

GENOTIPIFICACIÓN DE 14 VARIEDADES DE ARROZ (*Oryza sativa*)
MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES AFLP

ENRIQUE ARTURO CAMARGO CAMACHO

TRABAJO DE GRADO
Presentado como requisito parcial
Para optar al título de

BIOLOGO

ELSA LEONOR ALVAREZ MENDEZ.
DIRECTOR

PONTIFICIA UNIVERSIDAD JAVERIANA
FACULTAD DE CIENCIAS
CARRERA DE BIOLOGIA

Bogotá, D. C.
2008

firma, sin perjuicio de los acuerdos que el autor pacte con la Unidad Académica referentes al uso de la obra o a los derechos de propiedad industrial que puedan surgir de la actividad académica.

DESCRIPCIÓN TRABAJO DE GRADO

Enrique Arturo

Camargo Camacho

DIRECTOR (ES)

Alvarez Mendez Elsa Leonor

Montaña Jose Salvador

TRABAJO PARA OPTAR POR EL TÍTULO DE:

Biólogo

TÍTULO COMPLETO DEL TRABAJO: Genotipificación de 14 variedades de arroz (*Oryza sativa*) por medio de marcadores moleculares AFLP

FACULTAD: Ciencias

PROGRAMA: Carrera _x_ Especialización _____ Maestría _____ Doctorado

NOMBRE DEL PROGRAMA: Biología

CIUDAD: BOGOTA AÑO DE PRESENTACIÓN DEL TRABAJO:

2008.

NÚMERO DE PÁGINAS

97

TIPO DE ILUSTRACIONES:

- Tablas.

- Fotografías

DESCRIPTORES O PALABRAS CLAVES.

Marcadores moleculares, AFLP, Genotipificación, UPOV, ICA, Arroz, Variedades, Obtenciones Vegetales.

RESUMEN DEL CONTENIDO

Marcadores moleculares AFLP como herramienta de soporte a las pruebas de caracterización morfológica DHE (Distinguibilidad, Homogeneidad, Estabilidad) en la diferenciación de variedades de arroz para acceso a la protección de los Derechos de Obtenciones Vegetales.

TABLA DE CONTENIDOS

1. Introducción	1
2. Marco teórico y revisión de literatura	
2.1 Generalidades del arroz <i>Oryza sativa</i>	4
2.2 Fitomejoramiento en arroz	7
2.3 Protección a los Derechos de Obtentor de Variedades Vegetales	8
2.4 Caracteres varietales en la planta de arroz	10
2.5 Caracterización de variedades vegetales con marcadores moleculares	11
2.6 Marcadores moleculares en arroz	14
2.7 Generalidades de la técnica AFLP	16
2.8 Análisis resultados AFLP	20
3. Formulación del problema y justificación	
3.1 Formulación del problema	21
3.2 Preguntas de investigación	22
3.2 Justificación de la investigación	22
4. Objetivos	
4.1 Objetivo General	24
4.2 Objetivos específicos	24
5. Materiales y métodos	
5.1. Diseño de la investigación	25
5.1.1 Población de estudio y muestra	25
5.1.2 Variables del estudio	27
5.2 Métodos	29

6. Resultados	33
7. Discusión	46
8. Conclusiones	53
9. Recomendaciones	55
10. Referencias	56
11. <i>Anexos</i>	63
*Glosario	82
*Índices	83

INDICE DE TABLAS

Tabla 1. Variedades de la población de estudio.	26
Tabla 2. Combinaciones utilizadas en el estudio.	30
Tabla 3. Pureza y concentración variedades de estudio.	33
Tabla 4. Número de bandas y niveles de polimorfismo reportados en arroz.	36
Tabla 5. Variedades de arroz que mostraron perfiles electroforéticos AFLP de alta calidad.	37
Tabla 6. Numero de bandas y porcentaje de polimorfismo obtenido- iniciadores II y III.	38
Tabla 7. Perfil electroforético obtenido a partir de la combinación II.	40
Tabla 8. Perfil electroforético obtenido a partir de la combinación III.	42
Tabla 9. Lista de Variedades comunes entre el presente estudio y Acuña 2006.	51

INDICE DE FIGURAS

Figura 1. Esquema corte con enzimas de restricción.	17
Figura 2. Esquema Ligación de adaptadores.	18
Figura 3. Esquema de preamplificación.	19
Figura 4. Esquema amplificación selectiva.	20
Figura 5. Pruebas de calidad de ADN previamente extraídos.	24
Figura 6. Prueba de calidad del ADN extraído en este trabajo.	34
Figura 7. Prueba de digestión de ADN previamente extraído.	35
Figura 8. Huella genética con la combinación de iniciadores (II).	39
Figura 9. Dendograma consenso 14 variedades.	44

RESUMEN

Con el fin de determinar la utilidad de la técnica AFLP como herramienta de soporte para los diagnósticos morfológicos en variedades pertenecientes al programa de Derechos de Obtentor de Variedades Vegetales del Instituto Colombiano Agropecuario -ICA-, se genotipificó una población constituida por 14 variedades de arroz (*O. Sativa*). Se probaron dos nuevas combinaciones de iniciadores AFLP y cuatro reportadas en literatura, evidenciándose la mayor resolución y porcentaje de polimorfismo con las combinaciones E-AGC; M-CAC y E-AAC; M-CTA; los resultados obtenidos arrojaron un polimorfismo entre 60 y 100%, con un rango de 25-46 bandas totales y cinco bandas únicas, datos que resultan afines con los encontrados en la literatura y en estudios recientes adelantados por el ICA con marcadores moleculares RAMS. Se construyeron dendogramas empleando el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA, lo que permitió evidenciar el agrupamiento de las variedades Oryzica Caribe 8, Oryzica Yacu-9, Oryzica 1, Progreso 4-25, Inproarroz 1525, Coprosem 1 y Aceituno 25-40, en el cual los mayores porcentajes de similaridad se presentaron entre las variedades Oryzica 1, Aceituno 25-40 y Coprosem 1, con más del 90%. Las variedades Coprosem 2 y Selecta se mostraron como las más disímiles. La técnica AFLP permitió establecer diferencias entre las variedades de estudio, poniendo en evidencia su capacidad para diferenciar genotipos o variedades previamente establecidas y de esta forma contribuir y apoyar las pruebas de distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE) empleadas en el programa de Protección a los Derechos de Obtentor de Variedades Vegetales.

Palabras clave: AFLP, Dendograma, Derechos de Obtentor, Genotipificación, Polimorfismo, Variedad.

ABSTRACT

In order to determine AFLP technique usefulness as support tool for morphological diagnosis of varieties belonging to the Plant Varieties Breeder's Right Protection Programs of Colombian Agricultural Institute -ICA-, a population consisting of 14 varieties of rice (*O. Sativa*) was genotyped through AFLP molecular markers. Two new primer combinations of AFLP and six reported in literature were tested, finding the highest resolution and polymorphism percentage with E-AGC; M-ACC and E-AAC; M-CTA combinations, the obtained results revealed a polymorphism between 60 and 100%, 25-46 total bands and five unique bands. These data show great affinity with those found in the literature and recent studies with Random Amplified Microsatellites (RAMs) developed by ICA. Cluster analysis was constructed using UPGMA algorithm and Dice coefficient, which resulted in the formation of a single group that includes Oryzica Caribe 8, Oryzica Yacu-9, Oryzica 1, Progreso 4-25, Inproarroz 1525, Coprosem 1 and Aceituno 25-40 varieties, largest percentages of similarity over 90% were presented by Oryzica 1, Aceituno 25-40 and Coprosem 1. The varieties Coprosem 2 and Selecta were the most dissimilar. The AFLP technique allowed to establish differences between the study varieties, putting in evidence the ability to differentiate genotypes or varieties previously recognized, therefore contribute to the characterization studies developed by Plant Varieties Breeder's Right Protection Programs.

Key words: AFLP, Breeder's rights, Cluster analysis, Genotyping, Polymorphism, Variety.

1. INTRODUCCIÓN

Oryza sativa L. es una de las dos especies de arroz cultivadas a nivel global; en Latinoamérica y el Caribe es el cereal alimenticio más importante debido a que puede almacenarse y prepararse fácilmente. Ha encontrado un mercado considerable durante las últimas décadas en las zonas urbanas donde residen actualmente casi tres cuartas partes de la población latinoamericana. En Colombia está representado por cultivos de arroz paddy y arroz blanco que registran ganancias importantes y se observa un aumento del consumo en la última década.

Debido a la importancia de este producto agrícola, desde hace varias décadas se desarrollan programas de fitomejoramiento dirigidos a producir cultivos en forma más eficiente con menor costo unitario, disminuir el uso de plaguicidas y reducir la presión para incorporar nuevas tierras de producción. Esto ha conllevado a la generación de nuevas variedades que deben ser objeto de protección mediante la obtención de derechos sobre éstas “Protección a los Derechos de Obtentor de Variedades Vegetales”.

Para responder a las necesidades de pequeños y medianos productores, así como de los demás actores de la cadena de producción, donde se generan nuevas variedades, se han creado entidades como la UPOV (Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales) que establece los requisitos para considerar como nueva una variedad y poder ser objeto de protección. Para este fin se caracterizan las variedades realizando pruebas de diagnóstico morfológico como la prueba de Distinguibilidad, Homogeneidad y Estabilidad (DHE).

La caracterización basada en rasgos diagnósticos como los morfológicos y sistemas de cultivo, han sido los descriptores primarios usados para detallar las diferencias entre taxones cultivados desde 1970. Estos exámenes técnicos fijan una lista de caracteres útiles para describir - diferenciar y comparar las nuevas variedades con respecto a colecciones de referencia, sin embargo, estas pruebas pueden resultar exhaustivas y temporalmente extensivas. Adicionalmente, los caracteres morfológicos

pueden estar influenciados por el medio ambiente haciendo que los resultados no sean del todo confiables. Por este motivo, se han propuesto estrategias más eficientes basadas en el estudio de las variaciones presentes en el material genético, con la ventaja de no ser afectadas por el medio ambiente a corto o mediano plazo, lo que posibilita realizar una identificación y examen más profundo de la diversidad genética a través y dentro de los taxones, garantizando un refinamiento del sistema de descripción y diferenciación actual.

Con este fin, diferentes métodos de caracterización molecular han sido empleados para estudiar la diversidad genética en arroz, que en principio difieren en su aplicación, la cantidad de polimorfismos detectados, costo y tiempo requerido. Entre los marcadores comúnmente utilizados para estudiar la diversidad se encuentran los RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), RAPD (*Random Amplified Polymorphic DNA*) y AFLP (*Amplified Fragment length Polymorphism*). Los RAPD y AFLP, conocidos como “marcadores masivos”, generan una gran cantidad de información en corto plazo, no requieren conocimiento previo de secuencias amplificadas y reconocen secuencias anónimas dispersas a lo largo del genoma. La técnica AFLP combina la facilidad de los marcadores RAPD con la robustez de los RFLP, que generan complejos patrones de bandeo con un número elevado de fragmentos de ADN, ofreciendo mayor cobertura del genoma e información que otros sistemas de marcadores moleculares. Además son sensibles, altamente reproducibles y han sido empleados en estudios de caracterización en varias especies con resultados efectivos.

El Instituto Colombiano Agropecuario-ICA, por ser la entidad encargada de la realización de las pruebas morfológicas DHE y otorgar los Derechos de Obtentor de Variedades Vegetales en Colombia, adelanta proyectos de estandarización e implementación de las técnicas bioquímicas y moleculares como herramienta de soporte a las pruebas descriptivas.

En este contexto, el presente proyecto pretende genotipificar variedades de arroz (*O. sativa*) pertenecientes al programa “Derecho de Obtentor de Variedades Vegetales”

del ICA, para su identificación y diferenciación por medio de perfiles electroforéticos generados con marcadores moleculares AFLP.

2. MARCO TEÓRICO Y REVISIÓN DE LITERATURA

2.1 Generalidades del arroz *Oryza sativa*

El arroz, *O. sativa* es alimento para más de la mitad del mundo, es rico en diversidad, estructura, funciones y propiedades (Xueliang *et al.*, 2005), es el cereal alimenticio de mayor importancia en América Latina y el Caribe, suministra a quienes lo consumen más calorías que los alimentos básicos como el trigo, el maíz, la yuca o la papa. Tiene además otras virtudes alimenticias: es rico en vitaminas y minerales, es bajo en grasa y sal, y está libre de colesterol (Li *et al.*, 2007). Contiene todos los aminoácidos esenciales para humanos excepto la lisina (Sasaki, & Burr, 2000). Además presenta una gran cantidad de productos derivados, como el arroz molido, cereal infantil y barras energéticas, entre otros (Xueliang *et al.*, 2005).

Es cultivado al menos en cuatro continentes representando uno de los productos más importantes y versátiles a nivel mundial, que cuenta con variedades adaptadas a una amplia gama de climas, suelos y condiciones de humedad (Prashanth *et al.*, 2002).

El mayor productor latinoamericano de arroz es Brasil con 2.39 millones de toneladas, el segundo es Colombia con 2.28 millones de toneladas al año y un área sembrada de 475.915 Ha. Tres regiones productoras principales se encuentran en Colombia, dos de las cuales son de arroz irrigado y producen dos cosechas al año: departamentos del Tolima y Atlántico. La tercera región se encuentra en los Llanos Orientales y depende de las lluvias donde se produce una cosecha al año (Ruiz, 2002).

El género *Oryza* comprende veintidós especies (Brondani *et al.*, 2003) de las cuales las cultivariedades de arroz pertenecen al complejo *O. sativa* que contiene las dos especies cultivadas *O. sativa* y *O. glaberrima* y varias especies silvestres que son ancestros directos de éstas. Dentro de *O. sativa* dos grupos eco-geográficos se distinguen, tipo *O. japonica* y *O. indica* (Delseny *et al.*, 2001). *Indica* representa las subespecies predominantemente tropicales, y *japonica* consta de subespecies tropicales y de clima templado. Ampliamente distribuida, *japonica* es cultivada en el

este de Asia, Norte y Suramérica, Australia, Norte de África mediterránea y Europa, sumando el 20% de la producción mundial. (Ni, 2002).

Dentro del género *Oryza* existen niveles de ploidía: AA, BB, CC, BBCC y CCDD, en *Oryza sativa* el genotipo es diploide (AA) con 24 cromosomas y contenido Guanina Citocina de 51.4%. Se ha considerado de fácil manejo en programas de reproducción con fines fitomejoradores por la facilidad de transferencia de caracteres de importancia agrícola desde fuentes como las especies silvestres (Brondani *et al.*, 2003).

Clasificación Taxonómica

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

Superdivisión: Spermatophyta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida - Monocotiledonea

Subclase: Commelinidae

Orden: Cyperales

Familia: Poaceae

Género: *Oryza*

Especie: *Oryza sativa* L.

Nombre común: arroz

Taxonomía obtenida de Gramene: A Resource for Comparative Grass Genomics. (Stein *et al.*, 2008).

El arroz es una gramínea anual, monocotiledónea, de tallos redondos y huecos, compuestos por nudos y entrenudos, hojas de lámina plana unidas al tallo por la vaina y su inflorescencia es en panícula. Su tamaño varía desde 0.4m consideradas enanas y 7m las flotantes (Medina. 2005). Presenta un genoma corto, con 400 – 430 millones de pb, (Mpb) que ha sido objeto de secuenciación completa (Turcotte *et al.*, 2001), es uno de los más pequeños en la familia de gramíneas pero tres veces el de *Arabidopsis thaliana*. (Sasaki & Burr, 2000). Dada su cercana relación con cereales mayores y por

ser un cultivo de gran importancia, se ha considerado como especie modelo, por lo que su genoma ha sido el foco de varios experimentos asociados a localización de QTL, o loci relacionados con rasgos fenotípicos, presentando utilidad actualmente para mapeo físico, secuenciación genómica y aislamiento de genes (Delseny *et al.*, 2001), posee un mapa con cerca de 6.000 marcadores moleculares, cerca de 40.000 EST (*Expressed Sequence Tags*) que han sido reportados y muchos mapeados (Sasaki & Burr, 2000). Actualmente, existen colecciones grandes de germoplasma disponibles ofreciendo muchas posibilidades de estudios de diversidad genética, así como caracteres adaptativos y de tolerancia (Delseny *et al.*, 2001).

El punto de partida esencial del fitomejoramiento es el descubrimiento, o la creación, de la variación genética en el seno de una especie vegetal. La mejora genética es posible gracias a la variabilidad genética, a la heredabilidad del carácter que se quiere aislar, a la eficacia e intensidad de la selección aplicada y al tiempo necesario para realizar un ciclo de selección. Los fitomejoradores aplican diversas técnicas y tecnologías para crear la variación genética y seleccionar las mejores plantas (UPOV 2002).

Técnicas como la polinización cruzada y autopolinización en algunas plantas han sido una estrategia de selección de caracteres de interés, con ellos se procura generar la combinación más favorable de alelos. Algunas técnicas pretenden aumentar el número de variaciones al exponer las plantas a condiciones de estrés como los rayos X. Otro método desarrollado con este fin es el cultivo tisular, en esta técnica se cultivan células, tejidos y plantas completas con nutrientes artificiales (Byrne *et al.*, 2004).

En la década de los 70 también se utilizó el mejoramiento con haploides, en el que se duplica en forma artificial sus cromosomas para que la planta restablezca la cantidad cromosómica normal. Algunas variedades tienen brazos cromosómicos foráneos resultantes de una sustitución de material cromosómico proveniente de una especie diferente. En los últimos años se ha incorporado la tecnología de la ingeniería

genética que mediante la transgénesis posibilita realizar cruzas entre individuos de parentesco más lejano (Byrne *et al.*, 2004).

2.2 Fitomejoramiento en arroz

En el caso del arroz, los programas de fitomejoramiento han permitido la introducción de genes portadores de importantes características agronómicas (González *et al.*, 2001), pretendiendo principalmente superar las condiciones agroecológicas no óptimas, disminuir la presión sobre las tierras de cultivo, la necesidad del uso de plaguicidas y sustentar la demanda creciente al enfrentar el desafío del aumento poblacional.

