

**PROGRAMA DE EDUCACIÓN PARA EL DESARROLLO Y LA
CONSERVACIÓN
ESCUELA DE POSGRADUADOS**

**Estudio de la resistencia en variedades de arroz (*Oryza sativa* L.)
venezolanas al virus de la hoja blanca**

Tesis sometida a consideración de la Escuela de Posgrado, Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación del Centro Agronómico Tropical de Investigación y Enseñanza como requisito para optar por el grado de:

Magister Scientiae en Agricultura Ecológica

Por

Natalia Ysabel Labrín Sotomayor

Turrialba, Costa Rica, 2007

Esta tesis ha sido aceptada en su presente forma por el Programa de Educación para el Desarrollo y la Conservación y la Escuela de Posgrado del CATIE y aprobada por el Comité Consejero del Estudiante como requisito parcial para optar por el grado de:

MAGISTER SCIENTIAE

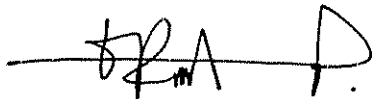
FIRMANTES:



Andreas Ebert, Ph.D.
Consejero Principal.



Lee Calvert, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

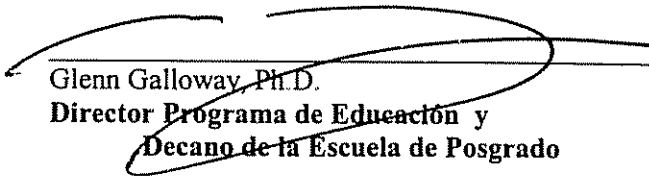


Galileo Rivas, Ph.D.
Miembro Comité Consejero

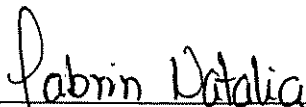


Carlos Astorga, M.Sc.
Miembro Comité Consejero

Iris Pérez, Ph.D.
Miembro Comité Consejero



Glenn Galloway, Ph.D.
**Director Programa de Educación y
Decano de la Escuela de Posgrado**



Natalia Labrín Sotomayor
Candidata

DEDICATORIA

A la santísima trinidad y la Virgen María por ser mi fuerza, luz, guía, protección y esperanza de todos los días.

A mis amados padres por ser quienes me dieron la vida, por guiar todos mis pasos, por haberme dado las herramientas más valiosas de mi vida y por haber confiado en mí...ayer, hoy y siempre.

A Edwin por su amor y por ser mi fuerza, apoyo y compañero incondicional en esta y cada prueba de la vida.

A mis queridos hermanos por su amor, apoyo constante y aliento positivo de ánimo cada vez que fue necesario.

A mis padrinos, tíos y primos por sus bendiciones y apoyo incondicional.

AGRADECIMIENTOS

A mi profesor consejero Andreas Ebert por haberme guiado pacientemente en cada paso de este proyecto, así como por su apoyo humano y profesional.

Al Dr. Lee Calvert por haber confiado en mí, haberme permitido realizar este trabajo en su laboratorio y guiado oportunamente en este camino.

Al Dr. Francisco Morales por su apoyo durante el transcurso de la tesis.

A Iván Lozano por sus sabios consejos e instrucciones de las técnicas empleadas.

A Luís Reyes y todo su equipo de entomología – Efrén, Rodrigo y Mauricio – por su valioso apoyo profesional y humano en la realización de las evaluaciones fenotípicas.

A Miriam C. Duque, James Silva y al profesor Fernando Casanoves por su valiosa ayuda en el procesamiento estadístico de datos.

A Luz Elena y Ana Karine por su valiosa colaboración en el desarrollo de la investigación, así como su amistad y apoyo incondicional humano y profesional.

A Natalia Villareal y Edgar Torres por las provechosas discusiones y valiosa colaboración en la realización de este trabajo.

Al equipo técnico de mejoramiento del FLAR por su valiosa colaboración en la obtención de los cruces.

A mis consejeros Iris Pérez, Carlos Astorga y Galileo Rivas por sus provechosos consejos y sugerencias en el desarrollo de esta investigación, así como su apoyo humano.

A mis compañeros de laboratorio Rocío, María Consuelo, María Claudia, Cristian, José, Ana Cecilia, María Fernanda y Mauricio por su valioso apoyo incondicional, humano y profesional, en la realización de esta tesis.

A mis amigos y compañeros de la promoción 2005-2006 por todas las inolvidables vivencias compartidas.

BIOGRAFÍA

Natalia Ysabel Labrín Sotomayor nació el 9 de octubre de 1978 en Maracay, estado Aragua – Venezuela. Durante el periodo 2000 - 2002, comenzó realizando trabajos de investigación en el Laboratorio de Virología Vegetal del CENIAP-INIA (Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias - Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas) como pasante *ad honren*. En el 2003, egresó de la Universidad Nacional Experimental Rómulo Gallegos como Ingeniero Agrónomo en Producción Vegetal, desde entonces ha realizado trabajos profesionales en la Fundación para la Investigación Agrícola DANAC y el Laboratorio de Virología del CENIAP-INIA, como asistente de investigación en el Programa de Mejoramiento de Maíz-Sorgo y en el proyecto Grupo Nacional de Investigación sobre Moscas Blancas del Complejo *Bemisia tabaci* (Genandius) y otros Insectos Vectores de Enfermedades Virales en Tomate y otros Cultivos, respectivamente.

CONTENIDO

DEDICATORIA.....	III
AGRADECIMIENTOS.....	IV
BIOGRAFÍA.....	V
CONTENIDO.....	VI
RESUMEN.....	IX
SUMMARY.....	XI
ÍNDICE DE CUADROS.....	XIII
ÍNDICE DE FIGURAS.....	XIV
Lista de unidades, abreviaturas y siglas.....	XV
1 INTRODUCCIÓN.....	1
1.1 Objetivos del estudio.....	3
1.1.1 Objetivo General.....	3
1.1.2 Objetivos específicos.....	4
1.2 Hipótesis del estudio.....	4
2 Marco conceptual.....	5
2.1 Generalidades del cultivo de arroz.....	5
2.1.1 Taxonomía, morfología, sistema de reproducción y fisiología.....	5
2.1.2 Aspectos genéticos y moleculares del arroz.....	6
2.1.3 Programas de mejoramiento de arroz en Venezuela y variedades liberadas en el país.....	7
2.2 El Virus de la hoja blanca del arroz.....	8
2.2.1 Morfolología, taxonomía y aspectos moleculares.....	8
2.2.2 Enfermedad y transmisión.....	8
2.2.3 Distribución geográfica y epidemias.....	9
2.2.4 Tagosodes orizicolus vector del RHBV.....	11
2.3 Resistencia al RHBV.....	11
2.4 Silenciamiento génico post-transcripcional como mecanismo de resistencia a virus en plantas.....	12
2.5 Microsatélites como marcadores moleculares en la selección asistida.....	15
3 MATERIALES Y MÉTODOS.....	17
3.1 Localidad y sitio de trabajo.....	17
3.1.1 Material Vegetal.....	17
3.2 Evaluación fenotípica de variedades de arroz venezolanas ante el RHBV en condiciones de campo e invernadero y su variabilidad genética a través de marcadores microsatélites asociados con la resistencia al RHBV.....	17
3.2.1 Evaluación de la reacción fenotípica de variedades de arroz venezolanas ante el RHBV en condiciones de campo.....	17

3.2.2	Evaluación de la reacción fenotípica de variedades de arroz venezolanas al RHBV con tres niveles de presión del virus, en condiciones de invernadero	19
3.2.3	Evaluación de la variabilidad genética en variedades de arroz venezolanas a través de marcadores microsatélites asociados a resistencia del RHBV	23
3.2.4	Análisis de asociación entre respuestas fenotípicas y moleculares	28
3.3	Desarrollo y evaluación fenotípica de la F ₁ de los cruces ‘WC366’ x ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’ x ‘Fundarroz PN-1’ en condiciones de invernadero	28
3.4	Clonación de un gen candidato de resistencia al RHBV, ubicado en el CR4, en dos variedades venezolanas: ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’	29
3.4.1	Amplificación de los segmentos	29
3.4.2	Ligación del producto de PCR con el vector	31
3.4.3	Transformación de células competentes	32
3.4.4	Análisis de eficiencia de ligación	32
3.4.5	Aislamiento del ADN plasmídico y prueba de restricción con ECO R1	33
3.4.6	PCR de secuencia	34
3.4.7	Precipitación del ADN	34
3.4.8	Secuenciación de clones	35
4	RESULTADOS Y DISCUSIÓN	36
4.1	Evaluación fenotípica de variedades de arroz venezolanas ante el RHBV en condiciones de campo e invernadero y su variabilidad genética a través de marcadores microsatélites asociados con la resistencia al RHBV	36
4.1.1	Evaluación de la reacción fenotípica de variedades de arroz venezolanas al RHBV en condiciones de campo	36
4.1.2	Evaluación de la reacción fenotípica de variedades de arroz venezolanas al RHBV, con tres niveles de presión del virus, en condiciones de invernadero	38
4.1.3	Evaluación de la variabilidad genética en variedades de arroz venezolanas a través de marcadores microsatélites asociados con resistencia al RHBV	46
4.1.4	Análisis de asociación entre respuestas fenotípicas y moleculares	49
4.2	Evaluación de la reacción fenotípica de la F ₁ de los cruces ‘WC366’ x ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’ x ‘Fundarroz PN-1’ en condiciones de invernadero	52
4.3	Clonación de un gen candidato de resistencia al RHBV, ubicado en el cromosoma 4, en dos variedades venezolanas: ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’	53
5	Conclusiones y recomendaciones	63
6	BIBLIOGRAFÍA	65
	Anexo 1: Metodología empleada para la obtención de cruzamientos	74
	Anexo 2: Distribución y ubicación de los microsatélites evaluados en las variedades de arroz venezolanas y testigos	75
	Anexo 3: Soluciones empleadas en la extracción de ADN	76
	Anexo 4: Soluciones empleadas en la preparación de geles de poliacrilamida	77
	Anexo 5: Soluciones empleadas en la tinción de plata	79
	Anexo 6: Mapa del vector PGEM T-Easy® de Promega	80
	Anexo 7: Soluciones y reactivos empleados en la clonación	81

Anexo 8: Resultados obtenidos en la evaluación fenotípica de las variedades de arroz evaluadas ante el RHBV en condiciones de campo, utilizando la escala de evaluación visual del IRRI.....	82
Anexo 9: Tamaño de los alelos esperados y observados con microsatélites evaluados en las variedades de arroz venezolanas y testigos.....	83

RESUMEN

Labrín S, NY. 2005. Estudio de la resistencia en variedades de arroz (*Oryza sativa* L.) venezolanas al virus de la hoja blanca. Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 99 p.

Palabras claves: *Rice hoja blanca virus*, evaluación fenotípica, microsatélites, silenciamiento génico post-transcripcional, Argonauta, marcadores tipo *SCAR*.

El arroz es uno de los tres alimentos básicos más importantes a nivel mundial. En América, su producción ha sido afectada por el virus de la hoja blanca (RHBV), enfermedad viral más importante del continente. En esta investigación se estudió la resistencia en nueve variedades de arroz venezolanas al RHBV considerando sus reacciones fenotípicas, variabilidad genética basada en microsatélites así como la asociación entre dichas variables, el desarrollo y evaluación de dos poblaciones con ‘Fundarroz PN-1’ como donador de resistencia y la clonación de un gen candidato de resistencia en ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’. La evaluación fenotípica en campo se realizó empleando la técnica de liberación masal y en invernadero con infestación dirigida y tres niveles de presión del virus. Trece microsatélites identificados como *QTL* asociados a la resistencia al virus y su vector se emplearon en la caracterización molecular. La evaluación fenotípica de las poblaciones se realizó a través de infestación dirigida y un nivel de presión del virus. La secuenciación del gen se realizó sobre 24 clones obtenidos con iniciadores previamente diseñados. En campo, el diseño empleado y el bajo número de repeticiones no permitieron realizar un análisis estadístico confiable arrojando resultados preliminares. Con respecto a la presión de infestación en invernadero, las variedades más resistentes fueron ‘Venezuela 21’ y ‘Fundarroz PN-1’ y las más susceptibles ‘Centauro’, ‘Cimarrón’ y ‘Fonaiap 2000’. Los microsatélites reflejaron baja diversidad genética entre las variedades. Se detectó 70% de concordancia entre la respuesta fenotípica y molecular; así como asociación de los microsatélites RM6770, RM7200, RM1305, RM13, RM11, RM346 y RM202 con la respuesta fenotípica, demostrando la eficiencia de ambos métodos de evaluación. La evaluación fenotípica de los cruces sugiere que la resistencia al virus de ‘Fundarroz PN-1’ es de tipo incompleta y que el gen dominante se encuentra en estado heterocigoto. Las secuencias de ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’ presentaron alta homología con proteínas putativas de dominio *PAZ-Piwi*, las cuales se asocian con el proceso de silenciamiento génico post-transcripcional (*PTGS*, por sus siglas en inglés). Se encontró

una variación de seis aminoácidos en el dominio *PAZ* de ‘Centauro’ con respecto a ‘Fundarroz PN-1’, lo cual podría estar provocando cambios en su función que resulten en diferencias del proceso de *PTGS*. Los iniciadores GS2F36 y GS2R1407 tienen potencial como marcadores tipo *SCAR* en programas de selección asistida por marcadores moleculares

SUMMARY

Labrín S, NY. 2005. Study of the resistance to rice hoja blanca virus in Venezuelans rice varieties (*Oryza sativa* L.). Thesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 99 p.

Key words: *Rice hoja blanca virus*, phenotypic evaluation, microsatellites, post-transcriptional gene silencing, Argonaute, SCAR markers.

Rice belongs to the three most important staple food crops worldwide. In the Americas, rice production is being affected by the *Rice hoja blanca virus* (RHBV), the most important viral disease on the continent. The objective of this research project was to study the resistance of nine Venezuelan rice varieties to RHBV, considering their phenotypic reactions, genetic variability based on microsatellites, as well as the association between these two variables, the development and evaluation of two populations with ‘Fundarroz PN-1’ as donor parent for RHBV resistance, and the cloning of one candidate resistance gene in both ‘Fundarroz PN-1’ and ‘Centauro’. The phenotypic evaluation of RHBV incidence was carried out after masal vector release in the field, and controlled infestation with three levels of virus pressure in the greenhouse. Thirteen microsatellites known to be associated with resistance to RHBV and its vector were used in the molecular characterization. The phenotypic evaluation of RHBV incidence of the two populations was carried out after controlled infestation with one level of virus pressure. Gene sequencing was done on 24 clones obtained through previously designed primers. The experimental design and the low number of replications (3) used in the field trials did not produce conclusive and statistically reliable results; therefore these results have to be considered as preliminary. According to the virus infestation level the most resistant varieties in the greenhouse were ‘Venezuela 21’ and ‘Fundarroz PN-1’ and the most susceptible ones were ‘Centauro’, ‘Cimarrón’ and ‘Fonaiap 2000’. The microsatellites revealed low genetic diversity among the tested varieties. Comparing the phenotypic and molecular response, a 70% coincidence were observed. The microsatellites RM6770, RM7200, RM1305, RM13, RM346 and RM202 were associated with the phenotypic response, indicating a high efficiency of both evaluation methods. The results of the phenotypic evaluation of the progenies of the two crosses suggest that the resistance of ‘Fundarroz PN-1’ is incomplete and

the dominant gene is heterozygous. The sequences of ‘Fundarroz PN-1’ and ‘Centauro’ showed high homology with putative proteins of the *PAZ-Piwi* domain, which are associated with the post-transcriptional gene silencing (*PTGS*). The *PAZ* domain of ‘Centauro’ presented a variation in six aminoacids compared with ‘Fundarroz PN-1’; which could be responsible for functional changes resulting in differences in the *PTGS* process. The primers GS2F36 and GS2R1407 have potential for use as SCAR markers in marker-assisted breeding programs.

