

## IDENTIFICACIÓN DE CULTIVARES Y LÍNEAS DE MEJORAMIENTO DE ARROZ DE CHILE MEDIANTE AMPLIFICACIÓN DE FRAGMENTOS POLIMÓRFICOS (AFLP)

### Identification of Chilean rice cultivars and breeding lines by means of Amplified Fragment Length Polymorphism (AFLP)

Carlos Aguirre<sup>1</sup>, Roberto Alvarado<sup>2</sup> y Patricio Hinrichsen<sup>1\*</sup>

#### ABSTRACT

Twelve rice (*Oryza sativa* L.) cultivars and breeding lines developed by the Rice Breeding Program at the National Institute of Agriculture Research (INIA), Quilamapu Regional Research Center, were genetically characterized by amplified fragment length polymorphism (AFLP). Sixteen of 21 primer combinations evaluated were informative, generating a total of 667 amplicons, 94 of them polymorphic (14.4%), with a range between 9 to 33% of polymorphism per primer combination. This indicates that the material handled by the breeding program at INIA has low genetic diversity in comparison to wild germplasm of the species, or even compared to the material managed by other rice breeding programs. The detected polymorphic amplicons were used to prepare a dendrogram of the genetic distances, detecting four differentiable groups that only partially coincide with the information available in their pedigrees. In spite of the low genetic diversity detected, it was determined that with the use of three AFLP+3 combinations (PE1G/PM1I, PE1H/PM1A and PE1G/PM1H), it is possible to differentiate among the cultivars studied.

**Key words:** genetic diversity, fingerprinting, AFLP, pedigree, Chilean rice varieties.

#### RESUMEN

Doce cultivares y líneas de arroz (*Oryza sativa* L.) desarrollados por el programa de fitomejoramiento del Instituto de Investigaciones Agropecuarias (INIA), Centro Regional de Investigación Quilamapu, fueron caracterizados genéticamente mediante amplificación de fragmentos polimórficos (AFLP). De 21 combinaciones ensayadas, sólo 16 fueron informativas, generando un total de 667 amplicones, 94 de ellos polimórficos (14,4%), con un rango entre 9 y 33% de polimorfismo por combinación. Esto indica que el material manejado por el programa de INIA presenta un bajo nivel de diversidad genética comparado tanto con germoplasma silvestre de la especie como con aquel usado por otros programas de fitomejoramiento de la especie. Los amplicones polimórficos detectados se usaron para preparar un dendrograma de distancias genéticas, detectándose cuatro grupos diferenciables que sólo coinciden parcialmente con la información disponible de sus pedigrís. A pesar de la baja diversidad genética detectada, se determinó que con el uso de tres combinaciones de partidores de AFLP+3 (PE1G/PM1I, PE1H/PM1A y PE1G/PM1H) es posible discriminar entre los cultivares estudiados.

**Palabras clave:** diversidad genética, fingerprinting, AFLP, pedigrí, cultivares chilenos de arroz.

<sup>1</sup> Instituto de Investigaciones Agropecuarias, Centro Regional de Investigación La Platina, Casilla 439/3, Santiago, Chile.  
E-mail: phinrich@inia.cl \*Autor para correspondencia.

<sup>2</sup> Instituto de Investigaciones Agropecuarias de Chile, Centro Regional de Investigación Quilamapu, Casilla 426, Chillán, Chile.  
Recibido: 29 de abril de 2000. Aceptado: 24 de noviembre de 2004.

## INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) fue introducido al país en la década de 1920; en el censo de 1938 se describía una superficie sembrada de casi 3.000 ha (Hepp, 1945), la que a fines de la década de 1970 estaba en el orden de las 40.000 ha. En los últimos años se ha mantenido estable en torno a las 28.000 ha (ODEPA, 2004). Este cultivo tradicionalmente es asociado a regiones tropicales y subtropicales del planeta, existiendo también materiales que se han adaptado a latitudes más septentrionales, de clima templado, con inviernos fríos y veranos secos y calurosos, como la Zona Central de Chile (IRRI, 1983).

Estas condiciones ambientales y la ausencia de patógenos importantes han permitido que los cultivares chilenos permanezcan vigentes por períodos prolongados, lo que también se verifica en otros países con similar clima, como Australia, y marca una diferencia con países tropicales. En el caso de Chile, la producción se ve afectada por factores agroclimáticos, de manejo y calidad de grano. Consecuentemente, los objetivos del programa de mejoramiento del cultivo son mejorar el rendimiento, la calidad del grano y la resistencia al frío (Alvarado y Grau, 1991).

Se ha sugerido que los cultivares chilenos de arroz tienen una elevada homogeneidad genética, lo que ha sido documentado en base a marcadores moleculares de ADN (amplificación de fragmentos de ADN en base a partidores de diseño aleatorio, o RAPD) y a patrones electroforéticos de las proteínas de acúmulo de la semilla (Hinrichsen *et al.*, 1996). En parte, esto se explicaría por tener un fondo genético estrecho, debido a la participación de un escaso número de progenitores, como Oro (Anónimo, 1964) y Diamante (Alvarado y Pino, 1982). No se sabe con certeza, pero se estima que el arroz llegó a Chile desde Italia (Alvarado, 1989) en los primeros decenios del siglo pasado, y la selección de plantas sobre la población heterogénea existente en el país dio origen a las primeras variedades, como la mencionada var. Oro. Desde sus inicios, el programa de mejoramiento ha trabajado con incorporación de germoplasma desarrollado en otros países (Alvarado, 1997). Una segunda variedad importante es Diamante, que fue generada por el método de pedigrí a partir de una progenie F<sub>2</sub> introducida desde Perú (Alvarado y Pino, 1982). Una de las características de este programa es que desde sus inicios se basó en pocos progenitores, lo

que sugiere *a priori* que debería presentar un estrecho fondo genético. Sin embargo, si los progenitores aunque escasos eran de diversos orígenes, podrían tener una diversidad genética más alta que lo sospechado, lo que constituye una hipótesis alternativa.

El estudio de la diversidad genética del germoplasma de arroz y las diferencias genéticas entre potenciales progenitores ha sido de gran interés para el manejo de los programas de fitomejoramiento, como para los involucrados en cualquiera de las etapas del proceso productivo y su control, incluyendo a quienes registran y regulan la distribución de semillas comerciales, los propios productores que deben elegir la semilla adecuada y los empresarios molineros y distribuidores. Actualmente es de alto interés tener herramientas analíticas adecuadas para establecer la identidad genética de los cultivares, y para determinar el nivel de pureza de las semillas (Staub y Meglic, 1993). Esta identificación se ha basado tradicionalmente en la caracterización agronómica y morfológica de las semillas y plantas, lo que ha evolucionado en el último decenio hacia el uso de diversos tipos de marcadores moleculares que permiten identificar polimorfismos o diferencias a nivel de secuencias de ADN, permitiendo comparar clones, cultivares o variedades botánicas, razas, especies, o cualquier nivel de organización taxonómica, tanto en plantas como en animales y microorganismos. Con diversos propósitos se han usado métodos bioquímicos en arroz, como el análisis electroforético de las proteínas de la semilla (Aliaga-Morel *et al.*, 1987), lo que, como en otras especies de cereales, se ha hecho principalmente mediante cromatografía líquida 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 discriminante.

Tanto los métodos que analizan las proteínas (una forma de expresión fenotípica) como los análisis agronómico-botánicos han sido complementados por alguna de las diversas formas de análisis del genoma, especialmente por métodos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) (Saiki *et al.*, 1988). Además, ha sido posible automatizar estas técnicas, lo cual permite disponer de metodologías rápidas y eficientes para analizar un gran número de muestras en breve plazo.