En la actualidad, la ingeniería genética ofrece múltiples soluciones a estreses abióticos y bióticos, mejoras en la calidad nutricional del cultivo e incremento en el rendimiento mediante transformación (Ruiz, 2002). Del mismo modo, se realizan actividades de mejoramiento en arroz basadas en la producción de híbridos de *O. sativa* (Li *et al.*, 2007), por lo que el estudio de la diversidad genética del germoplasma y las diferencias genéticas entre potenciales progenitores para actividades de multiplicación toma gran interés en el manejo de estos programas repercutiendo en una gran mejoría de su cultivo (Staub & Meglic, 1993).

Como consecuencia del fitomejoramiento se han generado nuevas variedades que poseen información genética de valor comercial. Dicha información hace posible obtener un cultivo de mayores rendimientos, excelente estabilidad con variadas resistencias y demás atributos, permitiendo al productor acceder a un beneficio superior seleccionando una variedad de alta calidad y ser competitivo en un mercado globalizado (González *et al.*, 2001).

La actividad sistemática y continuada que requiere el fitomejoramiento sólo se justifica si existe la posibilidad de acceder a un beneficio. Por esta razón, es imprescindible proporcionar un sistema eficaz de protección de las variedades

vegetales que fomente su obtención y resulte en favor del obtentor y la sociedad en general (UPOV, 2002), previniendo su reproducción por terceros cuando la variedad ha sido difundida. Por lo anterior, se entiende que es de gran importancia tener herramientas analíticas adecuadas para establecer la identidad genética de los cultivares y determinar niveles de pureza (Staub & Meglic, 1993).

2.3 Protección a los Derechos de Obtentor de Variedades Vegetales

Colombia, por ser miembro de la comunidad Andina se rige en materia para la normatividad de biotecnología y áreas conexas por lo convenido en la Comisión del acuerdo de Cartagena. En este sentido rige en nuestro país la decisión 345 o régimen común de protección a los derechos de los obtentores de variedades vegetales donde se asignan reglamentos, funciones, se establecen procedimientos de obtención de certificados de obtentor y se aprueba el Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (ICA, 1996).

El Convenio Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV), aprobado en París en 1961, establece un sistema internacional de protección de las obtenciones vegetales y reconocimiento de los derechos de propiedad intelectual de los obtentores. Tiene como objetivo proporcionar y fomentar un sistema eficaz para la protección de las variedades vegetales, con miras al desarrollo de nuevas variedades vegetales para beneficio de la sociedad.

De acuerdo con el Artículo 12 de la UPOV, sólo puede concederse la protección a una nueva variedad vegetal cuando su evaluación satisface los requisitos establecidos por el Convenio y en especial, cuando la variedad es distinta (D) de cualquier otra variedad notoriamente conocida, es suficientemente homogénea (H) y estable (E) (UPOV, 2002). En Colombia este diagnóstico es realizado por el Instituto Colombiano Agropecuario (ICA), autoridad nacional competente para el desempeño del régimen de protección a las nuevas variedades vegetales.

El Convenio de la UPOV establece como requisitos satisfacer los criterios de distinción, homogeneidad y estabilidad (DHE), los cuales se enuncian a continuación.

1. La variedad debe poder *distinguirse* claramente por uno o varios caracteres importantes de cualquier otra variedad, cuya existencia sea notoriamente conocida en el momento en que se solicita la protección. Los caracteres que permitan distinguir y definir una variedad deberán ser reconocidos y descritos con precisión.

2. La variedad debe ser suficientemente *homogénea* en una generación, teniendo en cuenta las particularidades de su reproducción sexual o multiplicación vegetativa.

3. La variedad debe ser *estable* a través de las generaciones en sus caracteres esenciales después de reproducciones sucesivas o cuando el obtentor haya definido un ciclo particular de multiplicaciones o definiciones al final de cada ciclo.

Otros criterios son: *Novedad* (en virtud del cual la obtención ha de ser "nueva", en el sentido que no debe haberse vendido o enajenado durante un período especificado anterior a la fecha de solicitud) y el requisito que la obtención ha de tener una *denominación* adecuada (UPOV, 2002).

El control de la pureza varietal y la discriminación de variedades protegidas (es decir, registradas) requieren de una adecuada identificación de los materiales.

Tradicionalmente, la identificación varietal se ha basado en la caracterización agronómica y morfológica de las semillas y plantas (Aguirre *et al.*, 2005), pero se ha encontrado que en la mayoría de los cultivos, la utilización de recursos genéticos similares en diferentes programas de mejoramiento ha reducido la eficiencia de discriminación por marcadores fenotípicos (Carrera *et al.*, 2004). De este modo, estas técnicas han ido evolucionando en el último decenio hacia el uso de marcadores moleculares que permiten identificar polimorfismos o diferencias a nivel de secuencias ADN (Aguirre *et al.*, 2005).

El uso de estas metodologías puede ofrecer una herramienta ágil y contundente para clarificar, confirmar o reformular la taxonomía sistemática (Talhinhas *et al.*, 2003). Adicionalmente el conocimiento de la diversidad genética debe tener un impacto más

fuerte en comparación con los datos morfológicos puesto que los datos basados en estudios genéticos no tienen inconvenientes en cuanto al número restringido de variantes (Carrera *et al.*, 2004), la influencia ambiental, estadios de desarrollo, y expresión genética (Simioniuc *et al.*, 2002).

La UPOV ha desarrollado protocolos con objeto de estandarizar los análisis de laboratorio para identificación de cultivares y reglamentar la utilización de diferencias moleculares en el control de la pureza varietal, la discriminación de variedades protegidas y en el otorgamiento de nuevas patentes. Con el objeto de evitar el registro de variedades esencialmente equivalentes, UPOV ha establecido umbrales mínimos de diferencias moleculares sobre la base de distancias genéticas obtenidas a partir de caracteres tradicionales, con los cuales es posible obtener distintos índices que ponen en evidencia la similitud genética de los materiales. En la actualidad se dispone de patrones moleculares varietales para una extensa lista de especies (Carrera *et al.*, 2004).

2.4 Caracteres varietales en la planta de arroz.

La raíz y su desarrollo: Aunque es un carácter varietal definido, está determinado por el sistema de cultivo y naturaleza de los suelos. En variedades de arroz flotante se forman raíces adventicias en los nudos más altos de la parte del tallo sumergida en el agua.

Tallo: Alternación de nudos y entrenudos. La altura de la planta de arroz es una función de la longitud y número de los entrenudos, tanto la longitud como el número de entrenudos son un carácter varietal definido que pueden variar debido al medio ambiente pero en condiciones semejantes tiene valores constantes.

Hojas: La presencia de vello y de pigmentación antociánica en los márgenes, o en toda la lámina de la hoja bandera tiene un ángulo de inserción determinado.

Órganos reproductivos: las flores poseen inflorescencia denominada panícula. El entrenudo superior del tallo en cuyo extremo se encuentra la panícula se denomina

pedúnculo. Su longitud varía considerablemente según la variedad de arroz; en algunas variedades puede extenderse más allá de la hoja bandera o quedar encerrada en la vaina de ésta. Las panículas pueden clasificarse en abiertas, compactas e intermedias, según el ángulo que formen las ramificaciones al salir del eje de la panícula. Tanto el peso como el número de espiguillas por panícula son caracteres varietales.

Las características de algunos órganos están definidas para cada variedad, aunque algunas como el desarrollo radical son determinadas por el sistema de cultivo y la naturaleza de los suelos. Rasgos como la altura, la longitud del pedúnculo, la presencia de vello en las hojas, la ubicación de pigmentación antociánica y el tipo de lámina son caracteres considerados para estudios morfológicos porque muestran diversificación según la variedad. (Acuña, 2006).

Características de algunas variedades que se han empleado para estudios descriptivos basados en rasgos fenotípicos de arroz que son objeto de protección en el ICA se muestran en el Anexo 1.

2.5 Caracterización de variedades vegetales con marcadores moleculares.

Con el desarrollo de nuevas tecnologías bioquímicas la identificación tradicional de variedades se basó en estudios de isoenzimas, técnica ampliamente usada para caracterizar parámetros genéticos de poblaciones, demostrando que derivados de aloenzimas son comparables a través de los estudios y están cercanamente asociados a varios caracteres de historia de vida, tienen el potencial de producir información de importantes implicaciones en biología evolutiva y ecología, así como en biología de la conservación. Aunque esta técnica permitió superar algunos problemas de clasificación se demostró la baja resolución ocasional (Krauss, 1999), restricciones prácticas (insuficiencia de tejido) y bajos niveles de polimorfismos que despertaron interés en los métodos basados en marcadores moleculares (Nybom, 2004).

Durante las pasadas dos décadas varios marcadores moleculares han sido desarrollados y aplicados en análisis de diversidad genética de cultivos, mapeo genético y como marcadores de selección (Xiel *et al.*, 2006), gracias al descubrimiento de la reacción en cadena polimerasa PCR (*Polymerase Chain Reaction*) diferentes métodos de huella de ADN “Genotipificación” (*fingerprinting*) pudieron ser desarrollados (Arenal *et al.*, 1999). De este grupo el primero y mas común fue el de los RAPD introducidos por Williams y colaboradores (1990), años después en 1995 se desarrollaron los ISSR (*Inter-simple sequence repeats*) relativamente similares, y el método de mayor demanda técnica, AFLP (*Amplified Fragment Length Polymorphism*) por Vos y colaboradores (1995), durante la misma década se desarrollaron otros métodos, como el ARDRA del inglés *Amplified Ribosomal DNA Restriction Analysis* (Ward y Akrofi, 1994; Fouly *et al.*, 1997; Roeijmans *et al.*, 1997); AP-PCR - *Arbitrarily Primed PCR* (Welsh y McClelland, 1990) y tDNA-PCR (Welsh y McClelland, 1991) entre otros.

Dentro del amplio grupo de marcadores actualmente utilizados, se encuentran diferencias que radican básicamente en su aplicación, (diversidad genética, análisis de cultivos, mapeo genético, marcadores para selección de genes de interés, aislamiento, clonación), la cantidad de polimorfismos detectados, la especificidad, costo y tiempo requerido. Mientras los RAPD, RFLP y AFLP idealmente no requieren inversiones iniciales relacionadas con el conocimiento del genoma o síntesis de iniciadores (Vos *et al.*, 1995), las técnicas basadas en “loci” microsatélites aunque se han convertido en una herramienta popular para análisis de genética de poblaciones, utilizan información de secuencia para desarrollar los iniciadores necesarios, por lo que el mayor impedimento se les atribuye al tiempo y costo del desarrollo de los iniciadores especie-especifico a partir de librerías genómicas (Nybom, 2004).

Para el caso del arroz, cuyo genoma ha sido secuenciado y del cual se encuentran iniciadores específicos disponibles no es un inconveniente el empleo de microsatélites o técnicas que requieran conocimiento previo de secuencia. Sin

embargo los AFLP presentan ventajas sobre estas técnicas por su alta reproducibilidad y capacidad de discernimiento entre plantas cercanamente emparentadas (Fay *et al.*, 2005).

Desde su desarrollo, los AFLP se han utilizado para discriminar genotipos, para mapeo genético localizado (*Bulk Segregant Analysis*) y para la construcción de mapas genéticos. Su éxito ha sido respaldado por estudios de diversidad genética entre variedades de especies cultivables con ADN de cualquier origen o complejidad (Fay *et al.*, 2005) mostrando resultados favorables de alta calidad (Prashanth *et al.*, 2002), sin embargo existen ciertas complicaciones o factores que se han demostrado influyen en la obtención de patrones de alta calidad.

En el protocolo desarrollado por Vos y colaboradores (1995) por ejemplo, se utilizaron organismos con tamaños de genoma relativamente diferentes al rango que se puede encontrar en el tamaño de las angiospermas, además de otras características que pueden diferir entre las especies, por ello varios autores han reportado dificultades en la obtención de AFLP de alta calidad usando los métodos estándar en Angiospermas con grandes genomas (más de 14700 Mb) (Fay *et al.*, 2005). Consecuente a esto, los investigadores se ven en la necesidad de desarrollar protocolos propios para optimizar el uso de estos marcadores. Factores como el tamaño del genoma (Fay *et al.*, 2005), la ploidía (Bennet *et al.*, 1998) y el contenido GC (Vekemans *et al.*, 2002) pueden ser solucionados modificando características del método tales como el número de nucleótidos añadidos como adaptadores o condiciones de PCR más rigurosas, entre otras. Por esta condición el número, la intensidad y la calidad de las bandas producidas se pueden alterar para generar patrones electroforéticos de mayor calidad.

Estudios de diversidad genética se han realizado en diferentes especies empleando AFLP, manifestando en algunos casos diferencias importantes con estudios previos que emplean caracteres morfológicos, esto se debe al bajo número de variaciones en los caracteres que pueden existir en algunas especies (Flores *et al.*, 2005 y Ayele *et al.*, 2000). Sin embargo otras investigaciones produjeron resultados acordes a los

datos históricos morfológicos basados en los métodos de taxonomía numérica (Bleas *et al.*, 1998).

Ayele y colaboradores (2000), demostraron la eficacia del poder resolutivo de la técnica AFLP al encontrar uno o más fragmentos únicos usando uno o más pares de iniciadores, revelando el potencial de la técnica para diferenciación genética. El poder resolutivo de los AFLP fue confirmado por Flores y colaboradores (2005); Qi y Lindhout (1997); Travis y colaboradores (1996); Paul y colaboradores (1997); Hill y colaboradores (1996); Sharma y colaboradores (1996) entre otros, mostrando altos porcentajes de polimorfismos y capacidad de discriminación general de genotipos en plantas.

En estudios comparativos de técnicas de huella genética, principalmente AFLP, RAPD, técnicas basadas en microsatélites, RFLP (Arenal *et al.*, 1999; Simionuic *et al.*, 2002; Sensi *et al.*, 1996; Powell *et al.*, 1996) en general se encuentra semejanza para los resultados en los datos de similitud genética en análisis de agrupamiento, y habitualmente todas las técnicas usadas discriminan todos los genotipos estudiados, incluyendo aquellos que no podían serlo por métodos morfológicos o caracteres fenotípicos. No obstante, toda la información recolectada es útil para realizar los estudios de relaciones genéticas, que al ser analizados en conjunto muestran remarcable efectividad en análisis filogenéticos y discriminación de genotipos.

2.6 Marcadores moleculares en Arroz

Previo a la implementación de marcadores moleculares, se usaron con diversos propósitos métodos bioquímicos en arroz como el análisis electroforético de las proteínas de la semilla (Aliaga *et al.*, 1987) 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 muestran baja capacidad discriminante (Aguirre *et al.*, 2005).

Con el auge de las técnicas moleculares, el estudio de las relaciones genéticas entre variedades de arroz se ha realizado mediante diferentes análisis basados en técnicas como la RFLP y algunas apoyadas en PCR, como AFLP (Virk *et al.*, 2000; Spada *et al.*, 2004), RAPD (Kumar & Huang, 1999), técnicas basadas en microsatélites –SSR- (Powel *et al.* 1996) y RAMS (*Random Amplified Microsatellite*) (Acuña., 2006) entre otras. Tras su aplicación se han arrojando resultados similares y se ha puesto en evidencia la efectividad de su uso. De la misma manera, análisis comparativos revelaron similitudes.

Kumar & Huang (1999), examinaron la distribución y cobertura en el genoma de individuos doblemente haploides empleando marcadores RAPD y mostraron que eran una alternativa práctica para la técnica RFLP. Sin embargo, fallaron en identificar marcadores ligados a genes de importancia agronómica después de utilizar gran número de iniciadores, por lo que se produjeron dudas de la accesibilidad de los RAPD en algunas partes del genoma. Además el método tiene un limitado nivel de reproducibilidad.

Spada y colaboradores (2004) emplearon dos tipos de marcadores: los AFLP y los SSR en el estudio de las relaciones genómicas en 96 cultivariedades de arroz. Los AFLP produjeron 461 fragmentos donde un 53% eran polimórficos, los SSR produjeron 4 a 11 alelos en 12 loci investigados. Los dos dendogramas de similitud produjeron resultados afines, mostrando la confianza de los dos métodos para discriminar cultivares.

Se han descrito diversas aplicaciones de AFLP para estudios genéticos de arroz, entre los cuales se destacan los análisis de identidad de cultivares y de diversidad genética de genotipos de diversos orígenes (Mackill *et al.*, 1996; Singh *et al.*, 1999; Zhu *et al.*, 1998; Aggarwal *et al.*, 2002), mapeo genético, 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.

Entre otros usos que se le han dado a los AFLP en arroz, se encuentran la búsqueda y la identificación diferencial de genes expresados por medio del método denominado cDNA-AFLP, la técnica es similar pero utiliza ADN complementario y no genómico, lo que permite encontrar genes de interés (Mao *et al.*, 2004).

También se han realizado investigaciones para aprovechamiento de las especies silvestres como fuentes de variabilidad genética y cómo pueden ser útiles para la introgresión en especies cultivadas de *Oryza*; para ello efectúan análisis de cruces específicos y se examinan las relaciones genéticas poniendo en manifiesto además la importancia de los resultados para fomentar y aplicar planes de conservación (Brondani *et al.*, 2001, 2003; Gao *et al.*, 2005).

La seguridad futura del arroz depende del continuo acceso a la diversidad genética como fuente de genes con caracteres útiles por parte de 21 especies de *Oryza*, por lo que la conservación de la diversidad genética en germoplasma de especies silvestres es reconocida (Gao, 2004).

