

**UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMÍA
COMISIÓN DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRÍCOLAS
MARACAY**

**ESTUDIO DE HERENCIA DE LA RESISTENCIA EN ARROZ AL
HONGO *Rhizoctonia solani* Y SU ASOCIACIÓN CON MARCADORES
MOLECULARES MICROSATÉLITES.**

Autor: Reinaldo Cardona
Tutora: Dra. Nelly Delgado

Maracay de de 2013

Trabajo de grado presentado como requisito final para optar al título de

Doctor en Ciencias Agrícolas

Comité Asesor

Dra. Nelly Delgado

Tutora

Dra. Catalina Ramis

Asesora

Dra. Iris Pérez

Asesora

AGRADECIMIENTO Y DEDICATORIA

RESUMEN

ESTUDIO DE HERENCIA DE LA RESISTENCIA EN ARROZ AL HONGO *Rhizoctonia solani* Y SU ASOCIACIÓN CON MARCADORES MOLECULARES MICROSATÉLITES.

Con el fin de investigar la herencia de la resistencia en el arroz a *Rhizoctonia solani*, (causante de la pudrición de la vaina en arroz, PDV) y su asociación con microsatélites marcadores moleculares se hicieron un par de cruces entre los padres de arroz resistentes (Palmar y Jefferson) y susceptibles (Fonaiap1 y Fonaiap2000) para obtener dos poblaciones experimentales para evaluar la herencia de la resistencia a *R. solani* y determinar la asociación con microsatélites que mostraron polimorfismos entre los padres evaluados. La progenie F2 de Palmar por Fonaiap1 y Jefferson por Fonaiap2000, en el comienzo de la emergencia de la panícula, se inocularon 4 hojas en el nudo dentro de la vaina con micelio del hongo cultivado en agar y se colocaron las plantas en una cámara de humedad durante una semana. Después de este tiempo se midió el área afectada por la enfermedad de PDV en cada planta y se agruparon de acuerdo a la escala de evaluación. De la progenie y sus descendientes se tomaron muestras de hojas para la extracción de ADN para evaluar los marcadores moleculares microsatélites seleccionados de la página web Graminae y se amplificó con la ayuda de un termociclador, los productos amplificados se colocaron individualmente en los pocillos de un gel de agarosa al 3% y se llevó a cabo la electroforesis en la cámara para esto. Para la detección de QTLs que confieren resistencia a PDV, se utilizó el método de mapeo por intervalos compuestos usando el descargas de Windows QTL Cartographer 2,5 decretando la presencia de QTL con umbral $LOD > 2,4$ ($P = 0,05$). No se detectaron QTL en la progenie de cruces entre Jefferson X F2000, mientras que la progenie de los cruces Pamar X Fonaiap1 se detectaron 3 QTLs localizados en los cromosomas 1, 4 y 12, flanqueado por los marcadores RM 572 y RM449, RM273 y RM3471, RM3472 y RM309, respectivamente. Los QTLs detectado en este trabajo son una valiosa contribución al estudio de la resistencia en el arroz a *R. solani*

Palabras clave: *Rhizoctonia*; arroz; microsatélites; resistencia

ABSTRACT

STUDY ON INHERITANCE OF RESISTANCE TO RICE *RHIZOCTONIA SOLANI* AND ITS ASSOCIATION WITH MICROSATELLITE MOLECULAR MARKERS .

In order to investigate the inheritance of resistance in rice to *Rhizoctonia solani* (causing sheath blight in rice, ShB) and its association with microsatellite molecular markers were made a couple of crosses between rice parents resistant (Palmar and Jefferson) and susceptible (Fonaiap 1 and Fonaiap 2000) so obtain two experimental populations for assess the inheritance of resistance to *R. solani* and determine the association with microsatellite that showed polymorphisms between the parents evaluated. The F₂ progeny from Palmar X Fonaiap1 and Jefferson X Fonaiap2000, at the beginning of the panicle emergence, were inoculated 4 leaves at the knot within the sheath with fungus mycelium grown in agar and were placed the plants in moist chamber for a week. After this time was measured the affected area by disease PDV at each plant and were grouped according to the assessment scale. From the progeny and their descendants leaf samples were taken for DNA extraction to evaluate the molecular markers microsatellite selected from Graminae web page and was amplified with the aid of a thermal cycler, the amplified products were individually placed in wells of an agarose gel 3% and was carried out the electrophoretic run in the camera for this. For detection of QTLs conferring resistance to ShB, were used method of composite interval mapping using the software Windows QTL Cartographer 2.5 decreeing the presence of QTL with LOD threshold > 2.4 (P = 0.05). Were not detected QTLs in the progeny from crosses between Jefferson X F2000 while the progeny from crosses Palmar X F1 were detected 3 QTL located on chromosomes 1, 4 and 12, flanked by markers RM 572 and RM449, RM273 and RM3471, RM309 and RM3472, respectively. The QTLs detected in this work are a valuable contribution to the study of resistance to *R. solani*

Key words: *Rhizoctonia*; rice microsatellite; resistance

INDICE

VEREDICTO.....	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
RESUMEN	v
ABSTRACT.....	vi
INDICE	vii
ÍNDICE DE CUADROS Y FIGURAS.....	x
I. INTRODUCCIÓN	1
II. OBJETIVOS.....	5
III. REVISIÓN DE LITERATURA	6
1. La Planta de arroz	6
1.1 Clasificación Botánica del Arroz	6
1.2 Origen y Distribución	10
1.3 Etapas de desarrollo del arroz	11
1.4 El arroz en Venezuela	12
2. <i>Rhizoctonia solani</i>	14
2.1 Clasificación taxonómica de <i>R. solani</i>	14
2.2 Agente causal	15
2.3 El patógeno	16
2.4 Los síntomas	17
2.5 Patogenesis.....	18
2.6 Eepidemiologia.....	21
2.7 Estrategias de control.....	22

3. Marcadores Moleculares.....	23
IV .MATERIALES Y MÉTODOS	31
1. Localización del estudio	31
2. Material vegetal a evaluar	31
3. Etapas de cruzamiento	32
3.1 Siembra, emasculación y polinización de progenitores.	32
4. Evaluación de la reacción de los progenitores y progenie.....	34
4.1 Diseño experimental y evaluación estadística	34
4.2. Producción del inóculo	35
4.3 Método de inoculación	35
4.4 Evaluación de la reacción a la inoculación con <i>R. solani</i>	36
5. Evaluación molecular de los progenitores y sus progenies.....	36
5.1 Extracción de ADN	36
5.2 Selección de Iniciadores de PCR	38
5.3 Amplificación de los microsatélites	38
5.4 Electroforesis	39
5.5 Electroforesis en geles de agarosa	39
6. Análisis de la información	40
6.1 Análisis de la reacción de los progenitores y progenie a <i>R. solani</i>	40
6.2 Análisis de los datos para detectar la asociación entre la resistencia en plantas de arroz a <i>R. solani</i> y los SSR	41
V. RESULTADOS	42

1. Cruzamiento	42
2. Evaluación de la reacción de los progenitores y progenie.....	42
3. Evaluación molecular de los progenitores y sus progenies.....	44
4. Asignación de QTL para la resistencia a <i>R. solani</i>	45
VI DISCUSIÓN	48
VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES	57
VIII LITERATURA CITADA	59

ÍNDICES DE FIGURAS Y CUADROS

Cuadro 1. Clasificación Botánica del arroz y Complejo de especies.....	9
Cuadro 2 Etapas de crecimiento de la planta de arroz	13
Fig. 1 Distribución modal del porcentaje de área afectada por el hongo <i>R. solani</i> en la población segregante F ₂ Palmar x Fonaiap 1	43
Fig. 2 Distribución modal del porcentaje de área afectada por el hongo <i>R. solani</i> en la población segregante F ₂ Jefferson x Fonaiap 2000	44
Cuadro 3. Sumario del análisis de QTLs para la Resistencia a pudrición de la vaina usando mapeo por intervalos compuestos	47
Fig. 3 Cromosomas (CHR) 1, 4 y 12 donde se localizan los QTLs identificados para resistencia a la pdv.....	47
Fig 4. Graficas de los cromosomas (CHR) 1,4 y 12 donde se detectaron QTL.	47

I INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) es una planta originaria de las Indias Orientales, cuyo hábitat, por lo general, es en terrenos muy húmedos, de allí que los agroecosistemas más productivos sean las planicies bajas irrigadas. Este cereal es consumido principalmente como grano y suple el 20% de las calorías diarias de la población mundial (<http://www.apps.fao.org>).

En Venezuela el arroz se ubica entre los rubros banderas del Estado, por ser una fuente calórica importante en la dieta diaria del venezolano y uno de los cultivos de mayor importancia en la agricultura, estimándose una superficie cosechada de 198.834 ha con un rendimiento promedio de 5.051 Kg/ha para el 2.008, mientras que el rendimiento promedio mundial fue de 4.309 Kg/ha (Fuente: FAOSTAT 2011)

Al igual que en otros cultivos, las plagas representan una de las principales limitantes para el aumento de la productividad del arroz en los trópicos, por aumentar los costos de los insumos en el sembrado y restringir la expansión del cultivo a nuevas áreas.

Entre las enfermedades que afectan a la planta de arroz se encuentra la pudrición de la vaina (PDV), causado por el hongo *Rhizoctonia solani* Kühn, considerada por muchos años de poca importancia económica, sin embargo. a partir de la década de los 80 comenzaron a observarse incrementos en su incidencia y severidad, debido al uso de un sistema de

producción caracterizado por altas densidades de siembra, abundante aplicación de fertilizantes nitrogenados y un monocultivo intensivo. Estas prácticas junto con la utilización de cultivares susceptibles, la naturaleza saprofita y el amplio rango de hospedantes del patógeno, han ayudado a la diseminación, establecimiento y persistencia del hongo en la mayoría de las áreas productoras de arroz (34).

Para controlar la enfermedad, se han usado principalmente prácticas culturales y entre ellas el uso de productos químicos (44), pero debido a su impacto ambiental se ha generado en los últimos años gran preocupación por el abuso de su aplicación en campos comerciales de arroz. Por ello, se han emitido serios cuestionamientos acerca de la sostenibilidad de los sistemas de producción de este cereal; de allí que cómo asegurar una producción sostenible de alimentos, es un tópico de álgida discusión en la actualidad.

Por lo antes expuesto, se hace necesaria la identificación de genes que permitan el desarrollo de variedades resistentes, definiéndose como planta resistente aquella que con caracteres heredados interfiere o reduce el crecimiento del patógeno, mostrando una menor infección o daño que otras plantas de esa especie en las mismas condiciones.

La resistencia varietal es una herramienta efectiva, económica y eficiente, que previene el establecimiento y evita la diseminación de enfermedades, comparado con otras medidas de control. Además, el uso de cultivares resistentes es prerequisite para la agricultura sustentable,

por lo económico, biológicamente seguro, usualmente compatible con el control biológico, el no ser dañino para el medio ambiente y no representar un costo adicional para el agricultor.

El desarrollo de una variedad resistente a enfermedades, en un programa de mejoramiento vegetal tradicional, puede tomar de 8 a 10 años o aún más, debido a que en muchos casos la resistencia puede ser el resultado de la acción de un grupo de genes, más que de un gen individual, siendo la aproximación más apropiada para su ubicación, la identificación de marcadores moleculares que estén asociados y flanqueen la región conocida del genoma que contiene estos genes de resistencia. Esta técnica se conoce como Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAM) (18).

El uso de la SAM, incrementa la eficiencia en la determinación de los genes de interés en una población segregante, por ser más preciso el marcar una región del genoma que intentar ubicar estos genes en una planta por su fenotipo, por eso, es de gran importancia identificar marcadores polimórficos asociados a los genes de interés (18).

La SAM es una nueva y prometedora herramienta para los fitomejoradores, que puede usarse en combinación con las prácticas de mejoramiento convencional, ayudando a incrementar la eficiencia en la determinación de la transferencia de genes favorables a nuevas variedades y lograr economizar entre un 50 a 70% en tiempo y esfuerzo (18). Hasta el presente, la información generada en Venezuela acerca de

R. solani, así como el grado de resistencia que poseen las variedades de arroz mejoradas en el país es escasa (9,13), mientras que en lo referente al mejoramiento asistido por marcadores moleculares es escasa.

II. OBJETIVOS.

1. OBJETIVO GENERAL

Estudiar la herencia de la resistencia al hongo *Rhizoctonia solani* y su asociación con marcadores moleculares en arroz.

2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

2.1. Desarrollar dos poblaciones F_2 a partir de los cruces entre los cultivares resistentes y susceptibles a *R. solani*.