La importancia del cultivo del arroz en el mundo es proporcional a la gran cantidad de trabajos que han recurrido a estas herramientas moleculares para distintos tipos de análisis genético en esta especie. Es así como RAPD, técnica basada en la amplificación de fragmentos de ADN mediante PCR por medio de partidores de secuencia aleatoria (Welsh y McClellan, 1990; Williams *et al.*, 1990), ha sido descrita en varios estudios para diferenciar cultivares de arroz (Fukuoka *et al.*, 1992; Yu y Nguyen, 1994; Hinrichsen *et al.*, 1996). Sin embargo, RAPD tiene un limitado nivel de reproducibilidad, lo que ha llevado a que su uso se prefiera más bien para estudios comparativos de colecciones de germoplasma. Posterior al RAPD se desarrolló el AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism), método altamente sensible para detectar polimorfismos de ADN (Vos *et al.*, 1995), que combina una digestión enzimática con una amplificación por PCR. Su ventaja es que entrega patrones de información con un mayor número de amplicones y de mayor reproducibilidad que RAPD, y como otros marcadores de tipo anónimo, no requiere información previa del genoma en estudio. Se han descrito diversas aplicaciones de AFLP para estudios genéticos de arroz, entre los cuales destacan los análisis de identidad de cultivares y de diversidad genética de genotipos de diversos orígenes (Mackill *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1998; Zhu *et al.*, 1998; Aggarwal *et al.*, 2002), mapeo de ligamiento (Mackill *et al.*, 1996; Virk *et al.*, 1998; Dong *et al.*, 2000), análisis filogenéticos entre ancestros de la especie cultivada y sus subespecies principales *indica* y *japonica* (Aggarwal *et al.*, 1999), y mejoramiento genético asistido por marcadores (Joseph *et al.*, 2004), entre otros.

El objetivo de este trabajo fue desarrollar un método de identificación varietal o "fingerprinting" molecular basado en AFLP de 12 cultivares y líneas avanzadas de arroz, así como usar la información generada para estimar la magnitud de la diversidad genética presente en esta subcolección del germoplasma manejado por el programa de fitomejoramiento del arroz del Centro Regional de Investigación Quilamapu de INIA.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Cultivares estudiados

El material empleado para la extracción de ADN fueron hojas de plántulas jóvenes de 12 cultivares

chilenos de arroz, cuyo pedigrí se indica en el Cuadro 1. Las plántulas se obtuvieron germinando semillas en cámara húmeda, bajo condiciones de humedad y temperatura controladas.

### Extracción de ADN

La extracción de ADN se realizó desde hojas frescas germinadas durante 25 días en cámara húmeda regulada a 25°C y se basó en el método del bromuro de cetil-trimetil amonio (CTAB) descrito por Rogers y Bendich (1988), con modificaciones menores. Las hojas se molieron en un mortero con N<sub>2</sub> líquido y se incubaron en 700 µL de tampón de extracción CTAB 2X (CTAB 2%, NaCl 1,4 M, Tris-HCl 100 mM, EDTA 25 mM [pH 8,0], PVP 2% y 1/100 vol. de β-mercaptoetanol) a 65°C por 20 min, agitando cada cierto tiempo. La mezcla se dejó enfriar a temperatura ambiente y luego se agregó 1 vol. de cloroformo:alcohol isoamílico (24:1) y se agitó en vórtex por 30 s. Para separar las fases se centrifugó a 14.000 r.p.m. por 15 min y se transfirió la fase acuosa a otro tubo, agregándosele 1/10 vol. de CTAB 10%. Se repitió la extracción orgánica con cloroformo y se recuperó la fase acuosa, a la que se le agregó 1 vol. de CTAB de precipitación, mezclando por inversión. Se centrifugó por 10 min a 14.000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. El sedimento se hidrató en 250 µL de TE (10 mM Tris-HCl [pH 8,0], 1 mM EDTA) conteniendo NaCl 1 M. Se dejó reposar hasta disolver el sedimento y se agregó RNasa A (Sigma, St. Louis, Missouri, EE.UU.) a una concentración final de 20 µg mL<sup>-1</sup>. Se incubó a 37°C por 20 min y se agregaron 2,5 vol. de etanol absoluto frío, dejando reposar a -70°C por 20 min. Se centrifugó por 10 min a 14.000 r.p.m. y se eliminó el sobrenadante. El precipitado se lavó con etanol al 70% y se centrifugó por 2 min a 14.000 r.p.m. El precipitado final se secó al vacío y se rehidrató en 50 µL de TE. Las muestras de ADN concentrado se re-centrifugaron posteriormente, para descartar posibles residuos de polisacáridos. La integridad y rendimiento del ADN genómico se observó en un gel de agarosa al 0,8% en TBE 1X (Tris 10 mM, Borato 20 mM, EDTA 1 mM), teñido con bromuro de etidio. La calidad del ADN obtenido fue adecuada para las digestiones con enzimas de restricción que requiere el AFLP.

### Partidores de PCR y adaptadores

Los partidores para la reacción +1 fueron: *EcoRI* +1: 5'-GAC TGC GTA CCA ATT CA-3'; *MseI* +1: 5'-GAT GAG TCC TGA GTA AG-3' (IDT Inc.,

**Cuadro 1.** Cultivares y líneas de arroz estudiadas y su respectivo pedigrí (se indica el nombre abreviado de cada cultivar en la segunda fila). Los valores indican los aportes teóricos de cada progenitor indicado a la izquierda, como fracción del genoma de cada cultivar obtenido. Para los cvs. Oro y Tuc-500 no se cuenta con información de pedigrí (asteriscos).

**Table 1.** Cultivars and breeding lines studied and their respective pedigree (abbreviated name of each cultivar in the second line). The values indicate the theoretical participation of each progenitor (listed at the left), as a fraction of the genome of each cultivar obtained. There is no pedigree data for cvs. Oro and Tuc-500 (asterisks).

Progenitores	Cultivares y líneas													
	Cinia 606	Cinia 609	Cinia 609	Quila 64129	Oro (*)	Oro (*)	Cristal Cri	Brillante Bri	Tuc 500 (*)	Perla Per	Diamante Dia	Buli Bul	Cinia 669	Cinia 242
	C606	C609	C609	Qui	Oro	Oro	Cri	Bri	Tuc	Per	Dia	Bul	C669	C242
Lemont	0,125	0,125	-	-	s/i	s/i	-	-	s/i	-	-	0,25	0,125	0,25
Cesarlot	0,0625	-	-	-	s/i	s/i	-	-	s/i	-	-	0,125	-	-
Oro	0,0625	0,1875	0,5	0,5	s/i	s/i	0,25	-	s/i	0,25	-	0,125	-	-
Diamante	0,25	0,4375	0,5	0,5	s/i	s/i	-	0,5	s/i	-	-	0,5	0,3125	0,625
Oryzella	0,5	-	-	-	s/i	s/i	-	-	s/i	-	-	-	0,5	-
Ñiquén	-	-	-	-	s/i	s/i	-	0,5	s/i	-	-	-	0,0625	0,125
385	-	-	-	-	s/i	s/i	0,25	-	s/i	0,25	-	-	-	-
L13-1-1-22	-	-	-	-	s/i	s/i	0,5	-	s/i	0,5	-	-	-	-
Estrela	-	0,25	-	-	s/i	s/i	-	-	s/i	-	-	-	-	-
Agostano	-	-	-	-	s/i	s/i	-	-	s/i	-	0,25	-	-	-
P6	-	-	-	-	s/i	s/i	-	-	s/i	-	0,25	-	-	-
Bluerose	-	-	-	-	s/i	s/i	-	-	s/i	-	0,0625	-	-	-
RB	-	-	-	-	s/i	s/i	-	-	s/i	-	0,1875	-	-	-
Balilla	-	-	-	-	s/i	s/i	-	-	s/i	-	0,25	-	-	-

Signo (-) indica que no hay relación filial entre un progenitor (columna de la izquierda) y un cultivar o línea analizado en este trabajo (fila superior); s/i: sin información de pedigrí. (-) denotes there is no parent-offspring relation between the progenitors (left column) and any of the cultivars or lines analyzed here (upper line); s/i: no pedigree available.