2.7 Generalidades de la técnica AFLP (Amplified Fragment Length Polymorphism)

Mientras los microsatélites y RFLP son marcadores co-dominantes, los AFLP involucran la aleatoriedad y son marcadores dominantes, sin embargo en esta técnica se destaca la sensibilidad por encima de otras técnicas de huella genética, ya que generan complejos patrones de bandeo con un número superior a 100 fragmentos de ADN por reacción (Mackill *et al.*, 1996; Zhu *et al.*, 1998) ofreciendo una cobertura de genoma amplia y mayor información (Prashanth *et al.*, 2002). Su poder como en otras técnicas moleculares, se basa en las variaciones genéticas que existen entre especies, variedades o cultivares estrechamente relacionados. Estas variaciones en la secuencia

de ADN son explotadas para la obtención rutinaria de huellas de un genotipo en particular.

La base molecular del polimorfismo de los AFLP, igual que el de RFLP, se debe a mutaciones puntuales, inserciones, deleciones o rearrreglos en el genoma debido a translocaciones e inversiones, que pueden generar pérdida o ganancia en las secuencias de reconocimiento de las enzimas de restricción. Las huellas de ADN producidas son, en otras palabras, RFLP amplificados selectivamente por medio de adaptadores específicos vía PCR. (Fay *et al.*, 2005).

Base molecular AFLP

La implementación de la técnica involucra tradicionalmente cuatro pasos: restricción, ligación, preamplificación y amplificación selectiva.

Restricción

El ADN genómico es digerido con 2 enzimas de restricción: *EcoR1* (con 6 pb de reconocimiento) y *Mse1* (4 pb de reconocimiento). Un gran número de fragmentos son generados en este paso; fragmentos *EcoR1* – *Mse1*- son generados típicamente en mayor cantidad que los fragmentos *EcoR1* - *EcoR1* o *Mse1*-*Mse1*.

El empleo de estas u otras enzimas de restricción produce fragmentos de ADN genómico con extremos cohesivos (Figura 1) que permiten la ligación de adaptadores otorgando mayor especificidad en la amplificación.

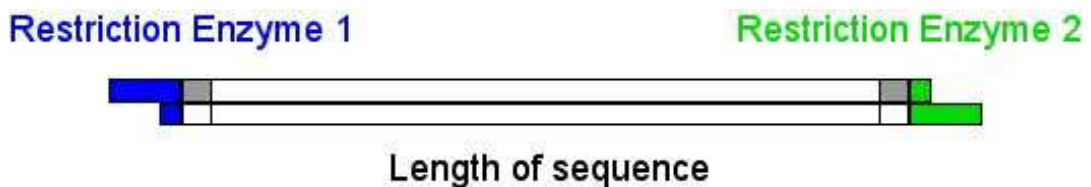


Figura 1. Esquema de corte con enzimas de restricción generando dos extremos cohesivos en ADN genómico. Fuente: Insilico simulation of molecular biology experiments.

Ligación

Durante esta fase los adaptadores proporcionados son ligados a los extremos cohesivos producto de la restricción, los adaptadores constan de una secuencia conocida complementaria a los cortes realizados, y una secuencia complementaria a los iniciadores que serán elegidos, por lo tanto es posible amplificar muchos fragmentos ADN sin conocimiento previo de secuencia..

Los fragmentos de ADN genómico son ligados a las secuencias de corte *EcoRI* y *MseI* (Figura 2) generando ADN molde para la amplificación.

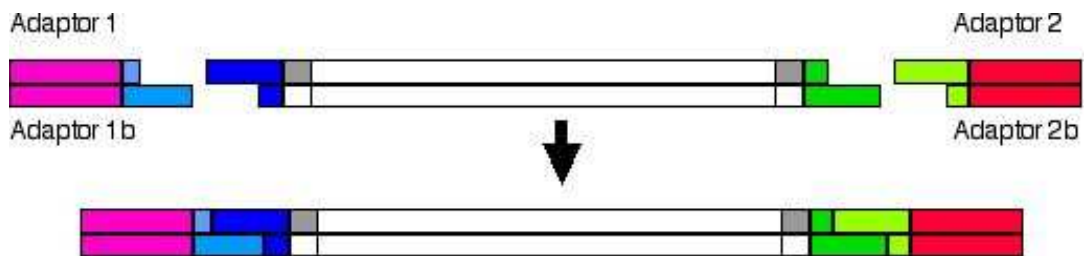


Figura 2. Ligación de los adaptadores a los extremos cohesivos. Fuente: Insilico simulation of molecular biology experiments.

Preamplificación

El propósito de la preamplificación es incrementar la cantidad de ADN molde disponible y disminuir el número total de bandas que se pueden amplificar. En la preamplificación se usa generalmente un nucleótido selectivo.

Los iniciadores con un nucleótido selectivo se unen a las secuencias complementarias de los adaptadores (Figura 3).

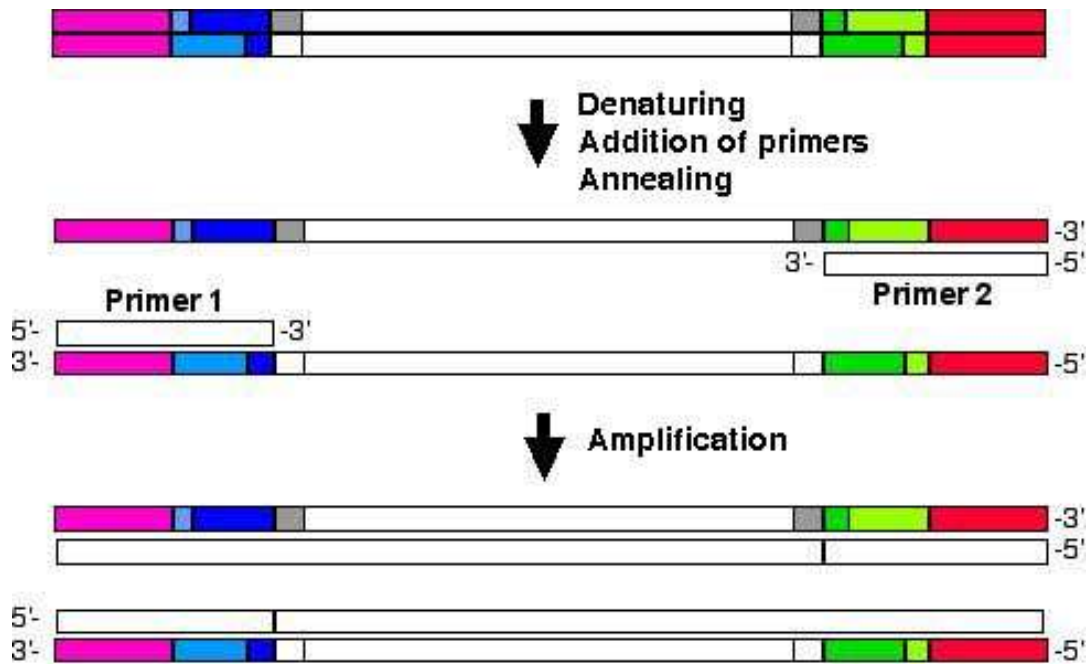


Figura 3. Esquema de preamplificación, los iniciadores con un nucleótido selectivo hibridan con las secuencias complementarias de los adaptadores y cortes de restricción Fuente: Insilico simulation of molecular biology experiments.

Amplificación selectiva

En esta fase los productos de preamplificación son usados como molde para amplificar selectivamente mediante iniciadores que contienen de dos a tres nucleótidos selectivos (Figura 4).

La amplificación de las bandas se determina por la presencia de nucleótidos en las secuencias complementarios a los selectivos presentes en los iniciadores.

Los productos de la amplificación son separados electroforéticamente, teñidos con nitrato de plata y visualizados por medio de un transiluminador de luz blanca idealmente o por observación directa.

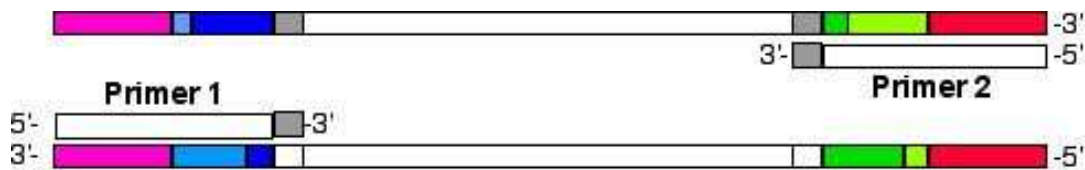


Figura 4. Los iniciadores con tres nucleótidos selectivos hibridan con las secuencias complementarias de los adaptadores y cortes de restricción durante la amplificación selectiva.
Fuente: Insilico simulation of molecular biology experiments.

En el caso de utilizar iniciadores marcados con isótopos fluorescentes, los geles son revelados mediante el uso de rayos X.

2.8 Análisis de la información generada por los marcadores AFLP

La comparación de genotipos o muestras de estudio se realiza por parejas, basados en la presencia o ausencia de bandas, matrices de similitud son generadas a partir de coeficientes como *Dice* o *Jaccard* (Saker *et al.*, 2005).

El Coeficiente de similitud de *Dice* es equivalente al de *Nei* y *Li* (1979). Solo considera coincidencias en presencia de las bandas y otorga mayor valor a estas (Saker *et al.*, 2005).

Las técnicas de agrupamiento tienen como objetivo construir fenogramas que permiten evidenciar las distancias genéticas dentro de un grupo determinado de estudio, pueden realizarse mediante tres algoritmos de ligamiento: simple, promedio y completo.

Es un algoritmo de aglomeración, el valor de similitud entre la OTU, (candidato a incorporarse) y el grupo o núcleo, es igual a una similitud promedio entre el candidato y cada integrante del núcleo.

3. FORMULACIÓN DEL PROBLEMA Y JUSTIFICACIÓN

3.1 Formulación del problema

La Unión Internacional para la Protección de las Obtenciones Vegetales (UPOV) es una organización intergubernamental que rige el acceso a la Protección de los Derechos a Obtentores de Nuevas Variedades y determina que para poder acceder a los beneficios, el fitomejorador debe demostrar que una variedad se encuentra, ante todo, claramente definida y cumple con los criterios de distinción, homogeneidad y estabilidad (examen DHE). Las técnicas convencionales basadas en caracteres morfológicos aunque vigentes, requieren de mucho tiempo y presentan diversas dificultades. Las variedades a ser registradas comúnmente satisfacen los estándares de homogeneidad y estabilidad, sin embargo los requerimientos de distinción son los más difíciles de establecer, en especial en materiales genéticamente emparentados, además está la influencia que los factores ambientales pueden tener sobre los rasgos fenotípicos, las prácticas de manejo y el hecho que la expresión genética ocurre dependiendo del estado-específico de la planta, lo que hace que los diagnósticos morfológicos no sean adecuados para el estudio de relaciones genéticas. Para el registro o lanzamiento de una nueva variedad de arroz se recurre a los descriptores morfológicos y aunque su utilización sigue siendo reglamentaria, es necesaria la búsqueda de alternativas.

Otro tipos de atributos han recibido especial atención, entre ellos se encuentran los marcadores bioquímicos (proteínas, isoenzimas, metabolitos) y los métodos basados en el análisis del ADN. Estos últimos han demostrado en gran medida una mejora en la eficacia del proceso de evaluación.

3.2. Pregunta de Investigación

¿La técnica AFLP permite diferenciar cultivares de arroz *Oryza sativa* demostrando un soporte eficaz a los diagnósticos fenotípicos?

3.3 Justificación de la Investigación

Las técnicas de fitomejoramiento empleadas pueden ser de muy diverso tipo, desde técnicas de mejora tradicionales, tales como el cruce y la selección hasta aquellas que involucran el uso de la ingeniería genética. El resultado de estos programas es la obtención de nuevas variedades de interés y valor comercial que deben protegerse para beneficio del fitomejorador concediéndose un dominio temporal, intelectual y económico sobre su obtención.

En algunos países la multiplicación, robo y comercio ilegal de semillas ha sido y sigue siendo un problema sin resolver año tras año, genera competencia desleal, evasión fiscal y un perjuicio económico que atenta el avance de la investigación y el desarrollo de la tecnología biológica. Por lo tanto, la implementación de técnicas moleculares para identificación varietal de semillas puede disminuir estos problemas permitiendo la distinción de obtenciones vegetales y su estado legal con mayor eficiencia y confianza.

La UPOV ha desarrollado protocolos con objeto de estandarizar los análisis de laboratorio para identificación de cultivares y reglamentar la utilización de diferencias moleculares en el control de la pureza varietal, la discriminación de variedades protegidas y en el otorgamiento de nuevas patentes.

En Colombia, el Instituto Colombiano Agropecuario -ICA-, siendo la autoridad nacional competente para aplicar el régimen de protección a las nuevas variedades vegetales, y de protección a la producción agropecuaria, reconoce la importancia de adelantar proyectos de estandarización e implementación de técnicas moleculares

como herramienta de apoyo a las pruebas diagnósticas tradicionales (DHE). De esta forma, Los perfiles electroforéticos generados con el AFLP para cada variedad, permiten su distinción y apoyan de manera consistente las pruebas tradicionales.

4. OBJETIVOS

4.1 Objetivo general:

Genotipificar variedades de *O. sativa* por medio de marcadores moleculares AFLP.

4.2 Objetivos específicos:

1. Estandarizar la técnica AFLP a partir de ADN genómico de variedades de arroz.
2. Obtener perfiles electroforéticos polimórficos y reproducibles de las variedades de arroz en estudio.
3. Determinar diferencias y relaciones de parentesco entre las variedades de arroz por medio de análisis de agrupamiento.

5. MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Diseño de la investigación

Objetivo 1

Factor de diseño: Calidad perfil electroforético **niveles:** alto y bajo.

Variable respuesta: Número, tamaño e intensidad de las bandas

Unidad de respuesta: Número, peso molecular (pb)

Unidad de muestreo: “Pool ADN” genómico por variedad

Objetivo 2

Factor de diseño: Nivel de polimorfismo **niveles:** alto y bajo.

Variable respuesta: Polimorfismo

Unidad de respuesta: Porcentaje

Unidad de muestreo: Perfiles electroforéticos variedades

Objetivo 3

Factor de diseño: Relaciones de parentesco **niveles:** cercano y lejano.

Variable respuesta: Distancias genéticas (Dendograma de agrupamiento)

Unidad de respuesta: Porcentaje de similitud

Unidad de muestreo: Matriz presencia / ausencia perfiles electroforéticos

5.1.1 Población de estudio y muestra:

La población de la investigación se constituyó inicialmente con 18 variedades de arroz del Programa de Protección a los Derecho de Obtentor de Variedades Vegetales (Tabla 1), tomadas del Banco de germoplasma de *Oryza sativa* del Instituto Colombiano Agropecuario ICA, ubicado en el Laboratorio Nacional de Semillas – LANASE- Km. 2 vía Madrid, Cundinamarca y muestras de campo enviadas desde el departamento del Tolima, donde se realizan los exámenes de Distinción, Homogeneidad y Estabilidad (DHE).

Tabla 1. Variedades que constituyeron la población de estudio.

Variedades de estudio	Extracción ADN
Oryzica Caribe-8	Acuña 2006
Yacu -9	''
Oryzica -1	''
Progreso 4-25	''
Inproarr 1525	''
Fedearroz 50	''
Coprosem 1	''
Irri 22	''
Línea 2	''
Aceituno 25-40	''
Aceituno 25-28	''
Aceituno 25-26	''
Coprosem 2	''
Selecta 3-20	''
Colombia XXI	''
Coprosem 304	Este trabajo
Alejandra	''
Coprosem 306	''

La muestra de estudio corresponde al ADN extraído de cada una de las 18 variedades de arroz; El ADN de 15 de variedades fué extraído por Acuña en el 2006 a partir de hojas jóvenes y el ADN de las 3 variedades restantes fue extraído en este trabajo a partir de hojas frescas colectadas en campo. (Tabla 1). El material vegetal empleado

en este estudio fué incinerado después de su uso, de acuerdo con las disposiciones del ICA.

En todos los casos la extracción del ADN se realizó utilizando el protocolo propuesto por McCouch y colaboradores 1988 modificado por Acuña (2006). (Anexo 2). Cada muestra se conformó por un grupo de catorce individuos representantes de cada variedad elegidos al azar después de su recolección.

5.1.2 Variables del estudio:

1. Calidad, pureza y cantidad de ADN:

Para aplicar las técnicas moleculares se requiere que el ADN cumpla condiciones de calidad, pureza y cantidad. La acumulación de ciertos componentes orgánicos presentes en la célula como metabolitos secundarios, pueden alterar dichas condiciones impidiendo el desarrollo de técnicas genéticas de alta exigencia como los AFLP. Por ello es necesario efectuar análisis que manifiesten sus condiciones de integridad (respecto al grado de degradación), relación entre ácidos nucleicos y proteínas y su concentración, que se determinan mediante pruebas de calidad, pureza y cantidad, respectivamente.

Medición: El ADN genómico es de alta calidad cuando cumple con los siguientes parámetros:

- Prueba de calidad: se espera observar una banda de alto peso molecular y sin barrido en geles de agarosa, demostrando la integridad del ADN.
- Prueba de pureza y cantidad: mide por espectrofotometría la relación de los ácidos nucleicos respecto a los demás componentes residuales y determina si la cantidad presente en el extraído soporta su empleo en el desarrollo de la técnica molecular.

2. Calidad del perfil electroforético (huella genética)

Los perfiles electroforéticos observados varían según el método de diagnóstico que se utilice, en principio los métodos de huella genética como AFLP proporcionan un único perfil para cada grupo de individuos de una variedad. Los resultados se

observan como un número variable de fragmentos de ADN de diferente peso molecular (pb) que migran diferencialmente en un gel de poliacrilamida. El grupo de estudio en este caso está constituido por las variedades de arroz.

La calidad de un perfil electroforético se mide por la presencia de 20 a 80 bandas claramente definidas con pesos moleculares entre 20-400 pb, determinado de acuerdo a un marcador de tamaño molecular de referencia.

3. Nivel de polimorfismo

El nivel de polimorfismo se define como el número total de bandas polimórficas presentes en un gel. Una banda se considera polimórfica cuando un número determinado de miembros de la población de estudio no la presentan. Esta variable se determina con la obtención del porcentaje de polimorfismo que corresponde al número de bandas polimórficas dividido por el número de bandas totales.