2.2. Evaluar la herencia de la resistencia a *R. solani* en dos poblaciones experimentales de arroz.

2.3. Determinar marcadores moleculares que resulten polimórficos en los progenitores y su descendencia (F_2).

2.4. Determinar la asociación de los marcadores moleculares con los genes de resistencia a *R. solani* en los cultivares de arroz evaluados y sus progenies.

III. REVISIÓN DE LITERATURA

La Planta de arroz

1.1 Clasificación Botánica del Arroz

Reino: Plantae

Subreino: Tracheobionta

División: Magnoliophyta

Clase: Liliopsida (Monocotiledoneas)

Sub-clase: Commelinidas

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Subfamilia: Bambusoideae

Tribu: Oryzeae

Género: *Oryza*

Especie: *O. sativa* L.

El género *Oryza* se ubica en la Familia Poaceae; está integrado por 25 especies entre diploides y tetraploides, cuyos genomas se clasifican en AA, BB, CC,DD, EE, FF, GG, HH, JJ, y KK; mostrando la gran variabilidad que presenta este género de plantas, lo que provocó que se dividiera en complejos, estos son: Complejo *Sativa*; Complejo *Officinalis*/complejo *Latifolia*; Complejo *Meyeriana*; Complejo *Ridleyi* y No clasificado (1) (Cuadro 1).

Las especies del género *Oryza* son hierbas perennes o anuales, en las especies perennes el sistema radicular presenta raíz principal con brotes subterráneos, mientras que en las especies anuales muestran largas raíces adventicias, ligeramente ramificadas (35).

Los tallos en todos los arroces son erectos o ascendente, excepto en *O sativa* que son geniculados ascendentes, decumbentes, con enraizamiento en los nudos y a veces produciendo nuevos brotes en estos puntos. Todas las especies de arroces que habitan en prados y bosques son hierbas, suaves y firmes y las especies que habitan suelos inundados presentan pasajes de aire en la parte de la vaina que se encuentra sumergida en el agua (35).

Las vainas de la hoja del arroz son siempre abiertas y glabras a lo largo del borde, sin embargo, .en algunas especies las vainas de las hojas pueden poseer cilios. Como en los tallos, las vainas de las hojas también tienen una nervadura claramente marcada o venación acanalada. De acuerdo con la forma de la lámina, las especies de arroces pueden dividirse en dos grupos, aquellos donde la longitud de la hoja es mucho mayor que el ancho, lineales lanceoladas, son parecidas a una cinta y aquellos que tienen una forma lanceoladas o lanceolada-alongada. En algunos casos la base de la hoja es tan estrecha que parece como si esta formara un peciolo (35).

En todas las especies *Oryza* la panícula contiene espiguillas con pedicelos cortos, las glumas coalescentes miden alrededor de 0,5 mm de largo. La articulación está presente en todas las especies de arroz, es bastante definida en la mayoría de las especies porque las espiguillas caen fácilmente al madurar las semillas. Sin embargo, es menos definida

en la especie cultivada *O. sativa* donde durante la maduración de los frutos, las espiguillas no caen y permanecen en las ramas (35).

Las espiguillas son siempre erguidas, orbiculares u oblicuamente oblongas, comprimidos hacia los lados, con surcos longitudinales profundos y costillas obtusas. De acuerdo con la forma de la espiguilla, los arroces pueden dividirse en tres grupos:

- ♣ Arroces con espiguillas estrechas, aquellos donde el largo es más de tres veces el ancho, como en *O. brachyantha*, *O. breviligulata*, *O. longistaminata*, *O. ridleyi*, *O. stapffi*, *O. subulata* y *O. coarctata*.
- ♣ Arroz con espiguillas orbiculares, aquellos en los que su largo es de 2 a 2,5 veces el ancho, como en *O. australiensis*, *O. glaberrima*, *O. latifolia*, *O. officinalis*, *O. punctata* y *O. sativa*.
- ♣ Arroz con espiguillas anchas, aquellos con un largo, aunque más ancho es menos del doble de ancho, como en *O. grandiglumis*, *O. minuta* y *O. schlechtri*.

Las espiguillas en todos los arroces presentan aristas, generalmente filiforme o setaceas, orbiculares y se estrechan sólo ligeramente en el ápice. De acuerdo con la longitud, las aristas de todas las especies de arroz se pueden dividir en:

- ♣ Sin aristas: *O. abromeitiana*, *O. glaberrima*, *O. granulata* y *O. schlechteri*
- ♣ Aristas cortas, en las cuales la arista es menor que la gluma por sí misma *O. coarctata* y *O. ridleyi*

Cuadro 1. Clasificación Botánica del arroz y Complejo de especies

Complejo de especies		Número de Cromosomas	Genoma	Distribución Geográfica
I	Complejo Sativa			
	1. <i>O. sativa</i> L.	24	AA	Sur y Sureste Asia
	2. <i>O. nivara</i> Sharma et Shastry	24	AA	Asia Tropical
	3. <i>O. rufipogon</i> Griff	24	AA	Asia Tropical
	4. <i>O. meridionalis</i> Ng	24	AA	Australia Tropical
	5. <i>O. glumaepetula</i> Steud	24	AA	America Tropical
	6. <i>O. glaberrima</i> Steud	24	AA	Oeste de África y Tropical
	7. <i>O. barthii</i> A. Chev. et Roehr	24	AA	Oeste de Africa
8. <i>O. Longistaminata</i> A. Chev. et Roehr	24	AA	Africa Tropical	
II	Complejo Officinalis/complejo Latifolia			
	9. <i>O. punctata</i> Kotschy ex Steud.	24	BB	Africa
	10. <i>O. rhizomatis</i> Vaughan	24	CC	Sri Lanka
	11. <i>O. minuta</i> J.S.Pesl. ex C.B.Presl.	48	BBCC	Filipina, Nueva Guinea
	12. <i>O. malamphuzensis</i> Krishn. et Chandr.	48	BBCC	Sur de India (Kerala)
	13. <i>O. officinalis</i> Wall. ex Watt	24	CC	Asia, Nueva Guinea
	14. <i>O. eichingeri</i> A. Peter	24	CC	Este África y Sri Lanka
	15. <i>O. latifolia</i> Desv.	48	CCDD	América Sur y Central
	16. <i>O. alta</i> Swallen	48	CCDD	América Sur y Central
	17. <i>O. grandiglumis</i> (Doell) Prod.	48	CCDD	Sur América
	18. <i>O. australiensis</i> Domin.	24	EE	Norte de Australia
19. <i>O. schweinfurthiana</i> Prod.	48	BBCC	África Tropical	
III	Complejo Meyeriana			
	20. <i>O. granulata</i> Nees et Arn. Ex Watt	24	GG	Sur, Sureste Asia
	21. <i>O. meyeriana</i> (Zoll. et Mor. ex Steud.) Baill.	24	GG	Sureste Asia
IV	Complejo Ridleyi			
	22. <i>O. longiglumis</i> Jansen	48	HHJJ	Indonesia, Nueva Guinea
	23. <i>O. ridleyi</i> Hook. F.	48	HHJJ	Sureste Asia
V	No clasificado			
	24. <i>O. brachyantha</i> A. Chev. et Roehr.	24	FF	África Oeste, Central
	25. <i>O. schlechteri</i> Pilger	48	HHKK	Indonesia, Nueva Guinea

Fuente: Brar and Khush, 2003

- ⤴ Arista moderadamente larga, la cual es más larga que la gluma, pero no mayor de 60 mm: *O. australiensis*, *O. latifolia*, *O. longistaminata*, *O. minuta*, *O. punctata* y *O. subulata*.
- ⤴ Aristas muy largas 60-200 mm: *O. brachyantha*, *O. breviligulata* y *O. stapfii*.

Los frutos son pequeños, comprimidos a los lados, 1-8 mm de largo, oblongos, elípticos u orbiculares, en función de la forma y el tamaño de la espiguilla. Los pequeños frutos de arroz son inicialmente amarillentos y luego a marrón oscuro.

O. sativa es una planta de hábito de crecimiento erecto, anual, de tamaño variable que puede ir desde 0,4 m (enanas) hasta más de 7 m (flotantes), de tallos redondos y huecos compuestos por nudos y entrenudos, hojas de lámina plana unidas al tallo por la vaina y su inflorescencia es una panícula ubicada en el ápice del tallo, protegida por una hoja terminal, más ancha y corta que las anteriores, llamada hoja bandera (35).

De acuerdo al tipo de polinización se clasifica como una planta autógama, de constitución genética diploide ($n=12$), que se propaga por semillas producidas por autopolinización, sin embargo los cruces naturales pueden ocurrir a una tasa de hasta 5 %. Una espiguilla de arroz tiene seis anteras con más de 1.000 granos de polen en cada uno y un óvulo con un estigma ramificado (35).

1.2 Origen y Distribución

La domesticación del arroz (*O. sativa*) comenzó hace unos 10.000 años dentro de un amplio rango geográfico y El Centro de origen según Vavilov: es la India y según Harlan es el Cercano Oriente y China (35).

En un estudio fitogeográfico realizado con 203 cultivares y 129 especies silvestres, utilizándose para este estudio las diferencias en las secuencias de ADN en una región de genes del cloroplasto y dos regiones de genes nucleares, señalan que el ancestro (*O. rufipogon* Griff) de las subespecies de *O. sativa* tiene su centro de diversidad en la India e Indochina (19). Los autores sugieren que el arroz cultivado fue domesticado al menos dos veces a partir de *O. rufipogon*, *O. sativa* subsp *indica* fue domesticado dentro de la región del sur de las montañas del Himalaya, incluyendo el Este de la India, Myanmar y Tailandia, mientras que *O. sativa* subsp japónica puede haberse originado en el sur de China (20).

1.3 Etapas de desarrollo del arroz

La planta de arroz presenta tres fases importantes de crecimiento: vegetativa, reproductiva y de maduración. La fase vegetativa se refiere al período desde la germinación hasta el macollamiento, la fase reproductiva se refiere al período desde la elongación del tallo hasta la floración y la etapa de maduración se refiere al período desde la emisión de la espiga a la madurez. Sin embargo, las etapas de crecimiento de la planta de arroz

están codificadas de 1 a 9, donde 1 se refiere a la etapa de la germinación y 9 se refiere a la etapa de la madurez (16) (Cuadro 2).

1.4 El arroz en Venezuela

En Venezuela, el arroz fue introducido poco después de la conquista, las primeras noticias sobre su presencia se remontan a 1578, «cuando la relación presentada por el gobernador Juan Pimentel lo señala como uno de los cultivos que se daban en la provincia de Caracas» (32); sin embargo no es sino hasta la segunda mitad del siglo XX cuando el arroz comienza a tomar importancia tanto en producción, como en consumo.

Hacia mediados de los años cincuenta (1954) se producían en Venezuela 16 mil t y se importaban 5 mil t de arroz (MAC, 1967). Puede admitirse que la participación del arroz en el patrón de consumo nacional es más bien reciente y su desarrollo parece estar muy asociado a la introducción, ampliación de la producción y la agroindustria desde finales de los años cuarenta hasta fechas contemporáneas.

En 1949, la Corporación Venezolana de Fomento introdujo en Venezuela el Plan Arrocero Nacional. Este plan fue iniciado en el estado Portuguesa y no sólo perseguía impulsar la producción del rubro, sino también promover la transferencia de un paquete de tecnología que se fundamentaba en la mecanización de las labores de cultivo anual y semipermanente. Las políticas incluían la colonización y de inmigración selectiva, así como programas de construcción de infraestructuras de vialidad, de riego casas y dotación de maquinaria.

El estado Guárico y particularmente Calabozo, fue objeto de políticas

Cuadro 2 Etapas de crecimiento de la planta de arroz

Etapa	Descripción	Código
		R
Germinación	Desde la siembra hasta la emergencia del coleoptilo de la semilla	1
Plántula	Desde la emergencia del coleoptilo hasta la aparición de la quinta hoja (contando como primera hoja la primera hoja sin lámina)	2
Macollamiento	Desde la aparición del primer macollo hasta la iniciación de la elongación del tallo	3
Elongación y engrosamiento de la vaina	Desde la iniciación de la elongación del tallo hasta el completo desarrollo de la panícula dentro de la vaina de la hoja bandera	4
Espigamiento	Desde la aparición de la punta de la panícula fuera de la vaina de la hoja bandera hasta más de 90% de emergencia de la panícula	5
Floración	Desde la primera floración hasta que se completa la floración de la panícula	6
Estado lechoso	El cariósido desde estado acuoso a lechoso	7
Estado pastoso	El cariósido desde estado de masa blanda a dura	8
Maduración	Maduración de más del 80% de las espiguillas en la panícula. El cariósido está completamente desarrollado, duro y sin tonalidades verdosas	9

dirigidas a la promoción agrícola, estando a la vanguardia de los programas la construcción y puesta en servicio del Sistema de Riego Río Guárico que fue inaugurado en el año 1956.

