

# GENETIC VARIABILITY AND DIVERSITY OF MUTANT RICE REVEALED BY QUANTITATIVE TRAITS AND MOLECULAR MARKERS

## VARIABILIDAD GENÉTICA Y DIVERSIDAD DE MUTANTES DE ARROZ, REVELADAS POR CARACTERÍSTICAS CUANTITATIVAS Y MARCADORES MOLECULARES

Yusuff **Oladosu**<sup>1</sup>, Mohd Y. **Rafii**<sup>1,2\*</sup>, Norhani **Abdullah**<sup>1,3</sup>, Mohammad Abdul **Malek**<sup>1,4</sup>, Harun A. **Rahim**<sup>5</sup>, Ghazali **Hussin**<sup>6</sup>, Mohd Razi **Ismail**<sup>1</sup>, Mohammad Abdul **Latif**<sup>2,7</sup>, Isiaka **Kareem**<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Institute of Tropical Agriculture. <sup>2</sup>Department of Crop Science, Faculty of Agriculture, <sup>3</sup>Department of Biochemistry, Faculty of Biochemistry and Biomolecular Science. Universiti Putra Malaysia, 43400 UPM Serdang, Selangor, Malaysia. (mrafi@upm.edu.my). <sup>4</sup>Bangladesh Institute of Nuclear Agriculture, Mymensingh-2202, Bangladesh. <sup>5</sup>Bioscience and Agrotechnology Division, Malaysian Nuclear Agency, Bangi, 43000 Kajang, Selangor, Malaysia. <sup>6</sup>Strategic Livestock Research Centre, Malaysian Agricultural Research and Development Institute (MARDI), Kluang, Johor, Malaysia. <sup>7</sup>Bangladesh Rice Research Institute (BRRI), Gazipur, Dhaka, Bangladesh.

### ABSTRACT

Genetic variability with mutagenic agents has been employed in plant breeding due to its significant contribution to the improvement of the existing rice genotypes by using genetically diverse parents. This study evaluated the genetic variability and diversity of mutant rice using quantitative traits and inter-simple sequence repeats (ISSR) molecular markers. A field experiment was carried out on M<sub>5</sub> generation of 31 developed mutant lines and their parent (control). Morphological traits and 25 ISSR molecular markers were used as tools for determining cultivar identities and genetic diversity. The selected primers generated 443 clear polymorphic bands with an average number of 18 per primer. The bands were 85.10 % polymorphic. Un-weighted Pair Group of Arithmetic Means (UPGMA) with similarity coefficients were used for cluster analysis. Through this, all the genotypes were grouped into six clusters. It was shown that crosses between MR219-ML8 and MR219-ML22 could be done for development of high yielding varieties. Also, these mutants could be used as donor parents in rice breeding programs and some can be recommended as new rice varieties suitable for rice cultivation in Malaysia.

**Keywords:** Plant breeding, genetic diversity, molecular marker, mutagenicity, polymerase chain reaction (PCR).

### RESUMEN

La variabilidad genética con agentes mutagénicos se ha usada en el cultivo de plantas debido a su contribución significativa a la mejora de los genotipos existentes de arroz a través de padres genéticamente diversos. En este estudio se evaluó la variabilidad y diversidad de mutantes de arroz mediante rasgos cuantitativos y marcadores moleculares de inter-secuencias simples repetidas (ISSR). El estudio se realizó en campo, en la generación M<sub>5</sub> de 31 líneas mutantes desarrolladas y su padre (testigo). Características morfológicas y 25 marcadores ISSR se utilizaron como herramientas para determinar las identidades y diversidad genética de los cultivares. Los iniciadores seleccionados generaron claras 443 bandas polimórficas claras con un número promedio de 18 bandas por iniciador. Las bandas fueron 85.10 % polimórficas. El método no ponderado de pares de grupo de medias aritméticas (UPGMA) con coeficientes de similitud se usó para el análisis de los grupos. Mediante esto, todos los genotipos se agruparon en seis grupos. Las cruces entre MR219-ML8 y MR219-ML22 podrían generarse para desarrollar variedades de alto rendimiento. Además, estos mutantes se pueden usar como padres donadores en programas de mejoramiento de arroz y algunos pueden recomendarse como variedades nuevas de arroz adecuadas para su cultivo en Malasia.

**Palabras clave:** Mejoramiento de plantas, diversidad genética, marcador molecular, mutagenicidad, reacción en cadenas de la polimerasa (PCR).

\* Author for correspondence ♦ Autor responsable.

Received: May, 2014. Approved: March, 2015.

Published as ARTICLE in *Agrociencia* 49: 249-266. 2015.

## INTRODUCTION

Rice varieties are subjected to mutagenesis because the crop is the world's leading food and most consumed staple (Sharma and Singh, 2013). The frequency of spontaneous mutation occurring in nature is very low and because it is difficult for plant breeders to use spontaneous mutations in plant breeding programmes, they utilize induced mutation (Hausmann and Parzies, 2009). The purpose of induced mutations is to increase the frequency of improving the plant varieties and developing new ones. Such developments and improvements could come through direct use of a mutant line by physical or chemical mutagenesis, or indirect use of a mutant line which is utilized as a parental variety in cross breeding (crosses between mutant lines or with commercial varieties) for the release of semi-dwarf and high yielding varieties (Baloch *et al.*, 2003; Qayyoom *et al.*, 2000).

The estimation of genetic diversity differences between genotypes is a first step in plant breeding and it requires knowing the amount of genetic diversity present in the candidate populations for starting the programme. DNA marker technology is readily available for evaluating genetic variability and relatedness among crop germplasm in rice varieties (Shah *et al.*, 2013), because it provides very effective and reliable tools for measuring genetic diversity in crop germplasm and studying evolutionary relationships. DNA markers can reveal differences among the genotypes at molecular level because they yield information to deciding the distinctiveness of species and their ranking, according to the number of close relatives and phylogenetic positions.

Molecular markers used in rice breeding include Restriction Fragment Length Polymorphisms (RFLPs), Diversity Array Technology (DArT), Inter Simple Sequence Repeat (ISSR), Randomly Amplified Polymorphic DNA markers (RAPDs), Simple Sequence Repeat (SSR) or Microsatellites, Amplified Fragment Length Polymorphisms (AFLPs), and they assist in genetic and breeding researches. Inter-simple sequence repeats (ISSRs) are the regions that lie within microsatellite repeats and offer great potential for determining intra- and inter-genomic diversity compared to other arbitrary primers because they reveal variations within unique regions of the genome at several loci simultaneously

## INTRODUCCIÓN

Varietades de arroz están sujetas a mutagénesis porque es el principal cultivo en el mundo y de mayor consumo (Sharma y Singh, 2013). La frecuencia de mutaciones espontáneas en la naturaleza es baja; para los agricultores es difícil usar mutaciones espontáneas en programas de mejoramiento, por lo cual usan mutaciones introducidas (Hausmann y Parzies, 2009). El objetivo de introducir mutaciones es aumentar la frecuencia de mejorar a las variedades de plantas y desarrollar nuevas variedades. Esas mejoras y desarrollos podrían venir del uso directo de una línea mutante por mutagénesis física o química, o el uso indirecto de una línea mutante como línea parental en hibridación (cruzas entre líneas mutantes o con variedades comerciales) para liberar variedades semienanas y de rendimiento alto (Baloch *et al.*, 2003; Qayyoom *et al.*, 2000).

La estimación de las diferencias de la diversidad genética entre los genotipos es un primer paso en el desarrollo de plantas cultivadas y requiere conocer la cantidad de la diversidad genética presente en las poblaciones candidatas para iniciar un programa. La tecnología de marcadores de ADN es accesible para evaluar la variabilidad genética y el parentesco entre el germoplasma en las variedades de arroz (Shah *et al.*, 2013), ya que provee herramientas efectivas y confiables para medir la diversidad genética en el germoplasma del cultivo y estudiar sus relaciones evolutivas. Los marcadores de ADN pueden revelar diferencias moleculares entre los genotipos porque aportan información para decidir sobre las diferencias de las especies y sus niveles taxonómicos, de acuerdo con el número de parientes cercanos y posiciones filogenéticas.

Los marcadores moleculares usados en el cultivo de arroz incluyen polimorfismos en la longitud de fragmento de restricción (RFLPs), tecnología de diversidad de arreglos (DArT), inter secuencias simples repetidas (ISSR), amplificación aleatoria de ADN polimórfico (RAPDs), secuencias simples repetidas (SSR) o microsatélites, y polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLPs), los cuales ayudan a las investigaciones en genética y mejoramiento. Las inter-secuencias simples repetidas (ISSRs) son las regiones dentro de las repeticiones microsatélites y ofrecen un gran potencial para determinar la diversidad inter e intra genómica comparada

(Ziętkiewicz *et al.*, 1994). Therefore, ISSR markers are used for characterization of germplasm (Charters and Wilkinson, 2000), estimating the level of genetic diversity between and within crop species (Ajibade *et al.*, 2000), to identify DNA markers closely linked to specific agronomic traits of interest (Levin *et al.*, 2000), determining the distribution of microsatellites in the genome (Pasakinskiene *et al.*, 2000), and for evaluating differences among closely related cultivars and varieties (Prevost *et al.*, 1999). Information is needed about maximizing parental selection to broaden the germplasm base of rice breeding programmes. Therefore, this study was carried out to evaluate genetic variability and diversity of mutant rice using quantitative traits and ISSR molecular markers.