ÍNDICE DE CUADROS

CUADRO 1: ESCALA DE EVALUACIÓN VISUAL DEL IRRI PARA RESISTENCIA AL RHBV.	18
CUADRO 2: FUENTES DE VARIABILIDAD Y GRADOS DE LIBERTAD DEL MODELO ESTADÍSTICO.	22
CUADRO 3: TEMPERATURA Y CONCENTRACIÓN DE MAGNESIO ESTANDARIZADA PARA CADA MICROSATÉLITE. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	25
CUADRO 4: PERFIL PARA PCR USANDO LA TÉCNICA DE MICROSATÉLITES. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	25
CUADRO 5: REACCIÓN PCR PARA AMPLIFICAR SEIS SEGMENTOS DEL GEN CANDIDATO DE RESISTENCIA BAJO ESTUDIO. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	30
CUADRO 6: PERFIL DE PCR PARA AMPLIFICAR SEIS SEGMENTOS DEL GEN CANDIDATO DE RESISTENCIA BAJO ESTUDIO. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	30
CUADRO 7: INICIADORES SELECCIONADOS PARA CADA SEGMENTO Y TEMPERATURA DE ALINEAMIENTO ESTANDARIZADAS PARA CADA INICIADOR. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	31
CUADRO 8: REACCIÓN DE LIGACIÓN PRODUCTO DE PCR-VECTOR. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	31
CUADRO 9: REACCIÓN PARA PCR DE COLONIA. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	32
CUADRO 10: PERFIL PARA PCR DE COLONIA. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	33
CUADRO 11: REACCIÓN DE LIGACIÓN PARA LA ENZIMA ECO R1. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	33
CUADRO 12: REACCIÓN PARA PCR DE SECUENCIA. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	34
CUADRO 13: PERFIL PARA PCR DE SECUENCIA. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	34
CUADRO 14: RESULTADOS DE LA EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE VARIEDADES DE ARROZ EVALUADAS ANTE EL RHBV EN CONDICIONES DE CAMPO. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	37
CUADRO 15: ANAVA DE LA INCIDENCIA DE VARIEDADES EVALUADAS ANTE TRES NIVELES DE PRESIÓN DEL RHBV EN CONDICIONES DE INVERNADERO. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	39
CUADRO 16: PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES R-E-G-W ENTRE EL PROMEDIO DE LA PROPORCIÓN ARCOSENO DE LAS VARIEDADES, PORCENTAJE PROMEDIO (TRES NIVELES DE PRESIÓN) DE PLANTAS ENFERMAS Y REACCIÓN DE VARIEDADES AL RHBV. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	40
CUADRO 17: INCIDENCIA OBSERVADA A LOS 46 DDI EN VARIEDADES DE ARROZ EVALUADAS ANTE TRES NIVELES DE PRESIÓN DEL RHBV EN CONDICIONES DE INVERNADERO. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	42
CUADRO 18: PRUEBA DE COMPARACIONES MÚLTIPLES R-E-G-W ENTRE EL PROMEDIO DE LA PROPORCIÓN ARCOSENO DE LA INCIDENCIA DE LAS VARIEDADES ANTE TRES NIVELES DE PRESIÓN DEL VIRUS. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	43
CUADRO 19: CONTENIDO DE INFORMACIÓN POLIMÓRFICA POR MICROSATÉLITE EVALUADO. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	47
CUADRO 20: PRUEBA DE INDEPENDENCIA ENTRE LA REACCIÓN FENOTÍPICA DE LAS VARIEDADES Y LOS MICROSATÉLITES EVALUADOS. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	51
CUADRO 21: PRUEBA DE KLUSTAL WALLIS DE LA EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE CRUCES Y PARENTALES ANTE EL RHBV EN CONDICIONES DE INVERNADERO. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	52
CUADRO 22: PORCENTAJE DE PLANTAS MOSTRANDO SÍNTOMAS DE RHBV EN CRUCES ENTRE UN PADRE RESISTENTE ('FUNDARROZ PN-1') Y DOS PADRES SUSCEPTIBLES ('WC366' Y 'CENTAURO'). CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	53
CUADRO 23: BLASTX DE 'CENTAURO' Y 'FUNDARROZ PN-1'. CIAT. CALI, COLOMBIA 2006.	61

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: CICLO DEL VIRUS DE LA HOJA BLANCA DEL ARROZ. FUENTE: BASADO EN GALVEZ (1968), LING (1972) Y ZEIGLER Y MORALES 1989.	9
FIGURA 2: EJEMPLARES DE T. ORIZICOLUS: A) MACHO ADULTO, B) HEMBRA ADULTA. FUENTE: VIVAS 2006.	11
FIGURA 3: MODELO GENERAL DE SILENCIAMIENTO GÉNICO INDUCIDO POR VIRUS Y TRANSGENES. FUENTE: BASADO EN GOLDBACH ET AL. 2003.	13
FIGURA 4: DESCRIPCIÓN ESQUEMÁTICA DEL MODELO DEL CORTE DE ARNm GUIADO POR siRNA. FUENTE: SONG ET AL. 2004.	14
FIGURA 5: EVALUACIÓN DE VARIEDADES DE ARROZ VENEZOLANAS AL RHBV EN CONDICIONES DE CAMPO. A) SIEMBRA DE VARIEDADES, B) INFESTACIÓN MASAL 18 DDS. CIAT. CALI, COLOMBIA, JUNIO 2006.	18
FIGURA 6: METODOLOGÍA EMPLEADA PARA EVALUAR LA REACCIÓN FENOTÍPICA DE VARIEDADES DE ARROZ VENEZOLANAS AL RHBV EN CONDICIONES DE INVERNADERO. CIAT. CALI, COLOMBIA, JUNIO 2006.	20
FIGURA 7: DISEÑO EN PARCELAS DIVIDIDAS CON ESTRUCTURA DE BLOQUES, DONDE LAS PARCELAS PRINCIPALES CORRESPONDIERON A LA DOSIS Y LAS SUBPARCELAS A LAS VARIEDADES. CIAT. CALI, COLOMBIA, JUNIO 2006.	21
FIGURA 8: METODOLOGÍA EMPLEADA PARA DETERMINAR EL PORCENTAJE DE VIRULENCIA DE LA COLONIA VECTORA AL MOMENTO DE LA INFESTACIÓN. CIAT. CALI, COLOMBIA, JUNIO 2006.	22
FIGURA 9: ESQUEMA DE TRABAJO REALIZADO EN LA TÉCNICA DE MICROSATÉLITES.	23
FIGURA 10: DISEÑO COMPLETAMENTE ALEATORIO EMPLEADO EN LA EVALUACIÓN FENOTÍPICA DE CRUCES, PARENTALES Y TESTIGOS ANTE EL RHBV EN CONDICIONES DE INVERNADERO. CIAT. CALI, COLOMBIA, SEPTIEMBRE 2006.	29
FIGURA 11: SÍNTOMAS CARACTERÍSTICOS OBSERVADOS DEL RHBV EN PLANTAS DE ARROZ. A) MOTEADO BLANCO O CLORÓTICO EN LAS HOJAS NUEVAS, B) DESARROLLO DE COLORACIÓN BLANCO AMARILLENTAS EN LA HOJA ENTERA O PARTE DE ESTA. CIAT. CALI, COLOMBIA, JUNIO 2006.	38
FIGURA 12: REACCIÓN FENOTÍPICA DE VARIEDADES DE ARROZ VENEZOLANAS ANTE EL RHBV EN CONDICIONES DE INVERNADERO USANDO DIFERENTES NIVELES DE DOSIS DEL VIRUS. CIAT. CALI, COLOMBIA, JUNIO 2006.	43
FIGURA 13: PLANO DE COORDENADAS PRINCIPALES DE DISTANCIA GENÉTICA ENTRE VARIEDADES EVALUADAS.	48
FIGURA 14: PRUEBA DE PROCRUSTES GENERALIZADO PARA LAS RESPUESTAS FENOTÍPICAS Y GENÉTICAS. LEYENDA: 1) 'ARAURE 1', 2) 'ARAURE 4', 3) 'CENTAURO', 4) 'CIMARRÓN', 5) 'FEDEARROZ 2000', 6) 'FEDEARROZ 50', 7) 'FONAIAP 1', 8) 'FONAIAP 2000', 9) 'FUNDARROZ PN-1', 10) 'PALMAR', 11) 'VENEZUELA 21' Y 12) WC366.	50
FIGURA 15: PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS EN EL PRIMER SEGMENTO DE LAS VARIEDADES EVALUADAS.	54
FIGURA 16: PRODUCTOS DE PCR OBTENIDOS EN EL SEGUNDO SEGMENTO DE LAS VARIEDADES EVALUADAS.	55
FIGURA 17: ESQUEMA DE INICIADORES, SEGMENTOS, REGIONES SECUENCIADAS Y REGIONES SIN SECUENCIA PARA EL GEN CANDIDATO DE RESISTENCIA EN 'CENTAURO'.	56
FIGURA 18: UBICACIÓN DE LA DELECCIÓN IDENTIFICADA EN 'CENTAURO' E INICIADORES DEL PRIMER Y SEGUNDO SEGMENTO EN 'CENTAURO'.	57
FIGURA 19: ESQUEMA DE INICIADORES, SEGMENTOS, REGIONES SECUENCIADAS Y REGIONES SIN SECUENCIAS PARAR EL GEN CANDIDATO DE RESISTENCIA EN 'FUNDARROZ PN-1'.	57
FIGURA 20: PRUEBA DE PROCRUSTES GENERALIZADO PARA LAS RESPUESTAS FENOTÍPICAS Y GENÉTICAS. LEYENDA: 1) 'ARAURE 1', 2) 'ARAURE 4', 3) 'CENTAURO', 4) 'CIMARRÓN', 5) 'FEDEARROZ 2000', 6) 'FEDEARROZ 50', 7) 'FONAIAP 1', 8) 'FONAIAP 2000', 9) 'FUNDARROZ PN-1', 10) 'PALMAR', 11) 'VENEZUELA 21' Y 12) WC366.	59
FIGURA 21: ALINEAMIENTO MÚLTIPLE DE LAS SECUENCIAS DE AMINOÁCIDOS DE 'CENTAURO', 'BGI-9311', 'NIPPONBARE', 'FUNDARROZ PN-1' Y CAMBIOS DETECTADOS EN LA REGIÓN DEL DOMINIO PAZ EN 'CENTAURO'.	60

LISTA DE UNIDADES, ABREVIATURAS Y SIGLAS

ADN: Acido desoxirribonucleico.

AGO: Argonauta.

ARN: Acido ribonucleico.

ARNm: Acido ribonucleico mensajero.

CIAT: Centro Internacional de Agricultura Tropical.

CR: cromosoma.

d: días.

dde: días después de la emergencia.

ddi: días después de la infestación.

dds: días después de siembra.

FEDEARROZ: Federación Nacional de Arroceros de Colombia.

FLAR: Fondo Latinoamericano de Arroz Bajo Riego.

FUNDARROZ: Fundación Nacional del Arroz.

HR: humedad relativa.

INIA: Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas.

kb: Kilo bases.

Mb: Mega bases.

min: minutos.

nt: nucleótidos.

pb: pares de bases.

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

PTGS: Post-transcriptional gene silencing (Silenciamiento génico post-transcripcional).

PIC: Polimorphic Information Content (Contenido de información polimórfica).

QTL: *Quantitative trait loci* (Loci controladores de características cuantitativas).

RHBV: Rice hoja blanca virus.

RISC: RNA - Induced Silencing Complex (Complejo de silenciamiento inducido por ARN)

RpRd: ARN polimerasa ARN dependiente.

RSV: *Rice stripe virus*.

s: segundos.

siRNA: short interference RNA (ARN pequeños interferentes).

Sogata: *Tagosodes orizicolus*.

TIGR: The Institute for Genomic Research.

μ l: microlitro.

1 INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza* sp.) es uno de los cultivos más importante en el mundo, se produce en 113 países y es el alimento básico de más de la mitad de la población mundial proporcionando el 27% de la energía alimentaria y el 20% de las proteínas (FAO 2004a, FAO 2004b, Gramene 2006). En el 2005, la superficie mundial cultivada de arroz fue de 156 millones de hectáreas, con una producción mundial de 628 millones de toneladas. Para el mismo año, China fue el responsable de 28,9% de la producción lo cual lo ubica en el primer lugar, seguido por India e Indonesia con 20,8% y 8,6% respectivamente (FAO 2006, FAOSTAT 2006).

En América Latina y el Caribe, se cultivaron en el mismo año 6.7 millones de hectáreas, con una producción total de 26.4 millones de toneladas, siendo los principales países productores: Brasil con 49,7% de la producción, seguido por Colombia (9,8%), Perú (9,3%), Argentina (3,9%) y Venezuela (3,6%) (FAOSTAT 2006).

En Venezuela, el consumo *per cápita* de arroz es de 15 k/año (ACA 2005), siendo este cereal el segundo en importancia agrícola después del maíz. La producción total para el 2005 fue 950.000 toneladas, con un rendimiento promedio de 5 toneladas/hectárea, sobre una superficie total cosechada de 190.000 ha (FAOSTAT 2006). En el país, el 90% de la producción se concentra en los estados Portuguesa y Guárico con pequeños aportes de Barinas y Cojedes (Vivas *et al.* 2002).

Las pérdidas causadas por plagas representan una de las mayores limitantes en el incremento de la productividad del arroz, causando un aumento significativo de los costos de producción (Dávalos 1997). En el mundo, se estima que las plagas destruyen cerca del 35% de la producción de arroz, de las cuales 12% son causadas por patógenos (Vivas *et al.* 2002).

De los 15 virus conocidos que afectan al arroz en el mundo, dos se presentan en América (Hibino 1996, Morales *et al.* 1999). El virus de la hoja blanca (RHBV: *Rice hoja blanca virus*) fue durante 60 años la única enfermedad viral conocida en el continente. En 1995, la identificación del virus de la necrosis rayada del arroz en Colombia (RSNV: *Rice stripe necrosis virus*), conocida comúnmente como ‘entorchamiento’ del arroz, elevó a dos el número de virosis reportadas en América (Morales *et al.* 1995, Morales 1996).

El RHBV fue observado por primera vez en Colombia por Garcés en 1935 (citado por Morales y Niessen 1983), sin embargo, su agente causal no fue identificado hasta 1983 por Morales y Niessen. En Venezuela, fue reportada por primera vez por Malaguti (1956a).

Actualmente, esta enfermedad ha alcanzado todas las zonas arroceras tropicales del continente americano, donde se han presentado epidemias cíclicas separadas por períodos de siete a quince años provocando pérdidas en la producción que oscilan entre 25 y 100% (Ling 1972, Zeigler y Morales 1990, Dávalos 1997, Calvert 1998).

El RHBV es transmitido únicamente y de forma persistente por el saltahojas *Tagosodes orizicolus* (Muir) (Homoptera: Delphacidae), conocido como “sogata” (Galvez 1968, Calvert y Reyes 1999). Las estrategias de control se han centrado en el uso de insecticidas dirigidos a sogata; sin embargo, el uso indiscriminado de plaguicidas (piretroides, órganofosforados monocrotofos, órganoclorados, entre otros) ha provocado el desarrollo de resistencia por parte de la plaga, serios problemas a la salud humana y animal, además de altos costos tanto económicos como ambientales (Velásquez *et al.* 1998, Zavaleta-Mejía 1999, Torres y Capote 2004). Actualmente, se busca utilizar otras estrategias de control más amigables con el medio ambiente tales como la liberación de cultivares con tolerancia al insecto y resistencia al virus (Zeigler *et al.* 1988, Alvarez *et al.* 2000).