Resultado de estos orígenes históricos, es la actual localización de las áreas de producción agrícola, de la mayor parte de las instalaciones agroindustriales y de servicios del arroz en Venezuela, localizándose éstas en Portuguesa y Guárico donde se concentra aproximadamente el 90% de las producciones primaria y de transformación industrial, así como los servicios relacionados con el rubro. Otras entidades productoras son Cojedes, Barinas y Delta Amacuro (32).

2. *Rhizoctonia solani*

2.1 Clasificación taxonomica de *R. solani*

Estado teleomorfo

Estado anamorfo:

Reino *Fungi*.

- **Filo *Basidiomycota*.**
- **Clase *Basidiomycetes*.** **Deuteromycete**
- **Orden Ceratobasidiales.** **Micelia sterilia.**
- **Familia Ceratobasidiae.**
- **Género: *Thanatephorus* (Donk) *Rhizoctonia* (De Candolle)**
- **Especie *T. cucumeris* (A.B. Frank) Donk. *R. solani* (Kühn)**

(Dictionary of the Fungi IX ed 2.001)

Desde su primer reporte en 1.728 en Francia, las enfermedades causadas por hongos del género *Rhizoctonia*, han sido estudiadas por muchos investigadores en diferentes países. La primera descripción del género *Rhizoctonia* fue hecha por De Candolle en 1.818 y desde entonces muchas especies han sido descritas por diferentes autores,

siendo Kühn en 1.858 el que describió la especie *R. solani* afectando el cultivo de la papa. (27).

R. solani y otros hongos clasificados en el género Rhizoctonia no producen conidios y sólo en raras ocasiones producen basidiosporas, lo que dificulta frecuentemente la clasificación de este género de hongo. Hasta los años 60, la clasificación de Rhizoctonia, se realizaba en el laboratorio, basándose en las observaciones morfológicas de las estructuras fúngicas desarrolladas al sembrar el hongo en medios nutritivos y por pruebas de patogenicidad realizadas sobre diferentes especies de plantas. (40).

Debido a lo difícil de identificar a *R. solani*, en 1.969 J. R. Parmeter y colaboradores de la Universidad de California en Berkeley, introducen el concepto de “anastomosis hifal” para caracterizar e identificar a *R. solani*. El concepto se basa en que las hifas de los diferentes aislamientos del hongo, tienen o no la habilidad para reconocerse y fusionarse con otras de su misma especie, agrupándose el hongo en genéticamente relacionados al fusionarse y genéticamente no relacionados al no fusionarse las hifas. Con el criterio de anastomosis hifal los aislamientos de *R. solani* se han ubicado dentro de grupos taxonómicos distintivos llamados grupos de anastomosis (40).

2.2 Agente causal

Para el cultivo del arroz la enfermedad denominada Pudrición de la Vaina (PDV) fue señalada por primera vez en Japón por Miyake en 1.910

y denominó al agente causal *Sclerotium irregulare*. Sin embargo, Swada en 1.912 observa que la descripción del hongo hecha por Miyake era idéntica a la descrita por Shirai en 1.906 para el hongo *Hypochnus sasakii*. Luego Reinking en 1.918 y Palo en 1.926 describen una enfermedad similar ocurriendo en Filipinas, la cual consideraron era causada por un hongo del grupo *R. solani* (37).

En 1.932 Park y Bertus reportan la enfermedad en Sri Lanka y refieren al agente causal como *R. solani*. Wei en 1934 señala la presencia de la PDV en China, luego Sakena y Chaubey en 1.972 y Sakena en 1.973 describen la enfermedad en el cultivo del arroz al Norte de la India, donde se observó un tizón en las hojas causado por la infección de basidiosporas y síntomas de manchado y bandeado en las vainas. (37)

Finalmente el agente causal de la PDV en arroz es el hongo cuyo estado anamorfico es *Rhizoctonia solani* Kühn y su estado teleomorfo es *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk, (Cuadro 3)

En Venezuela, la PDV fue reportada por primera vez en 1.952 (22), mientras que el agente causal de la enfermedad fue identificado como *R. solani*, grupo de anastomosis AG1-IA, estado sexual de *Thanatephorus cucumeris* (4).

2.3 El patógeno

R. solani es un hongo semi-saprofita, que muestra gran capacidad de supervivencia, manifiesta por su habilidad de adaptarse a distintos ambientes edafoclimáticos, diseminarse a través de la semilla y por la

formación de estructuras fúngicas llamadas esclerocios, que representan el inóculo inicial para el siguiente ciclo (6).

El hongo posee hifas incoloras a marrón amarillento, multinucleadas, presentan un septo doliporo, y de un diámetro de 8 a 12 μ . Las hifas pueden ser lobadas, moniloides y filamentosas, en este último caso presentan ramificaciones en ángulo de 45° o 90°. A partir de las células moniloides se forman los esclerocios, que son irregularmente esféricos, aplastados en la base y de color marrón oscuro (6).

2.4 Síntomas

Los síntomas que causados por la infección de *R. solani* se localizan fundamentalmente en las vainas y en casos severos se observan sobre el limbo de la hoja. Generalmente la coalescencia de varias manchas sobre una vaina, causa la muerte de la hoja completa. En casos severos, todas las hojas de una planta pueden ser atizonadas por esta causa. En los trópicos es frecuente encontrar afectadas la mayoría de las hojas de una planta.

Las plantas de arroz manifiestan los síntomas de la enfermedad en la fase de máximo macollamiento, aproximadamente 50-60 días después de la germinación. Las infecciones en las plantas comienzan al entrar en contacto los tallos con los esclerocios que sobrenadan en el agua de riego, los cuales al germinar desarrollan hifas que crecen en los tejidos de la planta. De estas hifas se desarrollan otras lobadas conocidas como cojín infeccioso de donde emergen las hifas de penetración (44).

La mayoría de los síntomas en las plantas se observan en la base de los tallos a nivel del agua de riego, comenzando con una mancha acuosa, circular, oblonga o elipsoidal, de color verde oliva de aproximadamente 1 cm de longitud. Luego se desarrollan hasta alcanzar de 2-4 x 1-1,5 cm de longitud, presentándose un centro de color marrón claro o blanquecino, rodeada de un halo de color marrón o morado con un borde irregular (6).

En condiciones favorables, la enfermedad puede afectar las hojas superiores, produciendo síntomas similares a los que ocurren en las vainas y si estas condiciones persisten las lesiones pueden unirse y provocar el secamiento de las hojas y tallos, las pérdidas en rendimiento pueden llegar de un 5 hasta un 50% (34).

2.5 Patogénesis

La patogénesis se define como el proceso mediante el cual el agente patogénico provoca la enfermedad en su hospedante, con este proceso los patógenos aseguran su nutrición, para ello utilizan diferentes estrategias que les permiten establecerse en el hospedante. Para el caso de los hongos necrótrofos, es esencial la inducción de la muerte de las células de su hospedante antes de la colonización de los tejidos de la planta. Después de la infección, la muerte celular es provocada por cambios en el metabolismo de la célula o por la acción de las toxinas o enzimas extra celulares producidas por el patógeno (49).

Se reportó que entre 5 y 7 horas después de realizarse la inoculación sobre la superficie de la vaina de la hoja de arroz con *R. solani* AG1-IA,

las hifa del hongo crecieron longitudinalmente siguiendo la unión de las células epidérmicas, luego la hifa se ramifica y continúan proliferando resultando en un micelio indistinguible de la hifa original. Posteriormente, de algunas hifas se desarrollaron estructuras de infección, las cuales mostraron una agrupación discreta de hifas compactas que se unen estrechamente al tejido vegetal sin la presencia de material mucilaginoso, a estas estructuras se les denomina “cojines de infección”. Así mismo, reportan que otras hifas individuales forman apresorios lobados, cortos, hinchados y ramificados que se adhieren a la superficie de la planta sin observarse sustancias mucilaginosas (23).

La penetración desde las estructuras de infección ocurre por dos vías, directamente a través de las células de la epidermis o por la abertura de los estomas ubicados en la superficie de las vainas. En la penetración directa algunas de las hifas del cojín de infección producen una fina clavija de penetración la cual atraviesa la cutícula y la pared celular que se alargan en el lumen de la célula. La penetración por los estomas ocurre simplemente por la hifa que se contrae ligeramente para entrar, crece dentro de la apertura estomatal y luego recupera su diámetro original una vez dentro de la cámara sub estomática (23).

Una vez que penetran las hifas colonizan el tejido tanto ínter como intra celularmente creciendo hacia el centro y periferia del culmo. El crecimiento longitudinal ocurre a través de los haces vasculares y las cavidades intercelulares de la vaina (23).

Se reportó que *R. solani* AG1 IA posee 10.489 genes contenidos en 13 cromosomas, que durante un tiempo de 72 h en el proceso de infección se expresan 10.103 genes involucrados en la patogenicidad, además observaron que durante la infección se manifestaron entre 6066 y 4369 genes hiperregulados y entre 5418 y 3711 hiporegulados. Así mismo, durante el proceso de infección el hongo secreta 223 enzimas carbohidratos activas (CAZymes), entre las cuales están la glucósido hidrolasa (GH) y la polisacárido liasa (PL). Sin embargo las enzimas celulosa y hemi-celulasa no se detectaron; no obstante *R. solani* posee un amplio conjunto de genes que codifican para enzimas que degradan las paredes celulares, principalmente las pectinasa, xilanasas y lacasa. Esta última, la lacasa degrada la lignina, se presenta en mayor cantidad y diversidad que en otros hongos del género *Rhizoctonia*, demostrándose que la lacasa es un factor determinante de la patogenicidad de *R. solani* AG1-IA (49).

Por otro lado, observaron la ausencia de la enzima cutinasas, por lo que sugieren que estas enzimas no son críticas para la penetración e infección por *R. solani* AG1 IA, lo cual es apoyado por el hecho de que la cutícula de la planta permanece intacta después de penetración a excepción de las áreas de entrada de las hifas. Adicionalmente, *R. solani* produce una serie de metabolitos secundarios involucrados en la patogénesis, reportándose que en el desarrollo de las lesiones y síntomas de la PDV participan fitotoxinas, demostrándose en investigaciones que

el ácido fenil acético (PAA), los derivados del PAA, compuestos fenólicos y un hidrato de carbono actúan como fitotoxinas de *R. solani*, sugerido su asociación con la patogenicidad de *R. solani* AG1 IA. El PAA es un producto catabólico del aminoácido aromático fenilalanina, cuyo precursor es el ácido chorismico, que es el producto final de la vía del shikimato. Además es señalado la asociación con la patogenicidad del metabolito secundario indol alcaloide (49)

2.6 Epifitología

R. solani sobrevive entre cultivos como esclerocios en el suelo y en menor grado como micelio en restos de plantas (35). Los esclerocios pierden su viabilidad después de 21 meses en el suelo seco, flotan en el agua durante el fangueo, la nivelación o cualquier otra labor agrícola que se realice con el empleo del agua. Pueden ser transportados a grandes distancias hasta que finalmente se pone en contacto con la planta de arroz e inician la infección. Inmediatamente después de aparecer las primeras lesiones, el micelio crece con mucha rapidez sobre la superficie de la planta, penetra en tejido de esta y ocasiona lesiones secundarias. El micelio es más activo e infeccioso cuando las lesiones son jóvenes, sobre las lesiones viejas se forma muy poco micelio (6).

El hongo penetra en la planta por los estomas o directamente a través de la cutícula, ocurriendo generalmente por la superficie interna de la vaina, pero en la hoja puede ocurrir por ambas caras.

La infección puede producirse a temperaturas entre 23 y 35°C, con un óptimo de 30 a 32°C. Se requiere además una alta humedad relativa (96 a 77%) para que este proceso ocurra. Al principio de la infección, la enfermedad se desarrolla en sentido vertical extendiéndose hacia las hojas superiores, después se desarrolla horizontalmente e infecta los tallos vecinos (6).

La PDV es una enfermedad muy destructiva en condiciones de alta humedad y temperatura. La temperatura dentro del campo de arroz está condicionada a la temperatura del aire; en cambio, la humedad predominante en el microclima de la planta está influida por la densidad de siembra, el uso de fertilizantes y las características varietales, en lo concerniente refiere al potencial de macollamiento, por eso la enfermedad es más severa cuando la densidad de siembra es alta, se aplican grandes cantidades de fertilizantes o cuando la variedad de arroz empleada produce un número abundante de hijos. Esta enfermedad es observada con más frecuencia al finalizar la etapa de macollamiento de la planta (6).

