysis of Australian rice (*Oryza sativa* L.) varieties. *Euphytica* 80: 179-189.
- MÄKI-VALKAMA, T. and KARJALAINEN, N. 1994. Differentiation of *Erwinia carotovora* subsp. *atroseptica* and *carotovora* by RAPD-PCR. *Annals Applied Biology* 125: 301-309.
- NG, P.K.W. and BUSHUK, W. 1987. Glutenin of marquis wheat as a reference for estimating molecular weights of glutenin subunits by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. *Cereal Chemistry* 64: 324-327.
- PADHYE, V.W. and SALUNKHE, D.K. 1979. Extraction and characterization of rice proteins. *Cereal Chemistry* 56: 389-393.

- PARK, Y. and KOHEL, R.J. 1994. Effect of concentration of $MgCl_2$ on Random-Amplified DNA Polymorphism. *BioTechniques* 16: 652-655.
- ROGERS, S.O. and BENDICH, A.J. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Molecular Biology Manual* A6(1): 1-10.
- ROHLF, F.J. 1993. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system. Version 1.80. Exeter Software Press. Setauket, New York. 13 capítulos.
- SAIKI, R.K., GELFAND, D.H., STOFFEL, S., SCHARF, S.J., HIGUCHI, R., HORN, G.T. and ERLICH, H.A. 1988. Primer detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239: 487-491.
- SAMBROOK, J., FRITSCH, E.F. and MANIATIS, T. 1989. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Segunda edición. Cold Spring Harbor Lab. Press. Cold Spring Harbor, New York.
- SECOND, G. 1982. Origin of the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp.): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Japanese Journal Genetics* 57: 25-57.
- SNEATH, P.H.A. and SOKAL, R.R. 1973. *Numerical Taxonomy*. Freeman Press. San Francisco. 573 p.
- STAUB, J.E. and MEGLIC, V. 1993. Molecular genetic markers and their legal relevance for cultivar discrimination: A case study in cucumber. *HortTechnology* 3: 291-300.
- WANG, Z.Y. and TANKSLEY, S.D. 1989. Restriction fragment length polymorphism in *Oryza sativa* L. *Genome* 32: 1.113-1.118.
- WAUGH, R. and POWELL, W. 1992. Using RAPD markers for crop improvement. *Trends Biotechnology* 10: 186-191.
- WELSH, J. and McCLELLAND, M. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Research* 18: 7.213-7.218.
- WILLIAMS, J.G.K., KUBELIK, A.R., LIVAK, K.J., RAFALSKI, J.A. and TINGEY, S.V. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Research* 18: 6.531-6.535.
- YOSHIMURA, S., YOSHIMURA, A. and IWATA, N. 1992. Simple and rapid PCR method by using crude extracts from rice seedlings. *Japanese Journal Breeding* 42: 669-674.
- YU, L.-X. and NGUYEN, H.T. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theoretical Applied Genetics* 87: 668-672.