## MATERIALS AND METHODS

### Development and selection of mutant lines

Because MR219 is the rice variety covering almost 90 % of the cultivated areas in Malaysia (Bashar *et al.*, 2014), efforts are made to increase its yield. Therefore, seeds were sent to Japan for radiosensitivity determination through ion beam irradiation, and 100 seeds were subjected to 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160, and 200 Gray (Gy) to determine the optimum doses for the production of high mutant frequency and spectrum, which was 60 Gy. The  $M_1$  seedlings were transplanted into the field with 25 cm × 25 cm planting distance; 10 000  $M_1$  seedlings were planted to produce  $M_2$  seeds and from 5,250 selected plants two panicles per hill were randomly harvested. About 5 % of  $M_2$  populations were selected for screening in  $M_3$ . After series of selection and fixation, 31 potential lines with the required adaptive traits were recovered at  $M_4$  generation during the 2009-2012 seasons ( $M_0$ - $M_4$ ). For our study, 32 genotypes containing 31 mutant lines derived from MR219 (Ibrahim *et al.*, 2013) and MR219 parent variety were evaluated in two locations.

### Experimental sites

This study was carried out at the experimental station of the University Putra Malaysia, Serdang, Selangor, Malaysia, located at 3° 02' N, 101° 42' E. Another replication was carried out on farmers' field at Melor, Kelantan, Malaysia, located at 5° 58' N, 102° 17' E. During the growing seasons, monthly average maximum and minimum temperature and relative humidity were 33.5 °C, 21.5 °C and 92.5 %, respectively; rainfall, evaporation and sunshine hours were 9.8 mm d<sup>-1</sup>, 4.6 mm d<sup>-1</sup>, and 6.6 h d<sup>-1</sup> respectively.

con otros iniciadores arbitrarios, porque revelan simultáneamente variaciones dentro de regiones únicas del genoma en varios loci (Ziętkiewicz *et al.*, 1994). Por tanto, los marcadores ISSR se usan para caracterizar germoplasma (Charters y Wilkinson, 2000), estimar el nivel de diversidad genética entre y dentro de especies de cultivos (Ajibade *et al.*, 2000), identificar marcadores de ADN asociados cercanamente a caracteres agronómicos de interés específico (Levin *et al.*, 2000), determinar la distribución de microsatélites en el genoma (Pasakinskiene *et al.*, 2000), y evaluar las diferencias entre cultivares y variedades muy relacionados (Prevost *et al.*, 1999). La información se requiere de cómo maximizar la selección parental para ampliar la base del germoplasma para programas de mejoramiento del arroz. Por tanto, este estudio se realizó para evaluar la variabilidad genética y la diversidad de arroz mutante utilizando caracteres cuantitativos y marcadores moleculares ISSR.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Desarrollo y selección de líneas mutantes

Dado que MR219 es la variedad de arroz usada en cubrir casi 90 % de las áreas de cultivo en Malasia (Bashar *et al.*, 2014), se busca aumentar su rendimiento. Para ello, las semillas se enviaron a Japón para determinar su radiosensibilidad mediante radiación con haz de iones y 100 semillas se sometieron a 0, 10, 20, 40, 60, 80, 100, 120, 160, y 200 gray (Gy) para determinar las dosis óptimas para la producción de frecuencia y espectro altos de mutación, la cual fue 60 Gy. Las plántulas  $M_1$  fueron trasplantadas en el campo con distancias de 25 cm × 25 cm; 10 000 plántulas se sembraron para producir semillas  $M_2$  y de 5 250 plantas seleccionadas, dos panículas por surco fueron cosechadas al azar. Cerca de 5% de las poblaciones  $M_2$  fueron seleccionadas para análisis en  $M_3$ . Después de series de selección y fijación, 31 líneas potenciales con las características adaptativas requeridas se recuperaron en la generación  $M_4$ , durante los ciclos de 2009 a 2012 ( $M_0$ - $M_4$ ). Para nuestro estudio, 32 genotipos con 31 líneas mutantes, derivadas de las variedades paternas MR219 (Ibrahim *et al.*, 2013) y MR219, se evaluaron en dos localidades.

### Sitios experimentales

Este estudio se realizó en la estación experimental de la universidad de Putra Malasia, Serdang, Selangor, Malasia (3° 02' N, 101° 42' E). Otra repetición se realizó en campos de agricultores en Melor, Kelantan, Malasia (5° 58' N, 102° 17' E). Durante las estaciones de crecimiento, la medias mensuales máximas y míni-

### Plant materials, crop management and experimental design

The 31 developed mutant lines along with un-irradiated parent (control) were planted in a nursery and 28 d old seedlings were transplanted into puddled fields at 25 cm × 30 cm spacing in 32 rows of 7 m length and 30.8 m width. The periods of cultivation were February to June 2013 and December 2013 to April 2014. The experimental design was randomized complete block (RCB) with three replications.

### Cultural practices

Throughout the experimental period the field was kept weed free, by weeding it every three weeks until harvesting. NPK fertilizer was 80-60-40 kg ha<sup>-1</sup>; P and K were applied as a single dose at transplanting, whereas N was applied at 15, 35, 55, and 75 d after transplanting.

### Data collection

Data were collected by sampling five plants in the middle of the rows with exclusion of the plot border rows. The traits of M<sub>5</sub> measured were plant height, days to maturity, number of effective tillers, total number of grains per panicle, total grain weight per hill, 100 grain weight, seed length/width ratio, yield per plant and yield per hectare.

### Molecular markers

Twenty five ISSR primers with clear amplifications were selected for the genetic diversity study of genotypes (Table 1).

### DNA extraction

DNA was extracted from young leaves of rice plants using the CTAB method (Doyle, 1990) with minor modifications. The crude DNA (pellet form) was washed with 75 % ethanol, dissolved in 50 μL TE buffer and treated with RNase. The quality of the extracted DNA was checked using spectrophotometer (Nanodrop).

### Amplification and electrophoresis

PCR was optimized to 15 μL with reaction mixture containing 1 μL with 60 ng of template DNA, 7.5 μL of PCR master mix (PCR master mix-2X containing 0.06U μL of Taq DNA polymerase, 3 mM MgCl<sub>2</sub> and 400 μM of each dNTPs) (Product code # BIO-5180-1000, from 1st BASE Company, Science Park Road, Singapore), 1 μL ISSR primer and 5.5 μL nuclease free water (double-distilled water) using a PCR machine

mas de temperatura y humedad relativa fueron 33.5 °C, 21.5 °C y 92.5 %, respectivamente; la precipitación pluvial, evaporación y horas de luz fueron 9.8 mm d<sup>-1</sup>, 4.6 mm d<sup>-1</sup> y 6.6 h d<sup>-1</sup>, respectivamente.

### Material vegetal, manejo del cultivo y diseño experimental

Las 31 líneas mutantes desarrolladas se plantaron en un vivero junto con los padres no irradiados (testigo) y las plántulas de 28 d se trasplantaron a campos inundados, con separación de 25 cm × 30 cm en 32 líneas de 7 m de largo y 30.8 m de ancho. Los periodos de cultivo fueron de febrero a junio de 2013 y de diciembre de 2013 a abril de 2014. El diseño experimental fue de bloques completos al azar (BCA) con tres repeticiones.

### Prácticas de cultivo

Durante el periodo experimental el campo fue mantenido libre de malezas mediante deshierbe cada tres semanas hasta la cosecha. Se fertilizó con 80-60-40 kg ha<sup>-1</sup> de NPK; el P y K se aplicaron en una sola dosis en el trasplante, mientras que N fue aplicado a los 15, 35, 55 y 75 d después del trasplante.

### Recolección de datos

Los datos se obtuvieron de cinco plantas muestreadas de la mitad de cada línea, excepto de las líneas en la orilla de parcela. Las características evaluadas de M<sub>5</sub> fueron altura de la planta, días hasta la maduración, número de macollos efectivos, número total de granos por panoja, peso total de grano, peso de 100 semillas, índice longitud/anchura de la semilla, rendimiento por planta y rendimiento por hectárea.

### Marcadores moleculares

Para evaluar la diversidad genética de los genotipos se seleccionaron 25 iniciadores ISSR con amplificación clara (Cuadro 1).

### Extracción de ADN

El ADN se extrajo de hojas jóvenes de plantas de arroz mediante el método CTAB (Doyle, 1990) con modificaciones menores. El ADN crudo (forma de pellet) fue lavado con etanol al 75 %, disuelto en 50 μL de solución amortiguadora TE y tratado con ARNasa. La calidad del ADN extraído se evaluó mediante espectrofotometría (Nanodrop).

**Table 1. List of ISSR markers and annealing temperature used in this study.****Cuadro 1. Lista de marcadores ISSR y temperatura de reconocimiento usadas en este estudio.**

Oligo name (marker)	Sequence	Tm (°C)
ISSR1	5' -ACA CAC ACA CAC ACA CG- 3'	54.8
ISSR2	5' -ACA CAC ACA CAC ACA CT- 3'	54.8
ISSR3	5' -ACA CAC ACA CAC ACA CC- 3'	54.8
ISSR4	5'-AGA GAG AGA GAG AGA GC- 3'	56.5
ISSR5	5' -AGA GAG AGA GAG AGA GT- 3'	56.5
ISSR6	5' -GAG AGA GAG AGA GAG- 3'	56.5
ISSR7	5' -GAG AGA GAG AGA GAG AT- 3'	55.6
ISSR8	5' -CTC TCT CTC TCT CTC TG- 3'	55.6
ISSR9	5' -AGA GAG AGA GAG AGA GGT- 3'	55.6
ISSR10	5' -ACA CAC ACA CAC ACA CGG- 3'	57.2
ISSR11	5' -ACA CAC ACA CAC ACA CGA- 3'	57.2
ISSR12	5' -TAG AGA GAG AGA GAG AGA G- 3'	58.0
ISSR13	5' -GAC ACA CAC ACA CAC ACA C- 3'	58.8
ISSR14	5' -CCA CTC TCT CTC TCT CTC T- 3'	54.2
ISSR15	5' -AGA GAG AGA GAG AGA GG- 3'	57.2
ISSR16	5' -ATG ATG ATG ATG ATG ATG- 3'	57.2
ISSR17	5' -GAC AGA CAG ACA GAC A- 3'	58.8
ISSR18	5' -GGA AGA GAG AGG AGA- 3'	43.9
ISSR19	5' -GGG TGG GGT GGG GTG- 3'	54.2
ISSR20	5' -CAC ACA CAC ACA CAC ATA- 3'	54.8
ISSR21	5' -CAC ACA CAC ACA CAC ATC- 3'	54.8
ISSR22	5' -ACA CAC ACA CAC ACA CGA- 3'	54.8
ISSR23	5' -TCC TCC TCC TCC TCC TG- 3'	54.8
ISSR24	5' -AGA GAG AGA GAG AGA GGC- 3'	56.5
ISSR25	5' -ACA CAC ACA CAC ACA CGT- 3'	56.5