2.7 Estrategia de control de *R. solani*

Se considera que el desarrollo de la enfermedad no es controlada ni siquiera por las plantas consideradas resistentes al hongo, por lo que se buscan otras estrategias para limitar la producción de esclerocios o su longevidad (44).

El inóculo primario puede ser reducido si se combinan cultivares resistentes con fungicidas. Esto último, en conjunto con programas

culturales diseñados para limitar el inóculo y reducir la severidad de la enfermedad, están siendo mejorados y desarrollados a nivel mundial (6)

Entre estos programas se incluye mantener los campos bajo inundación para limitar la sobrevivencia de los propágulos del hongo o lograr cierto control biológico a través de antagonistas del suelo (26; 30).

3. Marcadores Moleculares Microsatelites

Entre los marcadores moleculares se encuentran los microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR), que fueron descritos por primera vez en 1989 y comenzaron a ser usados en muchos campos de la ciencia, debido a su alta variabilidad, convirtiéndolos en un marcador molecular muy poderoso (47). Los microsatélites, tienen de 1 a 6 bases repetidas una tras otra y se encuentran en todos los genomas de los procariontes y eucariontes analizados hasta la fecha (48).

Los marcadores moleculares SSR son neutros (no son decodificados), co-dominantes y poseen una alta tasa de mutación lo que los hace muy polimórficos, sin embargo, la variabilidad que presentan es muy útil para su uso como marcadores moleculares, su variabilidad es respecto al número de repeticiones y no a su secuencia repetida. Por poseer estas características son marcadores eficientes para detectar QTL al ser polimórficos, con modo de herencia definido, ubicados a lo largo del genoma, co-dominantes y con frecuencias alélicas fijas en cada progenitor (8).

Esta segunda generación de marcadores es somáticamente estable y heredada de manera co-dominante siguiendo las leyes de Mendel, distinguiéndose además los heterocigotos de los homocigotos. Los microsatélites son secuencias abundantes, hipervariables, multialélicas y están equitativamente distribuidas a través del genoma nuclear, proveen una valiosa fuente de polimorfismo, lo que los hace una importante clase de marcador molecular (8).

Estos marcadores usualmente están caracterizados por un alto grado de longitud polimórfica y se presentan tanto en regiones codificadas como no codificadas del genoma, pero en su mayoría se encuentran en regiones del ADN que no codifican, en donde la tasa de sustitución de nucleótidos es mayor en comparación con las regiones que codifican (48).

El nivel excepcional de polimorfismo detectado por los marcadores SSRs, referidos también como SSLP (secuencias simples de longitud polimórficas), es debido a la variabilidad en el número de repeticiones seguidas una tras otra en un locus particular. Los marcadores SSLP pueden ser evaluados fácilmente, en forma precisa rápida y económica utilizando la técnica de PCR, mediante cebadores específicos con secuencias únicas para cada flanco del SSR. Todos estos factores conjuntos han hecho de los marcadores SSR ideales para el mejoramiento de plantas, análisis de ligamiento genético, mapeo de genes, análisis de paternidad, identificación forense, conservación biológica y genética de poblaciones (8).

Alrededor del 50% del genoma del arroz consiste en secuencias repetidas de ADN con aproximadamente 5.700 a 10.000 SSR. Del total hasta el año 2.000 solo 312 SSR habían sido mapeados en los doce cromosomas del arroz, éstos se ubican a una distancia promedio de un SSLP cada 6 cM. Muchos de los SSR estudiados principalmente contienen dinucleótidos y unos pocos trinucleótidos, mientras que hay muy pocos loci identificados con microsatélites que contengan tetra nucleótidos (8).

En el año 2.002 de un total de 2.414 loci únicos marcados se encontraron 2.240 nuevos di, tri y tetra nucleótidos con pares de primer no redundantes, desarrollados y experimentalmente validados para el arroz. La mayoría (92%) de los pares de primer desarrollados amplifican en regiones que flanquean repeticiones perfectas ≥ 24 bp en longitud, obteniéndose un total de 2.740 SSR confirmados experimentalmente (29).

La más reciente publicación realizada por el equipo del proyecto internacional de secuenciación del genoma del arroz, formalmente establecido en 1.998, reseña que el tamaño del genoma del arroz es de 389 Mb, además de reportar un total de 18.828 SSR di, tri y tetra nucleótidos, con un promedio de 51 SSR hipervariables por Mb, lo que provee una rica fuente de marcadores que pueden ser usados en genética y mejoramiento de la planta de arroz (15).

Para determinar la asociación entre dos o más genes es necesario contar con un estadístico y uno de ellos es la Prueba de Máxima Verosimilitud con el cual se acepta o rechaza el ligamiento entre genes, este estadístico se conoce como Lod-Score. El LOD score o puntuación LOD es un estimador que nos permite detectar ligamiento y estimar la frecuencia de recombinación más probable entre genes. Se calcula como el logaritmo de la razón entre la probabilidad de la descendencia dada la existencia de ligamiento con frecuencia de recombinación R respecto al caso sin ligamiento (11).

$$Z = \log_{10} \frac{\text{Probabilidad de los genotipos de una descendencia dada una cierta recombinación } R}{\text{Probabilidad de los mismos genotipos suponiendo segregación independiente}}$$

La prueba de Lod Score se ajusta a la evaluación con los marcadores SSR por mostrar co-dominancia en las poblaciones segregantes, y por ende de herencia mendeliana. El Lod-Score se puede interpretar como “Cuán probable los datos observados se derivaron de un QTL presente que de uno ausente”. Si el Lod-Score en un determinado segmento del ADN sobrepasa el umbral, generalmente entre 2 y 3, se toma como indicio de que el QTL está en el intervalo evaluado. (11)

Para determinar si dos genes están ligados es necesario conocer la intensidad de ligamiento, ésta se mide a través de la frecuencia de recombinación. Se espera que los loci que se encuentren muy próximos presenten recombinaciones poco frecuentes y viceversa. Para conocer la intensidad de ligamiento existen dos funciones para predecir los

entrecruzamientos, una propuesta por Haldane y la otra propuesta por Kosambi, la función de Haldane es simple por no asumir que exista interferencia, mientras que la función de Kosambi incluye interferencia parcial, por lo tanto en este trabajo se utilizó ésta última, por brindar mayor precisión (11).

Para determinar la distancia de mapeo se debe cumplir con la aditividad, es decir, que cuando se añadan nuevos loci al mapa las distancias ya determinadas no necesiten ser reajustadas, además se deben medir el número total de entre cruzamientos pares e impares entre dos marcadores. El análisis de ligamiento consiste en determinar si dos loci ubicados en diferentes cromosomas tiene una probabilidad de recombinarse y de segregan independientemente comparado con dos loci que se encuentran ubicados en el mismo cromosoma y segregan juntos. (11)

El ligamiento se entiende como la fracción de recombinación, que mide indirectamente la distancia entre dos loci y define la distancia genética. En otras palabras 1% de recombinación es igual a 1 centimorgan (cM), equivalente a una [1] unidad de mapa (11).

El análisis de ligamiento permite distinguir entre la segregación independiente de caracteres, mediante la estimación de la fracción de recombinación llamado q , por ejemplo si dos loci segregan independientemente, q asume un valor de 0.50 y el Lod Score es el logaritmo del cociente entre la probabilidad de cualquier fracción de

recombinación, dos loci estarían ligados según la probabilidad de que esos loci tengan una segregación independiente. Gracias a esta información se puede decir que la distancia de mapa es la razón entre el número observado de individuos con genotipos recombinantes y el número total de individuos evaluados (33).

El Análisis por Regresión por Marcadores proporciona una primera aproximación al analizar regiones del genoma asociadas con características de interés. Con este método se identifican un gran número de marcadores asociados con el rasgo de interés. Es bien sabido sin embargo, que la principal desventaja de este tipo de análisis es que cuanto mayor sea la distancia entre el marcador y el gen de interés, menor es la probabilidad de que sea detectado estadísticamente, debido a la recombinación entre el marcador y el gen. (11).

El método de Mapeo por Intervalo Simple y el Mapeo por Intervalo Compuesto son dos métodos ampliamente utilizados para superar las desventajas de la regresión por marcador. El Mapeo por Intervalo Simple (SIM) se basa en el análisis de regresión mediante el uso de marcadores ligados para el análisis de la evaluación de la probabilidad estadística de que se produjera un QTL en el intervalo entre dos marcadores (11)

El Mapeo por Intervalo Simple tiene como desventajas, que la prueba de detección no es realmente una prueba por intervalo, ya que no puede distinguir si hay un QTL o no dentro de un intervalo definido y además ser independiente de los efectos de otros QTL fuera de dicho intervalo. Si hay

más de un QTL en un cromosoma, la prueba estadística en una posición dada estará afectada por esos QTL y los estimados de posición y efecto de los QTL identificados por este método es probable que estén sesgados. No es eficiente el uso de sólo dos marcadores a la vez para realizar la prueba, ya que la información de los otros marcadores no se utiliza (11).

Para solucionar los problemas que presenta el Mapeo por Intervalo Simple se propuso un método que utiliza una combinación de aquél con la regresión múltiple, lo cual se conoce como Mapeo por Intervalo Compuesto (CIM) método considerado más potente estadísticamente, debido a que con este método se intenta explicar el efecto del QTL ubicado en otro lugar del genoma que pueda tener un efecto que interfiera, con lo cual aumenta la exactitud y precisión de la detección de QTL (11).

Se presentan dos tipos de función de mapeo una de ellas es; la función de mapeo de Kosambi, la cual realiza una corrección del fenómeno de interferencia y doble recombinación, el cual se fundamenta en que el efecto de recombinación inhibe la formación de otro en una región cercana; y la otra función de mapeo es la de Haldane, la cual asume que las recombinaciones se generan al azar entre los bivalentes sin que influyan entre ellas (7).

El programa QTL CARTOGRAPHER (QTL CART) es un algoritmo de computación que se encarga de obtener los estimados de los efectos

aditivos, dominancia, epístasis y posición del QTL según el modelo CIM. Los datos del mapa cromosómico fueron suministrados según el ya elaborado por la Universidad de Cornell. Por su precisión se usó el Modelo 6 que emplea un número fijo de marcadores previamente asociados al carácter a través de regresión paso a paso, y una ventana de longitud variable a los lados del intervalo que no se considera para controlar el antecedente genético (11).

IV MATERIALES Y MÉTODOS

1 Localización del estudio

La formación de las poblaciones experimentales a partir de los parentales susceptibles y resistentes para la evaluación de la resistencia tanto en progenitores como en su descendencia y la evaluación de la reacción de los padres y su descendencia a *R. solani* mediante inoculaciones artificiales se realizó en el umbráculo ubicado en las instalaciones del INIA-Portuguesa, Araure, estado Portuguesa.

La extracción del ADN de los padres y su descendencia se efectuó en el laboratorio de Biotecnología del INIA-CENIAP, así como la amplificación y evaluación de los diferentes SSR seleccionados.

2. Material vegetal a evaluado

Progenitores Resistentes: Palmar y Jefferson.

Susceptibles: Fonaiap 1 y Fonaiap 2000.

Cruces a evaluar: Fonaiap 1 X Palmar;

Fonaiap 2000 X Jefferson

Estos parentales fueron elegidos de acuerdo con los resultados obtenidos por Delgado y Rodríguez en el 2005 (9).

Desarrollo de progenies: F₁ y F₂

Las semillas de los cultivares a ser cruzados fueron suministrados por el programa de mejoramiento de plantas de arroz del INIA.

3. Etapas de cruzamiento

3.1 Siembra, emasculación y polinización de progenitores.

La siembra de progenitores se realizó en materos de plástico, utilizándose un pote por cultivar. Se colocaron 5 plántulas/matero, estas plántulas se obtuvieron al sembrar las semillas de cada cultivar en cajas de petri estéril contentivas de papel absorbente esterilizado y humedecidas con agua destilada estéril. Luego de la emergencia de la radícula, se procedió al trasplante al matero respectivo, el cual contenía suelo previamente esterilizado dos veces en una autoclave por 30 min a 121°C y 15 psi de presión. Para asegurar la coincidencia de floración entre los progenitores se realizaron 3 siembras escalonadas con 5 días de diferencia.

Las plantas en umbráculo fueron mantenidas bajo observaciones periódicas, realizándose, en los casos necesarios, las prácticas culturales requeridas para mantener su buen desarrollo y sanidad. Al llegar a la etapa de emergencia de la panícula le fueron removidas las macollas cuyas panículas presentaron una emergencia de 5 a 10 cm de la hoja bandera. Las macollas fueron removidas de la planta el día anterior a realizarse la emasculación. Estas se cortaron a ras del suelo con la ayuda de un cuchillo y luego le fueron removidas todas las hojas cortándose en la base de la lámina con la ayuda de una tijera.