Diversas teorías han tratado de explicar el tipo de resistencia que actúa tanto para el virus como para su vector, sin embargo, aún no se conoce con exactitud la base genética de la resistencia del binomio *T. orizicolus*-RHBV (Dávalos 1997). Diversos autores han sugerido que la resistencia de la planta tanto para el virus como para su insecto vector es de tipo poligénica o cuantitativa, donde dos o tres genes mayores están involucrados en la resistencia de la planta al insecto y un número similar de genes en la resistencia al virus (Zeigler *et al.* 1994, Pardey *et al.* 1996, Borrero *et al.* 2000). Factores como la antibiosis y antixenosis afectan la preferencia del insecto al posarse, longevidad, oviposición así como otros aspectos del ciclo de vida (Alvarez *et al.* 2000). La resistencia de la planta al virus es más compleja ya que involucra la interacción planta-virus-vector, donde la expresión se ve afectada entre otros factores por el número de vectores virulíferos por planta y la concentración de virus en los vectores (Cuevas-Pérez *et al.* 1992a, Zeigler *et al.* 1994, Calvert *et al.* 2001).

El mapeo genético de *loci* controladores de características cuantitativas o *Quantitative Trait Loci* (*QTL*, por sus siglas en inglés) ha ofrecido la posibilidad de estudiar la arquitectura de las características cuantitativas, es decir, identificar los principales *loci* involucrados en el control de estas características, su posición cromosómica y la magnitud de su efecto (Ferreira y Grattapaglia 1998). Posterior a la identificación de los *QTL*, el mayor reto es la clonación de los genes que controlan dichas características cuantitativas (Wisser *et al.* 2005).

Recientemente, Calvert *et al.* (2006) evaluaron la reacción fenotípica de dos poblaciones F₂ ante el RHBV y con microsatélites, provenientes de dos cruces entre las variedades ‘Fedearroz 2000’ x ‘WC366’ y ‘Fedearroz 50’ x ‘WC366’, donde identificaron cuatro *QTL* potenciales. El mayor *QTL* detectado se encontró en el brazo corto del cromosoma (CR) 4, cerca del cual se identificaron dos genes candidatos asociados a la resistencia del RHBV y posiblemente a su vector, uno de los genes presenta dominio CBS el cual tiene homología con un gen candidato de resistencia al saltahoja marrón (*Nilaparvata lugens*).

El segundo gen candidato identificado por Calvert *et al.* (2006) tiene homología con una proteína de la familia *Argonauta*, la cual cumple una función putativa en mecanismos de silenciamiento génico postranscripcional (Post-Transcriptional Gene Silencing - *PTGS*, por sus siglas en inglés) (Song *et al.* 2004). El *PTGS* es un fenómeno de degradación secuencia-específica de ARN presente en plantas, animales e insectos con funciones diversas, entre ellas: protección del genoma de los elementos móviles de ADN (trasposones), mecanismo de regulación del desarrollo mediante el control en la expresión de genes y como mecanismo natural en la defensa contra los virus (Chen *et al.* 2004).

En esta investigación se propuso estudiar la resistencia en variedades de arroz venezolanas al RHBV, a través de la evaluación de sus reacciones fenotípicas al virus y su variabilidad genética a través de la aplicación de microsatélites así como la asociación existente entre dichas variables, desarrollar y evaluar dos poblaciones con ‘Fundarroz PN-1’ como donador de resistencia y finalmente la clonación de un gen candidato de resistencia, que tiene una función putativa en mecanismos de *PTGS*, en dos variedades venezolanas, ‘Fundarroz PN-1’ como resistente y ‘Centauro’ como susceptible.

1.1 Objetivos del estudio

1.1.1 Objetivo General

Estudiar la resistencia en variedades de arroz venezolanas al RHBV tomando en consideración aspectos fenotípicos y moleculares.

1.1.2 Objetivos específicos

1. Evaluar la variabilidad fenotípica de nueve variedades de arroz venezolanas al RHBV en condiciones de campo e invernadero, así como genotípica a través del polimorfismo de *QTL* asociados con la resistencia al virus y su vector.

2. Desarrollar e iniciar la evaluación fenotípica de dos poblaciones F_1 con ‘Fundarroz PN-1’ como donador de la resistencia al RHBV.

3. Clonar un gen candidato de resistencia a RHBV, ubicado en el brazo corto del CR4, en dos variedades de arroz venezolanas: ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’.

1.2 Hipótesis del estudio

1. Existen diferencias en la reacción fenotípica de las nueve variedades evaluadas ante RHBV.

2. Existe variabilidad genética entre las nueve variedades de arroz venezolanas evaluadas.

3. Existe asociación entre la reacción fenotípica observada y el polimorfismo detectado a través de los microsatélites.

4. Existen diferencias en las secuencias de un gen candidato de resistencia al RHBV en las variedades ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’.

2 MARCO CONCEPTUAL

2.1 Generalidades del cultivo de arroz

El arroz es uno de los cultivos más antiguos, la mayoría de los autores indican que es originario del sudeste de Asia y que su domesticación ocurrió desde hace unos 10.000 años (Watanabe 1997, Quirós 2003). El género está representado en total por 23 especies en el mundo, de las cuales sólo dos especies son cultivadas: *O. sativa* y *O. glaberrima* (Watanabe 1997). La primera es de origen asiático y se cultiva en todas las áreas tropicales y subtropicales del mundo, la segunda se originó hace aproximadamente 35.000 años en África Occidental, probablemente en el Delta del Río Níger. *O. glaberrima* actualmente sólo se cultiva en esa región y en unas pocas áreas de América del Sur (León 2000, Hancock 2004).

El arroz es cultivado en un rango de temperaturas medias entre 24 y 28° C, desde los 53° N hasta los 40° S, en zonas comprendidas entre 0 y 1.250 msnm (Quirós 2003). La especie *O. sativa* está diferenciada en tres subespecies basadas en sus condiciones geográficas las cuales son Indica, Javanica, y Japónica. Indica se refiere a las variedades tropicales y subtropicales, Javanica designa a los arroces bulu (aristado) y gundil (sin aristas) con panículas largas y granos bien delineados que crecen a lo largo de las regiones índicas en Indonesia, y Japónica se refiere a las variedades de granos pequeños y redondeados de las zonas templadas (Heinrichs 2001).

En Venezuela, el arroz fue introducido por los españoles durante la colonia. Sin embargo, su producción comenzó a tener importancia económica en 1949, cuando se estableció el Plan Arrocero Nacional a través de la Corporación Venezolana de Fomento (Alvarez 1997).

2.1.1 Taxonomía, morfología, sistema de reproducción y fisiología

Taxonómicamente, el arroz pertenece al género *Oryza*, división *Angiospermae*, clase *Monocotyledoneae*, orden *Glumiflorae* y familia *Poaceae* (Watanabe 1997, León 2000). El arroz es una especie muy variable, se conocen cerca de 100.000 cultivares por lo que sus características morfológicas son muy variables (León 2000). En general, es una gramínea anual cuyo tamaño varía entre 0,4 m y más de 7 m de altura, sus tallos son 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 (Arregoces *et al.* 2005).

El ciclo del arroz se divide en tres períodos: 1) Período vegetativo: transcurre desde la germinación de la semilla hasta la aparición del primordio floral en la base de la planta y tiene una duración de unos 45 a 50 días dependiendo de la variedad; 2) Período reproductivo: comienza con la aparición de los primordios florales hasta la apertura de la flor, que por lo general ya está polinizada al abrir debido a su sistema de reproducción autógama; 3) Período de maduración: comprende el llenado de granos, teniendo especial importancia el aporte en carbohidratos generados por fotosíntesis en las hojas superiores, especialmente la hoja bandera (Alvarez 1997).

El arroz se caracteriza por ser una planta adaptada a condiciones anaeróbicas, por lo cual su principal sistema de siembra es el húmedo, donde el arrozal es inundado y el cultivo crece en agua estancada desde la plantación hasta cerca de la cosecha. También existen variedades adaptadas para crecer bajo el sistema de sequía, también conocido como de secano o de altiplanicie, en el cual el cultivo crece sobre tierra seca al igual que otros cereales (Heinrichs 2001). En Venezuela, la producción se realiza bajo régimen de inundación permanente, concentrándose la siembra en dos períodos: el lluvioso, desde mayo a octubre, en los Llanos Occidentales (estados Cojedes, Barinas y Portuguesa), y el seco, desde noviembre hasta abril, en los Llanos Centrales (estado Guárico) (Vivas *et al.* 2001, Torrealba *et al.* 2005).

2.1.2 Aspectos genéticos y moleculares del arroz

El arroz cultivado tiene 24 cromosomas ($n = 12$) y presenta una constitución genómica AA (Watanabe 1997). Este cultivo es el primero cuyo genoma fue secuenciado, trabajo que fue realizado por cuatro grupos independientes de investigadores: 1) El Instituto Beijing de Genómica en el cual trabajaron con la subespecie Indica; 2) Syngenta y el Proyecto Internacional de Secuenciamiento del Genoma del Arroz (International Rice Genome Sequencing Project, IRGSP) quienes trabajaron con la subespecie Japónica ‘Nipponbare’ y 3) Monsanto (Yu *et al.* 2005).

Goff *et al.* (2002) al secuenciar el 93% del genoma de la subespecie Japónica ‘Nipponbare’ (420 Megabases, Mb) sugirieron que contiene entre 32.000 a 50.000 genes. En la subespecie Indica se conoce el 96% de su genoma, el cual contiene entre 46.022 y 55.615 genes (Yu *et al.* 2002). Estos tamaños son significativamente menores en comparación con

otros miembros de la familia Gramineae tales como el maíz y el trigo con 2.5 Mb y 15.9 Mb respectivamente (Yuan *et al.* 2000). Todos estos factores hacen que el arroz sea un modelo atractivo para el estudio de la genética y genómica de las plantas (Song y Goodman 2001).

2.1.3 Programas de mejoramiento de arroz en Venezuela y variedades liberadas en el país

Desde 1969 al 2005 han resultado elegibles 24 variedades de arroz en Venezuela, de las cuales, el 58% fueron liberadas por el INIA (Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas), 13% en alianzas estratégicas del INIA con otras instituciones tales como FUNDARROZ (Fundación Nacional del Arroz), y 29% por parte de empresas privadas como Fundación DANAC (Torrealba *et al.* 2005).

Las nuevas variedades deben obtener el “Certificado de Elegibilidad” para que puedan ser comercializadas en el país, para lo cual deben superar los Ensayos Regional Uniformes donde el objetivo es ser probadas en las principales zonas arroceras del país durante un año y medio y superar o igualar el promedio de los testigos (Torrealba *et al.* 2005).

En general, los criterios de selección se centran en las características agronómicas, la resistencia o tolerancia a enfermedades y plagas: Sogata, piricularia (*Magnaporthe grisea*), RHBV, escaldado de la hoja (*Monographella albescens*), pudrición del tallo (*Sarocladium oryzae*) entre otras y calidad del grano (uniformidad del tamaño, grano largo, color translúcido y excelente calidad culinaria) (Rico 1974, Graterol 2000, Torrealba *et al.* 2005).

Las variedades que han sido liberadas por el INIA son: ‘Araure 1’, ‘Araure 2’, ‘Araure 3’, ‘Araure 4’, ‘Cimarrón’, ‘Palmar’, ‘Fonaiap 1’, ‘Fonaiap 2’ y ‘Fonaiap 2000’. Las variedades ‘Fundarroz PN-1’, ‘Venezuela 21’ y ‘Centauro’ han sido liberadas por la alianza INIA-FUNDARROZ. ‘D-primerá’, ‘D-sativa’ y ‘D-oryza’ fueron liberadas por Fundación DANAC. Finalmente, las variedades ‘Zeta 15’ liberada por FUSAGRI-MIDAS y ‘Butzina’ liberada por Productores Asociados Chispa¹.

¹ Pérez, I. 2006. Origen de variedades venezolanas (comunicación personal).

2.2 El Virus de la hoja blanca del arroz

2.2.1 Morfología, taxonomía y aspectos moleculares

El RHBV pertenece al género de los Tenuivirus, cuyo virus tipo es el virus del rayado del arroz (RSV: *Rice stripe virus*). Este género se caracteriza por ser transmitido de forma propagativa por delfácidos y presentar un genoma multipartito constituido por cuatro a cinco partículas ribonucleoprotéicas, cada una de las cuales contiene una cadena simple de ARN (Falk y Tsai 1998).

Las partículas del RHBV son filamentosas pero pueden adoptar una configuración circular, cuyas dimensiones varían entre 3 y 8 nm de diámetro (Nguyen *et al.* 1997, Calvert *et al.* 1992), su genoma está constituido por cuatro ARN de cadena sencilla de 9 kilobases (kb), 3,6 kb, 2,2 kb y 1,9 kb cada una, para un total de 16,84 kb (Falk y Tsai 1998). La maleza *Echinochloa colonum*, comúnmente asociada al cultivo de arroz, es infectada por el virus de la hoja blanca de *Echinochloa* (EHBV, *Echinochloa hoja blanca virus*) la cual comparte propiedades morfológicas y fisicoquímicas muy similares al RHBV, sin embargo, Calvert *et al.* (1992) demostraron a través del uso de sondas de ADN complementario que las cepas que ocasionan los síntomas en ambas plantas son genéticamente distintas.

Las cadenas secuenciadas del RHBV permiten afirmar que no es una cepa americana del RSV (Miranda *et al.* 1994), sin embargo, la estrategia de codificación de las cadenas estudiadas es similar. Todas las cadenas, a excepción de la primera, codifican para dos proteínas con lecturas en sentido contrario (Garavito 2003).

Hasta el momento, no se ha identificado razas distintas del RHBV. Miranda *et al.* (1997) no encontraron diferencias significativas al comparar la secuencia del ARN-3 y ARN-4 de aislamientos de RHBV provenientes de Costa Rica y Colombia.

2.2.2 Enfermedad y transmisión

Las plantas infectadas con el RHBV exhiben bandas de color crema en las hojas, posteriormente, el virus se mueve sistémicamente causando clorosis general, atrofiamiento general y marchitez temprana. Las panículas de plantas infectadas pueden ser completamente estériles con glumas deformes y descoloridas (Zeigler *et al.* 1988, Hibino 1996). Sin embargo, estos síntomas varían con las variedades infectadas y la severidad es inversamente proporcional a la edad de las plantas a la hora de la inoculación. Los síntomas son más severos

en plantas inoculadas en edades tempranas, aún en aquellas que presenten cierto grado de resistencia (Calvert *et al.* 2005a).

El RHBV se multiplica tanto en la planta como en su insecto vector *T. orizicolus* y tiene dos mecanismos de transmisión, uno vertical (de la hembra a su progenie) y otro horizontal (planta-insecto-planta) (Figura 1). El primero y principal corresponde a la transmisión transovarial ya que presenta alta eficiencia (80%) y las ninfas al nacer son transmisoras. El segundo tipo es menos eficiente debido al periodo prolongado de incubación en el vector posterior a la adquisición, el cual es de 36 días (d) (Galvéz 1968, Zeigler *et al.* 1988).

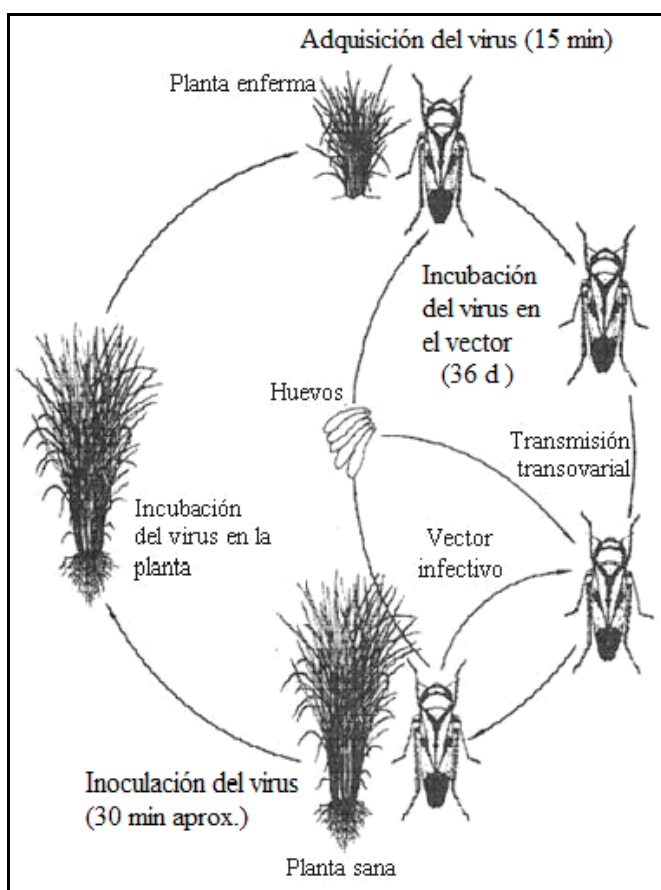


Figura 1: Ciclo del virus de la hoja blanca del arroz. Fuente: basado en Galvez (1968), Ling (1972) y Zeigler y Morales 1989.