Coralville, Iowa, EE.UU.). Los partidores para la reacción +3 tienen la misma secuencia que los +1, con dos nucleótidos adicionales hacia el extremo 3', según se indica en el Cuadro 2. Los adaptadores empleados fueron los siguientes, alineados de acuerdo a lo descrito por Vos *et al.* (1995):

Adaptador *EcoRI*: 5'- CTCGTAGACTGCGTACC  
CTGACGCATGGTTAA-5'

Adaptador *MseI*: 5'- GACGATGAGTCCTGAG  
TACTCAGGACTCAT-5'

### Reacción de AFLP

La reacción de AFLP se realizó de acuerdo al protocolo de Vos *et al.* (1995), con algunas modificaciones. Primero, la digestión del ADN se realizó en un volumen total de 25 µL: 0,2 µg de ADN genómico con 2,5 U de *EcoRI* y 2,5 U de *MseI* (New England Biolabs, Maryland, EE.UU.), 2,5 µL de tampón NEB2 10X (NaCl 500 mM, Tris-HCl 100 mM [pH 7,9], MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 10 mM), a 37°C por 3 h. En segundo lugar, la ligación de adaptadores se efectuó en una reacción que contenía 2,5 pmol de adaptador *EcoRI*, 25 pmol de adaptador *MseI*, 3,0 µL de tampón de ligasa 10X (Tris-HCl 500 mM [pH 7,8], MgCl<sub>2</sub> 100 mM, DTT 100 mM, ATP 10 mM, 50 µg mL<sup>-1</sup> de BSA) y 100 U de ADN ligasa T4 (New England Biolabs), en un volumen final de 5 µL. Esta mezcla se agregó al ADN digerido y se

incubó toda la noche con ciclos de 30 s, oscilando entre 10 y 30°C. Las amplificaciones se realizaron en dos etapas. En la primera (PCR +1), la mezcla de reacción contenía 5 µL de una dilución 1/10 de la mezcla de ligación, 75 ng de cada partidor más MgCl<sub>2</sub> (1,2 mM), dNTP (0,2 mM), 0,5 U de ADN polimerasa *Taq* y tampón de PCR (Tris-HCl 10 mM [pH 8,3], KCl 50 mM, y 0,01% de gelatina) en un volumen final de 50 µL. El programa de amplificación utilizado fue de 94°C por 2 min; 35 ciclos de 94°C por 30 s, 55°C por 30 s y 72°C por 1 min, con una extensión final de 5 min a 72°C. Finalmente, para la amplificación selectiva (PCR +3) se mezclaron 5 µL de una dilución 1/10 del PCR +1 con 30 ng de cada partidor, dNTP (0,8 mM final), MgCl<sub>2</sub> (2 mM final), tampón de PCR (Tris-HCl 10 mM [pH 8,3], KCl 50 mM, y gelatina 0,01%) y 0,5 U de ADN polimerasa *Taq* en un volumen final de 20 µL. El programa de amplificación +3 fue una desnaturación inicial de 94°C por 3 min, 12 ciclos de 94°C por 30 s, 65°C por 30 s (disminuyendo 0,7°C por ciclo hasta llegar a 56°C) y 72°C por 1 min. Luego, 26 ciclos de 94°C por 30 s, 56°C por 30 s y 72°C por 1 min, finalizando con una extensión de 2 min a 72°C.

### Electroforesis y tinción del gel

Los productos de la amplificación PCR +3 se concentraron a 1/3 de su volumen mediante centrifugación al vacío y se mezclaron con 1 vol. de tampón de

**Cuadro 2. Combinaciones de partidores *EcoRI* +3 (columna de la izquierda) y *MseI* +3 (fila superior) usados en el análisis de 12 genotipos de arroz. Se indica la nomenclatura resumida de los partidores (PE1A, PE1B, PE1C, etc.) y los nucleótidos adicionales respectivos, así como el nivel de polimorfismo observado para 21 de las 48 posibles combinaciones.**

**Table 2. *EcoRI* +3 (left column) and *MseI* +3 (upper row) primer combinations used in the analysis of 12 rice genotypes. Brief primer names (PE1A, PE1B, PE1C, etc.) and their corresponding additional nucleotide sequences as well as the polymorphism level observed for 21 out of 48 possible combinations are indicated.**

Partidores <i>EcoRI</i> +3	Partidores <i>MseI</i> +3							
	PM1A M-GTA	PM1B M-GCG	PM1C M-GAC	PM1D M-GGT	PM1E M-GTT	PM1G M-GCA	PM1H M-GAG	PM1I M-GAT
PE1A E-AAC	√√√	√	√√√	0	√√	0	n/e	√√
PE1B E-ACG	√√	0	√	0	n/e	n/e	n/e	n/e
PE1D E-ACA	n/e	n/e	√√	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e
PE1E E-AAT	√√	n/e	√	n/e	n/e	n/e	n/e	n/e
PE1G E-ATC	n/e	n/e	n/e	√√	n/e	√√	√√√	√√
PE1H E-AGA	√√	n/e	n/e	n/e	0	n/e	n/e	√

n/e: indica que la combinación de AFLP respectiva no fue ensayada.

√: símbolo que denota el nivel de polimorfismo de cada combinación de partidores: √√√, 8 ó más bandas polimórficas (b. polim.); √√, 5 a 7 b. polim.; √, 2 a 4 b. polim.; 0, ausencia de polimorfismos.

n/e: non assayed AFLP combinations.

√: denotes the polymorphic level of each AFLP combination: √√√, 8 or more polymorphic bands (polym. b.); √√, 5 to 7 polym. b.; √, 2 to 4 polym. b.; 0, no polymorphisms detected.

carga (95% de formamida, EDTA 10 mM [pH 8,0], y azul de bromofenol y xylene cyanol a 1 mg mL<sup>-1</sup> cada uno). Las muestras se desnaturaron a 90°C por 4 min y luego se enfriaron en hielo. Las muestras (entre 1 y 3 µL) se cargaron en un gel de secuencia de poliacrilamida al 6%, conteniendo urea (7,5 M) preparada en TBE 1X. El gel se fijó a uno de los vidrios usando Bind-Silane A (Promega, Madison, Wisconsin, EE.UU.), mientras que el otro vidrio se trató con Repel-Silane ES (Pharmacia-Biotech, Rochester, New York, EE.UU.). La electroforesis se corrió a 70 W y 1800 V por 2,5 h, aproximadamente. El gel se fijó sumergiendo el vidrio que lo contenía en ácido acético al 10% por 30 min con agitación; después de dos lavados rápidos en agua destilada, el gel se transfirió a la solución de tinción (0,1% de AgNO<sub>3</sub> y 1,5 mL L<sup>-1</sup> de formaldehído al 37%) y se mantuvo con agitación por 30 min. Luego se reveló sumergiéndolo en una solución de revelado (3% de NaCO<sub>3</sub>, 2 mg L<sup>-1</sup> de tiosulfato de sodio anhidro y 1,5 mL L<sup>-1</sup> de formaldehído al 37%) hasta la aparición de los fragmentos de amplificación, antes que la tinción de fondo del propio gel interfiriera. La tinción se detuvo con un exceso de ácido acético al 10% y finalmente se lavó por 30 min en agua destilada.

### Análisis de datos

Los fragmentos de ADN polimórficos se compilaron en una matriz de datos binarios con los cuales se calcularon índices de similitud genética relativos usando el paquete estadístico NTSys-PC 2.03 (Rohlf, 1997), usando el índice de Jaccard para los cálculos de distancias genéticas. La formación de clados para construir el dendrograma se realizó con el índice Simple Matching, realizando los agrupamientos en base al estadígrafo UPGMA (pares matemáticos de peso estadístico no balanceado).