Las macollas se conservaron en cilindros de plástico contentivos de agua, que dando los tallos sumergidos en 15 cm de agua. El agua se

cambió cada dos días manteniéndose las macollas en el umbráculo, evitando así la evapotranspiración excesiva. Luego fueron identificadas con etiquetas, donde se indicó el nombre del cultivar y la fecha de recolección.

La emasculación se realizó removiendo las anteras de las flores de las plantas seleccionadas como madres antes de que ocurriera la antesis, evitándose la autofecundación. De las panículas se eliminaron las espiguillas ubicadas en el tercio superior e inferior. Luego con la ayuda de una tijera se efectuó el corte de las espiguillas en el punto medio, permitiéndose observar las anteras con facilidad. Después se removieron las 6 anteras con la ayuda de una pinza de punta fina, cuidando no dañar el estigma ni el ovario. Se emasclaron 50 espiguillas por panícula.

Una vez emasculadas las espiguillas, éstas se protegieron de ser polinizadas por polen indeseado, cubriéndolas con una bolsa de papel glasé. La polinización se realizó al ocurrir la antesis en el progenitor masculino, anotando el nombre del cultivar padre y la fecha de polinización. Una vez que las panículas emasculadas se polinizaron, se cubrieron inmediatamente de nuevo con la bolsa de papel glasé, dejándose cubiertas por 5 días, tiempo en el cual el estigma deja de ser receptivo y se puede quitar la bolsa.

Una vez realizada la polinización los tallos se mantuvieron en umbráculo hasta el desarrollo completo de la semilla, realizándose el cambio del agua del cilindro de plástico cada dos días.

Cuando la semilla maduró, se colectó y guardó en sobres, estos se identificaron con el cruce y fecha de cosecha, luego se almacenaron en la nevera hasta su utilización.

Las semillas F_1 se sembraron en cajas de petri que contenían papel de filtro esterilizado y se humedecieron con agua destilada estéril. Después de 4 días las plántulas se trasplantaron a materos de plástico, utilizando 5 materos por cruce y colocando 5 semillas por matero, los cuales contenían suelo esterilizado en autoclave. Durante el desarrollo de las plantas se realizaron todas las prácticas culturales necesarias para garantizar un sano y buen desarrollo de las plantas y semilla.

Una vez madurada la semilla se colectaron en bolsas individuales identificadas con el cruce y fecha de cosecha, esta semilla constituyó la generación F_2 . Las semillas colectadas fueron almacenadas en refrigeración hasta su uso.

4. Evaluación de la reacción de los progenitores y las progenies

4.1 Diseño experimental y evaluación estadística

La evaluación de los cultivares de arroz por su reacción a *R. solani*, se hizo con un diseño completamente al azar. Se utilizaron tres potes por variedad con 4 plantas cada uno y se evaluaron tres tallos por planta, mientras que en la progenie, cada individuo se evaluó de manera independiente, colocando una planta por pote y se evaluaron 3 tallos/individuo.

4.2 Producción del inóculo.

En este estudio se usó el aislamiento 101 - 18, el cual posee comprobada patogenicidad, colectado de plantas enfermas en campos de producción comercial. Este aislamiento ha sido registrado, identificado y preservado en el laboratorio de Fitopatología del INIA-Portuguesa.

La producción del inóculo se hizo en cajas de petri estériles contentivas de 20 mL de agar papa dextrosa esterilizado y acidificado (APDA), dejándose crecer en ambiente de laboratorio por 5 d, luego se tomaron 10 trozos de agar contentivo de micelio del hongo y se colocaron en igual número de caja de petri contentivas de APDA y se dejaron en un mesón en ambiente de laboratorio hasta su utilización.

4.3 Método de inoculación

Las semillas de los cultivares de arroz usados como progenitores y su descendencia fueron pre-germinadas en papel de filtro humedecido por 3 d en ambiente de laboratorio. Luego los progenitores se trasplantaron a potes contentivos de suelo estéril, colocando 4 plántulas por pote, mientras que para las progenies F_1 y F_2 fue sembrada una plántula por pote y se colocaron en condiciones de umbráculo hasta su inoculación. Para el caso de la progenie, de cada cruce se evaluarán 100 plantas.

Los estados de crecimiento de los progenitores y su descendencia fueron registrados. La inoculación se realizó al inicio de la ejerción de la panícula. Las hojas se enumeraron del 1 al 5 comenzando de arriba hacia abajo, siendo la número 1 la hoja bandera. Se evaluaron las lesiones en

la segunda, tercera, cuarta y quinta hoja por ser estas las más indicadas para determinar la severidad de la infección en plantas individuales (12).

Con la ayuda de un sacabocados previamente flameado, los tallos se inocularon tomando discos de agar contentivos de micelio del hongo y colocados en las cuatro hojas por debajo de la hoja bandera a nivel del nudo dentro de la vaina. Inmediatamente después de la inoculación las plantas se cubrieron con una bolsa plástica y se dejaron incubadas en cámara húmeda por una semana (12).

4.4 Evaluación de la reacción a la inoculación con *R. solani*

Después de una semana de la incubación, se midió el área total y el área afectada de cada una de las plantas, determinándose con estos datos el porcentaje de área afectada, por la enfermedad PDV para luego ser agrupadas según la escala 0 a 9 donde 0 = sin lesión, 1 = lesiones cubriendo el 10% de la superficie del área foliar y así sucesivamente hasta 9 = lesiones cubriendo toda el área foliar (90 a 100% de las hojas).

5. Evaluación molecular de los progenitores y sus progenies

5.1 Extracción de ADN.

Las semillas de los progenitores y su descendencia fueron pregerminadas en papel de filtro humedecido por 3 d en ambiente de laboratorio. Luego se trasplantaron a potes de 12,5 cm de diámetro contentivos de suelo estéril y colocadas en umbráculo hasta que las plantas presentaron macollamiento. En este momento se colectaron 7 hojas/planta con las cuales se procedió a la extracción del ADN.

Las hojas se colocaron en un mortero agregándole rápidamente nitrógeno líquido, se maceraron con la ayuda del pestillo hasta obtener un polvo fino; de éste se tomaron 40 mg y se colocaron en un tubo de microcentrifuga de 1,5 mL de capacidad, adicionándose 750 µL de solución tampón de extracción CTAB (2X) para solubilizar las membranas lipoproteicas y desnaturalizar las proteínas, luego se agitó con la ayuda de un vortex durante 1 a 3 s hasta lograr el total humedecimiento del material vegetal. y se colocaron los tubos en baño de María por 30 min a 65°C

Luego, se agregaron 300 µL de acetato de potasio (3 M a pH 4,8), se mezcló suavemente y se colocó a -20°C por 15 min. Transcurrido este tiempo se sometieron a centrifugación por 10 min a 14.000 RPM. Luego se transfirió cuidadosamente el sobrenadante a otro tubo.

Después, en la campana de flujo laminar, se agregaron 500 µL de cloroformo-alcohol isoamílico 24:1, se mezcló suavemente por inversión y se centrifugó a 14.000 RPM por 5 min. Luego se agregaron 500 µL de isopropanol muy frío y se dejó a -40°C entre 30 y 60 min. Transcurrido el tiempo, se centrifugó a 14.000 RPM por 10 min y se descartó el sobrenadante, quedando el ADN en el pelet.

El pelet se lavó dos veces con 500 µL de etanol al 70% frío, centrifugándose dos veces a 14.000 por 5 min, luego se dejó secar invertido sobre una servilleta. Para resuspender el ADN se utilizó tampón TE y se guardó a -20°C

5.2 Selección de Iniciadores de PCR.

Las secuencias y posición en el mapa de los cromosomas del arroz de los marcadores SSR para PCR, se obtuvieron de la base de datos GRAMENE (28), página Web creada y mantenida por la Universidad de Cornell, y sintetizados en IDT, Inc. (Coralville, IA, EE.UU). Para determinar cuáles microsatélites resultaban polimórficos y mostraban mayor asociación con el gen o los genes de resistencia presentes en los cultivares progenitores y sus segregantes, se evaluó un conjunto de aproximadamente 150 microsatélites seleccionados con base a una separación de 10 cM aproximadamente entre dos marcadores.

5.3 Amplificación de los microsatélites

Los extractos de ADN obtenidos de las muestras, se sometieron a PCR usando la técnica de microsatélites o de secuencias simples repetidas (SSR), bajo las siguientes condiciones de reacción: Volumen final 15 μ L, extracto de ADN 1,5 μ L (10ng/ml), cebadores (primers) 0,6 μ L (10 μ M, sentido y contrasentido), mezcla de dNTPs 0,3 μ L (10 mM), Tampón 10X PCR/MgCl₂ 1,5 μ L, Taq polimerasa 0,15 μ L y agua desionizada estéril 10,95 μ L.

El programa de amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 *Programmable Thermal Controller MJ Research, Inc.*, el cual constó de un paso de desnaturalización inicial a 94°C por 5 min. Seguido de 35 ciclos de desnaturalización 94°C por 15 s, hibridación a 55°C por 15 s, seguido de extensión a 72°C por 15 s, luego paso de extensión final a 72°C por 5

min y se terminó con una temperatura de 4°C para conservar indefinidamente.

Los marcadores se amplificaron a diferentes temperaturas de hibridación [T_m : por sus siglas en inglés melting temperature] de acuerdo a la temperatura estimada por el fabricante para los cebadores.

5.4 Electroforesis

Una vez amplificado el ADN, las muestras se sometieron a corridas electroforéticas en geles de agarosa a una concentración del 3% usando el tampón de corrida TBE 1 X en una cámara de electroforesis horizontal, con el fin de observar el polimorfismo de los microsatélites evaluados. Se observaron los productos de PCR amplificado que fueron mayores de 50 pb.

5.5 Electroforesis en geles de agarosa

Para la elaboración de los geles de agarosa se emplearon cámaras de 250 mL y peines de 42 pozos. Se mezclaron 250 mL de buffer TBE 1X con 7,5 gr de agarosa [3%] y se sometió a calentamiento en horno microondas con agitaciones periódicas hasta ebullición. Luego, bajo agitación lenta, cuando la mezcla alcanzó una temperatura aproximada de 45°C, se agregaron 5 μ L de bromuro de etidio y se sirvió en la cámara de extracción dejando polimerizar por el término de 30 min aproximadamente. Una vez polimerizado el gel se retiraron los peines y se introdujo en la cubeta con tampón TBE 1X.

A cada muestra de producto de PCR amplificado se le añadió 2 μL de tinción de carga 2X [Formamida 95%, EDTA 20mM, Azul de bromofenol 0,05%, Xilencianol FF 0,05%], y se colocaron en cada pozo 10 μL de la mezcla. Al completar el llenado de los pozos se corrió durante 1 h 45 min aproximadamente a 60 W/cm^3 y posterior a este tiempo, el gel se expuso a luz ultravioleta para visualizar las bandas ampliadas de ADN las cuales se digitalizaron en un ChemiDoc™ XRS + System.

6. Análisis de la información.

6.1 Análisis de la reacción de los progenitores y las progenies a *R. solani*.

Las plantas inoculadas se clasificaron de acuerdo a la escala de evaluación en resistentes (R) y susceptibles (S), representándose en una matriz. El criterio para dicha clasificación fue el siguiente, todas aquellas plantas que mostraron, según la escala, valores entre 0 y 4 según la escala fueron consideradas resistentes, mientras que las que tuvieron valores entre 5 y 9 se consideraron susceptibles. Se usó la prueba de Chi-cuadrado (χ^2) para el análisis de la herencia de la resistencia a la PDV.

El criterio utilizado fue el siguiente: Si las plantas evaluadas en la población F_2 muestran una distribución normal de acuerdo con la escala de evaluación, para su análisis cada planta mantendrá su valor de acuerdo con la escala de evaluación.

6.2 Análisis de los datos para detectar la asociación entre la resistencia en plantas de arroz a *R. solani* y los SSR

Para detectar la presencia de QTL que confieren resistencia a la PDV en arroz asociado a marcadores SSR se utilizó el método de Mapeo por Intervalo Compuesto.

A partir de la visualización de los productos de PCR en geles de agarosa, se preparó una matriz para asignarle el alelo correspondiente por cada SSR seleccionado a cada progenitor y progenie F₂. El promedio del porcentaje de área afectada de cada individuo de la población F₂ y la función de Kosambi fueron utilizados para determinar la distancia de mapeo por intervalo compuesto (CIM) (11).

El análisis QTL [(Quantitative Trait Loci), Loci de Rasgos Cuantitativos] se realizó usando el programa Windows QTL Cartographer[®], versión 2.5 (45), con los parámetros predeterminados del modelo 6, modelo estándar, con cinco marcadores fijados previamente asociados al carácter a través del método de regresión paso a paso y una longitud de ventana de 10 cM a los lados del intervalo. Para declarar la presencia de QTL se usó el umbral de LOD ≥ 2.4 (P= 0,05).