2.2.3 Distribución geográfica y epidemias

El RHBV ha sido reportado únicamente en el continente americano, específicamente en Belice, Colombia, Costa Rica, Cuba, Republica Dominicana, Ecuador, El Salvador, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Puerto Rico, Surinam,

USA y Venezuela (Malaguti *et al.* 1956b, Atkins y Adair 1957, Jennings y Beachell 1960, Dávalos 1997, Mariani y Remes 2000).

Las epidemias del RHBV se han presentado de forma cíclica, alcanzando picos máximos cada 7 a 15 años, intercaladas por períodos de bajos niveles de infección. Las dos primeras epidemias del RHBV se presentaron durante las décadas de 1950 y 1960, después la enfermedad desapareció virtualmente. En 1981, serios brotes se presentaron nuevamente en Colombia, Ecuador y Venezuela causando pérdidas del 100% (Vargas 1985 citado por Zeigler *et al.* 1988, Calvert *et al.* 2005a).

Diversos autores señalan razones que podrían ser la causa de dicho comportamiento, entre ellas mencionan el efecto deletéreo que causa el virus sobre la longevidad y fecundidad de los insectos (Jennings y Pineda 1971), las medidas de control que se realizan sobre el vector y la habilidad del vector para poder transmitir el virus la cual es controlada por un gen recesivo (Zeigler y Morales 1990), el tipo de variedad sembrada en la zona (susceptible, resistente o ambas) y las condiciones ambientales, lo cual unido al comportamiento, distribución y movimiento de los vectores (migración de insectos entre variedades susceptibles y resistentes de áreas anexas) definen la epidemiología de la enfermedad (Reyes *et al.* 1997, Calvert *et al.* 1998).

Por otra parte, Espinoza (1996) señala que la habilidad del RHBV de multiplicarse en el vector y de transmitirse verticalmente a la progenie a través del huevo facilita la persistencia del virus en el vector en ausencia de arroz. Al persistir en su vector, el RHBV puede acarrearle lejos hasta nuevas plantaciones, donde ocurre dispersión secundaria por el movimiento local de los inmigrantes o de su progenie.

Diversos autores señalan que en campos de arroz normalmente la población de vectores virulíferos es menor al 2% y durante las epidemias sólo un 5 a 15% de las sogatas son transmisoras del virus (Galvéz 1968, Zeigler *et al.* 1988, Reyes *et al.* 1998a). Sin embargo, Reyes *et al.* (1997) reportaron en Colombia poblaciones de sogata con 21% de capacidad genética (activa y potencial) de transmitir el RHBV. Dicha capacidad no cambia con la variedad ni cambia rápidamente en el tiempo, siendo este un factor importante en el manejo del riesgo de una epidemia.

2.2.4 *Tagosodes orizicolus* vector del RHBV

Los machos de *T. orizicolus* tienen una longitud aproximada de 2 mm, de color pardo oscuro o negro. Las hembras, miden entre 3,33 y 3,35 mm, de color ámbar más claras que los machos, el dorso del tórax hasta la quilla es de color más pálido y este color se extiende hasta la cabeza (Figura 2). Los huevos son transparentes y miden entre 0,5 y 0,7 mm de largo. Las ninfas son de color blanquecino y su tamaño varía entre 0,65-0,6 mm de largo x 0,2-0,3 mm de ancho, a medida que crecen se va incrementando la nitidez de las líneas laterales que poseen en el dorso (Meneses *et al.* 2001).



Figura 2: Ejemplares de *T. orizicolus*: a) macho adulto, b) hembra adulta. Fuente: Vivas 2006.

Las hembras pueden llegar a producir entre 21 y 98 huevos, los que usualmente ovipositan en el nervio central de la cara superior de la hoja. La eclosión de los huevos puede tardar entre 7 y 19 días (d), los períodos pueden variar por efecto de la temperatura. Las ninfas pasan por cinco estados cuya duración puede variar entre 14 y 21 d. Finalmente, los adultos tienen un periodo de vida que varía entre 14 y 31 d (Meneses *et al.* 2001, Vivas 2006).

Diferentes estados de desarrollo pueden encontrarse sobre las plantas de arroz; los insectos prefieren alimentarse de plantas jóvenes, hábito que ha sido observado en todas las regiones arroceras donde predomina (Vivas 2006). En Venezuela, las poblaciones más altas de sogata generalmente se registran en los meses de febrero y marzo, cuando las temperaturas medias oscilan entre 27 y 29° C (Vivas *et al.* 2002).

2.3 Resistencia al RHBV

Desde más de 50 años, la mayoría de las variedades de arroz liberadas en el continente han mostrado susceptibilidad al RHBV (Atkins y Adair 1957). Más recientemente, Cuevas-

Pérez *et al.* (1992) reportaron que de 74 variedades recomendadas para siembras de América Latina, más del 50% fueron susceptibles.

Diversos esfuerzos se han realizado para identificar fuentes de resistencia al RHBV, entre ellas las principales fuentes provienen de materiales de origen Japónica, estas fuentes han sido introducidas en arroces tipo Indica a través de retrocruces en los diferentes programas de mejoramiento genético de América Latina (Atkins y Adair 1957). Después de ser inoculadas las plantas de líneas resistentes con vectores probados de RHBV, típicamente un porcentaje bajo de plantas desarrollan síntomas de igual severidad que las líneas susceptibles (Zeigler *et al.* 1988).

Los resultados obtenidos por Zeigler *et al.* (1988) al evaluar la F₁ de una población, proveniente de un cruce triple simple con un parental resistente ('Colombia 1') en el primer cruce, sugieren que la resistencia al RHBV es de tipo incompleta, controlada por un gen dominante y posiblemente afectada por la acción de genes modificadores. Romero (2005) al evaluar fenotípicamente y molecularmente la resistencia de 291 líneas F₃, provenientes de un cruce entre 'Fedearroz 50' y 'WC366', al daño mecánico de sogata concluyó que la resistencia a sogata es controlada por la acción de un gen mayor junto con genes menores.

2.4 Silenciamiento génico post-transcripcional como mecanismo de resistencia a virus en plantas

El *PTGS* fue descrito por primera vez por Napoli *et al.* (1990) cuando introdujeron el gen de la Chalcona Sintetasa (*CHS*) para sobre-expresar la biosíntesis de las antocianinas responsables del color púrpura en petunias, donde un 42% de las plantas transgénicas produjeron flores blancas y/o con sectores morados y blancos. Extracciones de ARN mensajero (ARNm) demostraron que en plantas sin transgen los niveles se mantuvieron normales, mientras que en plantas transgénicas los niveles de ARNm se redujeron 50 veces. Los resultados obtenidos por los autores mostraron que la introducción de un gen homólogo bloqueó la síntesis de antocianinas debido a la co-inhibición del gen endógeno y el transgen *CHS*, fenómeno que fue llamado co-supresión.

Desde entonces, ha sido relacionado con diversos procesos en animales, insectos y plantas donde recibe el nombre de ARN interferente, *quelling*, y co-supresión. La acción del *PTGS* en la resistencia a virus ha sido señalado por diversos autores (Waterhouse *et al.* 1998, Voinnet *et al.* 1999, Goldbach *et al.* 2003, Bisaro 2006) y comienza con la identificación del

duplex del ARN viral de hebra positiva (sentido) y negativa (antisentido), la cual se genera como intermediario durante el proceso de replicación del virus de ARN de cadena simple. Un complejo multicomponente en el que se incluye la ARN polimerasa ARN dependiente (*RpRd*, por sus siglas en inglés) viral, ARN helicasa y a *DICER* (RNasa III helicasa) se encarga de identificar y degradar al ARN en pequeños fragmentos de 21-27 nucleótidos (nt) llamados ARN pequeños interferentes (*siRNA*, por sus siglas en inglés) (Stage 2006). Estos *siRNA* se incorporan al complejo de silenciamiento inducido por ARN (*RISC*, por sus siglas en inglés), guiando la unión específica con el ARNm complementario a la posición central de un *siRNA*/ARNm (Volpe *et al.* 2002, Chen *et al.* 2004) (Figura 3).

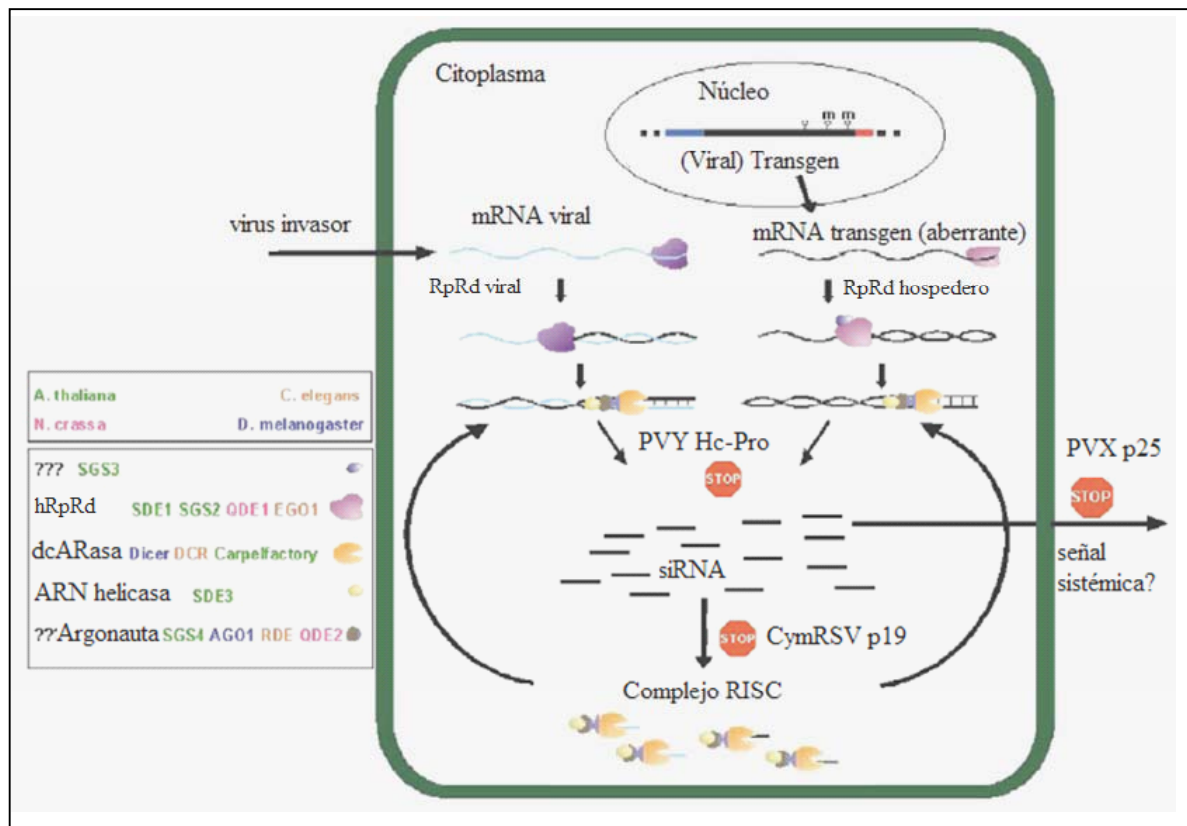


Figura 3: Modelo general de silenciamiento génico inducido por virus y transgenes. Fuente: basado en Goldbach *et al.* 2003.

La composición del complejo *RISC* aún no se conoce con certeza, pero está constituido por al menos una proteína de la familia Argonauta (*AGO*) la cual se caracteriza por presentar un dominio *terminal-N* y los dominios *PAZ*, *Mid* y *Piwi* (Lingel y Izaurrealde 2004). Song *et al.* (2004) estudiaron la estructura cristalina de *AGO* y determinaron que es la proteína encargada de cortar el ARNm en *RISC* a través de la acción de los dominios *PAZ* y *Piwi*, donde *PAZ* tiene un sitio de reconocimiento del extremo 3' de los *siRNA* y *Piwi* es una RNasa H,

especializada en el corte de ARNm guiado por la hebra simple del *siRNA*, en un sustrato de ARN de cadena doble (Figura 4).

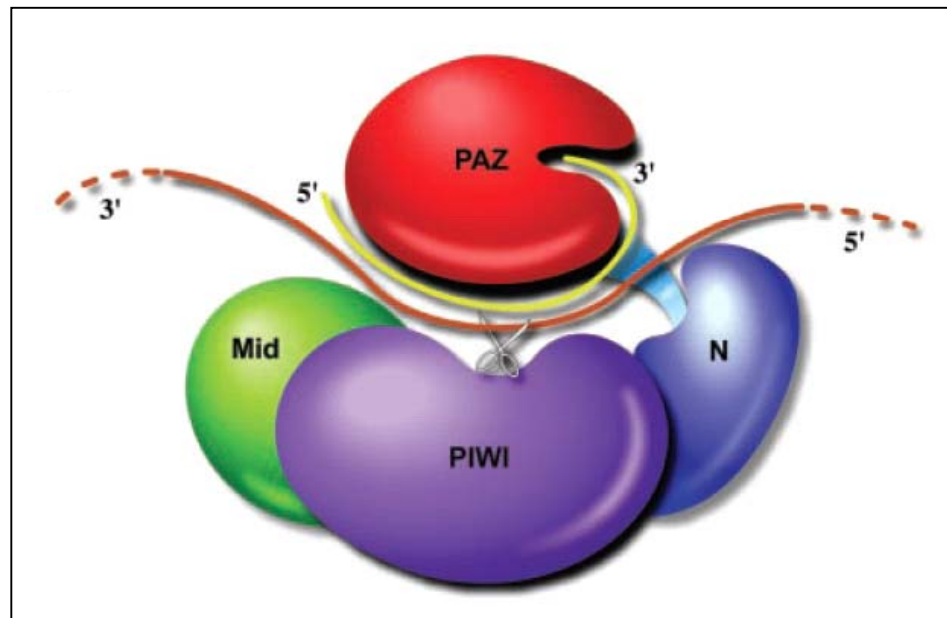


Figura 4: Descripción esquemática del modelo del corte de ARNm guiado por *siRNA*. Fuente: Song *et al.* 2004.

Actualmente se conocen por lo menos 10 proteínas *AGO* en *Arabidopsis*, de las cuales se han caracterizado cuatro: *AGO1*, *AGO10*, *AGO4* y *AGO7*. *AGO1* se requiere para el desarrollo normal de las plantas y está implicada como cortador de los *siRNA*. *AGO10* muestra características similares a *AGO1*, pero no ha sido comprobada aún su asociación con el *PTGS*. *AGO4* se requiere para la producción de *siRNA* endógeno y los estudios indican que actúa a nivel nuclear en cambios tales como la metilación de ADN. *AGO7* está asociada con cambios en la fase vegetativa pero no se ha establecido su asociación con el *PTGS* (Jones *et al.* 2006).

El *PTGS* puede ser inducido localmente y luego diseminarse al resto de la planta a través del tejido vascular paralelamente al virus (Stage 2006). Aún no se conoce con exactitud el mecanismo a través del cual se dispersa la señal de silenciamiento génico, sin embargo, Hamilton *et al.* (2002) señalan que en *PTGS* de plantas existen dos tipos de *siRNA* con funciones diferentes, uno corto de 21 a 22 nt encargado de guiar al complejo *RISC* para clivar el ARNm y otro largo de 24 a 26 nt que además de guiar la degradación específica del ARNm está asociado con la amplificación de la señal sistémica y en la metilación de ADN.