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Diversidad genética de cultivares chilenos de arroz determinada mediante AFLP y comparación con otros estudios

La diversidad genética (DG) de esta muestra de 12 genotipos del programa de mejoramiento genético se evaluó mediante el uso de 21 combinaciones de partidores de AFLP (Cuadro 2), de las cuales 16 fueron informativas. Estas 16 combinaciones generaron un total de 667 fragmentos de ADN amplificados (amplicones), de las cuales sólo 94 fueron polimórficos (14,4%). Si el cálculo de este índice de

polimorfismo hubiese incluido también los amplicones detectados con las combinaciones de partidores no informativas (Cuadro 2), el porcentaje de polimorfismo sería probablemente menor. En promedio, se identificaron 41 amplicones y 5,9 bandas polimórficas por cada reacción de AFLP. En valores absolutos, cinco combinaciones coincidieron con una cantidad mínima de cuatro polimorfismos, mientras que una combinación (PE1G/PM1H) alcanzó un máximo de 11 polimorfismos (Cuadro 3). Los niveles de polimorfismo asociados a cada combinación de partidores variaron en un rango entre 8,9 y 33,3% (combinaciones PE1E/PM1C y PE1G/PM1H, respectivamente).

Un indicador de la alta homogeneidad genética de esta colección de cultivares y líneas de arroz es que un 23,8% de las combinaciones ensayadas no revelaron ninguna banda polimórfica. Además, sólo tres combinaciones (PE1A/PM1A, PE1A/PM1C y PE1G/PM1H) presentaron ocho o más fragmentos polimórficos, coincidiendo con ser las combinaciones porcentualmente más informativas; estas combinaciones son candidatas para realizar estudios adicionales de DG en ésta u otras colecciones de germoplasma de arroz estructuradas en base al mismo o similar grupo de progenitores.

Los 12 genotipos analizados en este trabajo (Cuadro 1) representarían la mayor parte de la DG del germoplasma de arroz usado en el Programa de Fitomejoramiento del INIA, aunque este es un aspecto que requeriría ser determinado con mayor precisión, mediante estudios adicionales. Estos resultados indican que la diversidad genética de estos genotipos es muy reducida en comparación con otros grupos de genotipos de arroz estudiados mediante AFLP (Mackill *et al.*, 1996). Probablemente, la difícil adaptación de germoplasma exótico a las condiciones chilenas, principalmente por las bajas temperaturas, ha sido un factor limitante para tener una mayor diversidad genética. En comparación, Zhu *et al.* (1998) identificaron 179 polimorfismos con sólo cuatro combinaciones de partidores, sobre una muestra de 57 variedades de arroz de diversos orígenes, a la vez que demostraron una amplia distribución de estos marcadores en diferentes grupos de ligamiento del genoma de la especie.

El estrecho fondo genético determinado para este grupo de 12 genotipos no se explicaría porque sean todos de una misma subespecie (*Oryza sativa* subsp.

*japonica*), puesto que en el citado trabajo de Zhu *et al.* (1998), como en otros que han estimado la DG dentro de la subespecie *indica* (Singh *et al.*, 1999; Prashanth *et al.*, 2002), han revelado niveles de polimorfismo mucho más altos. En el caso de 42 cultivares de India analizados con un conjunto de seis combinaciones de partidores, se detectó un 91% de amplicones polimórficos, con 41 fragmentos amplificados en promedio (Singh *et al.*, 1999). La elevada DG detectada en ese caso se explica por tratarse de germoplasma proveniente de uno de los centros de origen y diversidad de la especie, incluyendo varios cultivares tradicionales. En otro trabajo más reciente (Prashanth *et al.*, 2002), cuyo universo de estudio fue muy similar al anterior (49 accesiones de la India, incluyendo cultivares tradicionales y modernos), se detectó un 62% de amplicones polimórficos, que aunque menor que lo reportado por Singh *et al.* (1999), es muy superior al valor establecido para la colección de cultivares y líneas manejadas en Chile (14%). Al igual que en otros trabajos publicados (Prashanth *et al.*, 2002), cada uno de los 12 genotipos considerados en este estudio presentó un patrón genético único (patrón de amplicones de AFLP), es decir, se pudo discriminar entre cultivares y líneas.

Algunos autores han comparado diversos tipos de marcadores para diferenciar genotipos de arroz. Cho *et al.* (1999) encontraron que AFLP fue el método más apropiado para diferenciar cultivares coreanos con estrecho fondo genético, lo que se asemeja a la situación analizada en este trabajo. Marcadores de tipo ISSR (Inter-Simple Sequence Repeats) han sido usados también en el análisis de DG de arroz, mostrando una mayor eficiencia que AFLP en términos de número y proporción de fragmentos polimórficos obtenidos por cada reacción efectuada (Blair *et al.*, 1999). Sin embargo, el trabajo en que se compararon ambas metodologías se basó en 59 cultivares que presentaban una alta DG, por lo que sería interesante evaluar este tipo de marcador (ISSR) con un conjunto de cultivares que presentan un fondo genético más estrecho, como el analizado en este trabajo. Por otra parte, el uso de otro tipo de marcador basado en elementos transponibles con terminaciones repetidas pequeñas (MITE-AFLP; Park *et al.*, 2003) permitió detectar diferencias entre diferentes especies del género *Oryza* y entre genotipos dentro de cada especie. En este caso, sin embargo, la distancia genética detectada mediante MITE-AFLP para nueve accesiones (cinco de la subespecie *japonica* y cuatro de *indica*) fue

**Cuadro 3. Número total de amplicones por combinación de partidores de AFLP, N° de polimorfismos y razón de las bandas polimórficas sobre el total de bandas amplificadas detectado en 12 genotipos de arroz.**

**Table 3. Total number of amplicons per AFLP primer combination, N° of polymorphisms and the ratio of polymorphic bands to total bands detected among the 12 rice genotypes.**

Combinación de partidores	N° total de amplicones	N° de bandas polimórficas	Bandas polimórficas/ bandas totales
PE1A/PM1A	55	9	0,16
PE1D/PM1C	40	5	0,125
PE1A/PM1B	43	4	0,09
PE1A/PM1C	44	8	0,18
PE1A/PM1E	51	7	0,137
PE1A/PM1I	51	7	0,137
PE1B/PM1A	40	5	0,125
PE1E/PM1A	40	5	0,125
PE1E/PM1C	45	4	0,09
PE1G/PM1D	31	4	0,129
PE1G/PM1G	44	5	0,114
PE1G/PM1H	33	11	0,33
PE1G/PM1I	37	6	0,16
PE1H/PM1A	38	6	0,16
PE1H/PM1I	43	4	0,09
PE1B/PM1C	32	4	0,125
Total de bandas	667	94	--
Promedio por combinación	41,2	5,88	0,1435

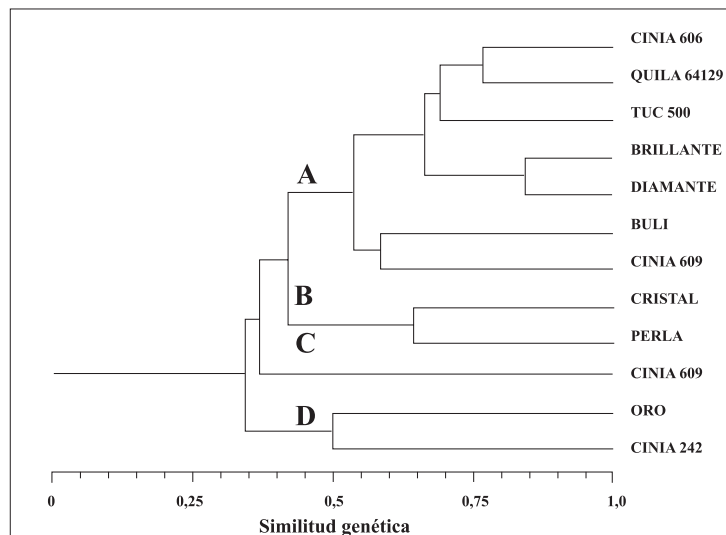
de sólo 0,119, proporcionalmente menor que lo descrito en este trabajo mediante AFLP, aun cuando se tratase de material filogenéticamente más distante.