(My cycler thermo cycler, BIO RAD, Watertown, Massachusetts, USA). Touch down PCR protocol was followed in this experiment (Korbie and Mattick, 2008), which included three phases. The temperature was adjusted to 95 °C for 3 min before the first phase. In the first phase temperature and duration were respectively 95 °C for 30 s for denaturation, Tm +10 °C for 45 s for annealing and 72 °C for 60 s for elongation. In the second phase the temperature and duration were respectively 95 °C for 30 s for denaturation, Tm -5 °C for 45 s for annealing and 72 °C for 60 s for elongation. In the third phase, the temperature and duration were adjusted to 72 °C for 5 min for elongation. Phases 1 and 2 were repeated 10 and 20 times, respectively. Five microliters (5 µL) of each PCR product was mixed with DNA loading dye, loaded on an agarose gel (1.8 %w/v) and run at 90 V for 90 min in 1× TBE buffer. Band pattern was documented using an UVPRO Alpha Innotech gel documentation unit.

#### Data analysis

The data were analyzed using ANOVA with SAS 9.1 (SAS, 2002). Cluster analysis was performed with quantitative data

#### Amplificación y electroforesis

La PCR se optimizó para 15 µL con la mezcla de reacción que contenía 1 VL con 60 ng de ADN plantilla, 7.5 µL de la mezcla PCR "master mix" (PCR master mix-2X contiene 0.06U µL de Taq ADN polimerasa, MgCl<sub>2</sub> 3 mM y de cada dNTPs 400 mM) (Producto código # BIO-5180-1000, 1st BASE Company, Science Park Road, Singapore), 1 µL del iniciador ISSR y 5.5 µL de agua libre de nucleasas (agua doblemente destilada) y se usó un equipo PCR (My cycler thermo cycler, BIO RAD, Watertown, Massachusetts, EE.UU.). En este estudio se siguió el protocolo de PCR "Touch down" (Korbie and Mattick, 2008), el que incluyó tres fases. La temperatura se ajustó a 95 °C por 3 min antes de la primera fase. En la primera fase la temperatura y duración fueron 95 °C por 3 s para desnaturar, Tm +10 °C por 45 s para recocer y 72 °C por 60 s para elongación. En la segunda fase la temperatura y duración fueron 95 °C por 30 s para desnaturar, Tm -5 °C por 45 s para recocer y 72 °C por 60 s para la elongación. En la tercera fase, la temperatura y duración se ajustaron a 72 °C por 5 min para la elongación. Las fases 1 y 2 fueron repetidas 10 y 20 veces, respectivamente. Cinco microlitros (5 µL) de cada producto PCR fueron mezclados con

for grouping similar accessions using NTSYS-PC 2.1. with two algorithms: Un-weighted Pairing Group Method with arithmetic averages (UPGMA), and SAHN clustering method. First, quantitative data were standardized using the software STAND and the Jaccard similarity coefficient was calculated with the quantitative database. The fitting between the distance matrix and the dendrogram was estimated by using a cophenetic correlation coefficient ( $r$ ) (Sokal and Rohlf, 1962) through NTSYS pc 2.1 software (Rohlf, 2000). The average genetic distance was used as a cut-off value for the description of the clusters. Distances were later used for principal component analysis (PCA).

### Band scoring and data analysis

Genotypes were scored for the presence or absence of the ISSR bands utilizing UVIDoc version 99.02. The bands scored were those reproducible and above 100 bp in length and the data were entered into a binary matrix as 1 (present) and 0 (absent). Similar bands were assumed as representative of the same locus. The Excel file containing the binary data was imported into NT Edit of NTSYS-pc 2.02J. The 0/1 matrix was then used to calculate similarity as DICE coefficient using SIMQUAL subroutine in SIMILARITY routine. The genetic similarity was transformed to genetic dissimilarity with the equation:

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

where  $D_{ij}$ : genetic distance for each genotype pair ( $i$  and  $j$ ), and  $S_{ij}$ : genetic similarity for each genotype pair ( $i$  and  $j$ ).

Based on the dissimilarity matrix generated, a dendrogram was obtained using the UPGMA clustering procedure. The adjustment between the dissimilarity matrix and the dendrogram was estimated by the cophenetic correlation coefficient ( $r$ ) according to Sokal and Rohlf (1962). The average genetic distance was used as cut-off value to define genotype clusters. In addition, the evolved score matrix was employed for analyzing effective number of alleles ( $N_e$ ), Nei's gene diversity ( $H$ ) and Shannon information index ( $I$ ) using POPGENE (version 1.31) software. NTSYS-PC Mantel test was used to determine the correlation between quantitative traits and molecular data.

## RESULTS AND DISCUSSION

### Morphological analysis

The data presented in Table 2 represent the mean performance of the tested entries for agronomic traits in two locations. Results showed that all tested genotypes including MR219 (parent) and its new

colorante de carga de ADN, cargados en un gel de agarosa (1.8 % w/v) y se corrió a 90 V por 90 min en amortiguador 1 × TBE. El patrón de banda fue documentado usando una unidad de documentación de gel UVPRO Alpha Innotech.

### Análisis de datos

Los datos se analizaron mediante ANOVA con SAS 9.1 (SAS, 2002). Un análisis de conglomerados se realizó con los datos cuantitativos para agrupar recolectas similares usando NTSYS-PC 2.1. con dos algoritmos: método de agrupamiento pareado no ponderado con medias aritméticas (UPGMA), y el método de agrupamiento SAHN. Primero, los datos cuantitativos se estandarizaron con el programa STAND y se calculó el coeficiente de similitud Jaccard con la base de datos cuantitativa. El ajuste entre las matrices de distancia y el dendrograma fue estimado con un coeficiente de correlación cofenética ( $r$ ) (Sokal y Rohlf, 1962), con el programa NTSYS pc 2.1 (Rohlf, 2000). La distancia genética promedio se utilizó como un valor de corte para la descripción de los grupos. Las distancias fueron usadas para el análisis de componentes principales (PCA).

### Bandas marcadas y análisis de datos

Los genotipos fueron marcados por la presencia o ausencia de las bandas ISSR mediante UVIDoc versión 99.02. Las bandas marcadas fueron aquellas reproducibles y sobre 100 bp de largo, y los datos fueron ingresados en una matriz binaria como 1 (presencia) y 0 (ausencia). Bandas similares se asumieron como representativas del mismo locus. El archivo de Excel con los datos binarios se importó a NT Edit de NTSYS-pc 2.02J. La matriz 0/1 se usó entonces para calcular la similitud como coeficiente de DICE usando la subrutina SIMQUAL en la rutina SIMILARITY. La similitud genética fue transformada a disimilitud genética mediante la ecuación:

$$D_{ij} = 1 - S_{ij}$$

donde  $D_{ij}$ : distancia genética de cada par genotípico ( $i$  y  $j$ ), y  $S_{ij}$ : similitud genética por cada par genotípico ( $i$  y  $j$ ).

Con base en la matriz de disimilitud generada, un dendrograma se obtuvo usando el procedimiento de agrupamiento UPGMA. El ajuste entre la matriz de disimilitud y el dendrograma fue estimado mediante el coeficiente de correlación cofenética ( $r$ ) de acuerdo con Sokal y Rohlf (1962). La distancia genética media se utilizó como valor de corte para definir los grupos genotípicos. Además, la matriz de puntuación desarrollada se usó para analizar el número efectivo de alelos ( $N_e$ ), diversidad de genes Nei ( $H$ ) y el índice de información de Shannon ( $I$ ) con el programa POPGENE (versión 1.31). El análisis de NTSYS-PC

**Table 2. Quantitative traits from 31 rice mutants derived from MR219.**  
**Cuadro 2. Características cuantitativas de 31 mutantes de arroz derivados de MR219.**