4. Relaciones de parentesco

Las relaciones de parentesco varían dependiendo de las distancias genéticas existentes entre las variedades. Estas distancias se calculan utilizando un índice de similitud obtenido a partir de matrices combinadas. El perfil electroforético de cada variedad es comparado uno a uno con los demás para establecer grupos de parentesco a partir de los índices de similitud o distancia genética.

5.2 Métodos

Evaluación de la cantidad, calidad y pureza del ADN

La evaluación de la concentración de ADN de las 18 variedades se realizó por espectrofotometría usando el programa de cuantificación de ácidos nucleicos con factor de dilución 10, para ello se diluyó 10 µl de ADN total en 90 µl de TE. La concentración de ADN en µg/ml se determinó de acuerdo con la fórmula:

$$\text{Concentración (µg/ml) ADN} = \text{absorbancia 260 nm} \times 50 \times F \text{ (factor dilución)}$$

La pureza ideal en muestras de ADN se determina con base en la relación de absorbancia 260nm/280nm. Un valor en el rango de 1.7 – 2.0 significa que el ADN se encuentra con una pureza óptima para realizar análisis moleculares.

$$\text{Pureza} = \frac{\text{absorbancia 260 nm}}{\text{absorbancia 280 nm}}$$

La calidad del ADN extraído se determinó en primera instancia mediante una electroforesis en gel de agarosa al 0.8% buffer Tris-Borato-EDTA (TBE) 0.5X por 45 minutos y 5V/cm. El gel fue teñido con bromuro de etidio 0.5µl/ml y la banda de alto peso molecular se determinó por comparación visual con el marcador de 500 pb ladder (Invitrogen®) (Anexo 3). El gel fue fotografiado en el equipo Gel Documentation de BioRad®

Con el fin de confirmar la calidad del ADN previamente extraído, se realizó una restricción con cuatro muestras seleccionadas al azar siguiendo el procedimiento indicado en el *Kit* AFLP® Analysis System I (Anexo 4). Para determinar si las enzimas de restricción digieren el ADN extraído, se llevó a cabo una digestión

preliminar con la enzima *EcoRI*. La digestión fue confirmada mediante electroforesis en gel de agarosa al 1.5% en TBE 0.5X. (Figura 7).

Estandarización de la técnica AFLP

Se empleó el *Kit AFLP® Analysis System I Starter Primer Kit* de *Invitrogen®* diseñado para genomas de plantas con tamaños entre 5×10^8 y 6×10^9 pb (Anexo 5) Se siguió el protocolo sugerido por el fabricante utilizando seis combinaciones de iniciadores suministradas en el “kit”. Cuatro de estas combinaciones han sido evaluadas por Prashanth y colaboradores (2002) (tabla 2) y las otras dos fueron seleccionadas aleatoriamente. Las reacciones de amplificación se llevaron a cabo en un termociclador *Techné®* con un programa que inicia con 12 ciclos de “touchdown” donde la temperatura de anillamiento disminuye un grado por ciclo desde 65°C hasta 56°C y 23 ciclos adicionales de 94°C por 30 s; 56°C por 30 s; y 72°C por 60 s (Anexo 6).

Tabla 2. Combinaciones utilizadas en el estudio para medir el nivel de polimorfismo.

No.	Combinación
I	E-AGG; M-CAC
II	E-AGC; M-CAC
III	E-AAC; M-CTA
IV	E-AGC; M-CAT
V	E-AAC; M-CAC
VI	E-ACA; M-CTA

Los productos de la amplificación selectiva se mezclaron con 0.25 volúmenes de tampón de carga (95% de formamida, EDTA 10 mM [pH 8,0] y azul de bromofenol y xylene cyanol a 1 mg ml⁻¹ cada uno). Las muestras se denaturaron a 94°C por 4 min. y luego se enfriaron en hielo. De cada reacción de amplificación se sembraron 4 µl en geles de poliacrilamida. Como control positivo, se utilizó (100ng) de ADN de tomate

digerido y preamplificado. Para calcular el tamaño de las bandas separadas en el gel se utilizó el marcador de peso molecular de 10pb (Invitrogen[®])

Condiciones electroforesis

La electroforesis se realizó en una cámara Sequi-Gen BioRad[®]. Para la preparación y polimerización del gel fueron utilizados 100 ml de acrilamida al 6% (29:1), 500 µl de Persulfato de amonio al 10% y 150 µl de TEMED al 99%, con un tiempo mínimo de polimerización del 1:30 h. El gel se fijó a los vidrios usando Bind-Silane A (Anexo 7).

Para determinar la mejor resolución de los perfiles electroforéticos se evaluaron diferentes tiempos de corrido (1.5 y 2.5 h), proporción de acrilamida - bisacrilamida (29:1 ó 19:1) y corriente aplicada (entre 60 y 110 watts). Para todos los casos, los geles fueron teñidos con Nitrato de Plata (Anexo 8) siguiendo las indicaciones del manual para tinción de geles de poliacrilamida de Promega.

Selección de iniciadores y determinación del grado de polimorfismo.

Con el fin de buscar marcadores polimórficos útiles en la diferenciación de las 14 variedades de arroz con las que se obtuvo perfiles electroforéticos completos y de alta calidad, se seleccionaron las combinaciones que por observación produjeron un buen número de bandas, alto grado de polimorfismo y resolución en los geles. De las seis combinaciones inicialmente evaluadas, solo E-AGC; M-CAC y E-AAC; M-CTA, cumplieron con los requisitos establecidos. El total de bandas obtenidas con cada una de las combinaciones de iniciadores seleccionadas, fue codificado en una matriz binaria de presencia y ausencia, donde a la presencia de la banda correspondiente se asigna un valor de “1” y a su ausencia un valor “0”. Los resultados obtenidos (bandas totales, únicas y porcentaje de polimorfismo) fueron comparados con los registrados en la literatura.

Determinación Diferencias y relaciones de parentesco

A partir de la matriz de presencia y ausencia se construyó una matriz de similitud empleando el índice de Dice. Las distancias genéticas que determinan las relaciones de parentesco se obtuvieron mediante un análisis de agrupamiento utilizando el algoritmo UPGMA (*Unweighted Pair –Group Method using Arithmetic Averages*; Sneath & Sokal, 1973) del programa NTSYS-pc 2.0 (*Applied Biostatistic Inc.*)

6. RESULTADOS

Utilizando el protocolo propuesto por *McCouch*, y colaboradores en 1988 modificado de acuerdo a necesidades (cantidad de tejido foliar, calidad, cantidad y pureza de ADN) se obtuvieron cantidades superiores a 100 ng/ μ l, cantidad mínima requerida para los ensayos de AFLP.

La relación de absorbancia 260/280 (pureza) del ADN debe encontrarse idealmente en un rango de 1.7 – 2.0 para su correcto desempeño en el desarrollo de marcadores AFLP. Como se observa en la tabla 3, el ADN de 15 variedades presentó una pureza ideal para el desarrollo de la técnica. Sin embargo, tres muestras que presentaron una relación de A260/A280 inferior a 1,7 fueron también incluidas en los procedimientos posteriores.

Tabla 3. Rango de purzas alcanzadas por medio del protocolo *Mc. Couch* 1988 modificado y la concentración de ácidos nucleicos.

VARIEDAD	CONCENTRACIÓN (ng/ μ l)	PUREZA
Oryzica Caribe	907	1,81
Yacu-9	300,5	1,87
Oryzica 1	473	1,73
Progreso 425	580	1,85
Inproarroz 1525	373	1,86
Fedearroz 50	722	1,84
Coprosem 1	893	1,84
Irri 22	937	1,81
Línea 2	701	1,9
Aceituno 2540	396,2	1,73
Aceituno 2528	179,7	1,62
Aceituno 2526	180,2	1,63
Coprosem 2	871	1,85
Selecta 3-20	233	1,74
Colombia XXI	255	1,93
Coprosem 304	752,3	1,72
Alejandra	248,2	1,82
Coprosem 306	184,5	1,45

Prueba de calidad

En las pruebas de calidad se observaron bandas de alto peso molecular poco degradadas tanto para el ADN obtenido por Acuña (2006) (Figura 5) como el obtenido a partir de hojas frescas en este trabajo (Figura 6). Algunas bandas se observan más intensas, consecuencia de la mayor cantidad de ADN extraído en algunas variedades.

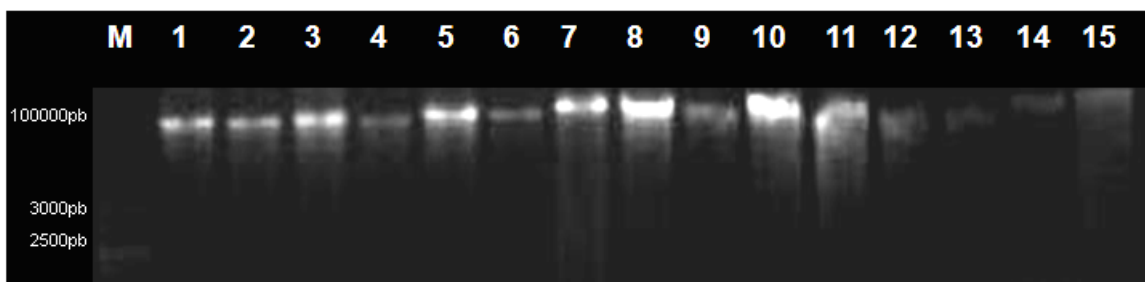


Figura 5. Prueba de calidad de ADN extraído por Acuña, et al., 2006. Bandas de alto peso molecular en gel de agarosa 0.8% teñido con bromuro de etidio 0.5 ug/ml.

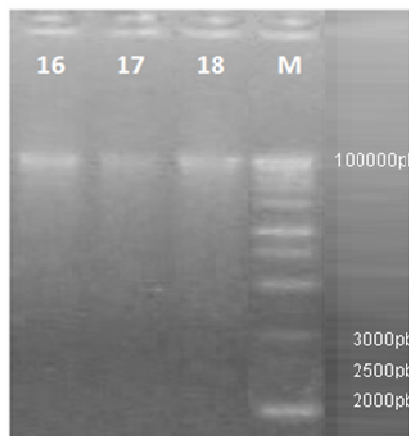


Figura 6. Prueba de calidad del ADN extraído a partir de hojas frescas en este trabajo.

Prueba de restricción

En la Figura 7A se observa la digestión de cuatro muestras elegidas aleatoriamente empleando la enzima *EcoRI*. La digestión completa en las muestras empleadas demuestra que el ADN es adecuado para desarrollar la técnica AFLP. En la Figura 7B se observa el ADN sin digerir de las mismas muestras.

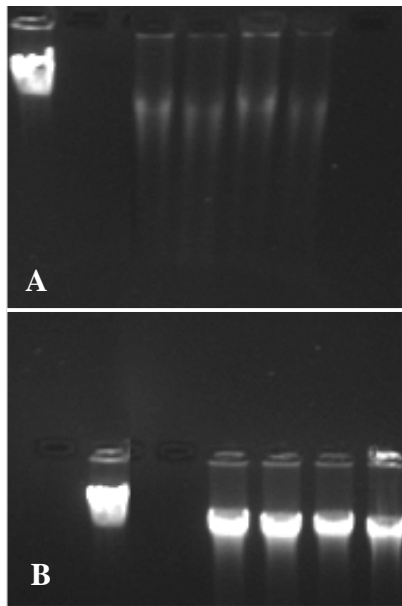


Figura 7. Prueba de digestión de cuatro muestras de ADN elegidas al azar (*Oryzica Caribe-8*, *Coprosem 1*, *Inproarroz 1525* y línea 2). En A muestras digeridas, en B muestras sin digerir.

Estandarización técnica AFLP

Para la digestión del ADN de alto peso molecular de las variedades de estudio se emplearon las enzimas de restricción *EcoRI* (corte poco frecuente) Sigma[®] y *MseI* (corte frecuente) GIBCO BRL[®] para preparar la solución combinada de enzimas en la concentración final sugerida por el Kit de AFLP de 1.5 U/ μ l, en todas las reacciones se empleó agua destilada desionizada. La ligación y demás reacciones se realizaron siguiendo las indicaciones del Kit con el atenuante que se utilizaron volúmenes de reacción inferiores conservando las proporciones sugeridas.

Condiciones electroforesis

Con la proporción de acrilamida – bisacrilamida 29:1 y las condiciones de corrido electroforético: dos horas y veinte minutos, con 70 Watts de corriente se obtuvieron los mejores resultados en cuanto a calidad, intensidad y resolución de las bandas.

Selección de iniciadores y determinación del grado de polimorfismo.

Las seis combinaciones de iniciadores propuestas inicialmente fueron evaluadas en cuatro variedades seleccionadas aleatoriamente (Oryzica Caribe 8, Oryzica Yacu-9, Coprosem 304 y Fedearroz 50). La selección de las bandas utilizadas para el análisis se realizó con base en los criterios de intensidad y resolución

Con las combinaciones de iniciadores (II) E-AGC, M-CAC y (III) E-AAC, M-CTA reportadas por Prashanth (2002) (tabla 4), se obtuvieron los mejores porcentajes de polimorfismo, intensidad, reproducibilidad y mejor resolución de bandas para 14 de las 18 variedades de estudio. Por esta razón los ensayos sobre reproducibilidad de la técnica y los análisis de agrupamiento respectivos, se realizaron para las 14 variedades que presentaron perfiles electroforéticos de buena calidad (Tabla 5). Las variedades Aceituno 25-26, Aceituno 25-28, Colombia XXI y Coprosem 306 presentaron muy pocas bandas debido posiblemente a una digestión incompleta, razón por la cual fueron excluidas de los análisis posteriores.

Tabla 4. Número total de bandas y nivel de polimorfismo obtenidos con diferentes combinaciones de iniciadores utilizadas por algunos autores en trabajos de genotipificación de accesiones de arroz.

Autor	Bandas totales	Polimorfismo (%)	Combinación
Prashanth <i>et al.</i> , 2002	-	75	E-AGG; M-CAC
	-	74	E-AGC; M-CAC
	-	65	E-AAC; M-CTA
Spada <i>et al.</i> , 2004	48	70,8	E-ACA; M-CCC
	38	68	E-ACA; M-CGA
	32	62,5	E-ACA; M-CTG

Saker <i>et al.</i> , 2005	67 - -	91 72 65	E- CAC; M-CAT E- AGT; M-CTC E- AGT; M-CAG
Aguirre <i>et al.</i> , 2005	55 40 43	10-30	E-AAC; M-GTA E-ACA; M-GAC E-AAC; M-GCG
Bligh <i>et al.</i> , 1999	-	15	-
Singh <i>et al.</i> , 1999	41	81	-

Tabla 5. 14 Variedades de arroz que mostraron perfiles electroforéticos AFLP de alta calidad.

	Variedad
1.	Oryzica caribe-8
2.	Oryzica Yacu -9
3.	Oryzica -1
4.	Progreso 4-25
5.	Inproarroz 1525
6.	Fedearroz 50
7.	Coprosem 1
8.	Irri 22
9.	Línea 2
10.	Aceituno 25-40
11.	Coprosem 2
12.	Selecta 3-20
13.	Coprosem 304
14.	Alejandra

Con la combinación (II) E-AGC, M-CAC se obtuvo en promedio, 44 bandas totales y 70% de polimorfismo; la combinación (III) E-AAC, M-CTA mostró 30 bandas totales y 100% de polimorfismo (Tabla 6). Estos resultados son consistentes con los reportados en la literatura (Tabla 4). Los perfiles electroforéticos obtenidos con dos ensayos de la combinación II y uno de la combinación III mostraron bandas con pesos moleculares que oscilan entre 40-400 pb (Figura 8; Tablas 7 y 8).

Tabla 6. Numero de bandas y porcentaje de polimorfismo obtenido con dos combinaciones de iniciadores II y III. Ensayo realizado por duplicado.

Combinación	Ensayo	Polimorfismo (%)	Total bandas
(II) E-AGC, M-CAC	1	78	46
(II) E-AGC, M-CAC	2	61	41
(III) E-AAC, M-CTA	2	100	30
Total	4	79 Prom.	143

Un estudio con RAMs, realizado por Acuña (2006) utilizando seis iniciadores permitió diferenciar variedades de arroz con un porcentaje promedio de polimorfismo de 75.5%, similar al encontrado en este trabajo con la combinación de iniciadores II (E-AGC, M-CAC).