Por otra parte, la comparación de AFLP, RAPD y SSR para diferenciar cultivares de arroz de las subespecies *japonica* e *indica* indicó que todos estos métodos son potencialmente útiles para este propósito, aunque con diferente eficiencia (Mackill *et al.*, 1996). Por una parte, AFLP fue la estrategia que entregó más información por cada reacción, obteniéndose 147 polimorfismos con 18 combinaciones de partidores, es decir, un promedio de ocho amplicones discriminantes por gel. Sin embargo, el nivel global de polimorfismo de AFLP fue más bajo, con sólo 22%, menor que RAPD (24%) y que microsatélites (36% excluyendo los marcadores monomórficos) (Mackill *et al.*, 1996). En contraste, el análisis de los cerca de 40 principales cultivares de Cuba (subsp. *indica*) mediante isoenzimas, RAPD y AFLP, estableció que este último método fue el más informativo, con un 42% de diversidad genética en base a cuatro combinaciones de partidores, comparado a 27% estimado en base a 21 partidores de RAPD y 8% con cuatro combinaciones de isoenzimas (Fuentes *et al.*, 1999). Estos valores son intermedios entre los que se establecieron para

germoplasma de la India y lo que se ha podido detectar en los cultivares chilenos, que alcanza los valores más bajos coincidentemente con su estrecho fondo genético. En el caso del germoplasma chileno no es posible efectuar comparaciones sistemáticas entre diferentes tipos de marcadores, puesto que sólo hay una coincidencia parcial en los cultivares analizados anteriormente mediante RAPD (Hinrichsen *et al.*, 1996), y sólo se tienen resultados preliminares de un análisis basado en marcadores de microsatélites. A pesar de ello, se puede afirmar que cualquiera de estos tres métodos es capaz de diferenciar los genotipos de arroz analizados, toda vez que se han seleccionado los marcadores adecuados.

### Relaciones de similitud genética y correlación con origen y pedigrí de los genotipos estudiados

Un dendrograma (gráfica de agrupamiento) construido a partir de los valores de similitud genética determinados entre cada par de genotipos (Figura 1) sugirió que existen cuatro grupos principales: el primero y más numeroso está integrado por los cultivares o líneas Cinia-606, Cinia-609, Quila-64129, Tuc-500, Brillante, Diamante y Buli; el segundo, por los cvs. Cristal y Perla; el tercer grupo lo integran Oro y Cinia-242; finalmente, Cinia-609 no se asoció con ningún otro genotipo, aunque



**Figura 1. Dendrograma que representa las similitudes genéticas entre los 12 genotipos de arroz estudiados (escala de 0 a 1,0). Los cuatro grupos de genotipos descritos en el texto se indican con una letra mayúscula a la izquierda de cada clado.**

**Figure 1. Dendrogram that represents genetic similarities among the 12 rice genotypes studied (scale from 0 to 1.0). The four genotype groups described in the text are labeled with a capital letter at the left of each clade.**



podría considerarse en el mismo grupo anterior, junto a Oro y Cinia-242. En una etapa posterior sería interesante detectar más polimorfismos de tipo AFLP o de otra naturaleza genética, para verificar la cuantía de la diferencia entre estos grupos detectados mediante AFLP, así como ver si las diferencias detectadas corresponden a valores significativos y se trata de un mismo grupo genético o de dos diferentes. En todo caso, las diferencias entre cada uno de estos tres últimos genotipos mencionados es similar a la que se observa entre los otros dos grupos mencionados más arriba.

Entre los principales progenitores del programa de fitomejoramiento de arroz de INIA se encuentran las variedades Oro y Diamante. Oro es una línea pura seleccionada a partir del arroz que se sembraba inicialmente en Chile; sus orígenes probablemente están en las primeras variedades introducidas desde Europa en la década de 1920, principalmente desde Italia. Similar origen tendría la línea 385 (cuyo nombre habría sido N-54-385), obtenida por mejoradores del Ministerio de Agricultura alrededor del año 1954 y utilizada posteriormente como progenitora por la Sociedad Industrial del Arroz (INDUS), la que aporta un 25% del genotipo de Cristal y Perla. Considerando que estos dos últimos son cultivares "hermanos" (comparten además 25% de Oro y 50% de la línea L13-1-1-22), tiene sentido que se encuentren asociados en un mismo grupo. Entre los genotipos analizados en este trabajo, Oro también participa en el linaje de Cinia 609, Buli y Cinia 606, con aportes de 19, 12 y 6%, respectivamente, aunque en menor proporción que en Quila 64129 (50%), Cristal (25%) y Perla (25%). Curiosamente, Oro no se asocia con ninguno de éstos, sino con Cinia 242, que de acuerdo a su pedigrí debería presentar una estrecha relación con Diamante en lugar de Oro; sin embargo, este agrupamiento no es completamente inesperado, ya que Cinia 242 tiene un 6,25% de Oro, ya que éste es uno de los padres de Ñiquén.

Aunque los progenitores no son numerosos, tienen orígenes bastante diversos. Además de los ya mencionados Oro y 385 (derivados del arroz sembrado en el país, correspondiente a poblaciones heterogéneas), Cesariot, Estrela y Oryzella provienen de Europa, mientras que Lemont es de EE.UU., al igual que las líneas 'L 13-1-1-22' y 'RR/B L 138-1-1', que provienen de Louisiana. No hay antecedentes claros sobre Tuc-500, siendo parte de materiales que provienen del Programa de INDUS, traspasado

por AGMA (Asoc. Gremial de Molineros de Arroz) al INIA en 1996 y donado finalmente en el 2001.

Por su parte, Diamante es el progenitor de más amplia ascendencia entre los cultivares y líneas analizadas, con ascendiente en el pedigrí de Quila 64129 (50%) y Brillante (50%), aunque Cristal y Perla no descienden de Diamante. La relación entre estos genotipos determinados por su pedigrí y sus relaciones de similitud genética graficados en el dendrograma son más evidentes en el grupo que tiene en común a Diamante como progenitor, formado por Cinia 606 (25% de Diamante), Cinia 669 (31%), Quila 64129 (50%), Brillante (50%), Buli (50%) y Tuc 500 (sin información), además del propio Diamante; sin embargo, Cinia 609 y Cinia 242 tienen también un importante ascendiente de Diamante, pero no se asociaron en el mismo grupo o clado.