Genotype code	Accession name	PH (cm)	DM (g)	NT	TNG/P	100 GW (g)	TGW/H (g)	SLWR (mm)	Yield (t ha <sup>-1</sup> )
GN1	MR219-ML1	88.8	112	17.83	141.17	2.55	33.26	2.22	5.32
GN2	MR219-ML2	86.13	111	15.67	145.67	2.31	26.6	2.13	4.26
GN3	MR219-ML3	89.07	112	17	157	2.85	30.22	2.34	4.84
GN4	MR219-ML4	84.27	107	14	204.67	2.67	42.21	2.29	6.72
GN5	MR219-ML5	83.47	111	15.5	142.5	2.47	21.12	2.25	3.38
GN6	MR219-ML6	91.27	113	16.17	152.33	2.41	40.48	2.32	6.48
GN7	MR219-ML7	85.27	116	13.17	157.67	2.42	28.8	2.26	4.61
GN8	MR219-ML8	82.73	114	16.17	156.33	2.52	32.27	2.27	5.16
GN9	MR219-ML9	88.87	113	16.17	187.83	2.72	44.55	2.25	7.13
GN10	MR219-ML10	90.4	110	16.17	206.83	2.81	40.79	2.3	6.53
GN11	MR219-ML11	86.53	114	15.33	152.5	2.48	29.46	2.14	4.71
GN12	MR219-ML12	87.07	115	12.83	130.17	2.51	17.91	2.15	2.87
GN13	MR219-ML13	88.67	112	16.5	160	2.63	39.65	2.19	6.34
GN14	MR219-ML14	89.27	109	15	141.17	2.42	29.47	2.4	4.72
GN15	MR219-ML-15	88	111	16.5	157.33	2.51	26.81	2.2	4.29
GN16	MR219-ML16	86.73	112	17.17	172.33	2.54	32.91	2.32	5.27
GN17	MR219-ML17	84.87	111	14.83	160	2.55	28.71	2.27	4.59
GN18	MR219-ML18	85.27	113	14.5	163.17	2.55	31.68	2.36	5.07
GN19	MR219-ML19	84.4	110	15.83	142.67	2.44	33.72	2.3	5.4
GN20	MR219-ML20	87.73	113	19.67	146.5	2.62	27.97	2.34	4.48
GN21	MR219-ML21	80.27	113	17.83	199.17	2.75	39.79	2.34	6.37
GN22	MR219-ML22	84.33	114	15.83	160.83	2.46	27.32	2.18	4.37
GN23	MR219-ML23	87.6	112	16.67	166	2.41	29.5	2.21	4.72
GN24	MR219-ML24	86.13	114	17	158.83	2.42	28.54	2.24	4.57
GN25	MR219-ML25	84.27	115	18.67	163.5	2.63	38.48	2.25	6.16
GN26	MR219-ML26	89.87	116	19.5	158.5	2.51	32.07	2.34	5.13
GN27	MR219-ML27	84.13	113	18.33	153	2.48	36.83	2.26	5.89
GN28	MR219-ML28	91.8	114	16.83	152.83	2.5	29.5	2.4	4.72
GN29	MR219-ML29	83.33	111	15.83	155.17	2.59	31.73	2.35	5.08
GN30	MR219-ML30	83.47	114	15.33	155.83	2.42	27.34	2.36	4.38
GN31	MR219-ML31	83.67	111	16.33	167.83	2.43	29.23	2.31	4.68
GN32	MR219 (parent)	85.27	115	15.67	143.83	2.38	30.52	2.34	4.88
Mean square		48.87 <sup>ns</sup>	50.78 <sup>**</sup>	16.89 <sup>**</sup>	2764 <sup>**</sup>	0.07 <sup>ns</sup>	0.07 <sup>**</sup>	212.84 <sup>**</sup>	5.46 <sup>**</sup>
LSD		5.74	3.07	2.39	27.49	0.02	9.31	0.3	1.48

\*\*significant  $p \leq 0.01$ ; ns; not significant  $p > 0.01$ ; PH: plant height; DM: days to maturity; NT: number of tillers per hill; TNG/P: total number of grains per panicle; 100 GW: one hundred grain weight; TGW/H: total grain weight per hill; SLWR: seed length width ratio; ♦ \*\*significativo  $p \leq 0.01$ ; ns: no significativo  $p > 0.01$ ; PH: altura de la planta; DM: días hasta la maduración; NT: número de brotes por surco; TNG/P: número total de granos por panícula; 100 GW: peso de cien granos; TGW/H: peso total de grano por surco; SLWR: proporción longitud anchura de semilla.

derived mutants were statistically different from one another ( $p \leq 0.01$ ) in their days to maturity, yield and yield components with the exception of 100 grain weight. Days to maturity in mutants were significantly shorter than that of the parent with the exception of lines MR219-ML7 and MR219-ML26. The days to maturity recorded for the 31 derived mutants ranged between 107 d in MR219-ML04 to 116 d in MR219-ML7 and MR219-ML26. The

Mantel se utilizó para determinar la correlación entre caracteres cuantitativos y la información molecular.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Análisis morfológico

Los datos en el Cuadro 2 representan el desempeño promedio de los caracteres agronómicos analiza-

shorter life cycle and variability displayed in other traits reflects the likelihood of having significant improvement of important agronomic traits in rice using mutation breeding. It is worth noting that most of the derived mutants showed better performance than MR219 in days to maturity, numbers of effective tillers, total number of grains per panicle, total grain weight per hill, seed length to width ratio and yield per hectare. Thus, the results showed a considerable amount of variation at the morphological level and the significance of mutation breeding for enhancing genetic variability in breeding programmes. Since mutation breeding enhances the quantitative traits of rice genotypes (Saleem *et al.*, 2005, Shehata *et al.*, 2009, Babaei *et al.*, 2011 and Gomma *et al.*, 1995), we conclude that mutation breeding is a welcoming tool for betterment of rice productivity without denying other methods for the achievement of the same objective.

#### Diversity assessment using quantitative traits

Genetic divergence analysis among the rice genotypes on the basis of quantitative traits plays a part in the selection of the diverse genotypes for further improvements of the rice varieties through breeding (Shahidullah *et al.*, 2009). The diversity analysis using quantitative traits is a traditional approach (Kaw, 1995), but it can be used in classifying and differentiating different genotypes or species in a population (Franco *et al.*, 2001).

In our study, the standardized morphological data were utilized to compute Euclidean distances among the 32 rice genotypes and an UPGMA dendrogram was generated using quantitative traits. The dendrogram showed that similar genotypes tend to cluster together (Figure 1) and the 32 rice genotypes were grouped into five major clusters (Table 3) with dissimilarity coefficient of 1.43. Among the five clusters, groups I and IV had one variety each, group III had the highest number (22) of varieties, and groups II and V had four varieties each. This implies that these groups contain accessions that belong to different lines and would have some morphological and yield differences among themselves (Arif *et al.*, 2005). Varieties clustered together showed close relationship phenotypically, whereas those distant from one another were phenotypically and genetically different. For those clustered together, the irradiation

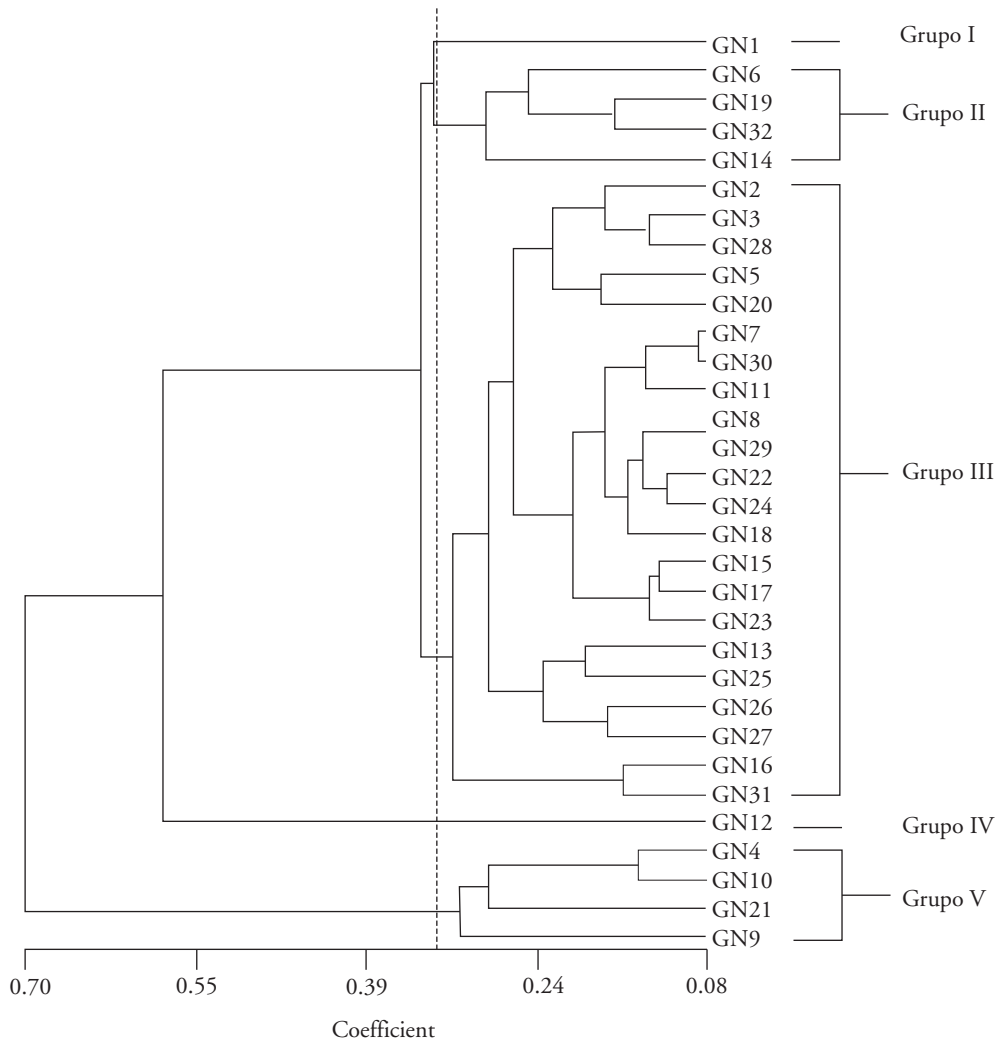
was done in two localities. The results showed that all the genotypes evaluated including MR219 (parent) and its derived mutants were statistically different ( $p \leq 0.01$ ) in their days for maturation, yield and components of yield, except for the weight of 100 grains. The days for maturation in the mutants were significantly shorter than the parental lines, except for the lines MR219-ML7 and MR219-ML26. The days for maturity of the 31 mutants varied between 107, in MR219-ML04 to 116 d in MR219-ML7 and MR219-ML26. The shorter life cycle and the variability shown in other characteristics reflect the probability of having significant improvements in the agronomic variables important in rice using mutagenesis. It is worth noting that the majority of the derived mutants showed better performance than MR219 in the days for maturation, number of effective panicles, total number of grains per panicle, total grain weight per hill, seed length to width ratio and yield per hectare. Thus, the results showed a considerable amount of variation at the morphological level and the significance of mutation breeding for enhancing genetic variability in breeding programmes. Since mutation breeding enhances the quantitative traits of rice genotypes (Saleem *et al.*, 2005; Shehata *et al.*, 2009; Babaei *et al.*, 2011 and Gomma *et al.*, 1995), we conclude that mutation breeding is a welcoming tool for betterment of rice productivity without denying other methods for the achievement of the same objective.