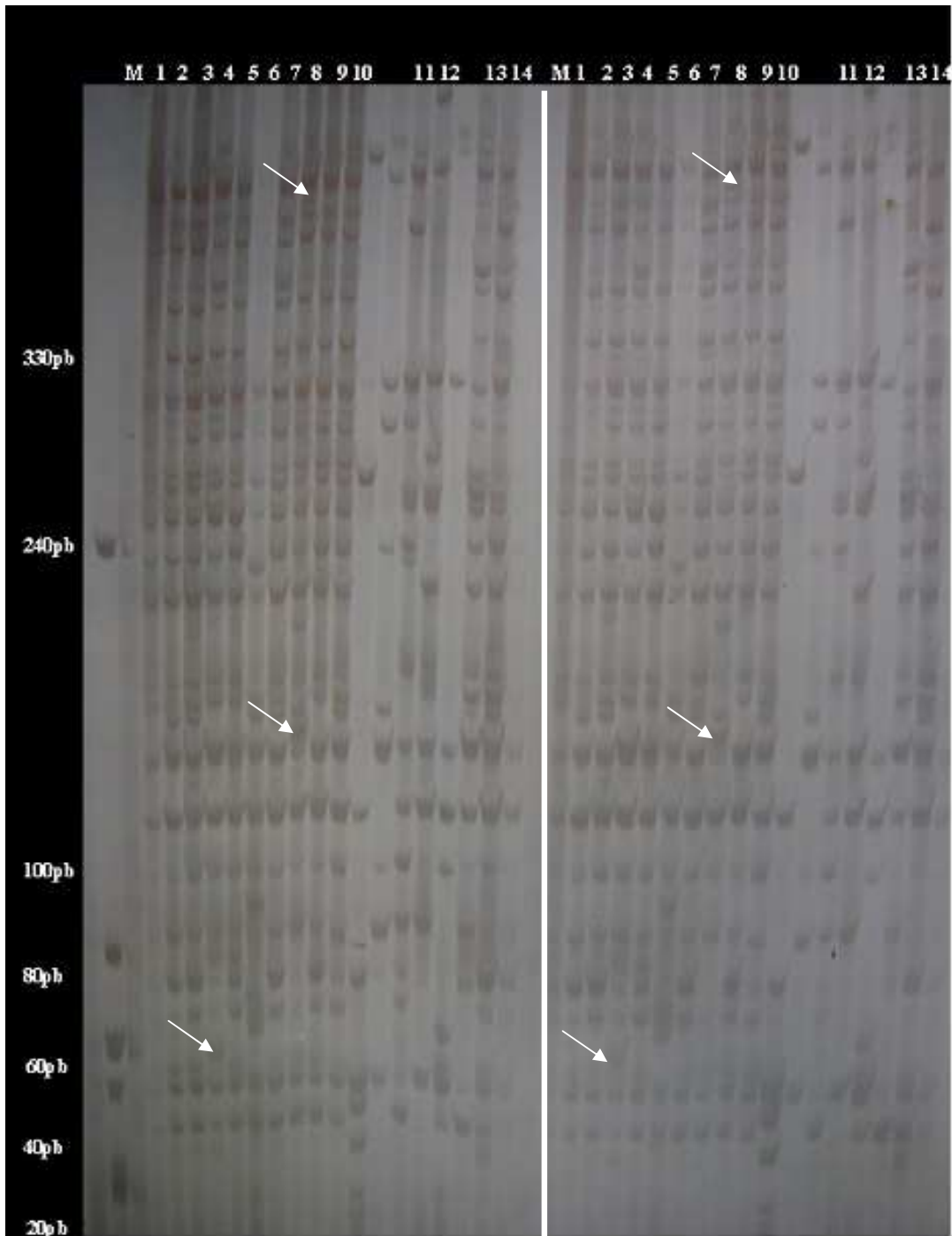


Figura 8. Huella genética obtenida por duplicado con la combinación de iniciadores AFLP II. (E- AGC; M-CAC) para 14 variedades de arroz. El experimento esta repetido y separado en dos secciones, cada sección representa iguales condiciones. Las variedades enumeradas presentaron perfiles electroforéticos de alta calidad: 1. Oryzica caribe-8, 2. Oryzica Yacu -9, 3. Oryzica -1, 4. Progreso 4-25, 5. Inproarroz 1525, 6. Fedearroz 50, 7. Coprosem 1, 8. Irri 22, 9. Línea 2, 10. Aceituno 25-40, 11. Coprosem 2, 12. Selecta 3-20, 13. Coprosem 304, 14. Alejandra. Bandas únicas señaladas.

Tabla 7. Perfil electroforético obtenido a partir de la combinación II.

Bandas	Peso Molecular (pb)	Variedades													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	370	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
2	360	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
3	350	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	0	0	0
4	338	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
5	335	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
6	333	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
7	330	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
8	310	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	1
9	280	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1
10	275	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	1	1	0	0
11	270	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	1
12	265	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	1	0	1
13	260	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
14	255	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0
15	250	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	1
16	245	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1
17	240	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
18	220	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1
19	210	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0
20	200	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1
21	198	1	0	1	0	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0
22	190	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	1	1	1
23	180	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1
24	160	0	1	1	0	0	1	1	1	0	1	0	0	1	1
25	140	0	0	0	0	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	0	0	0
26	130	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
27	120	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
28	110	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
29	100	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	0	0
30	90	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0
31	85	0	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1	1
32	80	1	1	1	0	1	0	1	0	1	1	1	1	1	1

33	75	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1
34	65	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
35	60	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1
36	57	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1
37	55	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	1
38	50	0	1	1	1	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1
39	45	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	1
40	40	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
41	35	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

Tabla 8. Perfil electroforético obtenido a partir de la combinación III.

Bandas	Peso molecular (pb)	Variedad													
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14
1	390	0	1	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1
2	380	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	1	0	0	0
3	370	0	0	0	0	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0
4	360	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
5	350	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
6	340	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
7	330	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
8	310	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0
9	290	0	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0	1	0
10	270	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0
11	250	1	1	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	1
12	230	0	<u>1</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
13	210	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	1	1
14	190	0	0	0	0	<u>1</u>	0	0	0	0	0	0	0	0	0
15	170	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	0
16	160	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0
17	150	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0
18	140	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	0	0
19	130	0	0	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	1
20	120	1	0	1	1	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1
21	110	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0
22	100	0	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	0	1
23	95	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	1	0	1	0
24	90	1	1	1	1	1	1	0	1	0	0	0	0	0	0
25	85	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	1	0	0
26	80	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
27	75	0	0	0	0	1	0	1	1	0	0	0	0	1	0
28	70	1	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
29	65	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
30	60	0	0	1	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0

Los resultados obtenidos empleando las dos combinaciones de iniciadores permitieron observar cinco bandas únicas. Este análisis de polimorfismo fue realizado en momentos diferentes y por duplicado confirmando la reproducibilidad de la técnica.

Determinación Diferencias y relaciones de parentesco

Con las huellas obtenidas del AFLP de las catorce variedades para las dos combinaciones de iniciadores que evidenciaron el mayor grado de polimorfismo (II y III) (Tabla 5) se realizó un análisis de agrupamiento empleando el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA.

El análisis de agrupamiento consenso (Figura 9) se realizó con base en el análisis de las dos matrices obtenidas con la combinación II y una con la combinación III. El dendograma presenta un grupo denominado 'A' con porcentajes de similaridad superiores al 83%. Dentro de éste grupo se aprecian tres subgrupos: el primero 'A1' está conformado por la variedad Oryzica Caribe-8, la más aislada, con un porcentaje de 84% de similaridad; el subgrupo 'A2', está conformado por Oryzica Yacu-9 y Progreso 4-25, con valores de similaridad de 86% y el subgrupo 'A3' compuesto por Oryzica 1, Aceituno 25-40, Coprosem 1 e Inproarroz 1525 con un porcentaje de 88%. En este subgrupo, Oryzica 1 y Aceituno 25-40 exhiben la mayor similaridad de todas las variedades de estudio, 92% y no presentan bandas únicas (Figura 8).

Próximo al grupo 'A' las variedades Línea 2, Fedearroz 50 e Irri 22 forman grupos independientes con valores de similaridad inferiores al 78%. Cabe recordar que la variedad Irri 22 se caracteriza por la presencia de dos bandas únicas. Las variedades Coprosem 2 y Selecta 3-20, con porcentajes de similaridad inferiores al 60% se diferencian en mayor grado y no se agrupan. Finalmente las variedades Coprosem 304 y Alejandra conforman el grupo 'B' con porcentajes de similaridad de 75%. Los patrones de agrupamiento observados en el dendograma consenso son coherentes

con los dendrogramas obtenidos para cada una de las combinaciones de iniciadores (Anexo 9).

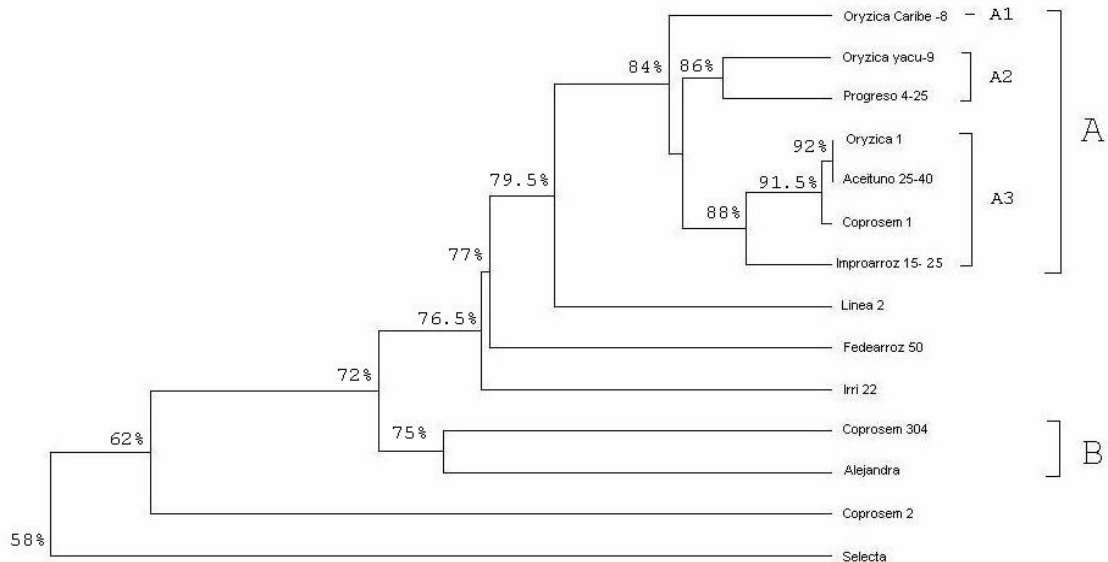


Figura 9. Dendrograma consenso obtenido a partir de dos ensayos de la combinación 2 y uno de la combinación 3 con el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA en 14 variedades de arroz.

Para la combinación II se observó un grupo cercanamente emparentado que contiene las variedades: Oryzica Caribe-8, Oryzica Yacu-9, Oryzica 1, Progreso 4-25, Inproarroz 1525, Coprosem 1, Línea 2 y Aceituno 25-40, asociados con un 84% de similitud. Sin embargo la variedad Progreso 4-25 es diferenciada por la presencia de una banda única con un tamaño aproximado de 65 pb. También puede observarse que este grupo contiene la variedad 14 (Alejandra) hecho que no se observa en el análisis de agrupamiento con la combinación III o en el análisis consenso. Las variedades Fedearroz 50, Irri 22, Coprosem 2, Selecta 3-20 y Coprosem 304 se encuentran en menor medida relacionadas y forman grupos independientes (Anexo 9). La variedad Irri 22 se encontró claramente diferenciada además por la presencia de dos bandas únicas con tamaños promedio de 350 y 140 pb.

El máximo porcentaje de similaridad se evidenció entre las variedades Oryzica 1 y Coprosem 1 con un 96%. Estas dos variedades no fueron diferenciadas por la presencia de bandas únicas.

Con la Combinación *III* se observó un grupo formado por las variedades Oryzica Caribe-8, Oryzica 1 y Progreso 25 que se relacionan con un porcentaje de similaridad de 87%. Dentro en este grupo, las variedades Oryzica Caribe-8, Oryzica 1 forman un subgrupo con una similitud máxima del 89%. El otro subgrupo está formado por las variedades Inproarroz 1525, Fedearroz 50, Coprosem 1, Irri 22 y Aceituno 25-40. En este subgrupo la variedad Inproarroz 1525 se diferenció por la presencia de una banda única con un tamaño aproximado de 190 pb (Figura 8). Estos subgrupos se relacionan con un 77% de similaridad conformando un grupo mayor que también se forma en el dendrograma producto del análisis con la combinación *II*. Las demás variedades se encuentran disímiles con valores inferiores o iguales a 58% con respecto a este grupo. Con la combinación *III*, la variedad Oryzica yacu 9 no esta incluida en un grupo definido contrario a lo que ocurre con la combinación *II* o el análisis consenso. Sin embargo presenta una banda única de 230 pb que permite diferenciarla claramente (Anexo 9).

7. DISCUSIÓN

La cantidad, calidad y pureza del ADN de catorce (14) variedades de arroz permitió su uso en las reacciones de AFLP. Con el ADN de las variedades, Aceituno 25-40; Coprosem 306, que no cumplían con los valores de pureza y Aceituno 25-26 y Colombia XXI que no cumplieron estándares de calidad no se obtuvieron perfiles de bandas claros, produciendo digestión incompleta debido posiblemente a una amplificación incipiente o la presencia de inhibidores de las enzimas de restricción.

Una de las posibles causas para una restricción incompleta es de la baja calidad y pureza del ADN extraído como consecuencia de la contaminación con almidón u otros metabolitos de las plantas que pueden transferirse en el momento de la maceración del material (Bligh *et al.*, 1999) o nucleasas que son inducidas en el proceso de senescencia de las hojas (Suzuki. 2001). Por otra parte, la ruptura del ADN puede ocurrir durante el molido de las hojas y la degradación por contaminación con agentes patógenos (hongos) antes de la extracción (Bligh *et al.*, 1999).

Estandarización AFLP

El factor más importante que determina la cantidad de fragmentos de restricción amplificados en una reacción AFLP, es el número de nucleótidos selectivos en los iniciadores. En el caso de las plantas que tienen genomas desde 5×10^8 hasta 6×10^9 pb, el número de fragmentos amplificados por muestra y combinación de iniciadores puede estar en un rango de 10 a 100 aproximadamente (Zabeau & Vos., 1993). Considerando que el genoma haploide del arroz es de aproximadamente 4.30×10^8 pb, el número de bandas promedio obtenidas con las combinaciones de iniciadores utilizadas en este trabajo fue adecuado.

Se ha reportado que la amplificación selectiva con dos o menos nucleótidos produce perfiles electroforéticos con mayor número de bandas posibilitando la obtención de un mayor grado de polimorfismo; sin embargo estos perfiles son difíciles de interpretar (Bligh *et al.*, 1999). Empleando la estrategia de amplificación en dos etapas (preamplificación con un nucleótido selectivo y amplificación con tres nucleótidos selectivos) se pudo obtener una huella genética limpia y reproducible con el beneficio de generar suficiente ADN molde para varias reacciones AFLP (Singh *et al.*, 1999). Este hecho es esencial cuando la cantidad de material genético extraído es limitante.

Determinación Nivel de Polimorfismo

Los perfiles electroforéticos obtenidos con las combinaciones II y III produjeron un número total de bandas promedio de 44 y 30 respectivamente y un nivel de polimorfismo de 70% y 80%. Estos resultados son consistentes con los reportados por autores como Prashanth, y colaboradores (2002) y Saker y colaboradores (2005) en trabajos con *O. sativa* (Tabla 4). Los perfiles electroforéticos de 14 variedades mostraron bandas claramente distinguibles con tamaños entre 40 y 400pb acorde con lo reportado por Singh y colaboradores (1999) y Blight y colaboradores (1999) (Tablas 7 y 8).

Otro aspecto de especial importancia que identifica o diferencia en mayor grado una variedad de forma excluyente es la presencia de bandas únicas. Representando el máximo nivel de polimorfismo estas bandas permiten el desarrollo de iniciadores específicos para cada variedad y su empleo en estudios de identificación. En este trabajo en las variedades Irri 22, Progreso 4-25, Oryzica yacu 9 e Inproarroz 1525 se observaron marcadores únicos que pueden ser útiles para el diseño de iniciadores específicos, especialmente para las variedades Irri 22 que presentó bandas únicas de 350 y 140 pb; la variedad Oryzica Yacu 9 una banda de 230 pb; e Inproarroz 1525 con una banda de 190 pb. En el caso de la variedad Progreso 4-25 el diseño del

iniciador específico se hace un poco más difícil por el pequeño tamaño del marcador únicos encontrado (65 pb).

Los valores de polimorfismo encontrados en este estudio son similares a los obtenidos por Acuña (2006) en su trabajo con marcadores RAMs. Sin embargo Acuña reporta 75% de polimorfismo con seis iniciadores, mientras que con los AFLP se consiguieron valores promedio de 79% empleando solamente dos combinaciones de iniciadores. Este hecho confirma la habilidad de la técnica AFLP para producir perfiles electroforéticos de alta calidad y resolución, generando un gran número de bandas polimórficas (Tabla 6; 7 y 8) que permiten la diferenciación de ejemplares cercanamente emparentados como las variedades Oryzica yacu 9 y Progreso 4-25 que cuentan con un 86% de similaridad, forman el subgrupo A2 (Figura 9) pero se diferencian claramente por la presencia de una banda única en cada caso.

Aunque la reproducibilidad de la técnica AFLP en arroz se encuentra ampliamente documentada (Bligh *et al.*, 1999; Singh *et al.*, 1999) es necesario confirmarla realizando múltiples extracciones a partir del mismo material vegetal o repetición del corrido electroforético como se hizo en este trabajo. Como el éxito en la reproducibilidad de la técnica se asegura debido al uso de iniciadores adaptador-específico seguido de una amplificación selectiva con un número variable de nucleótidos bajo condiciones rigurosas, no es necesario un esquema amplio de ensayos (Singh *et al.*, 1999).

Determinación Relaciones de parentesco

Concientes de las dificultades presentadas por las pruebas de distinguibilidad basadas en características morfológicas, especialmente en variedades cercanamente emparentadas se propuso como objetivo de este estudio explorar la utilidad de la técnica AFLP y su posible implementación como herramienta de soporte a las pruebas de diagnóstico morfológico (DHE) realizadas por el ICA. Ruiz (2002), afirma que para que las variedades puedan ser correctamente descritas con base en

rasgos morfológicos, se requiere que el estudio se lleve a cabo en más de una generación, lo que hace a los diagnósticos temporalmente ineficientes.

El uso de marcadores moleculares es reciente y limitado como herramienta de diferenciación de variedades pertenecientes al programa de Derecho de Obtentor de Variedades Vegetales en Colombia. Hasta el momento se ha realizado solo un estudio utilizando marcadores RAMs (también conocidos como ISSR) que permitió establecer diferencias claras entre las variedades Línea 2 y Colombia 21 entre otras (Acúna 2006).

En el dendograma consenso obtenido fue posible evidenciar diferencias en todos los materiales de estudio, sugiriendo que un número pequeño de combinaciones de iniciadores AFLP pueden ser empleados para distinguir variedades de arroz cercanamente emparentadas. Este hecho es evidente para las variedades Oryzica 1, Aceituno 25-40, Coprosen 1 e Inproarroz 1525 que formaron un grupo de similitud y donde la variedad Inproarroz 1525 es distinguible por la presencia de una banda única.