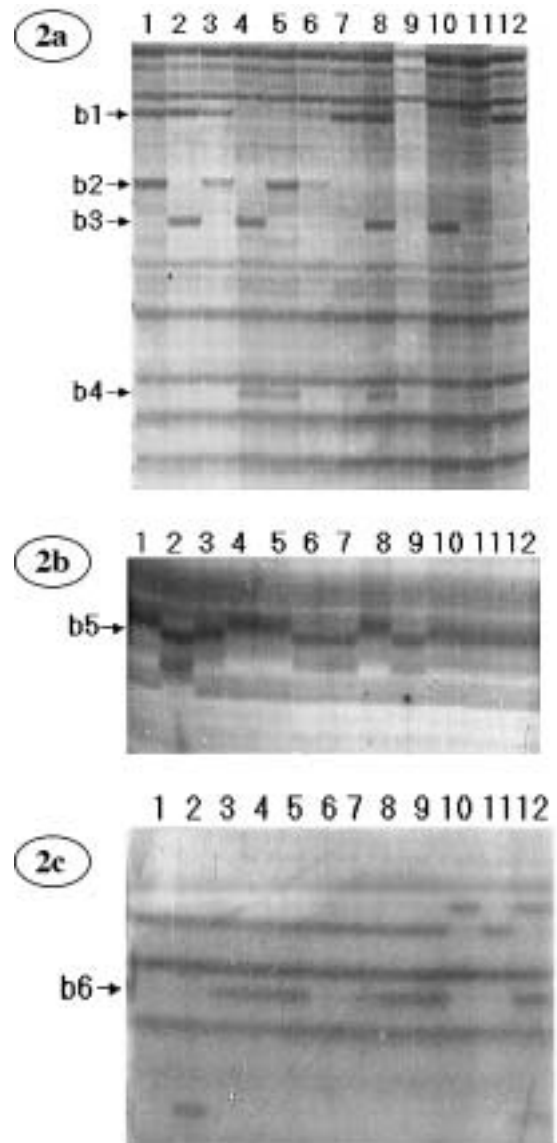
Brillante tiene un 50% de Diamante; el otro 50% es aportado por Ñiquén (Oro x RR/B L138-1-1). En lo que respecta a su relación de filogenia con Diamante, ello se refleja apropiadamente en el dendrograma, ya que fueron los dos genotipos más estrechamente relacionados, con un índice de similitud superior a 0,85. Este parentesco no tuvo la misma correlación con otro de sus progenitores, Oro, que le aporta un 25% de su dosaje génico. Este antecedente y los otros mencionados más arriba hacen suponer que el genotipo "Oro" que se presenta en el pedigrí de varios cultivares y líneas (Cuadro 1), podría haber sido diferente al cv. Oro que se está usando actualmente y que se incluye en estos análisis. Esta hipotética confusión podría haberse originado por tratarse de materiales morfológicamente similares, que se manejaron como una misma cosa, o bien que haya existido una mezcla de genotipos que en algún momento, posterior a los cruzamientos, fueron depurados. Alternativamente, las inconsistencias entre pedigrí y relaciones de similitud genética pueden explicarse por el proceso de selección de segregantes, que haya dado como resultado la pérdida del aporte genético de Oro, pero dado que es un fenómeno que se observa no sólo para Brillante sino para varios otros genotipos, es más probable que la primera explicación sea la correcta. Mayor apoyo a esta hipótesis proviene del hecho que durante un tiempo no hubo multiplicación de semilla y Oro fue recuperado de material de ensayos, lo que hace más probable que el genotipo Oro actual pueda ser diferente del original.

Finalmente, Cinia 609 posee en su linaje a Estrela (25%), lo que podría facilitar su diferenciación del resto. Es probable que su separación de los otros grupos (marcado como un genotipo único en el grupo "C" en el dendrograma) se deba en parte a este aporte único.

#### Diferenciación de cultivares y líneas de arroz mediante reacciones secuenciales de AFLP

La similitud genética (o su equivalente recíproca, DG) determinada entre cada uno de estos genotipos tendría su principal aplicación en el diseño de bloques de cruzamiento, así como para determinar los niveles de consanguinidad que den fundamento a esquemas de identificación genética de estos u otros genotipos. En este sentido, se pensó en establecer la forma más simple para identificar o diferenciar a nivel genético los cultivares y líneas analizadas. Para ello, se consideraron los cinco marcadores de AFLP más informativos (aquellos que presentaban sobre 16% de polimorfismo) y se permutaron algunas posibles combinaciones de ellos, considerando al mismo tiempo los patrones de amplificación más fáciles de interpretar (claridad de las bandas amplificadas, separación entre ellas, independencia alélica, etc.). El resultado de este análisis fue que usando tres combinaciones de partidores +3, se pudo diferenciar a los 12 genotipos de arroz en estudio (Figuras 2a, 2b y 2c). La primera combinación, que permitió diferenciar entre ocho genotipos, fue PE1G/PM1I. La segunda combinación PE1H/PM1A diferencia entre los genotipos 7 y 12, y separa además al genotipo 11 del 6 y 9, estos dos últimos no diferenciables con esta combinación. Finalmente, utilizando la combinación PE1G/PM1H se pudo discriminar entre los genotipos 1 y 3 y los genotipos 6 y 9, como se muestra en el esquema de la Figura 3.

Cabe señalar que de las tres combinaciones de partidores, las dos primeras presentaron un 16% de polimorfismo, con seis amplicones informativos cada una. Las Figuras 2a, 2b y 2c muestran una parte de las respectivas corridas electroforéticas, destacándose los amplicones polimórficos; esta información se resume en el Cuadro 4. De modo similar, usando sólo tres combinaciones de AFLP combinado con un sistema computarizado de registro de bandas polimórficas, Chen *et al.* (2000) identificaron al menos 16 amplicones que diferenciaron 15 cultivares de arroz de China; la diferencia con nuestros resultados estriba en que en ese caso se



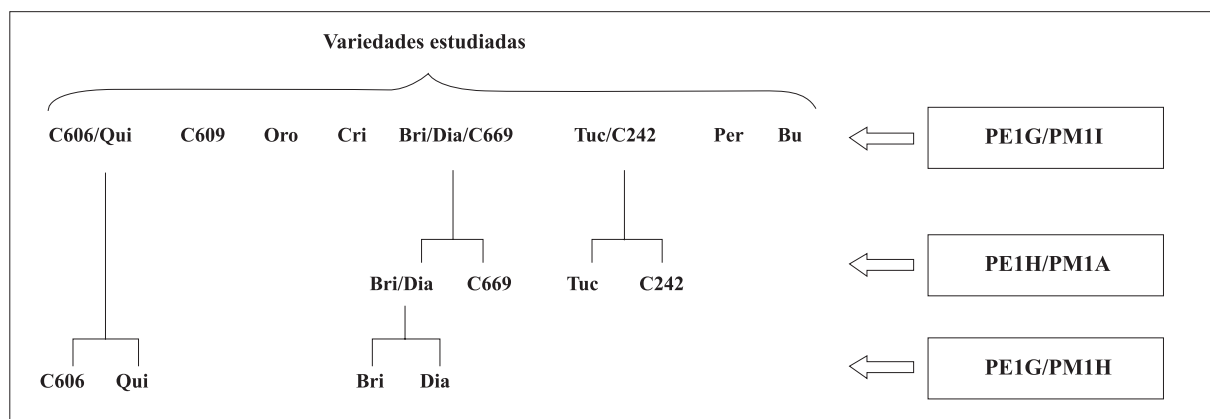
**Figura 2.** Polimorfismos de AFLP generados con las combinaciones de partidores PE1G/PM1I (Fig. 2a), PE1H/PM1A (Fig. 2b) y PE1G/PM1H (Fig. 2c). Se muestra la fracción del respectivo gel de poliacrilamida donde se encuentran las bandas polimórficas usadas para la diferenciación de los 12 cultivares en estudio, designadas como b1, b2, b3 y b4 (Fig. 2a), b5 (2b) y b6 (2c).

**Figure 2.** Polymorphisms obtained by AFLP primers PE1G/PM1I (Fig. 2a), PE1H/PM1A (Fig. 2b) and PE1G/PM1H (Fig. 2c). The portion of the polyacrylamide gel is shown where the polymorphisms used for the differentiation of the 12 cultivars were located; bands are designated b1, b2, b3 y b4 (Fig. 2a), b5 (2b) and b6 (2c).

trataba de germoplasma que presentaba una alta DG, por tratarse de cultivares tradicionales chinos. La diferenciación de genotipos es más probable de lograr cuando la DG presente en la muestra que se compara es mayor; por ejemplo, en el caso de 49 variedades tradicionales y modernas de la India, un centro de origen de la subespecie *indica*, cada una de las nueve combinaciones de partidores de AFLP fue capaz de diferenciar todos los genotipos analizados (Prashanth *et al.*, 2002).

Para este tipo de análisis es deseable usar amplicones que presenten una distribución uniforme en la población (presencia/ausencia lo más cercano posible a 50%); como este trabajo consideró pocos genotipos y éstos tienen un bajo nivel de DG, fue interesante verificar que los amplicones correspondientes a las combinaciones elegidas estaban presentes en al menos tres de los 12 genotipos, lo que nos parece un valor adecuado, pues representa una frecuencia mínima de 25% (el rango fue de entre 25 y 58% de frecuencia; Cuadro 4).