#### Evaluación de la diversidad usando características cuantitativas

El análisis de la divergencia genética entre genotipos de arroz, basado en las características cuantitativas, tiene una función en la selección de genotipos diversos para mejorar las variedades a través de cruzamientos (Shahidullah *et al.*, 2009). El análisis de la diversidad usando caracteres cuantitativos es un enfoque tradicional (Kaw, 1995), pero se puede usar para clasificar y diferenciar los genotipos o las especies en una población (Franco *et al.*, 2001).

En este estudio los datos morfológicos estandarizados se usaron para calcular las distancias euclidianas entre 32 genotipos de arroz y se creó un dendro-





**Figure 1. Clustering pattern of the rice accessions through UPGMA method based on their quantitative traits.**

**Figura 1. Patrón de agrupación de las variantes de arroz, obtenido con el método UPGMA basados en sus características cuantitativas.**

Abbreviation: GN1 - GN32, as in Table 2 ♦ Abreviaturas: GN1 - GN31, como en el Cuadro 2.

probably changed similar components of their genes; therefore, they will appear similar to showcase their genetic composition, due to mutation brought about by irradiation. These dissimilarities might be traced to environmental influence on the varieties or accessions over a period of time. Thus, crossing between these closely related varieties would not be an agronomic advantage because it will result in low heterotic vigour and degeneration of offspring.

For distant genotypes, it could be inferred that chromosomal changes caused by irradiation treatments took place at different locations and

grama UPGMA con las características cuantitativas. El dendrograma mostró que los genotipos similares tienden a agruparse (Figura 1) y los 32 genotipos fueron agrupados en cinco grupos principales (Cuadro 3), con un coeficiente de disimilitud de 1.43. De los cinco grupos, el I y IV tuvieron cuatro variedades cada uno, el III tuvo el número mayor (22) de variedades y los grupos II y V tuvieron cuatro variedades cada uno. Esto indica que los grupos contienen variantes que pertenecen a líneas diferentes y podrían tener algunas diferencias morfológicas y de rendimiento entre ellas (Arif *et al.*, 2005). Variedades

**Table 3. Eigenvectors and eigenvalues of the first four principal components.****Cuadro 3. Eigenectores y eigenvalores de los primeros cuatro componentes principales.**

Variable	Eigenvectors			
	PC1	PC2	PC3	PC4
Eigenvalue	3.8411	2.9991	1.9605	1.7737
Proportion of variance (%)	24	18.7	12.3	11.1
Cumulative variance (%)	24	42.8	55	66.1
PH	-0.056	0.055	0.112	-0.275
NT	-0.223	-0.34	0.112	-0.385
DM	0.156	-0.433	-0.103	0.239
TNG/P	-0.389	0.112	-0.234	0.221
100GW	-0.365	0.013	-0.131	0.01
TGW/H	-0.443	0.037	-0.209	0.061
SLWR	-0.241	-0.118	0.508	0.137
Y/ha	-0.444	0.036	-0.208	0.061

levels in the chromosome; thus, differences between genotypes would be wider. These changes are important for breeding programmes as this will lead to achievement of higher heterotic vigour, which is the ultimate aim of breeding programmes especially those designed for food security and other agricultural or aesthetic purposes. Higher genetic diversity that might be advantageous to breeding varieties with desirable traits is the lot of mutation breeding in rice (Latif *et al.*, 2001a, b), and as such it is well rooted in this study. This implies that mutation breeding will be a tool for generating genetic divergence in order to attain desirable traits in rice or other cultivars.

PCA is a multivariate grouping approach based on similarity coefficients or variance-covariance or correlation values. In our study it showed diversity among 32 rice accessions through few eigenvectors. Therefore, it is expected to be highly informative about the differences of major groups (Behera *et al.*, 2012).

In our study, the first four principal components (PC) contributed 66.1 % of the total variation out of which PC1 explained 24 % of the variation, and PC2, PC3 and PC4 explained 18.7 %, 12.3 %, and 11.1 %, respectively (Table 4). These results are due to the fact that the highest level of variation is usually recorded in the first or the second or both PC. Thus, for the total variation, 42.8% was explained by PC1 and PC2 in our study; and 82.7 % by PC1 among

en el mismo grupo mostraron relación fenotípica cercana, mientras aquellas distantes fueron fenotípica y genéricamente diferentes unas de las otras. En aquellas del mismo grupo, la radiación probablemente cambió componentes similares de sus genes, por tanto, parecerán similares en su composición genética, debido a mutaciones por la radiación. Estas diferencias podrían atribuirse a la influencia ambiental en las variedades o a las adhesiones durante un periodo de tiempo. Por tanto, la cruza entre estas variedades cercanamente emparentadas no sería una ventaja agronómica porque resultaría en vigor heterótico bajo y degeneración de la progenie.

Para genotipos distantes podría inferirse que los cambios cromosómicos causados por el tratamiento de irradiación sucedieron en diferentes lugares y niveles en el cromosoma; por tanto, las diferencias entre genotipos serían amplias. Estos cambios son importantes para los programas de mejoramiento ya que se logró más vigor heterogéneo, que es el objetivo de esos programas, en especial los diseñados para la seguridad alimentaria u otros propósitos agronómicos o estéticos. La mayor diversidad genética que podría ser ventajosa para variedades cultivadas con caracteres deseables es el objetivo de la mutagénesis en arroz (Latif *et al.*, 2001a, b), y por tanto está bien fundamentado en este estudio. Esto implica que la mutagénesis será una herramienta para generar diversidad genética y obtener caracteres deseables en arroz u otros cultivos.

El ACP es una aproximación de agrupamiento multivariado basada en coeficientes de similaridad o varianza-covarianza o valores de correlación. En nuestro estudio mostró diversidad entre 32 grupos de arroz a través de pocos eigenvectores. Por tanto, se espera que sea muy informativo acerca de las diferencias de los grupos principales (Behera *et al.*, 2012).

En nuestro estudio, los primeros cuatro componentes principales (CP) contribuyeron con 66.1 % del total de la variación, de ésta el CP1 explicó 24 % y el CP2, CP3 y CP4 exhibieron 18.7, 12.3 y 11.1 % (Cuadro 4). Estos resultados se deben a que el nivel mayor de variación es usualmente registrado en el primero, el segundo o ambos CP. Por tanto, en nuestro estudio del total de la variación, 42.8 % fue explicada por el CP1 y CP2; y 82.7 % por CP1 entre 32 genotipos de arroz (Lasalita-Zapico *et al.*, 2010), y 68.6 % por el CP1 y CP2 (Caldo *et al.*, 1996).

**Table 4. Genetic diversity parameters produced by 25 ISSR markers.**  
**Cuadro 4. Parámetros de diversidad genética producidos por 25 marcadores ISSR.**

S/N	Marker	Number of polymorphic loci	Nei's gene diversity	Polymorphic information content value	No. of effective alleles	Shannon's information index
1	ISSR1	18	0.39	0.31	1.23	0.22
2	ISSR2	18	0.34	0.28	1.24	0.24
3	ISSR3	19	0.4	0.32	1.3	0.28
4	ISSR4	17	0.42	0.33	1.34	0.29
5	ISSR5	13	0.36	0.29	1.2	0.18
6	ISSR6	19	0.39	0.32	1.24	0.22
7	ISSR7	15	0.39	0.32	1.27	0.25
8	ISSR8	17	0.39	0.31	1.28	0.25
9	ISSR9	17	0.37	0.3	1.28	0.26
10	ISSR10	22	0.36	0.29	1.2	0.2
11	ISSR11	21	0.29	0.24	1.14	0.15
12	ISSR12	19	0.4	0.32	1.25	0.22
13	ISSR13	12	0.42	0.33	1.18	0.18
14	ISSR14	19	0.41	0.33	1.26	0.22
15	ISSR15	18	0.38	0.31	1.25	0.24
16	ISSR16	19	0.31	0.26	1.15	0.15
17	ISSR17	18	0.36	0.29	1.25	0.23
18	ISSR18	22	0.35	0.29	1.24	0.23
19	ISSR19	21	0.35	0.29	1.19	0.19
20	ISSR20	19	0.33	0.28	1.21	0.21
21	ISSR21	11	0.25	0.22	1.18	0.17
22	ISSR22	16	0.44	0.34	1.38	0.35
23	ISSR23	15	0.46	0.35	1.38	0.34
24	ISSR24	17	0.45	0.35	1.24	0.22
25	ISSR25	21	0.44	0.34	1.23	0.23

32 rice genotypes (Lasalita-Zapico *et al.*, 2010), and 68.6 % by PC1 and PC2 (Caldo *et al.*, 1996).