Ahlquist (2002) indica que una vez activado el mecanismo de silenciamiento, comienza una carrera entre el virus y la amplificación de la señal de silenciamiento lo cual

resulta en el éxito o el fracaso de la infección viral. La importancia de esta carrera se relaciona con el hecho de que diversos virus codifican proteínas capaces de suprimir el silenciamiento en diferentes pasos del mecanismo de resistencia.

Bucher *et al.* 2003 identificaron una proteína codificada por el RHBV llamada *NS3* que actúa como supresor del *PTGS*, lo cual sugiere que este podría ser uno de los mecanismos activos en la resistencia de las plantas ante la enfermedad provocada por el RHBV.

2.5 Microsatélites como marcadores moleculares en la selección asistida

Los marcadores moleculares son características medibles que pueden detectar variaciones en las secuencias de ADN o proteínas (IPGRI 2004). Sus aplicaciones en los programas de mejoramiento genético son muy amplias, incluyendo: i) investigar y entender las bases fisiológicas y genéticas de la heterosis así como la predicción del rendimiento de los híbridos, ii) identificar factores genéticos útiles en poblaciones o líneas divergentes, iii) introgresión de factores genéticos deseados en líneas y poblaciones de mejoramiento, iv) potenciar los programas de selección recurrentes que se basan en las respuestas fenotípicas v) entender las interacciones genotipo-ambiente, vi) monitorear la diversidad en los acervos genéticos vii) identificar cultivares y sus progenitores (Stuber *et al.* 1999).

La identificación molecular de marcadores asociados a genes de resistencia economiza tiempo, dinero y esfuerzo en diferentes pasos del programa de mejoramiento pues aumenta la eficiencia en la transferencia de genes a nuevas variedades al tiempo que permite dilucidar la configuración genética del arroz (Dávalos 1997).

Desde que los marcadores genéticos basados en la reacción en cadena de la polimerasa (*PCR*, por sus siglas en inglés) se descubrieron hace más de una década, los microsatélites o secuencias simples repetidas han sido los más usados en un amplio ámbito de estudios a nivel de plantas y animales (Chen *et al.* 2002). Los microsatélites consisten en secuencias seguidas de nucleótidos que pueden variar entre 1 y 6 bases nucleotídicas repetidas hasta 50 veces, flanqueadas en sus extremos por secuencias únicas las cuales se mantienen estables dentro de una misma especie. Estas secuencias se encuentran localizadas en diferentes partes del genoma, son abundantes, hipervariables en el número de copias de los microsatélites y por ende altamente polimórficos entre diferentes individuos (Davierwala *et al.* 2001).

Las secuencias repetidas son amplificadas mediante *PCR* y el polimorfismo es detectado por las diferencias de tamaño de los fragmentos amplificados, los cuales son resultado de las diferencias en el número de repeticiones. Los microsatélites pueden tener un tamaño de 100 a 250 pares de bases (pb) y los iniciadores que los amplifican generalmente poseen entre 17 y 22 nucleótidos, con un contenido de GC aproximadamente del 50% y una temperatura de alineamiento de 60° C. La detección visual se realiza en geles de poliacrilamida o agarosa, fluorescencia de pequeñas secuencias en los microsatélites usados en secuenciación o en técnicas más sensibles como los SNPs (Holton 2001).

Actualmente, los marcadores basados en microsatélites están siendo usados para el desarrollo de mapas genéticos y la identificación de *QTL*. La determinación de ligamiento genético entre marcadores y *QTL* depende de la existencia de desequilibrio de ligamiento entre los alelos en el locus marcador y los alelos del *QTL*. Este desequilibrio genera efectos cuantitativos asociados al marcador que pueden verse detectados y estimados a través del análisis estadístico adecuado (Ferreira y Grattaplagia 1998). El desequilibrio de ligamiento implica mayor proporción de algunas combinaciones genéticas que, en consecuencia, modifica las clases y frecuencias genotípicas observadas en una población (Ramis *et al.* 2003).

Otro tipo de marcadores específicos son los *SCAR* (Sequence Characterized Amplified Region) los cuales utilizan un par de iniciadores de 20 a 25 nt de largo y amplifican una región específica del genoma, lo cual permite la amplificación de una banda única y por tanto presentan una interpretación más simple que otros marcadores (Calvert *et al.* 2005b).

3 MATERIALES Y MÉTODOS

3.1 Localidad y sitio de trabajo

Todos los procedimientos descritos a continuación se realizaron en las instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT) ubicado en el municipio de Palmira, departamento del Valle del Cauca - Colombia, situado a 3°16' latitud norte, 76°32' longitud oeste y altitud de 965 msnm, específicamente en la Unidad de Virología Vegetal y en los campos experimentales e invernaderos del Programa de Arroz.

3.1.1 Material Vegetal

Se evaluaron nueve variedades de arroz venezolanas: 'Araure 1', 'Araure 4', 'Centauro', 'Cimarrón', 'Fonaiap 1', 'Fonaiap 2000', 'Fundarroz PN-1', 'Palmar' y 'Venezuela 21'. La selección de las variedades se realizó con base a su importancia dentro del sector arrocero nacional, preferencia y uso por los productores y principalmente por la disponibilidad de los materiales en el banco de germoplasma del CIAT. En la evaluación se incluyeron las variedades 'Fedearroz 2000', 'Fedearroz 50' y la línea 'WC366' como testigos resistente, intermedio y susceptible respectivamente; los dos primeros provenientes del programa de mejoramiento de la Federación Nacional de Arroceros de Colombia (FEDEARROZ) y la última del Banco de Germoplasma del CIAT con origen asiático.

3.2 Evaluación fenotípica de variedades de arroz venezolanas ante el RHBV en condiciones de campo e invernadero y su variabilidad genética a través de marcadores microsatélites asociados con la resistencia al RHBV

3.2.1 Evaluación de la reacción fenotípica de variedades de arroz venezolanas ante el RHBV en condiciones de campo

Nueve variedades de arroz venezolanas y tres testigos se incluyeron en las evaluaciones de campo realizadas por el equipo de entomología del CIAT para evaluar materiales promisorios, seleccionados en los programas de mejoramiento del CIAT, FLAR (Fondo Latinoamericano de Arroz Bajo Riego) y FEDEARROZ. En piscinas de 23 x 14 m,

previamente fangueadas, se marcaron surcos de 22 x 1,20 m, los cuales se subdividieron en dos pequeños surcos de 50 cm sobre los cuales se sembraron 50 semillas/surco (Figura 5A). De cada variedad se sembraron 3 repeticiones bajo un diseño completamente aleatorio. Dieciocho dds se realizó la infestación, liberando masalmente los insectos virulentos con una presión aproximada de 1,2 insectos vectores/planta de segundo y tercer estado ninfal (provenientes de la colonia Jamundí con 75% de virulencia) (Figura 5B). Cinco ddi se aplicó insecticida Confidor para eliminar los insectos adultos y evitar la eclosión de posturas.



Figura 5: Evaluación de variedades de arroz venezolanas al RHBV en condiciones de campo. A) Siembra de variedades, B) Infestación masal 18 dds. CIAT. Cali, Colombia, junio 2006.

La evaluación fenotípica se realizó 25 ddi utilizando la escala visual del IRRI (1996, citado por Triana 2003) (Cuadro 1).

Cuadro 1: Escala de evaluación visual del IRRI para resistencia al RHBV.

Escala	Porcentaje de Infección (% de plantas con síntomas)
1	0-10%
3	11-30%
5	31-50%
7	51-70%
9	71-100%

3.2.2 Evaluación de la reacción fenotípica de variedades de arroz venezolanas al RHBV con tres niveles de presión del virus, en condiciones de invernadero

Se sembraron 180 semillas de cada variedad distribuidas equitativamente en 12 materos de 10 cm de diámetro, todos los materiales se mantuvieron en un cuarto de invernadero con temperatura y humedad relativa (HR) máxima de 42° C y 90%, mínima de 14° C y 35%, promedio de 25° C y 77% respectivamente. Diez días después de la siembra (dds) se raleó y se dejaron 10 plantas por matero, quince dds se trasladaron a otro cuarto de invernadero para realizar la infestación, para lo cual se cubrieron las plantas de cada matero con un tubo de acetato (calibre 15') de 8 cm de diámetro x 45 cm de alto. Por cada cuatro materos de cada variedad se liberaron 10, 20 y 40 insectos vectores virulentos de segundo y tercer estado ninfal (provenientes de la colonia Jamundí). Dichos niveles de infestación corresponden a los tres niveles de presión del virus aplicado en el experimento: 1, 2 y 4 insectos vectores por planta. Una vez realizada la infestación, se trasladaron los materos a otro cuarto de invernadero donde se mantuvieron durante el resto del ensayo; con temperatura y HR máxima de 42° C y 100%, mínima de 17° C y 40%, promedio de 25° C y 85% respectivamente. Cinco días después de la infestación (ddi), se aplicó el insecticida sistémico Furadán para evitar la eclosión de las posturas del insecto. En la evaluación fenotípica se contabilizó el número de plantas con síntomas virales por unidad experimental, se realizó una cuarta evaluación a los 46 ddi la cual se usó para los análisis (Figura 6).

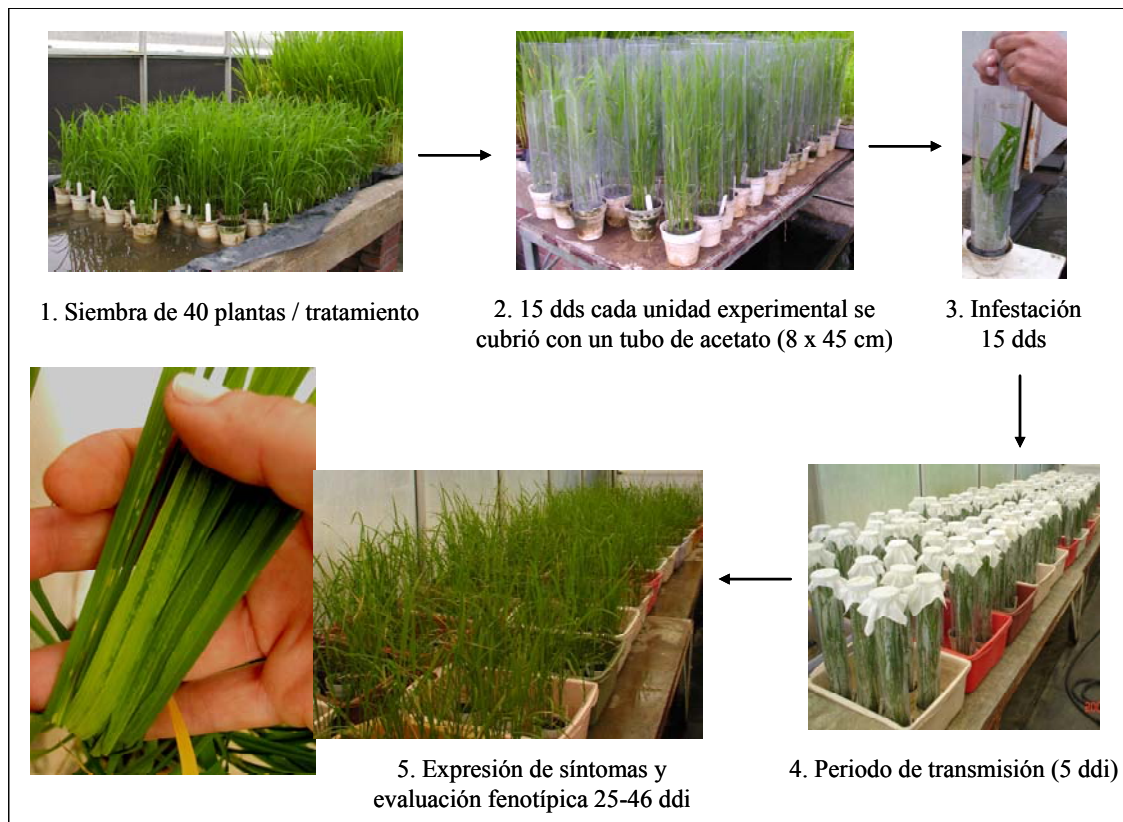


Figura 6: Metodología empleada para evaluar la reacción fenotípica de variedades de arroz venezolanas al RHBV en condiciones de invernadero. CIAT. Cali, Colombia, junio 2006.

La infestación se realizó siguiendo un diseño en parcelas divididas con estructura de bloques, donde las parcelas principales correspondieron a los diferentes niveles de presión (número de insectos/plantas) y las subparcelas a las variedades (Figura 7).

Parcelas Principales:																																																																																															
1 = 1 insecto/ planta																																																																																															
2 = 2 insectos/ planta																																																																																															
4 = 4 insectos/ planta																																																																																															
Sub Parcelas:																																																																																															
Código	Variedad																																																																																														
V1	Araure IV																																																																																														
V2	Araure I																																																																																														
V3	Cimarrón																																																																																														
V4	Palmar																																																																																														
V5	FONAIAP 1																																																																																														
V6	FONAIAP2000																																																																																														
V7	Centauro																																																																																														
V8	FUNDARROZ-PN1																																																																																														
V9	Venezuela 21																																																																																														
Fed50	FEDEARROZ 50																																																																																														
Fed2000	FEDEARROZ 2000																																																																																														
WC366	WC366																																																																																														
		<table border="1"> <tr> <td rowspan="3">Bloque 1</td> <td>1</td> <td>V1 V8</td> <td>V7 V4</td> <td>V3 V2</td> <td>V6 WC366</td> <td>V9 Fed2000</td> <td>Fed50 V5</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>V6 Fed2000</td> <td>V9 V7</td> <td>V1 V4</td> <td>V8 V2</td> <td>Fed50 WC366</td> <td>V5 V3</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Fed50 V9</td> <td>V3 Fed2000</td> <td>V8 V2</td> <td>V4 V6</td> <td>V5 V7</td> <td>V1 WC366</td> </tr> </table> <table border="1"> <tr> <td rowspan="3">Bloque 2</td> <td>2</td> <td>V3 V8</td> <td>V5 V9</td> <td>Fed2000 V1</td> <td>V6 V7</td> <td>V4 V2</td> <td>Fed50 WC366</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>WC366 V9</td> <td>Fed2000 V3</td> <td>V2 V5</td> <td>V1 V4</td> <td>V6 V7</td> <td>Fed50 V8</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>Fed2000 V6</td> <td>Fed50 WC366</td> <td>V5 V9</td> <td>V1 V4</td> <td>V8 V3</td> <td>V2 V7</td> </tr> </table> <table border="1"> <tr> <td rowspan="3">Bloque 3</td> <td>2</td> <td>Fed50 V3</td> <td>V6 V9</td> <td>Fed2000 V8</td> <td>V4 V1</td> <td>WC366 V7</td> <td>V2 V5</td> </tr> <tr> <td>4</td> <td>V9 V4</td> <td>V5 V1</td> <td>Fed2000 V2</td> <td>WC366 Fed50</td> <td>V8 V3</td> <td>V7 V6</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>V4 V9</td> <td>V7 Fed2000</td> <td>Fed50 V1</td> <td>V8 V3</td> <td>V6 WC366</td> <td>V5 V2</td> </tr> </table> <table border="1"> <tr> <td rowspan="3">Bloque 4</td> <td>4</td> <td>V7 V5</td> <td>Fed50 V1</td> <td>V2 Fed2000</td> <td>V9 V3</td> <td>V6 V4</td> <td>V8 WC366</td> </tr> <tr> <td>2</td> <td>WC366 Fed50</td> <td>V1 Fed2000</td> <td>V8 V5</td> <td>V9 V6</td> <td>V4 V3</td> <td>V2 V7</td> </tr> <tr> <td>1</td> <td>V7 V2</td> <td>V5 WC366</td> <td>Fed2000 V8</td> <td>V3 V4</td> <td>Fed50 V1</td> <td>V9 V6</td> </tr> </table>						Bloque 1	1	V1 V8	V7 V4	V3 V2	V6 WC366	V9 Fed2000	Fed50 V5	2	V6 Fed2000	V9 V7	V1 V4	V8 V2	Fed50 WC366	V5 V3	4	Fed50 V9	V3 Fed2000	V8 V2	V4 V6	V5 V7	V1 WC366	Bloque 2	2	V3 V8	V5 V9	Fed2000 V1	V6 V7	V4 V2	Fed50 WC366	1	WC366 V9	Fed2000 V3	V2 V5	V1 V4	V6 V7	Fed50 V8	4	Fed2000 V6	Fed50 WC366	V5 V9	V1 V4	V8 V3	V2 V7	Bloque 3	2	Fed50 V3	V6 V9	Fed2000 V8	V4 V1	WC366 V7	V2 V5	4	V9 V4	V5 V1	Fed2000 V2	WC366 Fed50	V8 V3	V7 V6	1	V4 V9	V7 Fed2000	Fed50 V1	V8 V3	V6 WC366	V5 V2	Bloque 4	4	V7 V5	Fed50 V1	V2 Fed2000	V9 V3	V6 V4	V8 WC366	2	WC366 Fed50	V1 Fed2000	V8 V5	V9 V6	V4 V3	V2 V7	1	V7 V2	V5 WC366	Fed2000 V8	V3 V4	Fed50 V1	V9 V6
Bloque 1	1	V1 V8	V7 V4	V3 V2	V6 WC366	V9 Fed2000	Fed50 V5																																																																																								
	2	V6 Fed2000	V9 V7	V1 V4	V8 V2	Fed50 WC366	V5 V3																																																																																								
	4	Fed50 V9	V3 Fed2000	V8 V2	V4 V6	V5 V7	V1 WC366																																																																																								
Bloque 2	2	V3 V8	V5 V9	Fed2000 V1	V6 V7	V4 V2	Fed50 WC366																																																																																								
	1	WC366 V9	Fed2000 V3	V2 V5	V1 V4	V6 V7	Fed50 V8																																																																																								
	4	Fed2000 V6	Fed50 WC366	V5 V9	V1 V4	V8 V3	V2 V7																																																																																								
Bloque 3	2	Fed50 V3	V6 V9	Fed2000 V8	V4 V1	WC366 V7	V2 V5																																																																																								
	4	V9 V4	V5 V1	Fed2000 V2	WC366 Fed50	V8 V3	V7 V6																																																																																								
	1	V4 V9	V7 Fed2000	Fed50 V1	V8 V3	V6 WC366	V5 V2																																																																																								
Bloque 4	4	V7 V5	Fed50 V1	V2 Fed2000	V9 V3	V6 V4	V8 WC366																																																																																								
	2	WC366 Fed50	V1 Fed2000	V8 V5	V9 V6	V4 V3	V2 V7																																																																																								
	1	V7 V2	V5 WC366	Fed2000 V8	V3 V4	Fed50 V1	V9 V6																																																																																								