Otro factor que se debe considerar en este tipo de estudios es la reproducibilidad de los amplicones polimórficos entre diferentes muestras de un mismo genotipo. Una discusión exhaustiva sobre este aspecto es presentada por Heckenberger *et al.* (2003), quienes analizaron líneas puras y dobles haploides de maíz (*Zea mays* L.) europeos, concluyendo que es muy difícil evitar un porcentaje mínimo variable de errores experimentales, cuya cuantificación resulta determinante a la hora de aplicar esta metodología en un caso de identificación de cultivares, líneas esencialmente derivadas, u otros materiales silvestres o derivados del mejoramiento genético. Por ello, la aplicación definitiva de estas metodologías para la identificación de cultivares requeriría aumentar la casuística y verificar los resultados bajo diversas condiciones experimentales, cambiando no sólo la fuente de las semillas sino también controlando factores como el protocolo de extracción de ADN, el termociclador empleado en la reacción de PCR, y los reactivos empleados en esa misma reacción, entre otros.



**Figura 3.** Esquema de identificación de cultivares chilenos de arroz. Se utilizaron tres combinaciones de partidores AFLP+3 para diferenciar los 12 genotipos. Como se describe en el texto, la combinación de partidores PE1G/PM1I diferencia a todos los genotipos con excepción de los grupos (C606/Qui), (Bri/Dia/C669) y (Tuc/C242); luego, la combinación de partidores PE1H/PM1A diferencia los genotipos Tuc y C242, y C669 del par (Bri/Dia); finalmente, la combinación de partidores PE1G/PM1H diferencia los genotipos C606 de Qui, y Bri de Dia. Las abreviaturas de los cultivares y líneas es como sigue: C606: Cinia 606; C609: Cinia 609; Qui: Quila 64129; Cri: Cristal; Bri: Brillante; Tuc: Tuc 500; Per: Perla; Dia: Diamante; Bul: Buli; C669: Cinia 669; C242: Cinia 242.

**Figure 3.** Graphical scheme for the identification of Chilean rice cultivars. Three AFLP+3 primer combinations were applied to differentiate the 12 genotypes. As described in the text, the primer combination PE1G/PM1I differentiate all the genotypes except groups (C606/Qui), (Bri/Dia/C669) and (Tuc/C242); later, the combination PE1H/PM1A differentiates genotypes Tuc and C242, and C669 from the pair (Bri/Dia); finally, the primer combination PE1G/PM1H separates genotypes C606 from Qui, and Bri from Dia. Cultivar and line names are abbreviated as follows: C606: Cinia 606; C609: Cinia 609; Qui: Quila 64129; Cri: Cristal; Bri: Brillante; Tuc: Tuc 500; Per: Perla; Dia: Diamante; Bul: Buli; C669: Cinia 669; C242: Cinia 242.

**Cuadro 4. Amplicones que diferencian los 12 genotipos de arroz estudiados.**  
**Table 4. Amplicons that differentiate the 12 studied rice genotypes.**

Amplicón	Genotipo												
	C606	C609	Qui	Oro	Cri	Bri	Tuc	Per	Dia	Bul	C669	C242	
PE1G/PM1I													
Banda 1	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	+	
Banda 2	+	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	
Banda 3	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	
Banda 4	-	-	-	+	+	-	-	+	-	-	-	-	
PE1H/PM1A													
Banda 5	+	-	+	-	-	+	+	-	+	-	-	-	
PE1G/PM1H													
Banda 6	-	-	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	

+: presencia de una banda, -: ausencia de una banda.

Las abreviaturas de los cultivares y líneas es como sigue: C606: Cinia 606; C609: Cinia 609; Qui: Quila 64129; Cri: Cristal; Bri: Brillante; Tuc: Tuc 500; Per: Perla; Dia: Diamante; Bul: Buli; C669: Cinia 669; C242: Cinia 242.

+: presence of a band, -: absence of a band.

Cultivar and line names are abbreviated as follows: C606: Cinia 606; C609: Cinia 609; Qui: Quila 64129; Cri: Cristal; Bri: Brillante; Tuc: Tuc 500; Per: Perla; Dia: Diamante; Bul: Buli; C669: Cinia 669; C242: Cinia 242.

Finalmente, en la medida que se ha demostrado que estos cultivares y líneas tienen un fondo genético estrecho (escasa DG), cobra mayor importancia disponer de herramientas de análisis que tengan la mayor capacidad discriminante posible. Aunque en este trabajo se ha demostrado que los marcadores de AFLP cumplen con este requisito, siendo capaces de diferenciar todos los genotipos con sólo tres combinaciones de partidores, sería de alto interés determinar la capacidad discriminante de marcadores de microsatélites (McCouch *et al.*, 1997), también conocidos como secuencias simples repetidas (SSR). Estos marcadores han sido ampliamente usados en arroz para diversos estudios genéticos, dado que aunque presentan un menor "índice de marcador" que AFLP, es decir, presentan un menor valor del producto entre el índice de heterocigocidad y el número de *loci* analizados por cada reacción (Powell *et al.*, 1996), son muy robustos desde un punto de vista de su reproducibilidad y de la facilidad para su interpretación y simpleza técnica, además de haber sido caracterizados en diversas poblaciones de la especie (Blair *et al.*, 2002). En este sentido, la caracterización genética de 95 cultivares japoneses de arroz usados en la preparación del vino de arroz "sake" más 76 cultivares de arroz de cocina (Hashimoto *et al.*, 2004), usando una

combinación de AFLP y SSR, permitió comparar la capacidad de discriminación de ambos métodos en una muestra que, de modo similar al germoplasma de mejoramiento usado en Chile, también presenta un fondo genético estrecho. En este estudio, usando 25 fragmentos de AFLP se identificaron 117 haplotipos, pudiendo diferenciarse 95 de los 171 genotipos estudiados. En contraposición, el uso combinado de 27 marcadores de SSR permitió identificar 157 haplotipos, siendo posible diferenciar 150 de los 171 cultivares estudiados, incluyendo 55 que no había sido posible diferenciar por AFLP. Resultados preliminares usando marcadores de SSR permiten estimar que en el germoplasma chileno de arroz se revelará una situación similar a la descrita para este germoplasma japonés.

## CONCLUSIONES

- Se ha aplicado la metodología de AFLP para el análisis genético de cultivares y líneas chilenas de arroz, determinándose un bajo nivel de polimorfismo y de diversidad genética en una muestra de 12 genotipos de arroz de Chile;
- Se ha establecido un conjunto mínimo de tres combinaciones de partidores de AFLP para diferenciar los 12 genotipos de arroz en estudio.