V RESULTADOS

1. Cruzamiento

De los cruces realizados entre los cultivares Palmar x Fonaiap 1 y Jefferson X Fonaiap 2000 se obtuvo un total de 30 semillas F_1 de cada cruce. El almacenamiento de las semillas bajo refrigeración no afectó su viabilidad, mostrando un 100% de germinación. De las semillas F_1 provenientes de cada cruce, se obtuvieron aproximadamente 3000 semillas F_2 .

2. Evaluación de la reacción de los progenitores y progenie

El método de inoculación realizado mostró ser efectivo, al presentarse en todas las vainas inoculadas síntomas de la enfermedad entre las 24 y 48 h después de realizada la inoculación.

Los progenitores mostraron un porcentaje de área afectada entre un 11 y 67%, resultando resistentes Palmar (11%) y Jefferson (32%) mientras que los cultivares Fonaiap 1 (60%) y Fonaiap 2000 (67%) resultaron susceptibles. La variación fenotípica a la reacción a la PDV entre los progenitores, medida por la diferencia del área foliar afectada, fue de 49% entre los cultivares Palmar y Fonaiap 1 y entre los progenitores Jefferson y F2000 fue de 35%.

La población F_2 producto del cruce entre Palmar X Fonaiap1 mostró un porcentaje de área afectada entre el 8 y 91%, siendo la variación a la reacción en esta población de 83%, mientras que para el cruce Jefferson

X Fonaiap2000 el porcentaje de área afectada mostró valores entre un 80 y un 12%, con una variación de 68%. La prueba de Chi-cuadrado (χ^2) mostró una relación 1:1 resistente susceptible para ambas poblaciones evaluadas.

La población F_2 obtenida del cruce Palmar X Fonaiap 1 mostró, de acuerdo a la fórmula de probabilidad para normalidad de Shapiro-Wilk, que la reacción fenotípica de la población segregante al hongo *R. solani* presentan una variación continua con un valor de $P(W) = 0,4084$, por lo tanto se ajustó a una distribución normal (Fig. 1), con media de 47,5; una desviación muestral de 17,54 y una varianza muestral de 307,80.

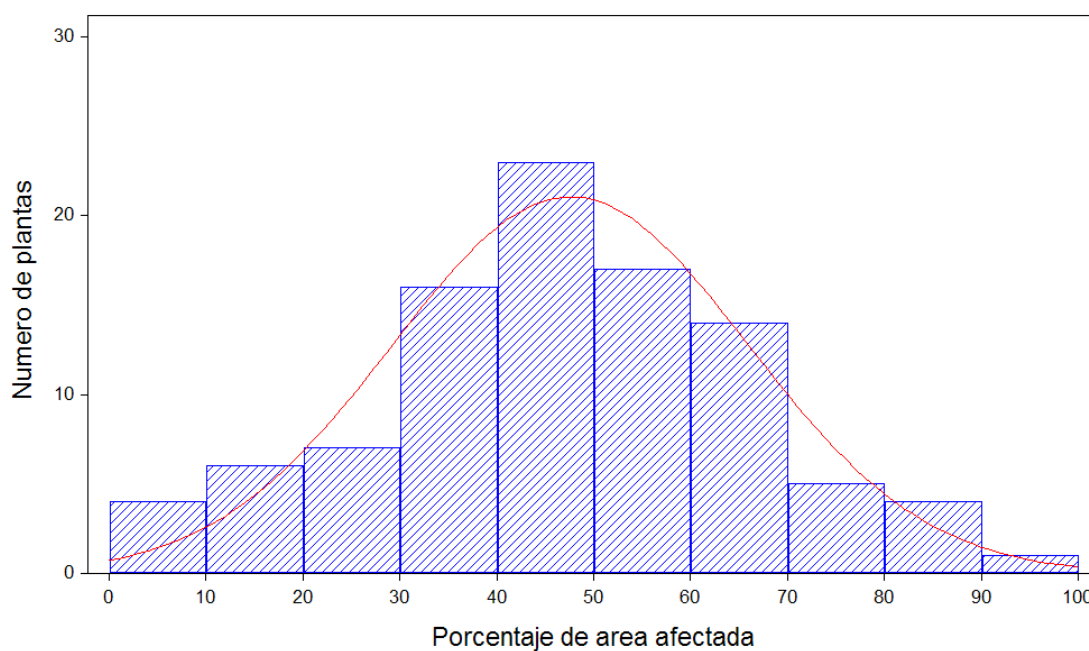


Fig. 1 Distribución modal del porcentaje de área afectada por el hongo *R. solani* en la población segregante F_2 Palmar x Fonaiap 1

De acuerdo a la formula de probabilidad de Shapiro-Wilk, la población F_2 del cruce Jefferson X Fonaiap 2000 mostró, que la reacción fenotípica de la población segregante al hongo *R. solani* presentó una variación continua con un valor de $P(W)= 0,1052$, por lo tanto se ajustó a una distribución normal (Fig. 2), con una media de 48,62; una desviación muestral de 13,55 y una varianza muestral de 183,48.

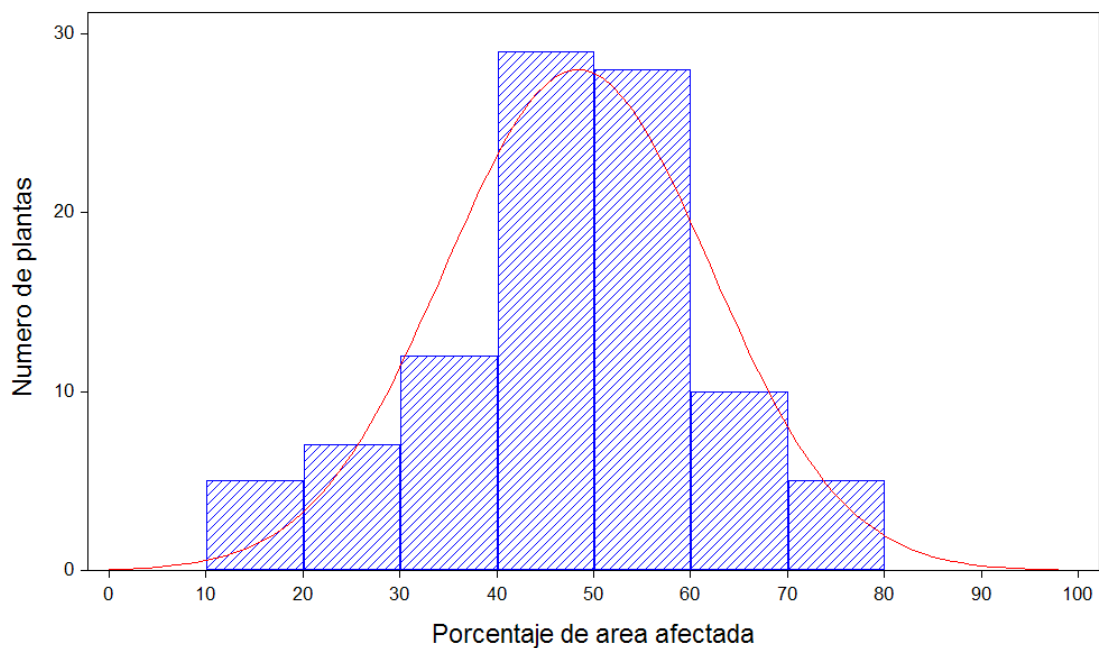


Fig. 2 Distribución modal del porcentaje de área afectada por el hongo *R. solani* en la población segregante F_2 Jefferson x Fonaiap 2000.

3. Evaluación molecular de los progenitores y sus progenies

La visualización de la amplificación de los marcadores SSR en geles de agarosa al 3% fue posible, observándose una banda producto de la amplificación del marcador para cada progenitor. Para los progenitores y la población F_2 producto del cruce Palmar x Fonaiap 1 se encontraron 70

marcadores SSR polimórficos, mientras que para los progenitores y la población F₂ producto del cruce Jefferson x Fonaiap 2000 se encontraron 69 SSR polimórficos.

La distribución de los 70 marcadores para el cruce Palmar x Fonaiap 1 fue la siguiente: 10 SSR cromosoma 1, 10 SSR cromosoma 2, 11 SSR cromosoma 3, 5 SSR cromosoma 4, 7 SSR cromosoma 5, 2 SSR cromosoma 6, 8 SSR cromosoma 7, 2 SSR cromosoma 8, 6 SSR cromosoma 9, 3 SSR cromosoma 10, 3 SSR cromosoma 11, 3 SSR cromosoma 12.

La distribución de los 69 marcadores para el cruce Jefferson x Fonaiap 2000 fue la siguiente: 7 SSR cromosoma 1, 8 SSR cromosoma 2, 9 SSR cromosoma 3, 6 SSR cromosoma 4, 6 SSR cromosoma 5, 7 SSR cromosoma 6, 8 SSR cromosoma 7, 2 SSR cromosoma 8, 4 SSR cromosoma 9, 4 SSR cromosoma 10, 4 SSR cromosoma 11, 4 SSR cromosoma 12.

4. Asignación de QTL para la resistencia a *R. solani*.

Como los segregantes F₂ provenientes de ambas poblaciones mostraron una distribución normal, de acuerdo con la escala de evaluación, el análisis para la asignación de QTL se realizó manteniendo cada planta su valor en porcentaje de área foliar afectada debida a la inoculación de *R. solani*.

En la población Jefferson x Fonaiap 2000 no se detectó la presencia de QTL, todos los valores obtenidos en el análisis, se ubicaron por debajo del límite LOD = 2,4.

El mapa SSR para el análisis QTL, para la población Palmar x Fonaiap 1, fue construido utilizando 96 plantas segregantes y 70 marcadores SSR, distribuidos en los 12 cromosomas del arroz.

Tres QTLs fueron identificados para la resistencia a *R. solani*, estos fueron **qShB1**, **qShB4** y **qShB12** localizados en los cromosomas 1, 4 y 12 respectivamente.

Los alelos resistentes provenientes del cultivar Palmar, mostraron los siguientes resultados, el qShB1 explicó 18,17% de la variación fenotípica total, con un efecto aditivo de 11, 2281; el qShB4 explicó el 2,94% de la variación fenotípica total, con un efecto aditivo de 4,2229, mientras que el qShB12 explicó el 10,5% de la variación fenotípica total, con un efecto aditivo de 9,1270 (cuadro 3). Los marcadores microsatélites RM572 y RM449 flanquean el QTL qShB1, los microsatélites RM3471 y RM273 flanquean el QTL qShB4 y los microsatélites RM3472 y RM309 flanquean el QTL qShB12 (fig. 3).

Cuadro 3. Sumario del análisis de QTLs para la Resistencia a pudrición de la vaina usando mapeo por intervalos compuestos

QTL ^a	Cromo- soma	SSR en intervalo	SSR cercano al locus	LOD ^b	Efecto aditivo ^c	% de variación fenotípica	
qShB1	1	RM572	RM449	RM572	4.3670	11.2281	18,17
qShB4	4	RM3471	RM273	RM3471	2.3119	4.2229	2,94
qShB12	12	RM3472	RM309	RM3472	2.2951	9.1270	10.50

a QTL : Loci de caracteres cuantitativos

b qShB-QTLs fueron determinados usando un valor de probabilidad (LOD) de 2.4.

c El efecto aditivo es el efecto asociado por la sustitución del alelo del Palmar por su correspondiente alelo del Fonaiaip 1.

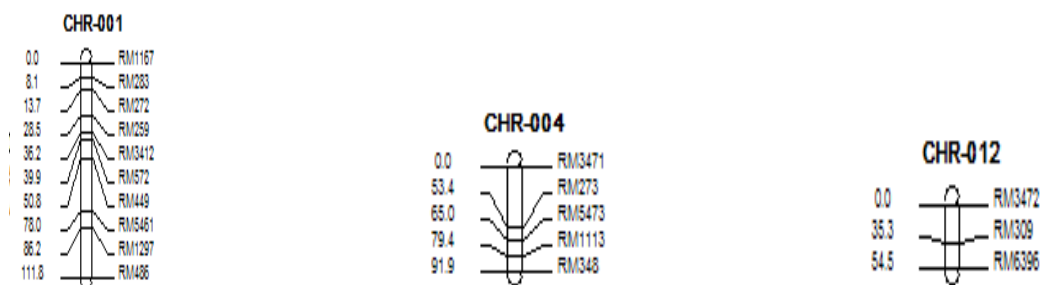


Fig. 3 Cromosomas (CHR) 1, 4 y 12 donde se localizan los QTLs identificados para resistencia a la PDV

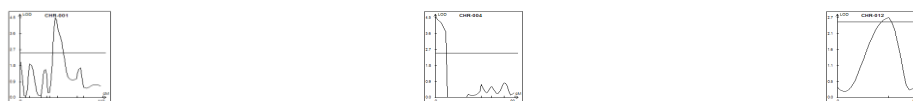


Fig 4. Graficas de los cromosomas (CHR) 1,4 y 12 donde se detectaron QTL.