Figura 7: Diseño en parcelas divididas con estructura de bloques, donde las parcelas principales correspondieron a la dosis y las subparcelas a las variedades. CIAT. Cali, Colombia, Junio 2006.

Los datos obtenidos se transformaron mediante la función de arcoseno de la raíz cuadrada previo al análisis estadístico aplicando la siguiente fórmula:

$$Y' = \arcseno(\sqrt{\%/100})$$

Una vez transformados los datos, se analizaron mediante análisis de varianza ($\alpha=0,05$) (ANAVA) y la prueba de comparaciones múltiples Ryan-Einot-Gabriel-Welsh (R-E-G-W) con el programa SAS (SAS 2004). El análisis estadístico se realizó bajo el siguiente modelo y grados de libertad (Cuadro 2).

$$\gamma_{ijk} = \mu + \text{Bloque}_i + \text{Dosis}_j + \text{Bloque}_i * \text{Dosis}_j + \text{Variedad}_k + \text{Variedad}_k * \text{Dosis}_j + \epsilon_{ijk}$$

donde:

γ_{ijk} = número de plantas con síntomas en la i-ésima repetición, j-ésima dosis y k-ésima variedad.

μ = media general.

Bloque_i = efecto de la i-ésima repetición.

Dosis_j = efecto del j-ésima dosis.

$\text{Bloque}_i * \text{Dosis}_j$ = Interacción entre la i-ésima repetición y la j-ésima dosis ($\text{Bloque}_i * \text{Dosis}_j$).

Variedad_k= efecto de la k-ésima variedad.

Variedad_k * Dosis_j= Interacción entre la k-ésima variedad en la j-ésima dosis.

E_{ijk}= Error experimental.

Cuadro 2: Fuentes de variabilidad y grados de libertad del modelo estadístico.

FV	Gl
Bloque	3
Dosis	2
Error A (Bloque*Dosis)	6
Variedad	11
Dosis*Variedad	22
Error	99
Total	143

Para determinar el porcentaje de virulencia de la colonia vectora al momento de la infestación se cubrieron 100 plantas individuales de ‘Bluebonnet 50’ con tubos de acetato (calibre 15’) de 2,5 cm de diámetro x 24 cm de alto. Dentro de cada tubo se colocó un insecto vector en segundo o tercer estado ninfal proveniente de la misma colonia con la cual se realizó la infestación (Jamundí). La evaluación se realizó 25 ddi tomando como dato el número de plantas con síntomas de RHBV (Figura 8).

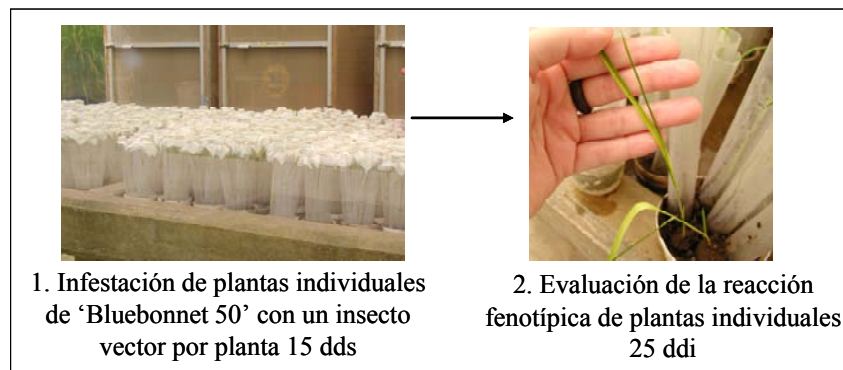


Figura 8: Metodología empleada para determinar el porcentaje de virulencia de la colonia vectora al momento de la infestación. CIAT. Cali, Colombia, junio 2006.

El porcentaje de virulencia de la colonia al momento de la infestación se determinó a través de la siguiente fórmula.

$\% \text{ de virulencia de la colonia vectora} = (\text{N}^\circ \text{ de plantas con s\u00edntoma} \times 100) / \text{N}^\circ \text{ total de plantas}$

3.2.3 Evaluaci\u00f3n de la variabilidad gen\u00e9tica en variedades de arroz venezolanas a trav\u00e9s de marcadores microsat\u00e9lites asociados a resistencia del RHBV

Se evaluaron 13 microsat\u00e9lites en las 12 variedades bajo estudio (venezolanas y testigos): cinco ubicados en el CR4, uno en el CR5, tres en el CR7, dos en el CR11 y uno en el CR12 (Anexo 1). La

Figura 9 representa un esquema del trabajo realizado con microsat\u00e9lites, seguidamente se especifica la metodolog\u00eda empleada en cada paso.

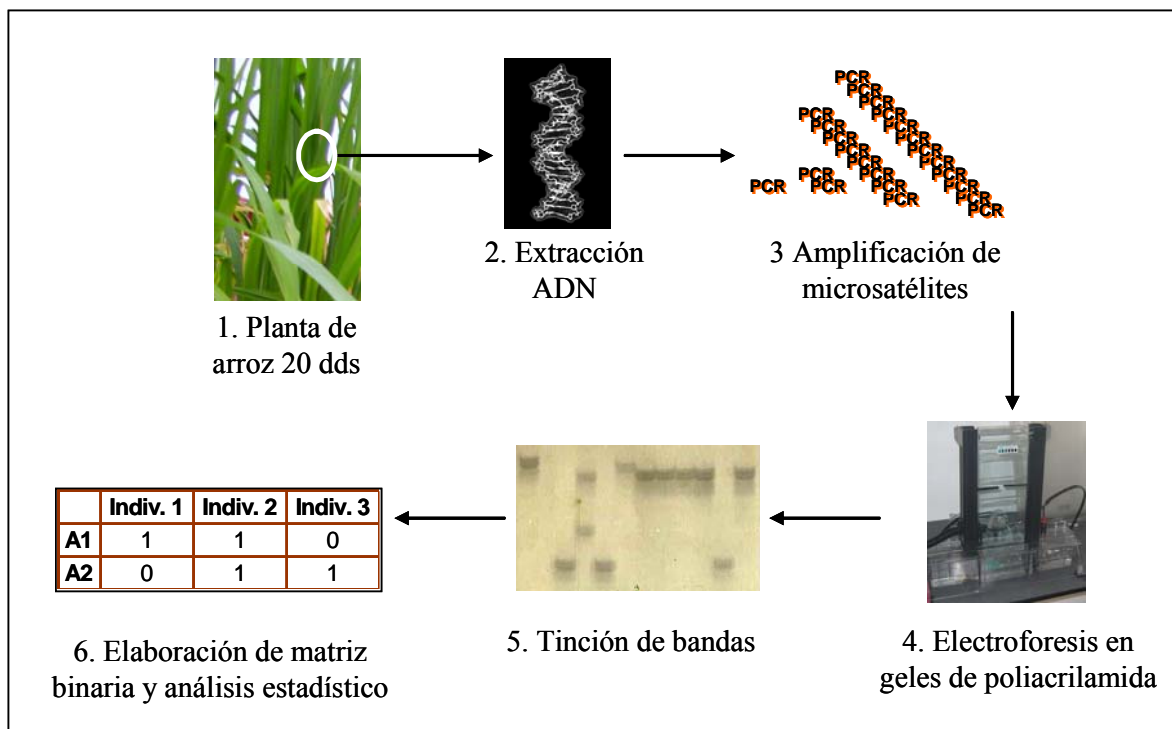


Figura 9: Esquema de trabajo realizado en la t\u00e9cnica de microsat\u00e9lites. CIAT. Cali, Colombia 2006.

3.2.3.1 Extracci\u00f3n de ADN

Tejido foliar de las 12 variedades (venezolanas y testigos) se colect\u00f3 en bolsas pl\u00e1sticas 20 d\u00edas despu\u00e9s de la siembra (dds) y se conserv\u00f3 a -20°C hasta el momento de la extracci\u00f3n. La extracci\u00f3n de ADN se realiz\u00f3 mediante el m\u00e9todo modificado de Lorieux (2002), para ello se coloc\u00f3 1 g de tejido foliar de cada variedad, previamente macerado con

nitrógeno líquido, en tubos Eppendorf de 1,5 ml. A cada tubo se adicionó 480 μ l de tampón de extracción (Anexo 2) precalentado a 74° C. Esta mezcla se incubó en baño maría a la misma temperatura durante 30 min. Posteriormente, se agregó 480 μ l de Cloroformo: Alcohol isoamílico (24:1) (Anexo 2) mezclando por inversión durante 5 min y se centrifugó a 10.000 rpm durante 12 min. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo y se adicionó 250 μ l de isopropanol 100%, se mezcló por inversión unos minutos y luego se mantuvo a -20° C durante 15 min. Una vez culminado el tiempo, se centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min y se descartó el sobrenadante, luego se realizó un lavado con 100 μ l de etanol 70% y centrifugó a 10.000 rpm durante 10 min, el sobrenadante se descartó dejando secar por inversión en una servilleta y luego en vacío hasta que estuvo completamente seco. Finalmente, se resuspendió en 30 μ l de Tris-EDTA pH 8.0 (Anexo 2) por algunas horas a temperatura ambiente y se guardó a -20° C. Los extractos concentrados de ADN se diluyeron con agua en proporción 1:3 (ADN: agua destilada) para obtener una concentración final promedio de 4 ng/ μ .

3.2.3.2 Amplificación de los microsatélites

Las muestras se sometieron a la *PCR* usando la técnica de microsatélites, bajo las siguientes condiciones: volumen final de 15 μ l, ADN [20 ng/ μ l], Buffer de *PCR* [1X]; DNTPs [10 mM]; iniciadores sentido y antisentido [10 μ M], Taq polimerasa y agua estéril. Para cada iniciador se ajustó la concentración de magnesio y la temperatura de alineamiento óptima para su amplificación (Cuadro 3).

El programa de amplificación se corrió en un termociclador PTC-100SM *Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Waltham, MA, EU), el cual inició con un paso de desnaturalización largo, seguido por desnaturalizaciones cortas, alineamiento, extensión y un ciclo de extensión final (Cuadro 4).

Cuadro 3: Temperatura y concentración de Magnesio estandarizada para cada microsatélite. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Microsatélite	Temperatura	[MgCl₂] mM
RM518	55	1.8
RM6770	57	1,8
RM7200	57	1.5
RM1305	50	1.8
RM261	55	2.5
RM349	55	1,5
RM13	55	1,8
RM11	55	1,8
RM346	55	1,8
RM234	55	1,5
RM202	55	1,8
RM21	55	1,8
RM19	55	1,8

Cuadro 4: Perfil para PCR usando la técnica de microsatélites. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Paso	Tiempo	Temperatura (° C)	Ciclos
Desnaturalización	3min	94	1X
2da desnaturalización corta	30seg	94	
Alineamiento	45seg	Temperatura específica para cada microsatélite	
Extensión	1min	75	29X
Extensión final	5 min	72	1X

3.2.3.3 Electroforesis en geles de poliacrilamida

Se visualizaron los productos amplificados por *PCR* a través de electroforesis en geles de poliacrilamida al 6%, lo cual permitió detectar polimorfismo de 5 pb o menos entre los microsatélites.

Para la preparación de los geles de poliacrilamida al 6%, se aplicó sobre el vidrio una mezcla de fijador *Bind silane*[®] (Anexo 3) y sobre la cara interna de la cámara una película de

repelente SIGMACOTE®. Una vez que ambas caras estuvieron completamente secas, se procedió a armar la cámara de electroforesis dejando la parte lisa del peine hacia adentro con la finalidad de formar el frente de corrida.

Posteriormente, se preparó la mezcla de poliacrilamida al 6% (Anexo 3), la cual se introdujo rápidamente dentro de cámara y se dejó polimerizar durante 30 min. Una vez polimerizado el gel, se ensambló la cámara a la base y se adicionaron 2 L de Tampón TBE 1X (Anexo 3), se retiró el peine y se introdujo nuevamente con las puntas hacia el interior para formar los pozos.

Seguidamente, se conectó la cámara a una fuente de poder a 110 W/cm^3 y se realizó la precorrida con tampón de carga 2X (Anexo 3) hasta alcanzar los 48° C . A cada producto de PCR se adicionó previamente $10 \mu\text{l}$ de Tampón de carga 2X, se desnaturalizó a 94° C durante 2 min y se mantuvo en hielo hasta el momento de servir en el gel. Listas las muestras, se dispensó $5 \mu\text{l}$ de cada muestra/pozo y $3 \mu\text{l}$ de marcador 10 pb para determinar los tamaños de los fragmentos, se dejó correr durante 1 hr y 30 min aproximadamente. Finalmente, se visualizó mediante tinción de plata.

3.2.3.4 Tinción de plata

Se retiró la cámara de su base y se separó cuidadosamente el vidrio. Inmediatamente se colocó el gel en solución fijadora (Anexo 4) durante 20 min. Finalizado el tiempo, se realizó dos lavados con agua destilada durante 3 min en agitación constante. Seguidamente, se dejó el gel en solución de tinción (Anexo 4) durante 30 min y se lavó con agua destilada durante 10 seg. Transcurrido el tiempo, se colocó el gel en solución reveladora (Anexo 4) con agitación constante hasta ver las bandas de ADN y se llevó inmediatamente a la solución de parada (Anexo 4) durante 5 a 10 min aproximadamente. Finalmente se lavó con agua destilada cerca de 5 min, dejando secar por varias horas.