## LITERATURA CITADA

- Aggarwal, R.K., D.S. Brar, S. Nandi, N. Huang, and G.S. Khush. 1999. Phylogenetic relationships among *Oryza* species revealed by AFLP markers. *Theor. Appl. Genet.* 98:1320-1328.
- Aggarwal, K., V. Shenoy, J. Ramadevi, R. Rajkumar, and L. Singh. 2002. Molecular characterization of some Indian Basmati and other elite rice genotypes using fluorescent-AFLP. *Theor. Appl. Genet.* 105:680-690.
- Aliaga-Morel, J.R., F.A. Culiñez-Macía, G. Clemente-Marín, and E. Primo-Yufer. 1987. Differentiation of rice varieties by electrophoresis of embryo protein. *Theor. Appl. Genet.* 74:224-232.
- Alvarado, R. 1989. Generación de variabilidad genética en arroz en Chile. p. 64-82. *In* Resultados de los viveros de arroz para América Latina distribuidos en 1988. XVIII Reunión sobre Mejoramiento de Arroz de Riego, Porto Alegre, Brasil. 25-29 septiembre de 1989. CIAT-IRRI, Cali, Colombia.
- Alvarado, R. 1997. Mejoramiento del arroz en Chile y uso de selección recurrente. *In* Elcio Guimaraes (ed.) Selección recurrente en arroz. Publicación N° 267. p. 117-123. CIAT, Cali, Colombia.
- Alvarado, R., y P. Grau. 1991. Mejoramiento del arroz en Chile por tolerancia a frío. p. 105-114. *In* J.L. Puignau (ed.) Diálogo XXXIII. Mejoramiento de arroz. Reunión sobre mejoramiento de arroz en el cono sur, Goiânia, Brasil. 17-21 de julio de 1989. IICA-PROCISUR, Montevideo, Uruguay.
- Alvarado, R., y A. Pino. 1982. Arroz Diamante-INIA. *Agric. Téc. (Chile)* 42:253.
- Anónimo. 1964. Semilla de arroz. 8 p. Centro de Comunicaciones Audiovisuales y Divulgación Agrícola de la Escuela de Agronomía, Universidad de Concepción, Chillán, Chile.
- Blair, M.W., O. Panaud, and S.R. McCouch. 1999. Inter-simple sequence repeat (ISSR) amplification for analysis of microsatellite motif frequency and fingerprinting in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 98:780-792.
- Blair, M.W., V. Hedetale, and S.R. McCouch. 2002. Fluorescent-labeled microsatellite panels useful for detecting allelic diversity in cultivated rice (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 105:449-457.
- Chen, Y.H., J.H. Jia, C.Y. Li, B. Wang, and M.L. Weng. 2000. Rice seed identification by computerized AFLP-DNA fingerprinting. *Chin. Rice Res. Newsl.* 8:1, 4-5.
- Cho, Y.C., Y.S. Shin, S.N. Ahn, K.H. Kang, and H.P. Moon. 1999. DNA fingerprinting of rice cultivars using AFLP and RAPD markers. *Korean J. Crop Sci.* 44:26-31.
- Dong, N.V., P.K. Subudhi, P.N. Luong, V.D. Quang, T.D. Quy, H.G. Zheng, *et al.* 2000. Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. *Theor. Appl. Genet.* 100:727-734.
- Fuentes, J.L., F. Escobar, A. Alvarez, G. Gallego, M.C. Duque, M. Ferrer, *et al.* 1999. Analyses of genetic diversity in Cuban rice varieties using isozyme, RAPD and AFLP markers. *Euphytica* 109:107-115.
- Fukuoka, S., K. Hosaka, and O. Kamijima. 1992. Use of random amplified polymorphic DNAs (RAPDs) for identification of rice accessions. *Jpn. J. Genet.* 67:243-252.
- Glaszmann, J.C. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.* 74:21-30.
- Hashimoto, Z., N. Mori, M. Kawamura, T. Ishii, S. Yoshida, M. Ikegami, *et al.* 2004. Genetic diversity and phylogeny of Japanese sake-brewing rice as revealed by AFLP and nuclear and chloroplast SSR markers. *Theor. Appl. Genet.* 109:1586-1596.
- Heckenberger, M., J. Rouppe van der Voort, A.E. Melchinger, J. Peleman, and M. Bohn. 2003. Variation of DNA fingerprinting among accessions within maize inbred lines and implications for identification of essentially derived varieties: II. Genetic and technical sources of variation in AFLP data and comparison with SSR data. *Mol. Breeding* 12:97-106.
- Hepp, R. 1945. Monografía del Agro. 14 p. Ediciones del Ministerio de Agricultura, Santiago, Chile.
- Hinrichsen, P., C. Amigo, R. Alvarado, y C. Muñoz. 1996. Identificación de variedades chilenas de arroz (*Oryza sativa* L.): evaluación del uso de perfiles proteicos y de fragmentos polimórficos amplificados al azar (RAPD). *Agric. Téc. (Chile)* 56:1-10.
- Hussain, A., M.G. Scanlon, B.O. Juliano, and W. Bushuk. 1989. Discrimination of rice cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chem.* 66:353-356.
- IRRI. 1983. Final report of the seventh international rice cold tolerance nursery. 34 p. Internacional Rice Research Institute (IRRI), Los Baños, Laguna, Philippines.
- Joseph, M., S. Gopalakrishnan, R.K. Sharma, V.P. Singh, A.K. Singh, N.K. Singh, and T. Mohapatra. 2004. Combining bacterial blight resistance and Basmati quality characteristics by phenotypic and molecular marker-assisted selection in rice. *Mol. Breeding* 13:377-387.

- McCouch, S.R., X.L. Chen, O. Panaud, S. Temnykh, Y.B. Xu, and Y.G. Cho, *et al.* 1997. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Mol. Biol.* 35:89-99.
- Mackill, D.J., Z. Zhang, E.D. Redona, and P.M. Colowit. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome* 39:969-977.
- ODEPA. 2004. Oficina de Estudios y Planificación Agrícola. Estadísticas macroeconómicas y productivas de la agricultura chilena. Disponible en <http://www.odepa.gob.cl/base-datos/> Leído: 12 de marzo de 2005.
- Park, K.C., J.K. Lee, N.H. Kim, Y.B. Shin, J.H. Lee, and N.S. Kim. 2003. Genetic variation in *Oryza* species detected by MITE-AFLP. *Genes Genet. Syst.* 78:235-243.
- Powell, W., M. Morgante, C. Andre, M. Hanafey, J. Vogel, S. Tingey, and A. Rafalski. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP and SSR (microsatellite) markers for germplasm analysis. *Mol. Breeding* 2: 225-238.
- Prashanth, S.R., M. Parani, B.P. Mohanty, V. Talame, R. Tuberosa, and A. Parida. 2002. Genetic diversity in cultivars and landraces of *Oryza sativa* subsp. *indica* as revealed by AFLP markers. *Genome* 45:451-459.
- Rogers, S.O., and A.J. Bendich. 1988. Extraction of DNA from plant tissues. *Plant Mol. Biol. Manual* A6(1):1-10.
- Rohlf, F.J. 1998. NTSYS-pc Numerical taxonomy and multivariate analysis system, Version 2.00. 31 p. Exeter Software Publications, Setauket, New York, USA.
- Saiki, R.K., D.H. Gelfand, S. Stoffel, S.J. Scharf, R. Higuchi, G.T. Horn, and H.A. Erlich. 1988. Primer detected enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science* 239:487-491.
- Second, G. 1982. Origin of the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza* spp.): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jpn. J. Genet.* 57:25-57.
- Singh, K.N., R. Nandi, P. Shanmugasundram, S. Sadasivam, N. Huang, D.S. Brar, *et al.* 1999. High-resolution DNA fingerprinting of Indian rice (*Oryza sativa* L.) varieties by amplified fragment length polymorphism. *Genet. Res. Crop Evol.* 46:427-433.
- Singh, S., J.S. Sidhu, S.K. Uberoi, M. Sodhi, Y. Vikal, and H.S. Dhaliwal. 1998. Genetic diversity analysis of *Oryza* using amplified fragment length polymorphism. *Crop Improv.* 25:15-20.
- Staub, J.E., and V. Meglic. 1993. Molecular genetic markers and their legal relevance for cultivar discrimination: A case study in cucumber. *HortTechnology* 3:291-300.
- Virk, P.S., J. Zhu, H.J. Newbury, G.J. Bryan, M.T. Jackson, and B.V. Ford-Lloyd. 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica* 112:275-284.
- Virk, P.S., B.V. Ford-Lloyd, and H.J. Newbury. 1998. Mapping AFLP markers associated with subspecific differentiation of *Oryza sativa* (rice) and an investigation of segregation distortion. *Heredity* 81:613-620.
- Vos, P., R. Hogers, M. Bleeker, M. Reinjans, T. Van de Lee, M. Hornes, *et al.* 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Welsh, J., and M. McClellan. 1990. Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218.
- Williams, J.G.K., A.R. Kubelik, K.J. Livak, J.A. Rafalski, and S.V. Tingey. 1990. DNA polymorphism amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.
- Yu, L.X., and H.T. Nguyen. 1994. Genetic variation detected with RAPD markers among upland and lowland rice cultivars (*Oryza sativa* L.). *Theor. Appl. Genet.* 87:668-672.
- Zhu, J., M.D. Gale, S. Quarrie, M.T. Jackson, and G.J. Bryan. 1998. AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theor. Appl. Genet.* 96:602-611.