#### Cluster analysis using ISSR markers

The selected primers generated 443 clear polymorphic bands (Table 4) and gel pictures of ISSR markers showing different patterns of polymorphism are shown in Figures 2 and 3. The size of the amplified products ranged from 100 to 3000 bp. The number of bands generated per primer varied from 11 to 22. Primer ISSR21 generated the minimum number of bands, whereas the peak was observed in primers ISSR10 and ISSR18, and average number of bands per primer was 18. Overall, bands were 85.10 % polymorphic in the accessions evaluated. Monomorphic bands are constant bands and cannot be used to study diversity, whereas polymorphic bands reveal differences that can be used to examine and

#### Análisis de agrupamiento usando marcadores ISSR

Los iniciadores seleccionados generaron 443 bandas polimórficas claras (Cuadro 4). Las imágenes de los geles de los marcadores ISSR que muestran patrones diferentes de polimorfismo se presentan en las Figuras 2 y 3. El tamaño de los productos amplificados varió de 100 a 3 000 pb. El número de bandas generado por iniciador varió de 11 a 22. El iniciador ISSR21 generó el número menor de bandas, mientras que el mayor se observó con ISSR10 e ISSR18; el número promedio de bandas por iniciador fue 18. En total, 85.10 % de las bandas fueron polimórficas en las variantes evaluadas. Las bandas monomórficas son constantes y no pueden usarse para estudiar la diversidad, mientras que las bandas polimórficas revelan diferencias que se pueden usar para examinar y establecer relaciones sistemáticas entre individuos y

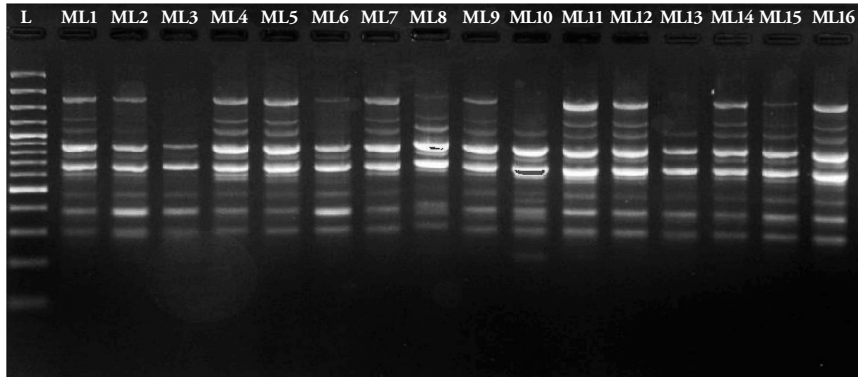


Figure 2. ISSR agarose gel profile of mutant lines 1 to 16 of MR219 using primer ISSR4.

Figura 2. Perfil de gel de agarosa ISSR de las líneas mutantes 1 a 16 de MR219 usando el iniciador ISSR4.

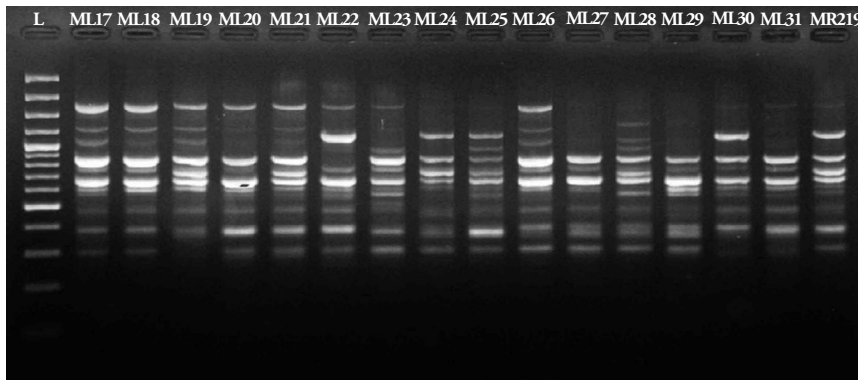


Figure 3. ISSR agarose gel profile of mutant lines 17 to 31 and the control (MR219) using primer ISSR4.

Figura 3. Perfil de gel de agarosa ISSR de las líneas mutantes 17 a 31 y el testigo (MR219) usando el iniciador ISSR4.

establish systematic relationships among individuals and populations. The number of alleles detected depends upon fingerprinting techniques and materials used in the study (Thomson *et al.*, 2009; Kaushik *et al.*, 2011). The variation in the number of bands amplified by different primers is due to factors such as primer structure, template quantity and number of annealing sites in the genome (Muralidharan and Wakeland, 1993). Each individual primer has a unique multi-locus phenotype.

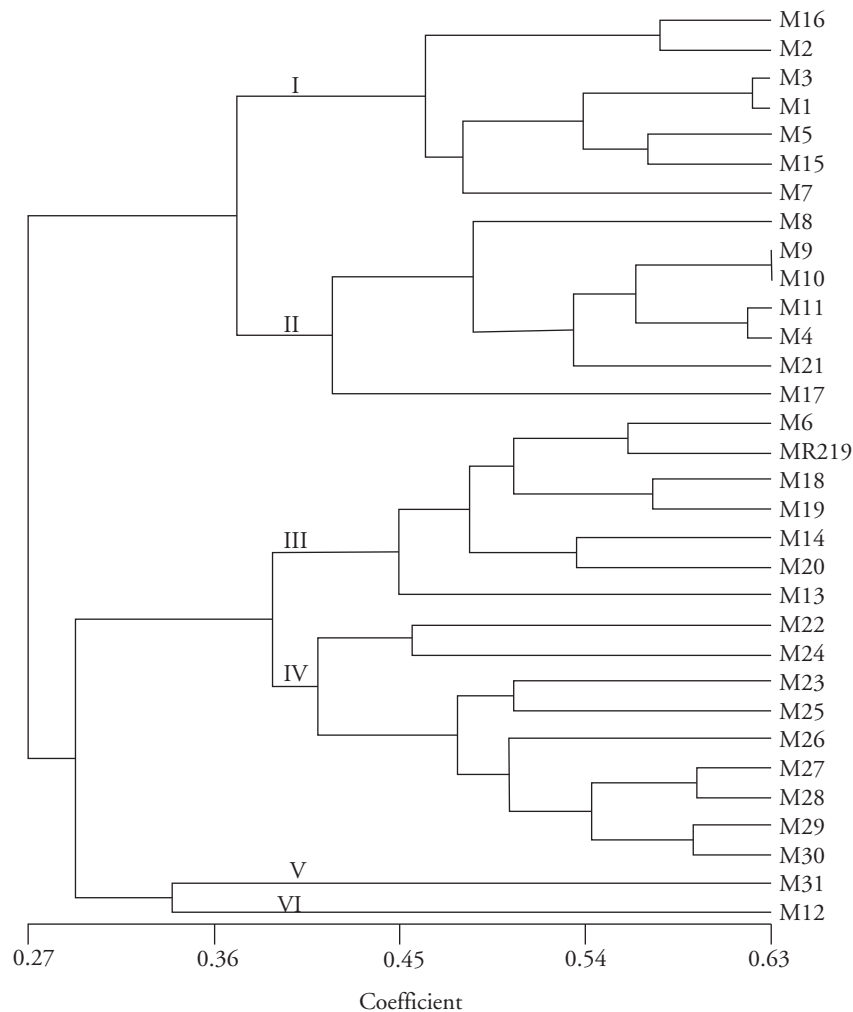
Jaccard's genetic similarity coefficient among rice genotypes ranged from 0.17 to 0.63 in our study. This indicates a high level of genetic variability because dendrogram coefficients ranging from 0.04 to 0.92 are categorized as great indicators of variation among rice genotypes (Tu *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2009). The lowest genetic similarity was observed between MR219-ML8 and MR219-ML22, whereas the highest similarity was found between MR219-ML9 and MR219-ML10. The difference between the highest and the lowest values of genetic distance showed a wide range of variability among the 32 accessions evaluated. Genotypes were grouped into

poblaciones. El número de alelos detectados depende de las técnicas de huellas genéticas y los materiales usados en el estudio (Thomson *et al.*, 2009; Kaushik *et al.*, 2011). La variación en el número de bandas amplificadas por diferentes iniciadores se debe a factores como la estructura del iniciador, la cantidad de plantilla y el número de sitios recocidos en el genoma (Muralidharan y Wakeland, 1993). Cada iniciador individual tiene un fenotipo multi-locus único.

El coeficiente de similitud genética de Jaccard entre los genotipos de arroz varió de 0.17 a 0.63 en nuestro estudio. Esto indica un nivel alto de variabilidad genética, debido a que los coeficientes del dendrograma que varían de 0.04 a 0.92 se categorizaron como grandes indicadores de la variación entre genotipos de arroz (Tu *et al.*, 2007; Wong *et al.*, 2009). La similitud genética menor se observó entre MR219-ML8 y MR219-ML22, mientras que la similitud mayor se encontró entre MR219-ML9 y MR219-ML10. La diferencia entre el mayor y el menor valor de distancia genética mostró un intervalo amplio de variabilidad ente las 32 variantes evaluadas. Los genotipos fueron agrupados en seis grupos principales

six major clusters with a threshold genetic distance of 0.396. The highest number of genotypes was found in cluster IV with nine, followed by clusters I, II and III with seven, and clusters V and VI had only one genotype each (Figure 4). High genetic diversity among mutant rice varieties in our study might be due to the effect of ion beam irradiation. The genetic diversity in the genotypes of clusters V and VI could be explained by some morphological or agronomical traits that differentiated them from the other varieties or genotypes (Arif *et al.*, 2005).

con una distancia genética umbral de 0.396. Nueve fue el número mayor de genotipos y se encontró en el grupo IV, lo siguieron los grupos I, II y III con siete, y los grupos V y VI tuvieron solo un genotipo (Figura 4). La diversidad genética alta entre variedades mutantes de arroz en nuestro estudio pudo deberse al efecto de la radiación del haz de iones. La diversidad genética de los genotipos en los grupos V y VI pudo explicarse por algunas características morfológicas o agronómicas que los diferenciaron de otras variedades o genotipos (Arif *et al.*, 2005).