El análisis UPGMA con las dos combinaciones de iniciadores (Anexo 10). mostró niveles bajos de similaridad a excepción de las siete variedades que forman los subgrupos 1, 2 y 3 del grupo 'A' en el que se obtuvieron los porcentajes más altos (Figura 9). En términos generales, las variedades evaluadas en este estudio mostraron marcadores diferentes, posiblemente por ser derivadas de diversos cruces. Resultados similares han sido reportados por Chauhan & Chauhan (1994) quienes afirman que co-variedades de arroz no necesariamente se agrupan con porcentajes altos de similaridad y es posible que dichas variedades hayan sido producidas para diferentes rasgos después de un proceso de selección continua. El agrupamiento de algunas co-variedades con valores de similaridad diferente también se puede explicar por el

hecho de haber sido seleccionadas a partir de líneas puras diferentes (Sigh, *et al.*, 1998).

Aguirre y colaboradores (2005) evaluaron la diversidad genética de 12 cultivares y líneas de arroz desarrollados por el Programa de Mejoramiento de Arroz en Chile con 21 combinaciones AFLP. En dicho estudio, a pesar de encontrarse baja diversidad genética entre los materiales, fue posible discriminar los cultivares con tres de las combinaciones AFLP utilizadas. De otra parte Bligh y colaboradores (1999) emplearon seis combinaciones de iniciadores de las cuales sólo dos pudieron distinguir todas las variedades; Prashanth y colaboradores (2002) por su parte, emplearon nueve combinaciones de iniciadores y con todas ellas pudieron distinguir las variedades de estudio. En este trabajo las dos combinaciones con las que se obtuvo mayor calidad y nivel de polimorfismo (II y III) y que han sido reportadas por Prashanth, fueron de gran importancia para realizar un acercamiento y ampliar el panorama dentro de las relaciones taxonómicas de las variedades y reconfirmaron la capacidad de los AFLP para diferenciar genotipos en arroz, lo que permitiría su implementación en los programas de protección de obtenciones vegetales.

Aunque el número de bandas únicas encontradas con la técnica RAM (Acuña 2006) fue superior (quince) es importante mencionar que estas se obtuvieron a partir de seis iniciadores, mientras que con AFLP cinco bandas únicas fueron obtenidas a partir de solo dos combinaciones de iniciadores. Las dos técnicas moleculares son de naturaleza dominante, sin embargo la cobertura de genoma en la técnica AFLP es mayor y por lo tanto más información es tomada para los análisis de agrupamiento. Esto se puede evidenciar ya que el rango de bandas totales obtenidas con los RAMs es de 10-20 aproximadamente, mientras que en AFLP fue de 30-46. Otra ventaja importante de los AFLP sobre los RAMs es que una sola reacción es suficiente para lograr gran parte de la cobertura genómica e identificar polimorfismos en varios loci. (Bligh *et al.* 1999).

Utilizando la información de la matriz consenso de los AFLP y la obtenida por Acuña en 2006 en el estudio de marcadores moleculares RAMS, se realizó un análisis de agrupamiento de 11 variedades que fueron comunes en los estudios con AFLP y RAMs (Tabla 9). En general se observó alta consistencia en los porcentajes de similaridad (Anexo 11 y 12). Aproximadamente el 80% de las variedades muestra valores de similaridad que no difieren en más del 10%.

Tabla 9. Variedades evaluadas tanto en los estudio AFLP como RAMs

1	Oryzica caribe-8
2	Yacu -9
3	Oryzica -1
4	Progreso 4-25
5	Inproarr 1525
6	Fedearroz 50
7	Coprosem 1
8	Irri 22
9	Línea 2
10	Coprosem 2
11	Selecta 3-20

Una característica importante es la variabilidad encontrada en el presente trabajo entre variedades de arroz (*O. sativa*). El reducido grupo de parentales base que son usados para una gran cantidad de características como la resistencia a enfermedades y producción ha generado pérdida de variabilidad; algunas como Oryzica 1 e IRRI 22 fueron empleadas como progenitores para fitomejoramiento en gran medida (Acuña, 2006). Sin embargo el empleo de la técnica AFLP con las dos combinaciones permitió generar diferencias entre las variedades y evidenciar su amplia base genética mostrando porcentajes de similaridad entre un mínimo de 58 y un máximo de 92%.

La información derivada de este trabajo debe ser analizada y confrontada con los datos obtenidos mediante las técnicas convencionales empleadas hasta el momento por el ICA (diagnostico morfológico) y las otras técnicas moleculares recientemente implementadas (RAMs) para las variedades estudiadas y así dilucidar con mayor grado de cobertura y seguridad las relaciones genéticas y diferencias existentes.

8. CONCLUSIONES

Se logro estandarizar la técnica de AFLP para 14 variedades de arroz *Oryza sativa* con las combinaciones de iniciadores E-AGC; M-CAC y E-AAC; M-CTA. Bajo las condiciones de ensayo se logró obtener un buen número de bandas con resolución e intensidad adecuadas que permitieron diferenciar genotípicamente las variedades de estudio.

Con la combinación E-AGC; M-CAC se obtuvo un total de 44 bandas y un porcentaje de polimorfismo del 70% mientras que con la combinación E-AAC; M-CTA se obtuvieron 33 bandas y un porcentaje de polimorfismo de 100%. El patrón de bandas generado con cada una de las combinaciones de iniciadores evaluadas por duplicado en cada una de las muestra de ADN, fue reproducible bajo las condiciones de electroforesis establecidas.

El análisis UPGMA permitió agrupar las variedades en dos grupos de similaridad (A y B); sin embargo se obtuvo un patrón de bandas característico para cada una de las 14 variedades. Este hecho es evidente para las variedades Oryzica 1, Aceituno 25-40, Coprosem 1 e Inproarroz 1525 que aunque forman un grupo de similaridad presentan polimorfismo e inclusive marcadores únicos como en el caso de la variedad Inproarroz 1525.

El análisis AFLP permitió diferenciar las variedades Irri 22, Progreso 4-25, Inproarroz 1525 y Oryzica yacu-9 por la presencia de una o dos bandas únicas que pueden ser útiles para el diseño de iniciadores específicos que pudieran permitir su identificación.

En este trabajo queda demostrada la utilidad de los marcadores AFLP como una posible herramienta de apoyo a las pruebas tradicionales de Distinción, Estabilidad y Homogeneidad (DHE) que permite el acceso a la Protección a los Derechos de Obtentor de Variedades Vegetales.

9. RECOMENDACIONES

Realizar comparaciones entre los descriptores morfológicos y los marcadores moleculares desarrollados en este trabajo con el fin de establecer su consistencia en las variedades estudiadas.

Evaluar la reproducibilidad de la técnica AFLP a partir de extracciones de ADN de diferentes muestras de la misma variedad.

Realizar un análisis de diversidad genética de las variedades de arroz utilizando los genotipos parentales con el fin de establecer la relación de los marcadores presentes.

Aumentar el número de combinaciones de iniciadores para permitan una mayor cobertura y encontrar posibles perfiles de bandeo únicos y discriminantes entre variedades, así como incluir las cuatro variedades que mostraron perfiles electroforéticos incompletos y no pudieron ser incluidas en los análisis de polimorfismo y parentesco.

Evaluar las variedades de arroz con marcadores SSLP (*Single Sequence Length Polymorphism*), reportados como una técnica altamente confiable, reproducible, rápida y de bajo costo.

10. REFERENCIAS

- Acuña, Y. 2006. Caracterización Molecular de 14 variedades de arroz (*Oryza sativa*) Pertenecientes al programa de Protección a los Derechos de Obtentor de Variedades Vegetales del Instituto Colombiano Agropecuario-ICA. Ingeniería en Producción Biotecnológica. Universidad Francisco de Paula Santander. Facultad de Ciencias Agrarias y del Ambiente. Plan de Estudios de Ingeniería de Producción Biotecnológica. San José de Cúcuta. 94 pp.
- Aggarwal, R; Brar, D; Nandi, S; Huang, S & Khush, G. 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.
- Aguirre, C; Alvarado, R & Hinrichsen, P. 2005. Identificación de Cultivares y Líneas de Mejoramiento de Arroz de Chile Mediante Amplificación de Fragmentos Polimórficos (AFLP). *Agricultura. Técnica.*, vol.65, no. 4, 356-369.
- Aliaga, J; Culianez, F; Clemente, G & Primo, E. 1987. Differentiation of rice varieties by electrophoresis of embryo protein. *Theor. Appl. Genet*, 74: 224-232.
- ICA. 1996. Instituto Colombiano Agropecuario, ICA. 1996. Legislación Sobre Protección a los Derechos de Obtentores de Variedades Vegetales. Segunda edición. Produmedios. Bogotá. Colombia. 63 pp.
- UPOV. 2002. Unión Internacional Para la Protección de las Obtenciones Vegetales, Ginebra. Los derechos del obtentor según el Convenio de la UPOV. [Consulta 28 jun. 2007]
- Arenal, F; Platas, G; Martín, J; Salazar, O & Pelaéz, F. 1999. Evaluation of different PCR-based DNA fingerprinting techniques for assessing the genetic variability of isolates of the fungus *Epicoccum nigrum*. *Journal of Applied Microbiology* 1999, 87, 898–906.

- Ayele, M & Nguyen, H. 2000. Evaluation of amplified fragment length polymorphism markers in tef, *Eragrostis tef* (Zucc.) Trotter, and related species. *Plant Breeding*, 119: 403-409.
- Bennet, M; Leitch, I; Hanson, L. 1998. DNA amounts in two samples of weeds. *Annals of Botany* 82: 121-134.
- Bikandi, J; San Millan, R & colaboradores. Insilico simulation of molecular biology experiments. University of Basque County. Última actualización: Julio 29 de 2008. <http://insilico.ehu.es/AFLP/info.html>
- Blears, M; De Grandis, S; Lee, H & Trevors, J. 1998. Amplified fragment length polymorphisms (AFLP): a review of the procedure and its applications. *Journal of industrial Microbiology and Biotechnology* 21. 99-114.
- Bligh, H; Blackhall, N; Edwards, K; & McClung, A. 1999. Using Amplified Fragment Length Polymorphisms and Simple Sequence Length Polymorphisms to Identify Cultivars of Brown and White Milled Rice. *Crop Sci.* No. 39:1715-1721.
- Brondani, C; Pereira, R; Brondani, V; Nakano, P & Ferreira, M. 2001. Development and mapping of *Oryza glumaepatula*-derived microsatellite markers in the interspecific cross *Oryza glumaepatula* x *O. sativa*. *Hereditas* 134: 59-71.
- Brondani, C; Hideo, P; Rangel, N; Cristina, T; Borba, O & Pereira, R. 2003. Transferability of microsatellite and sequence tagged site markers in *Oryza* species. *Rice Molecular Genetics and Breeding Laboratory, Hereditas* 138: 187–192.
- Byrne, P; Ward, S; Harrington, J & Fuller, L. 2004. Department of Soil and Crop Sciences at Colorado State University, 1999-2006. Cultivos transgenicos: Introducción y guía a recursos. *Historia de Mejoramiento de Plantas*. http://cls.casa.colostate.edu/CultivosTransgenicos/sp_history.html. [Consulta 3 jul. 2007].
- Carrera, A; Tranquilli, G; y Helguera, M. 2004. *Biología y Mejoramiento Vegetal. Parte IV: Métodos para acelerar programas de mejoramiento e identificación varietal. Capítulo 2: Aplicaciones de los marcadores moleculares.*

Ediciones INTA Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología. Argentina.

- Delseny, M; Salsesa, J; Cookea, R; Sallaudb, C; Regadb, F; Lagodab, P; Guiderdonib, E; Ventelonc, M; Brugidouc, C; Ghesquièrec, A. 2001. Rice genomics: Present and future *Plant Physiol. Biochem.* 39: 323-334.
- Dong, N; Subudhi, P; Luong, P; Quang, V; Quy, T & Zheng, H. 2000. Molecular mapping of a rice gene conditioning thermosensitive genic male sterility using AFLP, RFLP and SSR techniques. *Theor. Appl. Genet.* 100: 727-734.
- Fay, M; Cowan, R & Leitch, I. 2005. The Effects of Nuclear DNA Content (C-value) on the Quality and Utility of AFLP Fingerprints. *Annals of Botany* 95: 237–246.
- González, E; Vásquez, J; Ruiz, P; Corredor, E; Fory, L; Mora, A; Silva, J; Duque, M. y Lentini, Z. 2001 Caracterización Molecular de Arroz Rojo Colectado en Huila y Tolima. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT)
- Flores, E; González, A; Gaviño, A; Romano, P; Capece, A & Gschaedler, A. 2005. The uses of AFLP for detecting DNA polymorphism, genotype identification and genetic diversity between yeasts isolated from Mexican agave-distilled beverages and from grape musts. *Letters in Applied Microbiology*, 41: 147-152.
- Gao, L. 2004. Population structure and conservation genetics of wild rice *Oriza rufipogon* (Poaceae): a region-wide perspective from microsatellite variation. *Molecular Ecology*, 13: 1009-1024
- Gao, L. 2005. Microsatellite variation within and among populations of *Oryza officinalis* (Poaceae), an endangered wild rice from China. *Molecular Ecology*, 14: 4287-4297.
- Glaszmann, J. 1987. Isozymes and classification of Asian rice varieties. *Theor. Appl. Genet.* 74:21-30.
- Haig, S; Mace, T & Mullins, T. 2003. Parentage and Relatedness in Polyandrous Comb-Crested Jacanas Using ISSRs. The American Genetic Association. *Journal of Heredity*: 94 No 4. 302-309.

- Hill, H; Witsenboer, H; Zabeau, M; Vos, P; Kesseli, R & Michelmore, R. 1996. PCR based fingerprinting using AFLPs as a tool for studying genetic relationships in lactuca spp. *Theor Appl Genet*, 93: 1202-1210.
- Hussain, A; Scanlon, M; Juliano, B & Bushuk, W. 1989. Discrimination of rice cultivars by polyacrylamide gel electrophoresis and High-Performance Liquid Chromatography. *Cereal Chem*, 66: 353-356.
- Joseph, M; Gopalakrishnan, R; Sharma, V; Singh, A; Singh, N & Mohapatra, T. 2004. Combining bacterial blight resistance and Basmati quality characteristics by phenotypic and molecular marker-assisted selection in rice. *Molecular Breeding* Vol. 13:377-387.
- Krauss, S. 1999. Complete exclusion of nonsires in an analysis of paternity in a natural plant population using amplified fragment length polymorphism (AFLP). *Molecular Ecology* 8, 217-226.
- Kumar, P & Huang, N. 1999. RAPD mapping in a doubled haploid population of rice (*Oryza sativa* L.). *Hereditas*, 130: 41-49.
- Li, S; Yang, D & Zhu, Y. 2007. Characterization and Use of Male Sterility in Hybrid Rice Breeding. *Journal of Integrative Plant Biology* 49 (6): 791-804
- Mackill, D; Zhang, Z; Redona, E & Colowit, P. 1996. Level of polymorphism and genetic mapping of AFLP markers in rice. *Genome*, 39: 969-977.
- Mao, C; YI, K; Yang, L; Zheng, B; Wu, Y; Liu, F & Wu, P. 2004. Identification of aluminium-regulated genes by cDNA-AFLP in rice (*Oryza sativa* L.): aluminium-regulated genes for the metabolism of cell wall components. *Journal of experimental Botany*, Vol. 55, No. 394, pp. 137-143.
- Medina, M. 2005. *Morfología de la planta de arroz*: Centro Internacional de Agricultura Tropical. Cali: CIAT. 16 pp.
- McCouch, S; Kochert, G; Yu; Z; Wang, G. Khush, S; Coffman, R & Tanksley, S. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor Appl Genet* 76: 815–829.
- Ni, J; Colowit, P & Mackill, D. 2002. Evaluation of Genetic Diversity in Rice Subspecies Using Microsatellite Markers. *Crop Sci*. No 42: 601-607.

- Nybom, H & Bartish, I. 2000. Effects of life history traits and sampling strategies on genetic diversity estimates obtained with RAPD markers in plants. *Perspectives in Plant Ecology, Evolution and Systematics*, 3/2, 93-114.
- Nybom, H. 2004. Comparison of different nuclear DNA markers for estimating intraspecific genetic diversity in plants. *Molecular Ecology* 13, 1143-1155.
- Paul, S; Wachira, F; Powell, W; Waugh, R. 1997. Diversity and genetic differentiation among populations of Indian and Kenyan tea (*Camellia sinensis* (L.) O. kuntze) revealed by AFLP markers. *Theor Appl Genet*, 94: 255-263
- Powel, W; Morgante, M; Andre, C; Hanafey, M; Vogel, J; Tingey, S & Rafalski, A. 1996. The comparison of RFLP, RAPD, AFLP y SSR (microsatellite) markers for germoplasma analysis. *Mol Breeding*, 2: 225-238.
- Prashanth, S; Parani, M; Mohanty, B; Talame, V; Tuberosa, R & Parida, A. 2002. Genetic diversity in cultivars and landraces of *Oryza sativa* subsp. indica as revealed by AFLP markers. *Genome*; 45: 451-459
- Qi, X & Lindhout, P. 1997. Development of AFLP markers in barley. *Mol Gen Genet* 254: 330-336.
- Ruiz, P. 2002. Caracterización fenotípica y genética del arroz rojo (*Oryza Sativa* F. spontanea L.) de Saldaña (Departamento Tolima) y Huila. *Biología*. Pontificia Universidad Javeriana. Facultad de Ciencias Básicas. Bogotá. 125 pp.
- Saker, M; Youssef, S. Abdallah, N; Bashandy, H &. Sharkawy, A. 2005. Genetic analysis of some Egyptian rice genotypes using RAPD, SSR and AFLP *African Journal of Biotechnology* Vol. 4 (9), pp. 882-890.
- Sasaki, T. & Burr, B. 2000 International Rice Genome Sequencing Project: the effort to completely sequence the rice genome. *Rice Genome Research Program*. No. 3: 138-141. Biology Department, Bookhaven National Laboratory. Upton. New Cork.
- Second, G. 1982. Origin of the genetic diversity of cultivated rice (*Oryza pp.*): study of the polymorphism scored at 40 isozyme loci. *Jpn. J. Genet*, 57: 25-57.