VI DISCUSIÓN

En el presente trabajo se evaluó la reacción a la infección por *R. solani* en plantas de arroz, tanto en los progenitores como su descendencia, en dos poblaciones segregantes de arroz, producto de los cruces entre los cultivares Palmar x Fonaiap 1 y Jefferson x Fonaiap 2000. Las plantas fueron inoculadas con el hongo al alcanzar la etapa de crecimiento R4 (cuadro 2), debido a que la enfermedad PDV se desarrolla rápidamente dentro de la hoja envainadora, cuando las plantas se encuentran en la etapa de formación de la espiga. Además, ha sido demostrado que la severidad de la infección de *R. solani* es menor, cuando las plantas de arroz son inoculadas en etapas de crecimiento más tempranas a la R4 (12).

Se demostró la compatibilidad entre los parentales evaluados, así como también, se constató que el método utilizado para la emasculación de las flores de las plantas utilizadas como parental hembra fue adecuado, al poder obtener dos progenies segregantes que mostraron variabilidad fenotípica, evidenciadas por las diferencias en las épocas de floración.

Es importante resaltar que para realizar la prueba de patogenicidad independientemente del agente biótico causal de una enfermedad en plantas, se deben cumplir rigurosamente tres condiciones, la presencia de un patógeno capaz de causar la enfermedad, un hospedante susceptible

al patógeno evaluado y un ambiente favorable para el desarrollo del patógeno y del hospedante

Para realizar estudios sobre grados de resistencia al hongo *R. solani* en arroz, las plantas pueden ser inoculadas con el hongo de diferentes maneras, en este estudio la inoculación se realizó colocando discos de agar (PDA) colonizados por *R. solani* en las vainas de las hojas por haber sido demostrado que es más efectivo que otros métodos descritos; además, el método utilizado permitió diferenciar la reacción entre los individuos evaluados (10). Otra ventaja de la inoculación artificial de *R. solani* en condiciones controladas es la disminución de la variación debida al ambiente.

Por otro lado, ha sido señalado que en los experimentos para determinar la existencia de cultivares con susceptibilidad reducida a la PDV, se utilizan diferentes métodos de inoculación (24; 25; 28; 47), siendo la más utilizada, la evaluación en parcelas experimentales en campos inoculados artificialmente con *R. solani* (5; 38). Sin embargo las evaluaciones en estas pruebas muestran inconsistencia en la respuesta a la enfermedad, incluso entre plantas del mismo cultivar, repeticiones, año a año y de una localidad a otra (42).

Estudios realizados en invernadero para determinar la resistencia a PDV en diferentes cultivares de arroz, demostraron que además de la poca precisión en la determinación del grado de enfermedad, los cultivares seleccionados como resistentes en evaluaciones en campo,

resultaron ser susceptibles en condiciones de invernadero (3;12;19); de allí que es recomendable realizar las evaluaciones en invernadero, para determinar la resistencia a PDV en condiciones controladas y uniformes (42).

Debido a lo expuesto, el protocolo utilizado en este estudio para determinar eficientemente la reacción de los padres y su progenie a la infección causada por el hongo *R. solani* en condiciones controladas, resultó ser efectivo al no ocurrir escape, lo que se evidenció porque todas las plantas mostraron síntomas de la enfermedad con diferentes grados de severidad, lo que permitió agrupar a la descendencia (F_2) de acuerdo al porcentaje del área afectada. El estudio mostró que el mayor porcentaje de área afectada por la enfermedad fue del 91%.

En las progenies evaluadas se observó una variación continua en la reacción fenotípica a la inoculación artificial del hongo *R. solani*, por lo que se ajusta a una distribución normal, demostrándose en ambas descendencias que la resistencia a *R. solani* en plantas de arroz es una característica cuantitativa condicionada por varios genes.

Además, se observó segregación transgresiva, determinada por la reacción fenotípica a la inoculación artificial con *R. solani* de la descendencia (F_2), que mostró individuos extremos, es decir, más resistentes o más susceptibles que los respectivos parentales; la herencia transgresiva es considerada el efecto principal producto de la acción complementaria de genes presentes en ambos progenitores, por esto la

resistencia a PDV en estas poblaciones segregantes es determinada por muchos genes, donde cada gen tiene un efecto pequeño sobre la expresión fenotípica final de resistencia, siendo ésta la suma de los efectos individuales.

Ha sido determinado que existe ausencia de resistencia completa en arroz a *R. solani* (28; 31), considerándose que esta resistencia es multigénica, siendo difícil evaluar el efecto individual de los genes que confieren esta resistencia (5). Los resultados del presente estudio coinciden con las investigaciones antes señaladas.

En el presente trabajo, se evaluaron 100 marcadores SSR, obteniéndose las secuencias de los cebadores que los amplifican y su ubicación en los cromosomas del arroz señalados por Mc Couch *et al* (28) de los cuales 70 SRR resultaron polimórficos en la descendencia obtenida de los progenitores Palmar x Fonaiap 1 y 69 SSR mostraron polimorfismo en la descendencia obtenida del cruce entre los progenitores Jefferson x Fonaiap 2000, pudiendo ser detectados en geles de agarosa.

En la descendencia segregante del cruce Jefferson x Fonaiap 2000 no se detectó la presencia de QTL, con el programa Windows QTL Cartographer[®], versión 2.5 (46), por ubicarse la asociación entre los marcadores SSR y la resistencia a PDV por debajo del límite LOD = 2,4 (P= 0,05); propuesto como umbral para declara la presencia de QTL, esto puede explicarse debido a la divergencia fenotípica (68%) no es lo

suficientemente amplia, por lo que se necesita aumentar el tamaño de la población experimental para poder detectar los QTL con LOD > 2,4.

En la descendencia del cruce Palmar x Fonaiap 1, que mostró una divergencia fenotípica de 83%, se detectó asociación entre marcadores SSR y la resistencia a *R. solani*, identificándose tres QTL para la resistencia a PDV, **qShB1**, **qShB4** y **qShB12**, localizados en los cromosomas 1, 4 y 12 respectivamente.

Los alelos **qShB1** y **qShB12** explican el 28,67% de la variación fenotípica total, con un efecto aditivo de 20,36; demostrando la importancia de detectar estos dos **qShB** en plantas de arroz provenientes de los cruces Palmar x Fonaiap 1, estos QTL están flanqueados por los marcadores microsatélites RM572 - RM449 y los microsatélites RM3472 – RM309 respectivamente.

El hecho de haber realizado las inoculaciones artificiales de *R. solani* bajo condiciones controladas, permitió evitar que las respuestas genéticas se confundieran con otras variables como los factores ambientales (21), incluyendo también a otros factores fisiológicos y morfológicos, como la altura de la planta y fecha de emisión de la espiga, los cuales han sido reportados como factores que confunden la asociación entre la respuesta de resistencia y los genes cuantitativos (45; 50).

Desde 1995 hasta 2009, se han desarrollado diferentes poblaciones experimentales para la evaluación de QTL, estas poblaciones provienen de los cruces entre cultivares resistentes (Teqing, Jasmin85, Jingxi,

Minghui 63, 4001, Hinohikari y Pecos) y susceptibles (Lemont, Zhaiyeqing 8, Zhenshan 97, XZX19, WSS2 y Rosemont), usando segregantes obtenidos como F₄ bulk (granel), dobles haploides, F₂, RILs (Líneas endocriadas recombinantes), BC₁ (una retrocruza) F₁, observándose que en estos casos existe asociación entre los QTL con resistencia a la enfermedad PDV y QTL que determinan algunos rasgos agronómicos como altura de planta y fecha de emisión de la espiga (17).

Así mismo, otros reportes señalan correlación entre QTLs para resistencia a la PDV y varios caracteres morfológicos en arroz, encontrándose que estos rasgos morfológicos y la resistencia están localizados en el mismo intervalo (48); además, se señala que la inadecuada forma de evaluar la respuesta de la planta a la PDV, es probablemente la razón principal de los resultados inconsistentes entre los reportes anteriores (14).

Para lograr el objetivo con la SAM, es importante comprender los mecanismos de resistencia a la PDV, tener un mapa detallado de los genes de interés y la clonación de los mismos. Existen dos problemas comunes para el uso de SAM con QTL de resistencia al PDV, (i) Los marcadores de ADN identificados pueden no estar asociados a la resistencia a PDV en un germoplasma diferente al evaluado, y (ii) Los métodos de evaluación fenotípica deben ser precisos para verificar la resistencia genética (39).

La SAM es una técnica que ayuda ahorrar tiempo, recursos, esfuerzo, se puede aplicar en etapa de plántula, esto ultimo es util cuando las características de interés se manifiestan en etapas posteriores de desarrollo de la planta, eliminando los genotipos no deseados en etapas tempranas, reduciendo el numero de líneas a evaluarse en las etapas avanzadas del programa y aumenta la eficiencia del mejoramiento por realizarse la selección cuando existe mayor probabilidad de ligamiento entre el marcador y el QTL seleccionado. La SAM es una vía rápida por seleccionar plantas según su genotipo y ser difícil distinguir por fenotipo las plantas homocigotas de las heterocigotas para el carácter deseado (2).

Por lo señalado en los párrafos anteriores y de acuerdo a los resultados obtenidos en el presente trabajo, es importante señalar que una vez identificados los marcadores moleculares asociados a los QTL que confieren resistencia a PDV en una descendencia segregante, es posible plantear el uso de la SAM.

Para el caso de resistencia a la PDV, la SAM debe realizarse en generaciones tempranas, debido a que en éstas generaciones existe un mayor grado de asociación entre el marcador y el QTL de resistencia a PDV detectado, además, al avanzar las generaciones la asociación entre el QTL y los marcadores seleccionados puede romperse debido a la recombinación genética (2).

Los resultados obtenidos en este trabajo, sugieren que con la SAM pueden seleccionarse genotipos que presenten la acumulación de genes de resistencia ubicados en diferentes loci, que dan como resultado un incremento en los grados de resistencia a la enfermedad (Fig. 1).

Adicionalmente, con la SAM se posibilitará la selección de los individuos con mayor resistencia a la PDV, presentes en la población obtenida del cruce Palmar X FONAIAP 1, utilizando como referencia los marcadores asociados a los QTL de resistencia a esta enfermedad, que explican el 31,81% de la variación fenotípica total, sin necesidad de llevar a cabo la inoculación y evaluación de la resistencia.

Así mismo, Zuo *et al* (2008) demostraron el potencial que tienen los marcadores moleculares para la clonación e implementación del uso de genes de resistencia QTL en el mejoramiento del germoplasma en arroz entre sub especies (51). Se ha reportado que cultivares de arroz susceptibles poseen genes que confieren resistencia a la PDV y los padres susceptibles portadores de estos genes una fuente valiosa para el desarrollo de nuevas líneas con resistencia a la PDV superior a sus padres (52).

Zou, *et al*, encontraron que es efectiva la transferencia de QTLs entre cultivares de arroz, mejorando así la resistencia a la PDV al reducir la severidad de la enfermedad. También demostro, que algunos cultivares con reacción moderadamente resistente a la PDV, es posible mejorarlos en sus respuesta de resistencia por introgresión de genes contenidos en

QTLs, constituyendo una importante estrategia de desarrollo de cultivares con resistencia a la PDV. Es importante señalar que los QTLs favorables se puede transferir fácilmente utilizando la SAM a cultivares élites para reforzar sus grados de resistencia, por ello, los marcadores moleculares ligados a QTLs asociados a la resistencia a la PDV, son de mucha utilidad práctica en programas de mejoramiento de arroz (52).

En las progenies seleccionadas con la técnica SAM, se espera la predominancia del genotipo deseado dando lugar al final del proceso de mejoramiento, a líneas de arroz con resistencia durable y de amplio espectro a la PDV (41). Por último, los tres QTL detectados en el presente trabajo no han sido señalados en la literatura, lo que constituye un valioso aporte en el estudio de la resistencia a la PDV.

VII CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

El método de inoculación bajo condiciones controladas utilizado en este estudio mostró ser efectivo, al lograr que todas las plantas se enfermaran.

La etapa de desarrollo de las plantas de arroz es importante al momento de realizar la inoculación, debido a que la mayor susceptibilidad de las plantas de arroz a *R. solani* es la etapa R4 .