3.2.3.5 Estimación de la diversidad alélica

Para conocer el número promedio de alelos por loci y el porcentaje de loci polimórficos se aplicaron las siguientes fórmulas (Zambrano *et al.* 2003)

1. Número promedio de alelos por locus (A):

$$A = \sum A_i / n$$

Donde:

A_i es el número de alelos en el *i*ésimo locus

n es el número total de loci investigados

2. Porcentaje de loci polimórficos (**P**):

$$P = (K/n) \times 100$$

Donde:

K es el número de loci polimórficos

n es el número total de loci investigados

3.2.3.6 Estimación de la Heterozigosidad y análisis de coordenadas principales

La estimación de la heterozigosidad observada (H_o) promedio se obtuvo a través de la siguiente fórmula (Frankham *et al.* 2003):

$$H = (\Sigma H_i / n) \times 100$$

Donde:

H_i es la frecuencia de heterocigotos en el *i*-ésimo locus

n es el número total de loci polimórficos investigados

Para conocer el contenido de información polimórfica (PIC por sus siglas en inglés) de cada marcador, se aplicó la fórmula propuesta por Saal y Wricke (1999) basada en el valor de heterozigosidad esperado (1993).

$$PIC = H = 1 - \sum_{i=1}^{\text{\#alelos}} p_{ij}^2$$

Donde

p_{ij} es la frecuencia del *j*-ésimo alelo del *i*-ésimo locus

n es el número total de alelos

Con la ayuda del programa Infostat® (2004) se realizó un análisis de coordenadas principales para determinar el agrupamiento y las distancias genéticas entre variedades tomando en consideración los resultados moleculares.

3.2.4 Análisis de asociación entre respuestas fenotípicas y moleculares

A partir de una matriz binaria donde se registró la presencia o ausencia de bandas para cada alelo presente en cada locus, se realizó un análisis de Procrustes generalizado y χ^2 con el objetivo de estudiar la asociación entre la respuesta fenotípica y molecular.

3.3 Desarrollo y evaluación fenotípica de la F₁ de los cruces ‘WC366’ x ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’ x ‘Fundarroz PN-1’ en condiciones de invernadero

A partir de la línea ‘WC366’ y las variedades ‘Centauro’ y ‘Fundarroz PN-1’ se obtuvo la F₁ de dos cruces, con ‘WC366’ y ‘Centauro’ como madres susceptibles y la variedad ‘Fundarroz PN-1’ como padre donante de resistencia. La metodología para el desarrollo de los cruces se basó en el método modificado de Sarkarung (1989, citado por Vergel 1991), los pasos se describen en detalle en el Anexo 5.

Una semilla de cada cruce, parental y testigo se sembró por matero de 10 cm de diámetro, para un total de 50 semillas/cruce, 40 semillas/parental y 20 semillas/testigo. Todos los materiales se mantuvieron en un cuarto de invernadero con temperatura y HR máxima de 42° C y 90%, mínima de 14° C y 35%, promedio de 25° C y 77% respectivamente. Veinticinco dds, cada planta se cubrió con un tubo de acetato (calibre 15’) de 8 cm de diámetro x 45 cm de alto. Por cada matero se liberaron 4 insectos vectores virulentos de segundo y tercer estado ninfal (provenientes de la colonia Jamundí). Una vez realizada la infestación, los materos se trasladaron a otro cuarto de invernadero donde se mantuvieron durante el resto del ensayo; con temperatura y HR máxima de 42° C y 100%, mínima de 17° C y 40%, promedio de 25° C y 85% respectivamente. Cinco ddi, se eliminaron los insectos adultos y se aplicó el insecticida sistémico Furadán para evitar la eclosión de las posturas del insecto. En la evaluación fenotípica se contabilizó el número de plantas con síntomas virales por unidad experimental, se realizó una cuarta evaluación a los 46 ddi la cual se usó para los análisis. La infestación se realizó siguiendo un diseño completamente aleatorizado (Figura 10).

Los datos obtenidos se analizaron mediante la prueba no paramétrica de Klustal Wallis ($\alpha = 0,05$).

WC366	Cent	Cent	Blueb.50	Cruce1	Cruce2	Cent	Blueb.50	Cruce2	Cruce2
Fed2000	Cruce1	Cruce2	Fed2000	WC366	Blueb.50	WC366	Cruce2	FPN-1	Cruce2
Cruce2	FPN-1	Cent	Cent	Cruce1	WC366	FPN-1	Fed2000	Blueb.50	FPN-1
Cruce1	Cent	Cruce1	Cruce1	Cent	FPN-1	Cruce2	WC366	Cruce1	Fed2000
FPN-1	WC366	Cruce1	Cent	WC366	Cruce2	WC366	FPN-1	WC366	FPN-1
Cruce2	Fed2000	WC366	FPN-1	Cruce1	Cent	FPN-1	Cruce2	Cruce2	FPN-1
FPN-1	Blueb.50	Cruce2	Fed2000	Cent	Cruce1	FPN-1	Cent	FPN-1	WC366
Fed2000	Cent	Blueb.50	Cruce1	Cruce2	WC366	Cent	Blueb.50	Cruce1	Cent
WC366	Cruce1	Cruce2	Cent	FPN-1	Fed2000	Cruce1	Cruce1	Cent	Blueb.50
Blueb.50	WC366	Cent	Cruce1	WC366	Cruce1	Cruce2	Fed2000	WC366	WC366
FPN-1	WC366	FPN-1	Cruce2	Cent	Fed2000	FPN-1	Cruce2	Cruce1	Cruce2
Blueb.50	Cruce1	Cruce2	Cent	FPN-1	Blueb.50	WC366	Cruce1	Cruce2	WC366
Cruce2	Cruce1	Blueb.50	Cruce2	Cruce1	FPN-1	FPN-1	Cent	Cruce2	Fed2000
Cent	FPN-1	Fed2000	FPN-1	Cruce2	Cent	Blueb.50	Cent	WC366	Cent
Fed2000	Cent	Cruce1	FPN-1	Cruce2	FPN-1	Cent	WC366	Fed2000	WC366
WC366	FPN-1	Cruce2	WC366	WC366	Cruce1	Blueb.50	Cent	Cruce1	FPN-1
Cent	Cruce1	WC366	Cruce1	Cruce2	WC366	Cruce1	FPN-1	WC366	Cruce2
FPN-1	Cent	FPN-1	WC366	Fed2000	Cent	FPN-1	Cruce1	FPN-1	Cent
Cruce1	Fed2000	Cent	FPN-1	Cruce2	WC366	WC366	Fed2000	Cruce1	FPN-1
Cruce1	Cent	WC366	WC366	Cent	Cruce2	Cruce2	Cent	Fed2000	Cruce1
Cruce2	Blueb.50	Cent	Cruce2	WC366	Cruce1	Cruce1	WC366	FPN-1	Cruce2
Cent	Cruce1	FPN-1	WC366	Cruce2	Fed2000	Cruce2	FPN-1	Cruce1	Cent
Cruce1	Cruce2	WC366	Cruce2	Blueb.50	Cruce1	Cruce2	WC366	Cruce2	FPN-1
Cruce1	Cruce1	Cruce1	Cruce2	Blueb.50	Cruce2	Cruce2	Cruce1	Cruce2	Cruce1
Cruce1	Cruce2	Blueb.50	Cruce1	Cruce2	Cruce1	Blueb.50	Cruce2	Cruce2	Cruce1

Leyenda: Cruce 1: 'WC366' x 'Fundarroz PN-1'
 Cent: 'Centauro' Cruce 2: 'Centauro' x 'Fundarroz PN-1'
 FPN-1: Fundarroz PN-1 Fed2000: Fedearroz 2000

Figura 10: Diseño completamente aleatorio empleado en la evaluación fenotípica de cruces, parentales y testigos ante el RHBV en condiciones de invernadero. CIAT. Cali, Colombia, septiembre 2006.

3.4 Clonación de un gen candidato de resistencia al RHBV, ubicado en el CR4, en dos variedades venezolanas: 'Fundarroz PN-1' y 'Centauro'

El gen de interés se encontraba ubicado en el brazo corto del CR4 (3,5 Mb). A partir de la secuencia de 'Nipponbare' (LOC_Os04g06770.1) publicada por el grupo *TIGR* (The Institute for Genomic Research) accesible en la base de datos Gramene© (2006), el equipo del laboratorio de virología diseñó iniciadores distribuidos equidistantemente en la región de interés constituida por 7553 nt, incluyendo intrones y exones.

3.4.1 Amplificación de los segmentos

Los extractos concentrados de ADN total obtenidos a través del método modificado de Loreix (2002) se evaluaron con los iniciadores previamente diseñados. De un total de 25 iniciadores se seleccionó un par de iniciadores para cada segmento, lo cual permitió la

amplificación más específica del producto de PCR esperado. Para cada par de iniciadores se estandarizaron las condiciones de la reacción (Cuadro 5) y la temperatura de alineamiento óptima.

Cuadro 5: Reacción PCR para amplificar seis segmentos del gen candidato de resistencia bajo estudio. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Reactivo	1X
Agua estéril	15 μ l
Tampón de PCR 10X	2,5 μ l
MgCl ₂	2,0 μ l
dNTPs 50mM	0,5 μ l
Iniciador sentido	0,5 μ l
Iniciador anti sentido	0,5 μ l
<i>Taq</i> polimerasa	0,25 μ l
Sub total	21.25 μl
ADN [\approx 80 ng/ μ l]	4 μ l
Volumen final	25.25

La amplificación de los segmentos se realizó en un termociclador PCT100SM *Programmable Thermal Controller* (MJ Research, Waltham, MA, EU). En el Cuadro 6 se especifica el perfil de *PCR* y el Cuadro 7 muestra la temperatura específica para cada par de iniciador estandarizado.

Cuadro 6: Perfil de PCR para amplificar seis segmentos del gen candidato de resistencia bajo estudio. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Paso	Temperatura (° C)	Tiempo	Ciclos
Desnaturalización larga	94	2 min	1X
2da desnaturalización corta	94	30 seg	
Alineamiento	Específica para cada iniciador	30 seg	
Extensión	72	2 min	31X
Extensión final	72	10 min	1X

Cuadro 7: Iniciadores seleccionados para cada segmento y temperatura de alineamiento estandarizadas para cada iniciador. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Segmento	Iniciador sentido/antisentido	Temperatura de alineamiento (° C)
1er segmento	GS1F43/GS1R1373	55
1er – 2do segmento	GS1F43/GS2R1407	50
2do segmento	GS2F36/GS2R1407	55
3er segmento	GS3F49/GS3R1330	45
4to segmento	GS4F84/GS4R1411	45
5to segmento	GS5F50/GS5R1387	45
6to segmento	GS6F79/GS6R1462	45

Los productos obtenidos se visualizaron mediante electroforesis en gel de agarosa 1% y tinción con Bromuro de Etidio 10%; se utilizó un marcador de peso molecular 1 kb para determinar el tamaño de los productos obtenidos.

3.4.2 Ligación del producto de PCR con el vector

Una vez que se obtuvieron los productos de *PCR*, de los tamaños esperados, se realizó la ligación de los mismos en el vector pGEM®-T Easy Vector (Promega) (Anexo 6), para lo cual se preparó la reacción de ligación (Cuadro 8) y se incubó a 4° C toda la noche. La cantidad de agua usada en la ligación varió con relación a la concentración del producto de *PCR* obtenido, manteniendo la proporción 3:1 (producto de *PCR*:vector). Posteriormente, la ligación se conservó a -20° C hasta el momento de la transformación.

Cuadro 8: Reacción de ligación producto de PCR-vector. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Reactivo	1X
Agua estéril	----
T4 ADN Ligasa 2X Buffer	5 µl
Vector pCR® 2.1 (25ng/µl)	1 µl
T4 ADN Ligasa	1 µl
Producto de <i>PCR</i> fresco	3 µl (volumen calculado)
Volumen final	10 µl

3.4.3 Transformación de células competentes

Previo a la transformación se equilibraron a temperatura ambiente los platos agar LB que contenían antibiótico, X-Gal e IPTG (AXI) (Anexo 7) y el medio SOC. Luego, se colocó en hielo tanto los viales que contenían la reacción de ligación como los tubos Eppendorf que contenían 200 µl de células competentes. En cada tubo de células competentes se adicionó 5 µl de reacción de ligación. Luego, se incubaron los viales en hielo durante 30 min y una vez finalizado el tiempo se sometieron las células a un choque térmico de 42° C durante 42 seg. Inmediatamente después, se transfirieron los tubos a hielo durante 2 min y se adicionaron 200 µl de medio SOC y se puso en agitación a 220 rpm durante 1 hr a 37° C. Finalizado el tiempo, se estrió 200 µl de la transformación en platos agar LB que contenían AXI. Finalmente, se incubaron las placas durante toda la noche a 37° C y al día siguiente se incubaron a 4° C durante 2–3 hr para permitir el desarrollo apropiado del color de las colonias.

3.4.4 Análisis de eficiencia de ligación

Colonias que permanecieron blancas se picaron individualmente en platos de agar LB que contenían AXI, e incubaron a 37° C durante toda la noche. Posteriormente, se realizó un PCR de colonias a aquellas de buena forma y tamaño que hayan permanecido blancas, para lo cual se utilizaron los iniciadores T7 y M13 (sentido y antisentido respectivamente) (Cuadro 9).

Cuadro 9: Reacción para PCR de colonia. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Reactivo	1X
Agua estéril	40 µl
Tampón de PCR 10X	5,0 µl
MgCl ₂ [25 mM]	4,0 µl
dNTPs [50µM]	0,4 µl
Iniciador T7 [10µM]	0,25 µl
Iniciador M13 [10µM]	0,25 µl
Taq polimerasa	0,20 µl
Total	50,1 µl

El programa de amplificación se corrió en un termociclador PTC-100SM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Waltham, MA, EU), el cual inició con un

paso de desnaturalización largo, seguido por desnaturalizaciones cortas, alineamiento, extensión y un ciclo de extensión final (Cuadro 10).

Cuadro 10: Perfil para PCR de colonia. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Paso	Tiempo	Temperatura (° C)	Ciclos
Desnaturalización	3 min	94	1X
2da desnaturalización corta	30 seg	94	
Alineamiento	30 seg	55	
Extensión	2 min	72	30X
Extensión final	5 min	72	1X

El producto de *PCR* obtenido se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa (1,2%) TBE 1X y se utilizó marcador 1 kb para corroborar el tamaño adecuado del inserto.

3.4.5 Aislamiento del ADN plasmídico y prueba de restricción con *ECO R1*

El aislamiento del ADN plasmídico se realizó a través del Kit QIAprep® Spin Miniprep de QIAGEN, la metodología empleada fue la recomendada por la casa comercial. Una vez que se obtuvo el ADN plasmídico se procedió a verificar la presencia del inserto y evaluar la concentración del ADN mediante una prueba de restricción con la enzima *ECO R1*, la cual se encontraba presente en ambos extremos del lugar de inserción (Anexo 6). La reacción de ligación se preparó con la enzima *ECO R1*, Buffer H 10X, agua y el ADN plasmídico (Cuadro 11) y se incubó 37° C durante 1 hr.

*Cuadro 11: Reacción de ligación para la enzima *ECO R1*. CIAT. Cali, Colombia 2006.*

Reactivo	1X
Agua estéril	15 µl
Buffer H 10X	2 µl
Enzima <i>ECO R1</i>	1 µl
Sub total	18 µl
ADN plasmídico	2 µl
Volumen final	20 µl

El resultado de la prueba de restricción se visualizó mediante electroforesis en gel de agarosa 1,2% y se utilizó marcador de peso molecular 1 kb para verificar el tamaño de los fragmentos.

3.4.6 PCR de secuencia

Previo a la secuenciación se realizó un PCR para obtener el producto a secuenciar (Cuadro 12).

Cuadro 12: Reacción para PCR de secuencia. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Reactivo	1X
Agua estéril	1,0-3,0 µl
Iniciador T7, M13 o específico	1,0 µl
Mix	2,0 µl
Sub total	1,0-3,0 µl
ADN Plasmídico	3 µl
Total	7,0 µl

El programa de amplificación se corrió en un termociclador PTC-100SM Programmable Thermal Controller (MJ Research, Waltham, MA, EU), el cual inició con un paso de desnaturalización largo, seguido por desnaturalizaciones cortas, alineamiento, extensión y un ciclo de extensión final (Cuadro 13).