- Sensi, E; Vignani, R; Rohde, W & Biricolti, S. 1996. Characterization of genetic diversity with *Vitis vinifera* L. Sangiovese and Colorino genotypes by AFLP and ISTR DNA marker technology. *Vitis* 35: 183-188.
- Sharma, S; Knox, M; & Ellis, T. 1996. AFLP analysis of the diversity and phylogeny of Lens and its comparison with RAPD analysis. *Theor Appl Genet* 93: 751-758.
- Simioniuc, D; Uptmoor, R; Friedt, W & Ordon, F. 2002. Genetic diversity and relationships among pea cultivars revealed by RAPDs and AFLPs. *Plant Breeding* 121, 429-435.
- Singh, S; Sidhu, J; Uberoi, K; Sodhi, M; Vikal, Y & Dhaliwal, H. 1998. *Oryza* using amplified fragment length polymorphism. *Crop Improv*, 25: 15-20.
- Singh, K; Nandi, R; Shanmugasundram, P; Sadasivam, S; Huang, N; Brar, D & Khush, G. 1999. High-resolution DNA fingerprinting of Indian rice (*Oryza sativa* L.) varieties by amplified fragment length polymorphism. *Genetic Resources and Crop Evolution*. No. 46: 427-433.
- Spada, A; Mantegazza, R; Biloni, M; Caporali, E & Sala, F. 2004. Italian rice varieties: historical data, molecular markers and pedigrees to reveal their genetic relationships. *Plant Breeding*, 123: 105-111.
- Staub, J; & Meglic, V. 1993. Molecular genetic markers and their legal relevance for cultivar discrimination: A case study in cucumber. *HortTechnology* 3:291-300.
- Stein, L; McCouch, S; Buckler, E; Ware, D; Jaiswal, P. Gramene. 2008. A Resource for Comparative Grass Genomics. *Oryza Taxonomy*. http://www.gramene.org/species/oryza/rice_taxonomy.html [Consulta 8 jul. 2008]. Última modificación mayo 22 de 2008.
- Suzuki, Y; Makino, A & Mae Tadahiko. 2001. An efficient method for extraction of RNA from rice leaves at different ages using benzyl chloride. *Journal of experimental Botany*, Vol 52 No. 360. 1575-1579.
- Talhinhos, P; Neves, J & Leita, J. 2003. AFLP, ISSR and RAPD markers reveal high levels of genetic diversity among *Lupinus* spp. *Plant Breeding* 122, 507-510.

- Travis, S; Maschinski, J & Keim, P. 1996. An analysis of genetic variation in *Astragalus cremnophylax* var *cremnophylax*, a critically endangered plant, using AFLP markers. *Mol. Ecol*, 5: 735-745.
- Turcotte, K; Srinivasan, S & Bureau, T. 2001. Survey of transposable elements from rice genomic sequences. *The Plant Journal*. No 25 (2), 169-179.
- Vekemans, X; Beauwens, T; Lemaire, M & Ruiz, R. 2002. Data from amplified fragment length polymorphism (AFLP) markers show indication of size homoplasy and of a relationship between degree of homoplasy and fragment size. *Molecular Ecology*, 11: 139–15.
- Virk, P; Zhu, P; Newbury, H; Bryan, G; Jackson, M & Ford, B. 2000. Effectiveness of different classes of molecular marker for classifying and revealing variation in rice (*Oryza sativa*) germplasm. *Euphytica*, 112: 275-284.
- Vos, P; Hogers, R; Bleeker, M; Reijans, M; Van de Lee, T; Hornes, M; Frijters, A; Pot, J; Peleman, J; Kuiper, M & Zabeau, M. 1995. AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acid research*. Vol. 23. No. 21. 4407-4414.
- Williams, J; Kubenik, A; Livak, K; Rafalski, J; Tingey, S. 1990. DNA Polymorphisms Amplified by Arbitrary Primers are Useful as Genetic Markers. *Nucleic Acids Res*. No. 18: 6531-6535.
- Xie¹, Y; McNally, K; Li¹, C; Leung, H & Zhu¹, Y. 2006. A High-throughput Genomic Tool: Diversity Array Technology Complementary for Rice Genotyping. *Journal of Integrative Plant Biology*, 48 (9): 1069-1076.
- Xueliang, R; Zhu, X; Warndorff, M; Bucheli, P & Shu, Q. 2006. DNA extraction and fingerprinting of commercial rice cereal products. *Food Research International* 39 433-439.
- Zabeau, M. & Vos, P. 1993 European Patent Application, publication number EP 0534858.
- Zhu, J; Gale, M; Quarrie, S; Jackson, M & Bryan, G. 1998. AFLP markers for the study of rice biodiversity. *Theor. Appl. Genet.* 96: 602-611.

11. ANEXOS

1. Características morfológicas algunas variedades de estudio.

Carácter	Oryzica caribe 8	Oryzica yacu-9	Oryzica-1	Progreso 4-25	Inproarroz 15-25	Fedearroz 50	Coprosem 1
Macollamiento por planta	17.4	14-36	Intermedio	19	10.5	22.18	Bueno
Hojas	Pubescente verde	Verde	Verde oscuro	Glabras	Verde	Verde	Verde oscuro
Volcamiento %	0	19.33	Resistente	1.56	17.5	0	0
Vaneamiento %	3.8	12.25	oct-22	3.19	3.31	12.04	05-oct
Periodo vegetativo (días)	126	116-130	105-130	110-114	114	116-134	116
Contenido de Amilosa	31.9	30.5	29	24.1	27.2	30 alta	30.9

Carácter	Irri-22	Línea 2	Coprosem 2	Selecta 3-20	Colombia XXI
Macollamiento por planta	Medio	Intermedio	Intermedio	Intermedio	10
Hojas	Verde oscuro	Pubescente verde oscuro	Verde oscuro	Verde oscuro	Verde
Volcamiento %	Resistente	11.7	0	7.8	5.7
Vaneamiento %	Leve	5.83	05-oct	4.9	3.1
Periodo vegetativo (días)	115-135	118-125	115	125	106
Contenido de Amilosa	29	30.1	29	28.2	31.6

2. Protocolo extracción ADN McCouch y colaboradores. (1988) con modificaciones.

- Colectar de 0.2 g de tejido foliar joven en nitrógeno líquido.
- Macerar el tejido con nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino.
- agregar un ml de buffer precalentado a 65 °C
- Mezclar bien agitando el tubo vigorosamente
- Incubar a 65 °C durante 45 minutos, agitando cada 5 minutos.
- Agregar 0.4 ml de acetato de potasio 5 M.
- Mezclar vigorosamente.
- Incubar en baño de hielo durante 30 minutos, con agitación.
- Centrifugar a 4000 rpm durante 10 minutos.
- Pasar el sobrenadante a un tubo nuevo y centrifugar a 6000 rpm por 4 minutos a 4°C
- Repetir desde el paso 5 hasta el paso 9 si esta muy oscuro el liquido.
- Añadir uno de volumen de isopropanol a -20 °C y 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M, pH 5.2.
- Incubar a -80 °C por 15 minutos o a -20 °C por 40 minutos.
- Centrifugar a 12000 rpm, durante 5 minutos a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante.
- Lavar el precipitado de ADN con 400 µl de etanol al 70% a -20 °C.
- Centrifugar a 12000 rpm durante 3 minutos a 4 °C.
- Descartar el sobrenadante y secar bien.
- Resuspender en 100 µl de TE.
- Adicionar un µl de RNAsa.
- Incubar por 30 minutos a 37 °C.

- Almacenar a -20 °C.

Buffer de lisis

Tris HCL pH: 8.0 100mM

EDTA pH: 8.0 50 mM

NaCL 500mM

SDS 1.25 %

Bisulfato de sodio 3.8 g/L

Aforar a 1000 ml

3. Protocolo para la preparación de la prueba de calidad en gel de Agarosa

El corrido electroforético de ADN total se realiza en gel de agarosa al 0.8 % (p/v), con 1.3 µl de bromuro de etidio para 25 ml preparación agarosa.

Preparación de reactivos

TBE 10 X (pH 8.0):

Tris base 108 g/L

EDTA 9.3 g/L

Acido bórico 55 g/L

Buffer de Carga:

Xilencianol 0.20 %

Azul de bromofenol 0.25 %

Glicerol 50 %

Bromuro de etidio

10 mg/ml

Montaje de los productos

Se sirven 10 µl de la muestra con 2 µl de buffer de carga sobre papel parafilm o una placa de ELISA, se mezclan bien y luego se depositan en los pozos.

Corrido electroforético

Una vez servidas las muestras, el gel se corre a 60 voltios durante 45 minutos para el corrido de ADN.

4. Prueba de digestión

Componente	Conc. I	Conc. F	Volumen
Buffer de reacción	10X	5X	7.5 µl
Muestra ADN	250ng	250 ng	5.0 µl
EcoR I	40U	1.5U	0.56 µl
Agua destilada	--	--	1.94 µl
Volumen total	--	--	15 µl

- Mezclar suavemente y se colecta la reacción por centrifugación breve.
- Incubar la mezcla dos horas a 37 °C

5. Kit: AFLP® Analysis System I; AFLP® Starter Primer Kit

Componentes

El material se provee para realizar más de 1600 reacciones AFLP finales.

A. Digestión ADN Genómico

1. Añadir lo siguiente a un tubo de 1.5 ml

Componente	control	Muestra
5X buffer de reacción	5 µl	5 µl
Control ADN de tomate (100 ng/µl)	2.5 µl	—
Muestra ADN (250 ng en <18 µl)	—	18 µl
EcoR I/ MseI	2 µl	2 µl
Agua destilada	15.5 µl	a 25 µl
Volumen total	5 µl	25 µl

2. Se mezcla suavemente y se colecta la reacción por centrifugación breve. Incubación de la mezcla dos horas a 37 °C

3. Incubar la mezcla por quince minutos a 70 °C para inactivar las endonucleasas de restricción. Poner el tubo en hielo y colectar contenidos por centrifugación breve.

B. Ligación de Adaptadores

1. Añadir al ADN digerido

Componente	volumen
Solución ligación de adaptadores	24 µl
Ligasa ADN T4	1 µl

2. Mezclar suavemente a temperatura ambiente, para colectar contenidos centrifugar, incubar a 20°C ± 2 °C por dos horas.

3. Diluir 1:10 de la mezcla de ligación como sigue:

a. Tomar 10 µl de la mezcla de reacción y transferirla a un tubo de microcentrifuga de 1.5-ml.

b. Añadir 90 µl de buffer TE y mezclar bien.

4. La porción no usada de la mezcla de reacción debe ser almacenada a -20°C.

C. Preamplificación

1. Añadir a un tubo de 0.2- o 0.5-ml

Componente	volumen
ADN molde diluido	5 µl
Mezcla iniciadores	40 µl
Buffer PCR 10X + Mg	5 µl
Taq polimerasa ADN (5 unidades/µl)	1 µl
Volumen total	51 µl

2. Mezclar suavemente y centrifugar para colectar.

Realizar 20 ciclos a:

94°C for 30 s

56°C for 60 s

72°C for 60 s

3. Realizar una dilución de 1:50. 3 µl en 147 µl Suficiente para 30 amplificaciones AFLP selectivas.

Las reacciones diluidas y sin diluir pueden ser almacenadas a -20°C.

D. Amplificación AFLP Selectiva

1. Para cada pareja de iniciadores, añadir a un tubo de 1.5-ml. (Mezcla 1)

componente	volumen
Primer EcoR I	5 µl
Primer MseI	45 µl
Volumen total (suficiente para 10 reacciones)	50 µl

2. Añadir a un tubo de 1.5-ml. (Mezcla 2)

componente	volumen
Agua destilada	79 µl
Buffer PCR 10X + Mg	20 µl

Taq Polimerasa ADN (5 unidades/ μ l) 1 μ l
 Volumen total (suficiente para 10 reacciones) 100 μ l

3. En un tubo de 0.2- o 0.5-ml.

componente	volumen
AND molde diluido	5 μ l
control preamplificado (ADN de tomate, sin diluir)	
Mezcla 1 (iniciadores)	5 μ l
Mezcla 2 (Taq DNA polimerasa/buffer)	10 μ l
Volumen total	20 μ l

4. Mezclar suavemente y centrifugar para recolectar.

Programa termociclador.

- A. Realizar 1 ciclo a 94°C por 30 s; 65°C por 30 s; y 72°C por 60 s.
 - B. Disminuir la temperatura de anillamiento cada ciclo 0.7°C durante 12 ciclos.
 - C. 23 ciclos a:
 - 94°C por 30 s;
 - 56°C por 30 s; y
 - 72°C por 60 s.
- Tiempo total: 2 h, 2 min.

Protocolo de Invitrogen. life technologies. Instruction manual. Catalog nos. 10544-013 and 10483-014.

6. Programa termociclador Techne, tipo Perkin-Elmer 480.

File	°C	Time (s)	°C	Time	°C	Time	No. cycles	Link to	Type
1	94	60	65	60	72	90	1	2	Step
2	94	60	64	60	72	90	1	3	Step
3	94	60	63	60	72	90	1	4	Step
4	94	60	62	60	72	90	1	5	Step
5	94	60	61	60	72	90	1	6	Step
6	94	60	60	60	72	90	1	7	Step
7	94	60	59	60	72	90	1	8	Step
8	94	60	58	60	72	90	1	9	Step
9	94	60	57	60	72	90	1	10	Step
10	94	60	56	60	72	90	1	11	Step
11	94	30	56	30	72	60	23		Step

7. Preparación cámara de electroforesis en geles de acrilamida:

Preparación vidrio

Limpieza de vidrio con etanol al 95% y paños Kimwipes

Preparación solución pegante

Etanol	95%	47.7 ml
Acido acético	0.5%	250 μ l

Preparación pegante

Solución pegante	1000 μ l
Pegante (Bind silene)	1 μ l

Dependiendo de las condiciones si se presenta pegamiento del gel

Preparación cámara

Del mismo modo que con el vidrio, la cámara debe ser limpiada con paños y etanol al 95%. Posteriormente, se aplica *Lluviex* o soluciones a base de siliconas como los antiempañantes o soluciones para limpiar cueros como el *Lluviex* (productos que se consiguen en almacenes de cadena).

Es recomendable, luego de usar la cámara, poner antiempañantes antes de guardarla con el fin de prevenir que los geles se peguen por contaminación con el pegante y así se mantenga aislada de los mismos en posteriores montajes. Además es importante considerar el empleo de elementos de limpieza independientes para el vidrio y la cámara para prevenir la contaminación del vidrio a la cámara.

Preparación acrilamida (6%)

Acrilamida; bis-acrilamida en proporción 29: 1 respectivamente.

Acrilamida	57.99 g
Bis- acrilamida	2.01 g
Trisma base	5.4 g
Ácido Bórico	2.74 g
EDTA 0.5M pH 8.0	2 ml
Urea (7M)	420.42 g

Preparación buffer de carga denaturante

Formamida	90 ml
TBE 5X	10 ml
Azul de bromofenol	0.05 g
Xilene cyanol	0.05 g

8. Protocolo de tinción de plata

Posterior al proceso de electroforesis, el vidrio fue separado de la cámara y se efectuó la tinción aplicando el siguiente protocolo:

1. *Solución de fijación*: 20 min. como mínimo (siete usos)

Ácido acético glacial	350 ml
Agua bidestilada (d.d.)	3150 ml

Dos lavados de agua d.d. de 3 min. cada uno.*

2. *Solución de tinción*: Procedimiento efectuado en condiciones de oscuridad durante 30 min. (siete usos).

Nitrato de plata	3.5 g
Formaldehído 37%	4.5 ml

Lavado durante 10 s agua d.d.*

3. *Solución de revelado*: Este procedimiento se llevó a cabo con una duración de 5 a 10 min. (cuatro usos)

Carbonato de Sodio	105 g
Tiosulfato de Sodio (10mg/ml)	650 μ l
Formaldehído 37%	4.5 ml

4. *Solución de parada*: 5 min. seis usos.