**Figure 4. Dendrogram of 31 mutant lines (M5 genotypes) and the control (MR219) based on ISSR marker analysis constructed with UPGMA method.**

**Figura 4. Dendrograma de 31 líneas mutantes (genotipos M5) y el control (MR219) basados en análisis de marcadores ISSR construidos con el método UPGMA.**

### Genetic diversity with ISSR markers

Several rice genotypes were studied using enzymatic markers (Glaszmann, 1987), physiological and morphological characters (Oka, 1988; Vairavan *et al.*, 1973), as well as molecular markers. These molecular markers included RFLP (Mc Couch and Tanksley, 1991), microsatellite (Yang *et al.*, 1994), RAPD (Sarma and Bahar, 2005) and ISSR (Bhuyan, 2007). It is argued that ISSRs are not suitable for estimating the effective number of alleles ( $N_e$ ) and Nei's gene diversity ( $H$ ) because different bands on the gels do not imply different alleles. Therefore, it should be taken into account that estimates of diversity as number of alleles and Nei's gene diversity shown in our study by using dominant markers are likely underestimated. Average values for  $N_e$  ranged from 1.14 to 1.38 among the 25 markers, between 0.25 to 0.46 for  $H$ , from 0.15 to 0.35 for Shannon's information index ( $I$ ), and for PIC between 0.22 for ISSR21 and 0.35 for ISSR23 and ISSR24 (Table 4). The PIC value provides an estimate of the discriminating power of a marker based on the number of alleles at a locus and relative frequencies of these alleles. These values shown for  $N_e$ 's gene diversity, Shannon's information index and PIC might be slightly lower or higher in different research areas (Mazid *et al.*, 2013, Singh *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2012). The outcome of our study further establishes that the range of values for these diversity parameters is around 0.20. It should be noted that the minimum and maximum for each of these parameters are not usually or supposedly to be similar or the same, as reported by Mazid *et al.* (2013) for PIC and by Cheng *et al.* (2012) for Nei's gene diversity values. Determination of minimum and maximum value could be linked to the use of different markers as well as examination of different varieties or species.

### Correlation between phenotypic and ISSR markers data

The correlation between the Euclidean distance matrices based on the phenotypic traits and ISSR data was  $r=0.2$ , which indicates a low positive correlation between quantitative traits and ISSR markers. The reduced level of association between molecular and quantitative traits might be due to the uncontrollable influence of the environmental factors

### Diversidad genética con marcadores ISSR

Varios genotipos de arroz fueron estudiados usando marcadores enzimáticos (Glaszmann, 1987), características fisiológicas y morfológicas (Oka, 1988; Vairavan *et al.*, 1973), y marcadores moleculares. Estos marcadores moleculares incluyeron RFLP (Mc Couch y Tanksley, 1991), microsatelites (Yang *et al.*, 1994), RAPD (Sarma y Bahar, 2005) e ISSR (Bhuyan, 2007). Se argumenta que los ISSRs no son adecuados para estimar el número efectivo de alelos ( $N_e$ ) y la diversidad genética de Nei ( $H$ ) debido a que las bandas en los geles no implican diferentes alelos. Por tanto se debe tomar en cuenta que las estimaciones de diversidad dado el número de alelos y diversidad genética de Nei mostrada en este estudio usando marcadores dominantes, están probablemente subestimadas. Los valores promedio de  $N_e$  variaron de 1.14 a 1.38 entre los 25 marcadores, de 0.25 a 0.46 para  $H$ , 0.15 y 0.35 para el índice de información de Shannon ( $I$ ), 0.22 para el PIC con ISSR21 y 0.35 para ISSR23 y ISSR24 (Cuadro 4). El valor PIC provee un estimado del poder discriminante de un marcador basado en el número de alelos en un locus y la frecuencia relativa de estos alelos. Estos valores mostraron que la diversidad genética de  $N_e$ , el índice de información de Shannon y el PIC pueden ser ligeramente menor o mayor en diferentes áreas de investigación (Mazid *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2010; Cheng *et al.*, 2012). Los resultados de nuestro estudio además establecen que el intervalo de los valores de estos parámetros de diversidad es cercano a 0.2. Debe notarse que el mínimo y el máximo de cada uno de estos parámetros no es usual o supuestamente similar o el mismo, como lo reportan Mazid *et al.* (2013) para el PIC, y por Cheng *et al.* (2012) para los valores de diversidad genética de Nei. La determinación de los valores mínimos y máximos se podría asociar al uso de diferentes marcadores así como la evaluación de diferentes variedades o especies.

### Correlación entre información fenotípica y de marcadores ISSR

La correlación entre las matrices de distancias euclidianas basadas en las características fenotípicas y la información ISSR fue  $r=0.2$ , que indica una correlación positiva baja entre los caracteres cuantitativos y los marcadores ISSR. La asociación baja en-

on the quantitative traits, because molecular work is less influenced by the environment. This is the usual trend of the association between quantitative traits and molecular analyses in a single crop (Mazid *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2011). Thus, varietal or genotype selection and related decisions could be reliably based on the molecular result.

The overall results obtained from both quantitative and molecular data indicate that irradiation might introduce a significant level of genetic and morphological diversities in mutant lines, relative to what is inherent in the parent. Genetic diversity is evident through the use quantitative traits and it is confirmed at the molecular level (Babaei, 2010; Domingo *et al.*, 2007). This is attested to by the result of the correlation between molecular and quantitative trait parameters in our study; besides, our results showed that irradiation could generate a considerable amount of genetic variability, and provide new avenues for crop improvement and diversification (Elayaraja *et al.*, 2005; Luzi-Kihupi *et al.*, 2009). This crop improvement might also be successful development of mutant lines with desirable traits, which are absent in the parent (Shehata *et al.*, 2009). The similarity coefficients, dendrogram clusters and principal component analysis from the ISSR data in the M5 population, were highly correlated with the quantitative trait results. This shows the effectiveness of ISSR markers in varietal identification and detection of mutants with high reproducibility levels. Therefore, ISSR markers might overcome the major limitations to the methods of low reproducibility of RAPD, high cost of AFLP and the need to know the flanking sequences to develop species specific primers for SSR polymorphism (Reddy *et al.*, 2002).

## CONCLUSIONS

Both quantitative traits and molecular markers are useful tools for assessing genetic variability and diversity of mutant rice genotypes. There was a positive low correlation between quantitative trait and molecular data. Based on the molecular analysis, the diversity between MR219-ML8 and MR219-ML22 suggests that successful crossings could be done between them to develop high yielding varieties. Besides, there was genetic stability of the mutants because all ISSR markers showed homozygous bands. Finally, the best lines are MR219-ML10

tre características cuantitativas y moleculares podría deberse a la influencia no controlada de los factores ambientales en las primeras, porque el trabajo molecular es menos afectado por el ambiente. Esta es la tendencia común de la asociación entre los características cuantitativas y los análisis moleculares en un solo cultivo (Mazid *et al.*, 2013; Singh *et al.*, 2011). Por ello, la selección varietal o genotípica y decisiones relacionadas pueden estar confiablemente basadas en el resultado molecular.

Todos los resultados cuantitativos y moleculares obtenidos indican que la radiación podría inducir un nivel significativo de diversidad genética y morfológica en líneas mutantes, en relación a lo inherente en el padre. La diversidad genética es evidente a través del uso de características cuantitativas y se ha confirmado en el nivel molecular (Babaei, 2010; Domingo *et al.*, 2007). Esto se evidencia con el resultado de la correlación entre los parámetros de los rasgos cuantitativos y moleculares en nuestro estudio; además, nuestros resultados mostraron que la radiación podría generar una variabilidad genética considerable, y proveer nuevas avenidas para el mejoramiento de cultivos y su diversificación (Elayaraja *et al.*, 2005; Luzi-Kihupi *et al.*, 2009). Este mejoramiento de los cultivos podría también ser un desarrollo exitoso de líneas mutantes con características deseables, ausentes en los padres (Shehata *et al.*, 2009). Los coeficientes de similitud, dendrogramas y análisis de componentes principales de la información del ISSR en la población de M<sub>5</sub> tuvieron correlaciones altas con los resultados de las características cuantitativas. Esto muestra la efectividad de los marcadores ISSR en la identificación varietal y la detección de mutantes con niveles altos de reproducibilidad. Así, los marcadores ISSR podrían superar las principales limitaciones para los métodos RAPD de baja reproducibilidad, los AFLP de costos altos y la necesidad de conocer las secuencias laterales para desarrollar iniciadores específicos para polimorfismos SSR (Reddy *et al.*, 2002).

## CONCLUSIONES

Las características cuantitativas y los marcadores moleculares son herramientas útiles para evaluar la variación y diversidad genética de genotipos mutantes de arroz. Hubo una correlación positiva baja entre las características cuantitativas y los datos moleculares. Con base en el análisis molecular, la diversidad

and MR219-ML4 followed by MR219-ML9 and MR219-ML21 for higher grain yield production.

#### ACKNOWLEDGMENT

The authors would like to acknowledge the financial support of IAEA's Coordinated Research Project (CRP) for Food and Feed [CRP Code: D2.30.30]. We also appreciate Malaysia Ministry of Education for Long-Term Research Grant Scheme (LRGS) on enhancing sustainable rice production and MOSTI for Science Fund (06-03-01-SF0110).