Debido a que la respuesta a la inoculación en las poblaciones evaluadas muestran una distribución continua, la resistencia en arroz a *R. solani* es poligénica.

El uso de marcadores SSR que resultaron ser polimorfos en los padres y su descendencia permitió detectar QTLs.

Se detectaron tres QTL en la población segregante obtenida del cruce entre los progenitores Palmar y Fonaiap 1, los cuales no han sido señalados en la literatura.

Se recomienda aumentar el número de individuos a evaluar en la población segregante obtenida del cruce entre los progenitores Jefferson y Fonaiap 2000 para poder detectar QTL

Se recomienda realizar la evaluación fenotípica de progenitores a la reacción de patógenos del arroz, con fines de determinar si la resistencia es cualitativa o cuantitativa, en condiciones controladas.

Los progenitores a evaluar para detectar QTL deben ser polimorficos a los

marcadores moleculares utilizados y poseer marcada divergencia a la característica de interés a estudiar.

VIII LITERATURA CITADA

- 1) Acevedo, M., Castrillo, W., y Belmonte, U. 2006. Origen, Evolución y Diversidad del arroz. *Agronomía Trop.* 56(2): 151-170
- 2) Akhtar, S., Bhat, M. A., Wani, S.A., Bhat, K. A., Chalkoo, S., Mir, M. R. and Wani, S. A. 2010. Marker Assisted Selection in Rice. *Journal of Phytology.* 2: 66-81
- 3) Araújo, L., Prabhu, A., and da Silva G. 2007 Field and greenhouse inoculation methods for assessment of sheath blight resistance in rice *Crop Breed Appl Biotechnol* 7: 221-224
- 4) Cedeño, L., Nass, H., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H., Alemán, L. 1996. *Rhizoctonia solani* AGI-IA causa principal del añublo de la vaina en arroz. *Fitopatol. Venez.* 9:6-9.
- 5) Che, K.P., Zhan, Q.C., Xing, Q.H., Wang, Z.P., Jin, D.M., He, D.J., Wang, B. 2003. Tagging and mapping of rice sheath blight resistant gene. *Theor. Appl. Genet.* 106: 293-297.
- 6) Correa-Victoria, F. 1993. Alternativas para el manejo del añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani*. *Arroz* 41:32-37
- 7) CROW, J.F. 1990. Mapping functions. *Genetics.* 125: 669-671.
- 8) Davierwala A.P.; Ramakrishna W.; Chowdari V.; Ranjekar P.K.; Gupta V. 2001. Potential of (GATA)_n microsatellite from rice for inter-and intra-specific variability studies. *BMC Evolutionary Biology* 1:7
- 9) Delgado, N., Rodríguez, H. 2005 Creating a Rice Population Resistant to *Rhizoctonia solani* Kühn. Chapter 14. In *Population improvement: A way of exploiting the RICE genetic resources of Latin America*. Ed Elcio Perpétuo Guimarães. 350 pp.
- 10) Delgado, N., Rodríguez, H. y Ramon, M. 2004 Evaluación de métodos de inoculación de *Rhizoctonia solani* sobre germoplasma de arroz en campo. *Rev. Fac. Agron.*, 21: 374-384.
- 11) Díaz, A. 2005. Marcadores moleculares. Instituto de Genética Fagro - UCV. 111 pp
- 12) Eizenga, G.C.; Lee, F.N., Rutger, N.S. 2002. Screening *Oryza* species plants for rice sheath blight resistance. *Plant Dis.* 86: 808-812

- 13) Graterol, E., Borges, O., Nass, H., y Salih, A. 1996. Herencia transgresiva para la resistencia a *Rhizoctonia spp.* en poblaciones segregantes de arroz (*Oryza sativa* L.) Revista electrónica DANAC Investigación Agrícola N^o 1.
- 14) Han, Y. P., Xing, Y.Z., Gu, S.L., Pan, X.B., Chen, X.L. 2003. Effect of morphological traits on sheath blight resistance in rice. Acta Botanica Sinica 45:825-831.
- 15) Internacional Rice Genoma Sequencing Project. 2005. The map based sequenced of the rice genome. Nature 436: 793-800.
- 16) International Rice Research Institute 2002 [Growth Stages of the Rice plant](#) 31pp
- 17) Jia, Y., G. Liu, S. Costanzo, S. Lee, and Y. Dai. 2009. Current progress on genetic interactions of rice with blast and sheath blight fungi. Front. Agric. China 3: 231-239
- 18) Khush, G.S., Toniessen, G. 1991. Rice biotechnology. Biotechnology in Agriculture no. 6, IRRI (International Rice Research Institute). Wallingford, Oxon, UK: CAB International.
- 19) Liu, G., Jia, Y., Correa-Victoria, F. J., Prado, G. A., Yeater, K. M., McClung, A., and Correll, J. C. 2009. Mapping quantitative trait loci responsible for resistance to sheath blight in rice. Phytopathology 99:1078-1084
- 20) Londo, J., Chiang, Y., Hung, K., Chiang, T., and Schaal, B. 2006. Phylogeography of Asian wild rice, *Oryza rufipogon*, reveals multiple independent domestications of cultivated rice, *Oryza sativa*. PNAS 25: 9578-9583
- 21) Lu, C., Shen, L., Tan, Z., Xu, Y., He, P., Chen, Y., and Zhu, L. 1996. Comparative mapping of QTL for agronomic traits of rice across environments using a doubled haploid population. Theor. Appl. Genet. 93:1211-1217
- 22) Malaguti, G. 1952. Mancha de la hoja envainadora del arroz causada por *R. solani*. Agron. Trop. II 41-53.
- 23) Marshall, D., y Rush M. 1980. Relation between infection by *Rhizoctonia solani* and *R. oryzae* and disease severity in rice. Phytopathology 70: 941-946

- 24) Marchetti, M.A., Bollich C.N., McClung, A..M., Scott, J.E., Webb, B.D. 1995. Registration of RU8703196 disease resistant rice germplasm. *Crop Sci.* 35: 601
- 25) Marchetti, M.A., A.M. McClung, B.D. Webb, and C.N. Bollich. 1996. Registration of B82–761 long-grain rice germplasm resistant to blast and sheath blight. *Crop Sci.* 36:815.
- 26) Martin, A. 1977. *Introduction to Soil Microbiology*. Second edition. Wiley & Sons New York. 474pp
- 27) Matsumoto, T. 1921. Studies in the physiology of the fungi XII. Physiological specialization in *Rhizoctonia solani* Kühn. *Ann. Mo. Bot. Gard.* 8: 1-62
- 28) McCouch, S.R., Chen, X.L., Panaud, O., Temnykh, S., Xu, Y.B., Cho, Y.G., Huang, N., Ishii, T., Blair, M.. 1997. "Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding". *Plant. Molec. Biol.* 35:89-99.
- 29) McCouch, S.R., Teytelman, L., Xu, Y., Lobos, K.B., Clare, K., Walton, M., Fu, B., Maghirang, R., Li, Z., Xing, Y., Zhang, Q., Kono, I., Yano, M., Fjellstrom, R., DeClerck, G., Schneider, D., Cartinhour, S., Ware, D., Stein, L. 2002. Development and mapping of 2240 new SSR markers for rice (*Oryza sativa* L.). *DNA Res.* 31:199-207
- 30) Mew, T. W. y A. M. Rosales. 1985. Influence of *Thichoderma* on survival of *Thanatephorus cucumeris* in association with rice in the tropics. In: C. A. Parker et al. (eds). *Ecology and Management of Soilborne Plant Pathogens*. APS Press. St Paul. Minnesota. pp. 117 – 120
- 31) Mew, T. W., Leung, H., Savary, S., Vera Cruz, C. M., and Leach, J. E. 2004. Looking ahead in rice disease research and management. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 23:103-127.
- 32) Molina, L. 1998 Notas sobre la situación de la producción primaria de arroz en Venezuela *AGROALIMENTARIA* N 6: 45-55
- 33) MORTON, N.E. 1955. Sequential test for the detection of linkage. *American Journal of Human Genetics* 7: 277-318.
- 34) Nass, H.A., Cedeño, L., Carrero, C., Cardona, R., Rodríguez, H., Alemán, L. 1995. *Rhizoctonia solani* AG1-IA importante patógeno del arroz (*Oryza sativa*) en Venezuela. *Rev. Forest. Venez.*, 1: 142-143. (Abstract.).

- 35) National Bureau of Plant Genetic Resources. 2006 Document on Biology of Rice (*Oryza sativa* L.) in India. Indian Council of Agricultural Research New Delhi 79 pp
- 36) Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. Annual Review of Phytopathology 25: 125-143
- 37) Ou, S.H. 1985. Rice disease 2n ed. Common. Mycol. Inst. Kew Surrey, England 380 pp.
- 38) Pan, X.B., Rush, M.C., Sha, X.Y., Xie, Q.J., Liscombe, S.D., Stelina, S.R., Oard, J.H. 1999. Major gene nonallelic sheath blight resistance from the rice cultivars Jasmine 85 and Teqing. Crop. Sci. 39: 338-346
- 39). Pan, X., Zhang, Y., Zuo, S., and Chen, Z. 2005. Discussion on QTL identification and application for important quantitative traits in crops. J. Yangzhou Univ. (Agric. Life Sci.) 26:50-55. (In Chinese with an English abstract)
- 40) Parmeter, J.R., Jr. 1970. Biology and pathology of *Rhizoctonia solani*. Univ. Calif. Press, Berkeley
- 41) Pastor-Corrales, M.A., C. Jara, and S.P. Singh. 1998. Pathogenic variation in, sources of, and breeding for resistance to *Phaseoisariopsis griseola* causing angular leaf spot in common bean. Euphytica 103:161-171
- 42) Pinson, S R. M., Capdevielle, F. M., Oard, J. H. 2005 Confirming QTLs and finding additional loci conditioning sheath blight resistance in rice using recombinant inbred lines. Crop Sci. 45:503–510.
- 43) Prabhu AS, Filippi MC, Silva GB and Santos GR (2002) Resistência de cultivares de arroz a *Rhizoctonia solani* e *Rhizoctonia oryzae*. Pesquisa Agropecuária Brasileira 37: 589-595
- 44) Rodríguez, H., Nass, H., Cardona, R., Alemán, L. 1999. Alternativas para controlar el añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani* en arroz. Fitopatol. Venez. 12:18-21
- 45) Sato, H., Ideta, O., Ando, I., Kunihiro, Y., Hirabayashi, H., Iwano, M., Miyasaka, A., Nemoto, H., and Imbe, T. 2004. Mapping QTL for sheath blight resistance in the rice line WSS2. Breed. Sci. 54:265-271

- 46) Wang, S., Basten, C. J., and Zeng, Z. B. 2007. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh. (<http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm>)
- 47) Xie, Q.J., Liscombe, S.D., Rush, M.C., and Jodari, K.F. 1992. Registration of LSBR-33 and LSBR-5 sheath blight resistant germplasm line of rice. *Crop. Sci.* 32:507
- 48) Zane L.; Bargelloni L.; and Patarnello T.; 2002. Strategies for microsatellites isolation: a review. *Molecular Ecology*. 11 : 1-16.
- 49) [Zheng](#), A., [Lin](#), R., [Zhang](#), D., [Qin](#), P., Xu, L., [Ai](#), P., [Ding](#), L., [Wang](#), Y., [Chen](#), Y., [Liu](#), Y., [Sun](#), Z., [Feng](#), H., [Liang](#), X., [Fu](#), R., Tang, C., [Li](#), Q., [Zhang](#), J., [Xie](#), Z., [Deng](#), Q., [Li](#), S., [Wang](#), S., [Zhu](#), J., [Wang](#), L., Liu, H., and P. Li. 2013. The evolution and pathogenic mechanisms of the rice sheath blight pathogen. *Nat. Commun.* 4:1-10.
- 50) Zou, J.H., Pan, X.B., Chen, Z.X., Xu, J.Y., Lu, J.F., Zhai, W., Zhu, L.H. 2000. Mapping quantitative trait loci controlling sheath blight resistance in two rice cultivars (*Oryza sativa* L.) *Theor. Appl. Genet.* 101:569-573.
- 51) Zuo, S., Zhang, L., Wang, H., Yin Y., Zhang, Y., Chen, Z., Ma, Y., and Pan, X. 2008. Prospect of the QTL-qSB-9Tq utilized in molecular breeding program of *japonica* rice against sheath blight. *J. Genet. Genomics* 35:499-505.
- 52) Zuo, S., Yin, Y., Zhang, L., Zhang, Y., Chen, Z., Gu, S., Zhu, L. and Pan, X. 2011. Effect and breeding potential of qSB-11LE, a sheath blight resistance QTL from a susceptible rice cultivar. *Can. J. Plant Sci.* 91: 191-