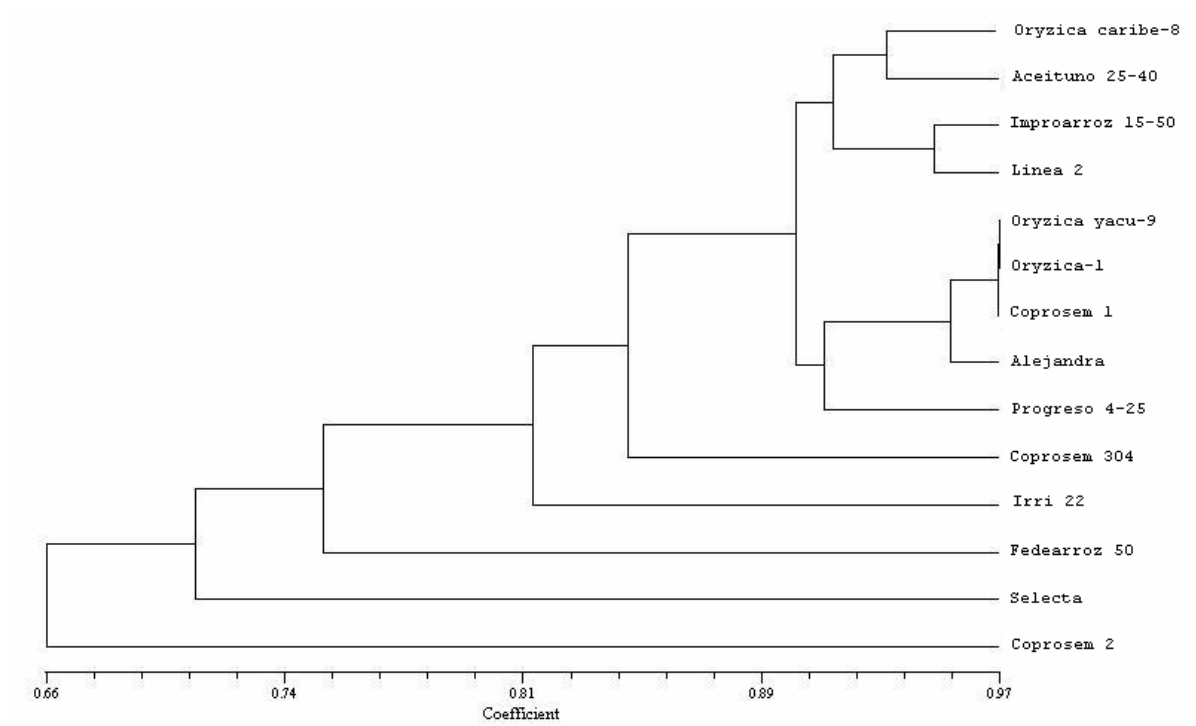
Ácido acético glacial	350 ml
Agua d.d.	3150 ml

Lavado con agua d.d por 4 min.*

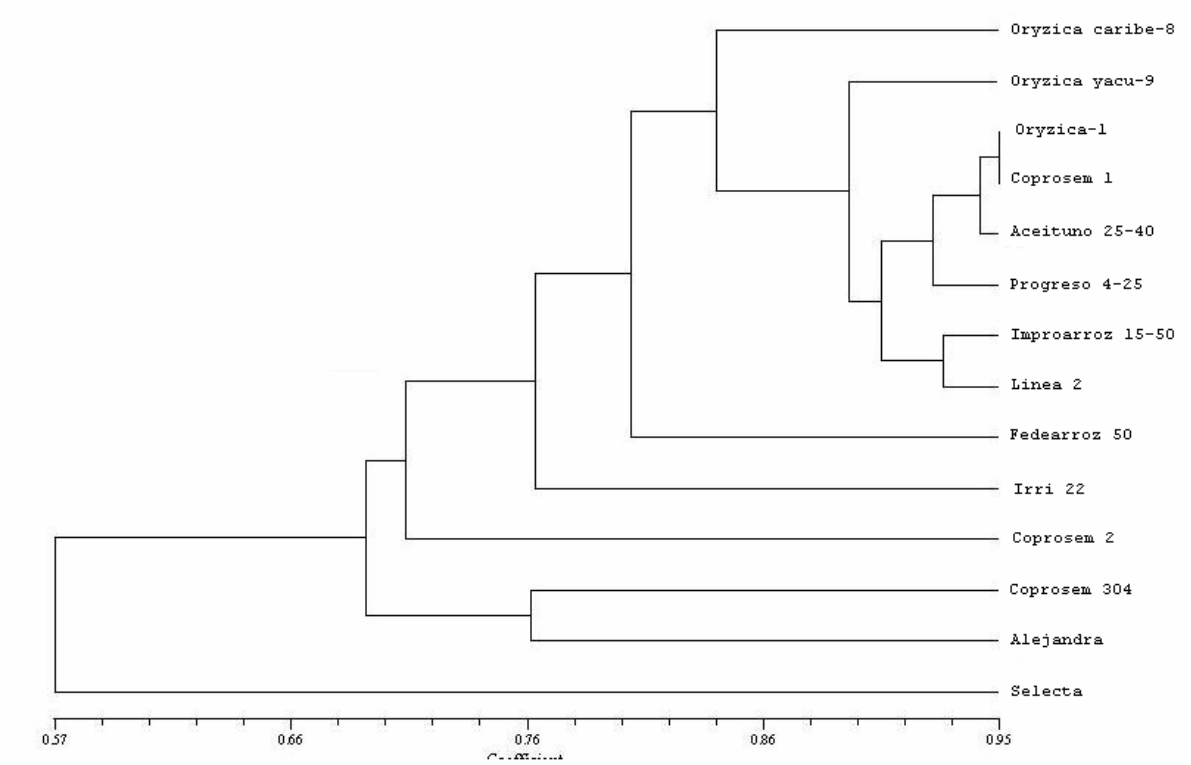
*En todas las reacciones las soluciones fueron llevadas a un volumen final de 3500 ml.

9. Análisis de agrupamiento por Combinación con 14 variedades

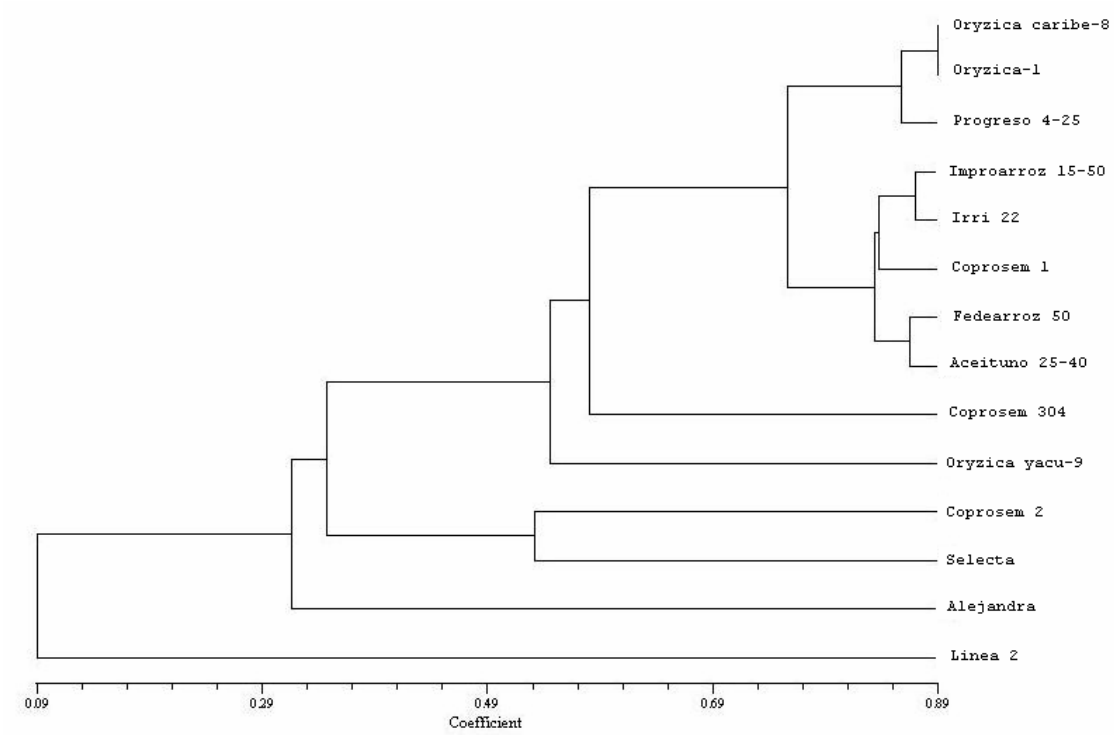
Dendograma de la Combinación II segundo ensayo con 14 variedades.



Dendograma Combinación II primer ensayo.



Dendograma Combinación III segundo ensayo.



10. Matriz de similitud consenso de 14 variedades obtenida por medio de AFLP.

	Organica Caribe	Organica Yaguajay	Organica 1	Progreso 4-15	Impugnacion 1518	Fedatarios 58	Coprosem 1	Irri 12	Lima 1	Activino 1546	Coprosem 1	Seleto	Coprosem 304	Alajandrea
Organica Caribe	1.00000000													
Organica Yaguajay	0.8009859	1.00000000												
Organica 1	0.8900226	0.8605031	1.00000000											
Progreso 4-15	0.8530333	0.8701299	0.9101796	1.00000000										
Impugnacion 1518	0.8366013	0.8152866	0.8941176	0.8466888	1.00000000									
Fedatarios 58	0.7366939	0.7549869	0.8170732	0.7988742	0.8024691	1.00000000								
Coprosem 1	0.8076923	0.8250000	0.9122948	0.8571429	0.8771930	0.80000000	1.00000000							
Irri 12	0.7916667	0.7867668	0.7980311	0.7307692	0.8080714	0.7480980	0.7901235	1.00000000						
Lima 1	0.8062016	0.8421053	0.8082192	0.7943262	0.7777778	0.6521739	0.7755102	0.6518519	1.00000000					
Activino 1546	0.8627451	0.8280255	0.9176471	0.8600861	0.8690876	0.8148148	0.9122807	0.8301887	0.7777778	1.00000000				
Coprosem 1	0.6333333	0.6129032	0.6423358	0.6363636	0.6222222	0.6201550	0.6086957	0.6031746	0.6666667	0.6666667	1.00000000			
Seleto	0.5964912	0.6101695	0.5954198	0.6021746	0.5736434	0.5040650	0.5050606	0.4666667	0.6666667	0.5736434	0.604166	1.00000000		
Coprosem 304	0.7538463	0.7164179	0.7619048	0.7323944	0.7448276	0.6043166	0.7432432	0.7205882	0.6942149	0.7586207	0.625000	0.520312	1.00000000	
Alajandrea	0.7187500	0.7878788	0.7586207	0.7285714	0.6853147	0.5423368	0.7534247	0.6288577	0.7731092	0.7272727	0.545454	0.6153846	0.7509240	1.00000000

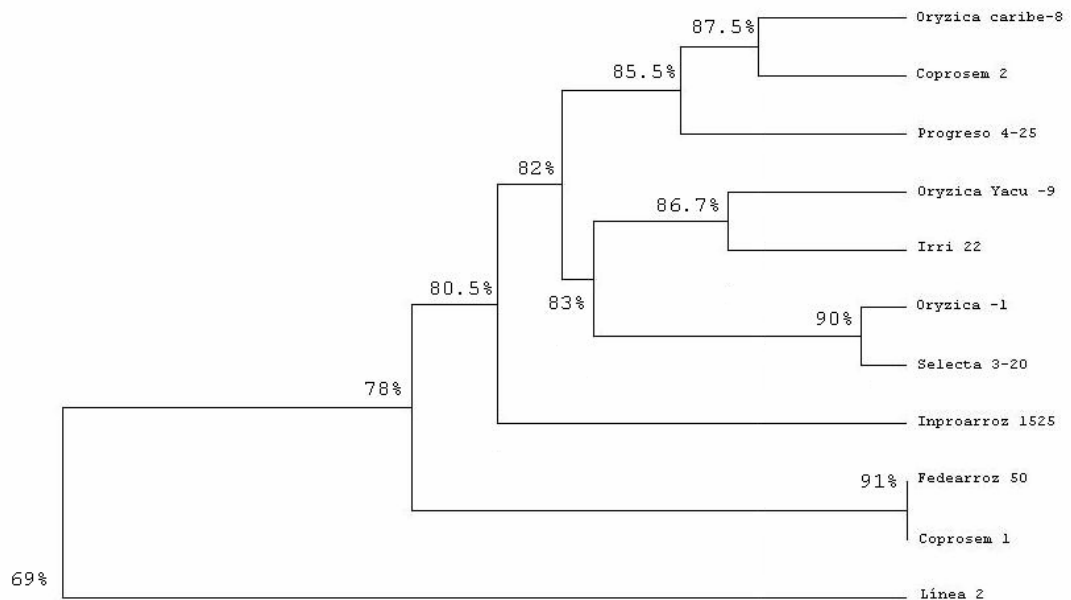
11. Matriz similaridad consenso obtenida en 11 variedades comunes de estudios ICA (AFLP y RAMs) en arroz mediante AFLP.

Variedad	Oryzica caribe-8	Oryzica Yacu -9	Oryzica -1	Progreso 4-25	Inproar 1525	Fedearroz 50	Coprosem 1	Irri 22	Línea 2	Coprosem 2	Selecta 3-20
Oryzica caribe 8	1.0000000										
Oryzica Yacu 9	0.8351648	1.0000000									
Oryzica 1	0.9108911	0.8600000	1.0000000								
Progreso 4-25	0.8842105	0.8936170	0.9038462	1.0000000							
Inproarroz 15-25	0.8400000	0.7676768	0.8807339	0.8349515	1.0000000						
Fedearroz 50	0.7311828	0.7173913	0.8039216	0.7708333	0.8118812	1.0000000					
Coprosem 1	0.8080808	0.7755102	0.8888889	0.8235294	0.8598131	0.8000000	1.0000000				
Irri 22	0.7916667	0.7157895	0.8190476	0.7474747	0.8269231	0.7422680	0.8155340	1.0000000			
Línea 2	0.7435897	0.8051948	0.7126437	0.7407407	0.6744186	0.5316456	0.6823529	0.5853659	1.0000000		
Coprosem 2	0.6052632	0.5600000	0.5882353	0.5822785	0.5714286	0.5194805	0.5542169	0.5750000	0.6129032	1.0000000	
Selecta 3-20	0.5866667	0.6216216	0.5952381	0.6153846	0.5783133	0.5000000	0.6341463	0.4556962	0.7213115	0.6440678	1.0000000

12. Matriz de similaridad consenso obtenida en 11 variedades comunes de estudios ICA (AFLP y RAMs) en arroz mediante RAMs.

Variedad	Oryzica caribe-8	Oryzica yacu-9	Oryzica 1	Selecta 3-20	Progreso 4-25	Improarroz 15-25	Fedearroz 50	Coprosem 1	Coprosem 2	Irri 22	Línea 2
Oryzica caribe-8	1.0000000										
Oryzica yacu-9	0.8275862	1.0000000									
Oryzica 1	0.8125968	0.7735849	1.0000000								
Selecta 3-20	0.8259481	0.8571429	0.9000000	1.0000000							
Progreso 4-25	0.8553261	0.8403361	0.8037383	0.8318584	1.0000000						
Improarroz 15-25	0.8059427	0.8333333	0.7407407	0.8421053	0.8099174	1.0000000					
Fedearroz 50	0.7845693	0.8620690	0.7115385	0.7818182	0.8034188	0.7288136	1.0000000				
Coprosem 1	0.7859153	0.8275862	0.7307692	0.7818182	0.8205128	0.7288136	0.9122807	1.0000000			
Coprosem 2	0.8756914	0.8245614	0.8235294	0.8333333	0.8521739	0.7758621	0.8035714	0.7857143	1.0000000		
Irri 22	0.8012567	0.8648649	0.8282828	0.8571429	0.7500000	0.8141593	0.7522936	0.7339450	0.7663551	1.0000000	
Línea 2	0.6894523	0.6846847	0.7070707	0.7619048	0.6607143	0.6902655	0.6238532	0.6605505	0.6542056	0.7307692	1.0000000

Dendograma consenso obtenido con el coeficiente de Dice y el algoritmo UPGMA en 11 variedades comunes de estudios ICA (AFLP y RAMs) en arroz mediante RAMs.



GLOSARIO

VARIEDAD: Conjunto de individuos botánicos cultivados que se distinguen por determinados caracteres morfológicos, fisiológicos citológicos, químicos, que se pueden perpetuar por reproducción, multiplicación o propagación.

VARIEDAD ESENCIALMENTE DERIVADA: Se considerará esencialmente derivada de una variedad inicial, aquella que se origine de ésta o de una variedad que a su vez se desprenda principalmente de la primera, conservando las expresiones de los caracteres esenciales que resulten del genotipo o de la combinación de genotipos de la variedad original, y aún, si se puede distinguir claramente de la inicial, concuerda con ésta en la expresión de los caracteres esenciales resultantes del genotipo o de la combinación de genotipos de la primera variedad, salvo por lo que respecta a las diferencias resultantes del proceso de derivación.

NUEVAS VARIEDADES: En primer termino se tiene; el convenio internacional para la protección de nuevas variedades de plantas aprobado en 1966, entrando en vigor en 1968. Este convenio ha sido objeto de sucesivas enmiendas (1972, 1978 y 1991) y persigue como finalidad principal que las partes contratantes reconozcan y protejan los derechos de los productores de nuevas variedades vegetales. De acuerdo con las enmiendas de 1991 el obtentor es la persona que haya creado o descubierto y puesto a punto una variedad.

ÍNDICES

Índice de unidades

l: litros

ml: mililitro

μ l: microlitro

g: gramo

mg; miligramo

ng: nanogramos

M: molar

mM: milimolar

pb: pares de bases

Mpb: mega pares de bases

U: unidades

Km: kilómetros

cm.: centímetros

h: horas

min: minutos

s: segundos

°C: grados centígrados

V: voltios

W: Watt

rpm: revoluciones por minuto

Índice de Siglas

PCR (Polymerase Chain Reaction): Reacción en Cadena de la Polimerasa.

RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphisms): Polimorfismos de Longitud en Fragmentos de Restricción.

RAPD (Random Amplified Polymorphic DNA): Polimorfismo de ADN Amplificado Aleatoriamente.

SSR (Single sequence repeats): Repeticiones de Secuencias Simples.

AFLP (Amplified Fragment length Polymorphisms): Polimorfismos de Longitud en Fragmentos Amplificados.

cDNA-AFLP: complementary DNA-AFLP: AFLP de ADN complementario.

ARDRA (Amplified ribosomal DNA restriction Analysis): Análisis de restricción de ADN ribosomal amplificado.

AP-PCR (Arbitrarily Primed PCR): PCR de Iniciadores arbitrarios.

tDNA-PCR (Transfer DNA- PCR): PCR- ADN de transferencia.

STMS (sequence tagged microsatellite sites): Sitios Microsatélite de Secuencias Marcadas.

EST (Expressed Sequence tags): Marcas de Secuencia Expresadas.

ISSR (Inter-simple sequence repeats): Repeticiones entre Secuencias Simples

UPOV: Unión Internacional para la Protección de Obtenciones Vegetales

ICA: Instituto Colombiano Agropecuario.