#### LITERATURE CITED

- Ajibade, S. R., N. F. Weeden and S. M. Chite. 2000. Inter-simple sequence repeat analysis of genetic relationships in the genus *Vigna*. *Euphytica* 111: 47-55
- Arif, M., S. Kousar, M. Asghar Bajwa, A. Arif, and Y. Zafar. 2005. Genetic diversity among rice genotypes of Pakistan through random amplified polymorphic DNA (RAPD) analysis. *Pak. J. Bot.* 37: 585-592.
- Babaei, A. 2010. Genetic diversity analysis of Nemat rice mutant (*Oryza sativa* L.) via RAPD marker. *American-Eurasian J. Agric. Environ. Sci.* 8: 452-456.
- Babaei, A., G. A. Nematzadeh, and H. Hashemi. 2011. An evaluation of genetic differentiation in rice mutants using semi-random markers and morphological characteristics. *Austr. J. Crop Sci.* 5: 1715-1722.
- Baloch, A. W., A. M. Soomro, M. A. Javed, H. R. Bughio, S. M. Alam, M. S. Bughio, T. Mohammed, and N. N. Mastoi. 2003. Induction of salt tolerance in rice through mutation breeding. *Asian J. Plant Sci.* 2: 273-276.
- Bashar, Z., U. A. Wayayok, and A. M. S. Mohd. 2014. Determination of some physical properties of common Malaysian rice MR219 seeds. *Austr. J. Crop Sci.* 8: 332-337.
- Behera, L., B. C. Patra, R. K. Sahu, A. Nanda, S. C. Sahu, A. Patnaik, G. J. N. Rao, and O. N. Singh. 2012. Assessment of genetic diversity in medicinal rices using microsatellite markers. *Austr. J. Crop Sci.* 6: 1369-1376.
- Bhuyan, N., B. K. Borah and R. N. Sarma. 2007. Genetic diversity analysis in traditional lowland rice (*Oryza sativa* L.) of Assam using RAPD and ISSR markers. *Current Sci.* 93: 967-972.
- Caldo, R. A., L. S. Sebastian, and J. E. Hernandez. 1996. Morphology-based genetic diversity analysis of ancestral lines of Philippine rice cultivars. *Phil. J. Crop Sci.* 21: 86-92.
- Charters, Y. M. and M. J. Wilkinson. 2000. The use of self-pollinated progenies as 'in-groups' for the genetic characterization of cocoa germ plasm. *Theor. Appl. Genet.* 100: 160-166.
- Cheng, Z. Q., F. Y. Ying, D. Q. Li, T. Q. Yu, J. Fu, H. J. Yan, and X. Q. Huang. 2012. Genetic diversity of wild rice species in Yunnan province of China. *Rice Sci.* 19: 21-28.
- Domingo, C., F. Andrés, and M. Talón. 2007. Rice cv. Bahía mutagenized population: a new resource for rice breeding in the Mediterranean basin. *Spanish J. Agric. Res.* 5: 341-347.
- entre MR219-ML8 y MR219-ML22 sugiere que la cruce exitosa puede lograrse entre ellos para desarrollar variedades altamente productivas. Además, existió estabilidad genética de los mutantes porque todos los marcadores ISSR mostraron bandas homocigóticas. Finalmente, las líneas con productividad mayor de granos son MR219-ML10 y MR219-ML4, seguidas por MR219-ML9 y MR219-ML21.

—Fin de la versión en Español—





- Lasalita-Zapico, F. C., J. A. Namocatcat, and J. L. Cariño-Turner. 2010. Genetic diversity analysis of traditional upland rice cultivars in Kihan, Malapatan, Sarangani Province, Philippines using morphometric markers. *Phil. J. Crop Sci.* 139: 177–180.
- Latif M. A., M. R. Yusop, M. M. Rahman, and M. R. Bashar Talukdar. 2011a. Microsatellite and minisatellite markers based DNA fingerprinting and genetic diversity of blast and ufra resistant genotypes. *Comptes Rendus Biol.* 334: 282–289.
- Latif, M. A., M. M. Rahman, M. S. Kabir, M. A. Ali, M. T. Islam, and M. Y. Rafi. 2011b. Genetic diversity analyzed by quantitative traits among rice (*Oryza sativa* L.) genotypes resistant to blast disease. *Afr. J. Microbiol. Res.* 5: 4383–4391.
- Levin, I., N. Gilboa, E. Yeselson, S. Shen, and A. A. Schaffer. 2000. *Fxr*, a major locus that modulates the fructose to glucose ratio in mature tomato fruits. *Theor. Appl. Genet.* 100: 256–262.
- Luzi-Kihupi, A., J. A. Zakayo, H. Tusekelege, M. Mkuya, N. J. M. Kibanda, K. J. Khatib, and A. Maerere. 2009. Mutation breeding for rice improvement in Tanzania. Book of Abstracts, International Symposium on Induced Mutations in Plants Held at Vienna, Austria 12–15 August 2008. FAO. Rome. pp: 177.
- Mazid, M. S., M. Y. Rafii, M. M. Hanafi, H. A. Rahim, and M. A. Latif. 2013. Genetic variation, heritability, divergence and biomass accumulation of rice genotypes resistant to bacterial blight revealed by quantitative traits and ISSR markers. *Physiologia Plantarum* 149: 432–447.
- McCouch, S. R., and S. D. Tanksley. 1991. Development and use of restriction fragment length polymorphism in rice breeding and genetics. *In: Khush, G. S., and G. H. Toenniessen* (eds). *Rice Biotechnology. Biotechnology in Agriculture No. 6.* International Rice Research Institute. Manila, Philippines. pp: 109–133.
- Muralidharan, K., and E. K. Wakeland. 1993. Concentration of primer and template qualitatively affects products in random-amplified polymorphic DNA PCR. *Biotechniques* 14: 362–364.
- Oka, H. I. 1988. Indica-Japonica differentiation of rice cultivars. *In: Oka, H. I.* (ed). *Origin of Cultivated Rice.* Japan Science Society Press/Elsevier. Tokyo/Amsterdam. pp: 141–179.
- Pasakinskiene, I., C. M. Griffiths, A. J. E. Bettany, Y. Paplauskiene, and M. W. Humphreys (2000) Anchored simple-sequence repeats as primers to generate species-specific DNA markers in *Lolium* and *Festuca* grasses. *Theor. Appl. Genet.* 100: 384–390.
- Prevost, A. and M. J. Wilkinson. 1999. A new system of comparing PCR primers applied to ISSR fingerprinting of potato cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 98: 107–112.
- Qayyoom, A., M. U. Mufti, and S. A. Rabbani. 2000. Evaluation of different rice genotypes for stability in yield performance. *Pak. J. Scient. Ind. Res.* 43: 188–190.
- Reddy, M. P., N. Sarla, and E. A. Siddiq. 2002. Inter simple sequence repeat (ISSR) polymorphism and its application in plant breeding. *Euphytica* 128: 9–17.
- Rohlf, F. J. 2000. NTSYS-pc: numerical taxonomy and multivariate analysis system, version 2.1. Exeter Software.
- Saleem, M. Y., Z. Mukhtar, A. A. Cheema, and B. M. Atta. 2005. Induced mutation and *in vitro* techniques as a method to induce salt tolerance in Basmati rice (*Oryza sativa* L.). *Int. J. Environ. Sci. Technol.* 2: 141–145.
- Sarma, R. N., and B. Bahar. 2005. Genetic variation of Bora rice (glutinous rice) of Assam as revealed by RAPDs. *Plant Genetic Resources Newsletter* 144:34–38.
- SAS Institute. (2002). SAS/STAT software, version 9.1.
- Shah, S. M., S. A. Naveed, and M. Arif. 2013. Genetic diversity in basmati and non-basmati rice varieties based on microsatellite markers. *Pak. J. Bot.* 45: 423–431.
- Shahidullah, S. M., M. M. Hanafi, M. Ashrafuzzaman, M. R. Ismail, and M. A. Salam. 2009. Phenological characters and genetic divergence in aromatic rices. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 3199–3207.
- Sharma, A., and S. K. Singh. 2013. Induced mutation-a tool for creation of genetic variability in rice (*Oryza sativa* L.). *J. Crop Weed* 9: 132–138.
- Shehata, S. M., M. H. Ammar, A. F. Abdelkalik, and B. A. Zayed, 2009. Morphological, molecular and biochemical evaluation of Egyptian jasmine rice variety and its  $M_5$  derived mutants. *Afr. J. Biotechnol.* 8: 6110–6116.
- Singh V. K., P. Upadhyay, P. Sinha, A. K. Mall, S. K. Jaiswal, A. Singh, R. K. Ellur, S. Biradar, R. M. Sundaram, S. Singh, I. Ahmed, B. Mishra, A. K. Singh, and C. Kole. 2011. Determination of genetic relationships among elite thermosensitive genic male sterile lines (TGMS) of rice (*Oryza sativa* L.) employing morphological and simple sequence repeat (SSR) markers. *J. Genet.* 90: 11–19.
- Singh, S., R. K. Gautam, R. K. Singh, R. Deshmukh, and A. Ojha. 2010. Molecular diversity in rice genotypes differing in physiological mechanisms of salt tolerance through SSR and ISSR markers. *Int. J. Applied Biol. Pharmaceut. Technol.* 1: 550–560.
- Sokal, R. R. and F. J. Rohlf. 1962. The comparison of dendrograms by objective methods. *Taxon* 11: 33–40.
- Thomson, M. J., N. R. Polato, J. Prasetyono, K. R. Trijatmiko, T. S. Silitonga, and S. R. McCouch. 2009. Genetic diversity of isolated populations of Indonesian landraces of rice (*Oryza sativa* L.), collected in East Kalimantan on the Island of Borneo. *Rice* 2: 80–92.
- Tu, M., B. R. Lu, Y. Zhu, and Y. Wang. 2007. Abundant within-varietal genetic diversity in rice germplasm from Yunnan Province of China revealed by SSR fingerprints. *Biochem. Genet.* 45: 789–801.
- Vairavan, S., E. A. Siddiq, V. Arunachalam, and M. S. Swaminathan. 1973. A study on the nature of genetic divergence in rice from Assam and North East Himalayas. *Theor. Appl. Genet.* 43:213–221.
- Weising, K., P. Winter, B. Hüttel, and G. Kahl. 1998. Microsatellites markers for molecular breeding. *J. Crop Prod.* 1: 113–143.
- Wong, S. C., P. H. Yiu, S. T. W. Bong, H. H. Lee, P. N. P. Neoh, and A. Rajan. 2009. Analysis of Sarawak Bario rice diversity using microsatellite markers. *Am. J. Agric. Biol. Sci.* 4:298–304.
- Yang, G. P., M. A. Saghai Maroof, C. G. Xu, Q. Zang, and R. M. Biyashev. 1994. Comparative analysis of microsatellite DNA polymorphism in landraces and cultivars of rice. *Mol. General Genet.* 245: 187–194.

Ziętkiewicz, E., A. Rafalski, and D. Labuda. 1994. Genomic fingerprinting by simple sequence repeat (SSR)-anchored polymerase chain reaction amplification. *Genomics* 20: 176-183.