Cuadro 13: Perfil para PCR de secuencia. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Paso	Tiempo	Temperatura (° C)	Ciclos
Desnaturalización	3 min	94	1X
2da desnaturalización corta	30 seg	94	
Alineamiento	30 seg	55	
Extensión	2 min	72	30X
Extensión final	5 min	72	1X

3.4.7 Precipitación del ADN

Se adicionó 13 µl de agua para PCR con la finalidad de obtener un volumen final de 20 µl. Luego, se tomó todo el volumen y se traspasó a un nuevo tubo Eppendorf de 1,5 ml. A

cada muestra se adicionó 2 μ l de Acetato de Sodio 3M pH 5.2 y 50 μ l de Etanol 100% y se mantuvo a -20° C durante 20 min. Finalizado el tiempo, se centrifugó a 14.000 rpm durante 30 min a 4° C. Se tomó el sobrenadante con una micropipeta y se adicionó 250 μ l de Etanol 70% y se centrifugó por 15 min a 14.000 rpm a 4° C. Finalmente, se retiró el sobrenadante y se terminó de secar al vacío durante 3 min. Se mantuvo a -20° C hasta el momento de la secuenciación.

3.4.8 Secuenciación de clones

La secuenciación de los clones fue realizada por la Lic. Ana Karine Martínez en un secuenciador automático (CIAT).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1 Evaluación fenotípica de variedades de arroz venezolanas ante el RHBV en condiciones de campo e invernadero y su variabilidad genética a través de marcadores microsatélites asociados con la resistencia al RHBV

4.1.1 *Evaluación de la reacción fenotípica de variedades de arroz venezolanas al RHBV en condiciones de campo*

Bajo un diseño completamente aleatorio con tres repeticiones y un nivel de presión del virus (1,2 insectos vectores/planta con 75% de virulencia) se evaluaron 13 variedades de arroz (nueve venezolanas y cuatro testigos). Tanto el diseño experimental empleado como el bajo número de repeticiones arrojaron resultados con una alta variabilidad; por lo cual, no se pudo realizar un análisis estadístico confiable. El Cuadro 14 muestra los valores promedios de la escala obtenidos en las evaluaciones de campo y la reacción observada para cada variedad, según la escala de medias en la cual se definieron los siguientes rangos: Resistente (1 - 3), Intermedio (3,1 - 6), Susceptible (6,1- 9). Los datos totales obtenidos en la evaluación de campo se encuentran detallados en el Anexo 8.

Las reacciones de ‘Fedearroz 2000’ y ‘Fundarroz PN-1’ se mantuvieron estables con relación a la evaluación de invernadero donde estas variedades también presentaron una reacción resistente, similar a lo que ha sido reportado en la literatura (Reyes *et al.* 2001a, Reyes *et al.* 2001b, Calvert *et al.* 2005a). De igual forma, las variedades susceptibles ‘Cimarrón’, ‘Araure 1’, ‘Centauró’, ‘Fonaiap 2000’ reaccionaron de la misma manera como se había observado previamente en las evaluaciones de invernadero.

Sin embargo, la reacción de un grupo de variedades que anteriormente habían reaccionado como resistentes e intermedias al ser evaluadas en condiciones de invernadero, cambiaron al ser evaluadas en campo. La variedad ‘Venezuela 21’ que había presentado reacción resistente - incluso ante el nivel de presión más alto - resultó intermedia en campo y la variedad ‘Araure 1’ que había mostrado reacción intermedia se comportó como susceptible.

Cuadro 14: Resultados de la evaluación fenotípica de variedades de arroz evaluadas ante el RHBV en condiciones de campo. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Tratamiento	Medias	Reacción
Fedearroz 2000	1,0	R
Fundarroz PN-1	3,0	R
Colombia	4,0	I
Fedearroz 50	5,3	I
Araure 4	5,7	I
Fonaiap 1	5,7	I
Palmar	5,7	I
Venezuela 21	5,7	I
Cimarrón	6,3	S
Araure 1	7,0	S
Centauro	7,7	S
Fonaiap 2000	7,7	S
Bluebonnet 50	9,0	S

Diversos autores han señalado que la resistencia al RHBV es de tipo cuantitativa. Estudios recientes indican que la misma podría estar controlada por la acción de 1 gen dominante y 1 gen recesivo o por 1 gen dominante y 2 recesivos². Ribeiro *et al.* (2001) indica que este tipo de resistencia puede ser modificada por el ambiente, por lo cual podría sugerirse que los cambios observados se deban parcialmente a la acción del factor ambiente. Sin embargo, Cuevas-Pérez *et al.* 1992 al realizar evaluaciones de 107 variedades en condiciones de campo e invernadero encontraron correlaciones significativas, relativamente bajas, entre las variables correlacionadas.

Estos resultados deben ser considerados como una evaluación preliminar ya que ni el diseño ni el número de repeticiones fue adecuado. Por lo tanto, es aconsejable realizar nuevos ensayos con mayor número de repeticiones tanto en el espacio como el tiempo, preferiblemente empleando un diseño en bloques y dos niveles de presión del virus.

² Calvert, L. 2006. Resistencia al RHBV (comunicación personal). Turrialba, CR, CATIE.

4.1.2 Evaluación de la reacción fenotípica de variedades de arroz venezolanas al RHBV, con tres niveles de presión del virus, en condiciones de invernadero

Doce variedades de arroz (nueve venezolanas y tres testigos) se evaluaron en condiciones de invernadero usando tres niveles de presión del virus (1, 2 y 4 insectos vectores/planta). Inicialmente, las plantas infestadas presentaron pequeños moteados blancos o cloróticos en las hojas nuevas, posteriormente desarrollaron coloraciones blanco amarillentas, pudiendo cubrir la hoja entera o parte de esta en forma de estrías (Figura 11). También se observó disminución del macollamiento, reducción del tamaño general de la planta y en casos de mayor severidad muerte de las plantas antes de los 46 ddi. Estas observaciones coinciden con los síntomas reportados por diversos autores para el RHBV (Malaguti *et al.* 1956b, Ling 1972).

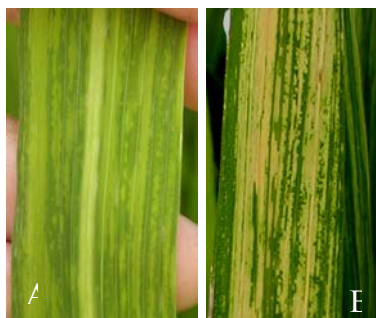


Figura 11: Síntomas característicos observados del RHBV en plantas de arroz. A) Moteado blanco o clorótico en las hojas nuevas, B) Desarrollo de coloración blanco amarillentas en la hoja entera o parte de esta. CIAT. Cali, Colombia, junio 2006.

Los resultados obtenidos demuestran que no hubo resistencia del 100% en los materiales evaluados, lo cual coincide con la no inmunidad al RHBV reportada por diversos autores (Zeigler *et al.* 1988, Cuevas-Pérez *et al.* 1992a, Reyes *et al.* 2001a).

La metodología empleada permitió alcanzar eficientemente los objetivos propuestos ya que aún la variedad más resistente, Venezuela 21, presentó incidencia de la enfermedad en condiciones de baja presión de infestación, reduciendo la posibilidad de escape y el factor de preferencia por parte del insecto hacia materiales susceptibles, lo cual ha sido reportado en infestaciones masales (Pardey *et al.* 1996). Por otra parte, el uso de 4 vectores por planta además de niveles menores de presión permitió confirmar la reacción de las variedades bajo estudio ante el virus, lo cual coincide con lo reportado en trabajos previos donde se ha

empleado la metodología al evaluar variedades distintas a las seleccionadas en este estudio (Vergel 1991).

Los resultados obtenidos del ANAVA demostraron diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre variedades y entre dosis (Cuadro 15).

Cuadro 15: ANAVA de la incidencia de variedades evaluadas ante tres niveles de presión del RHBV en condiciones de invernadero. CIAT. Cali, Colombia 2006.

F.V	gl	SC	CM	F	Pr > F
Bloque	3	0,07216456	0,02405485	0,60	0,6145
Dosis	2	3.29126538	1,64563269	41,26	<.0001*
Bloque*Dosis	6	0,32577351	0,05429559	1,36	0,2378
Variedad	11	9,60949863	0,87359078	21,90	<.0001*
Dosis*Variedad	22	0,75055875	0,03411631	0,86	0,6508

Leyenda: gl: grados de libertad, SC: suma cuadrado, CM: Cuadrado medio, F: estadístico de la prueba, Pr: Probabilidad

A través de la prueba de comparaciones múltiples de R-E-G-W realizada entre las medias de la incidencia se detectó la formación de dos grupos bien diferenciados que presentaron susceptibilidad al virus, mientras que los grupos formados para reacciones intermedias y resistentes resultaron menos claras. Sin embargo, con base en los porcentajes promedios de plantas enfermas de los testigos, se identificaron rangos para definir la reacción de las variedades al RHBV: Resistente (< 25% de plantas enfermas), Intermedio (26-45% de plantas enfermas) y Susceptible (> 46% de plantas enfermas) (Cuadro 16).

Basándose en los porcentajes promedios de plantas con síntomas de RHBV de los testigos, el grupo de cultivares con reacción resistente comprende las tres variedades ‘Fedearroz 2000’, ‘Venezuela 21’ y ‘Fundarroz PN-1’. La resistencia observada en ‘Fedearroz 2000’ y ‘Fundarroz PN-1’ coincide con diversos reportes realizados previamente, donde al someterlas ante diferentes niveles de presión y edades de infestación han presentado reacciones de resistencia ante el RHBV (Reyes *et al.* 2001a, Reyes *et al.* 2001b). Con relación a ‘Venezuela 21’, este es el primer reporte de su reacción fenotípica ante diferentes niveles del presión del virus.

El grupo de variedades susceptibles estuvo constituido por ‘Centauro’, ‘WC366’ (testigo susceptible), ‘Cimarrón’ y ‘Fonaiap 2000’. ‘Cimarrón’ es una variedad comercial que fue liberada por el FONAIAP (Fondo Nacional de Investigaciones Agropecuarias, actualmente

INIA) en 1988 (Martínez y Cuevas-Pérez 1995), y su susceptibilidad al RHBV ha sido señalada por diversos autores (Velásquez *et al.* 1998, Valera 2001). ‘Fonaiap 2000’ y ‘Centauro’ son variedades más recientes, la primera fue liberada en el 2000 y la segunda será liberada al comercio próximamente³. Sin embargo, en ambas ha sido reportada su susceptibilidad ante el RHBV (Vivas 2001, Pacheco 2006), lo cual coincide con los resultados obtenidos en estos experimentos.

Cuadro 16: Prueba de comparaciones múltiples R-E-G-W entre el promedio de la proporción arcoseno de las variedades, porcentaje promedio (tres niveles de presión) de plantas enfermas y reacción de variedades al RHBV. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Variedad	N	χ	R-E-G-W			PPPE	Reacción al RHBV	
‘Centauro’	12	1,19959	A			80,00	S	
‘WC366’ (TS)	12	1,08419	A	B		71,67	S	
‘Cimarrón’	12	1,01034	A	B		70,65	S	
‘Fonaiap 2000’	12	0,95066	B			62,87	S	
‘Palmar’	12	0,72458	C			44,58	I	
‘Araure 1’	12	0,69277	C			43,33	I	
‘Fedearroz 50’ (TI)	12	0,66049	C	D		38,33	I	
‘Araure 4’	12	0,59719	C	D	E	32,50	I	
‘Fonaiap 1’	12	0,58189	C	D	E	32,94	I	
‘Fundarroz PN-1’	12	0,50800	C	D	E	25,83	R	
‘Venezuela 21’	12	0,41638	D			E	18,33	R
‘Fedearroz 2000’ (TR)	12	0,36373				E	17,50	R

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$). Leyenda: PPPE: Porcentaje Promedio de Plantas Enfermas.

Leyenda: TS = testigo susceptible, TI = testigo intermedio, TR = testigo resistente, S = susceptible, I = Intermedio, R = Resistente.

Las variedades ‘Palmar’, ‘Araure 1’, ‘Fedearroz 50’ (testigo intermedio), ‘Araure 4’ y ‘Fonaiap 1’, presentaron una reacción intermedia. Los dos primeros y los dos últimos

³ Pérez, I. 2006. Origen de variedades venezolanas (comunicación personal).

cultivares han sido liberados por el INIA durante el periodo comprendido entre 1978 a 1993 (Martínez y Cuevas-Pérez 1995). Cuevas-Pérez *et al.* (1992a) evaluaron, ante el RHBV, 74 variedades de arroz recomendadas para siembras comerciales en América Latina, entre ellas ‘Araure 1’ y ‘Araure 4’, reportándolas como susceptible e intermedio respectivamente. Los autores señalan que la dosis del virus a la que están sometidas las variedades es un factor principal que afecta su reacción, la cual es influenciada también por otros factores como la presión de infestación y el porcentaje de virulencia de la colonia vectora al momento de la infestación. En nuestro caso, el porcentaje de virulencia de la colonia vectora al momento de la infestación fue de 66%, más baja que la empleada por los autores los cuales señalan que su colonia tenía al menos 90% de virulencia; lo cual podría ser la razón de la diferencia en la reacción.

La reacción reportada en la literatura para ‘Fonaiap 1’ y ‘Palmar’ es principalmente intermedia (Fory *et al.* 2002, Vivas 2006) lo cual coincide con los resultados obtenidos. La variedad ‘Fedearroz 50’ ha sido reportada con reacción resistente e intermedia (Reyes *et al.* 2001a, Reyes *et al.* 2001b). Sin embargo, en evaluaciones recientes se ha detectado una reducción de su nivel de resistencia siendo actualmente considerada como una variedad intermedia⁴, razón por la cual se usó en este trabajo como tal, coincidiendo los resultados con lo esperado.

El análisis de varianza apoya la hipótesis del efecto significativo de la dosis de virus ($\alpha = 0,05$) para todas las variedades, donde la incidencia fue una variable de respuesta independiente sin interacciones significativas entre variedades y dosis. Estos resultados coinciden con los obtenidos por Zeigler *et al.* (1994) quienes evaluaron el efecto de la dosis de virus usando 1, 2, 4, 8 y 12 insectos vectores por planta sobre variedades resistentes, ‘tolerantes’ a nivel comercial y susceptibles, detectando diferencias significativas entre dosis, sin presencia de interacciones entre dosis y variedades. El Cuadro 17 contiene la reacción promedio por variedad y la incidencia promedio por dosis para cada variedad, la Figura 12 esquematiza gráficamente el comportamiento de las variedades en las tres dosis.

⁴ Reyes, L. 2006. Fedearroz 50 (comunicación personal). Cali, CO, CIAT.

Cuadro 17: Incidencia observada a los 46 ddi en variedades de arroz evaluadas ante tres niveles de presión del RHBV en condiciones de invernadero. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Variedad	Reacción al VHB	1 vector/planta (% plantas enfermas)	2 vectores/planta (% plantas enfermas)	4 vectores/planta (% plantas enfermas)
‘Centauro’	S	55,00	92,50	92,50
‘WC366’	S	50,00	75,00	90,00
‘Cimarrón’	S	59,44	67,50	85,00
‘Fonaiap 2000’	S	38,61	67,50	82,50
‘Palmar’	I	27,64	53,61	52,50
‘Araure 1’	I	27,50	40,00	62,50
‘Fedearroz 50’	I	25,00	40,00	50,00
‘Fonaiap 1’	I	18,81	32,50	47,50
‘Araure 4’	I	30,00	32,50	35,00
‘Fundarroz PN-1’	R	17,50	25,00	35,00
‘Fedearroz 2000’	R	2,50	15,00	35,00
‘Venezuela 21’	R	7,50	22,50	25,00

Leyenda:  Susceptible  Intermedio  Resistente

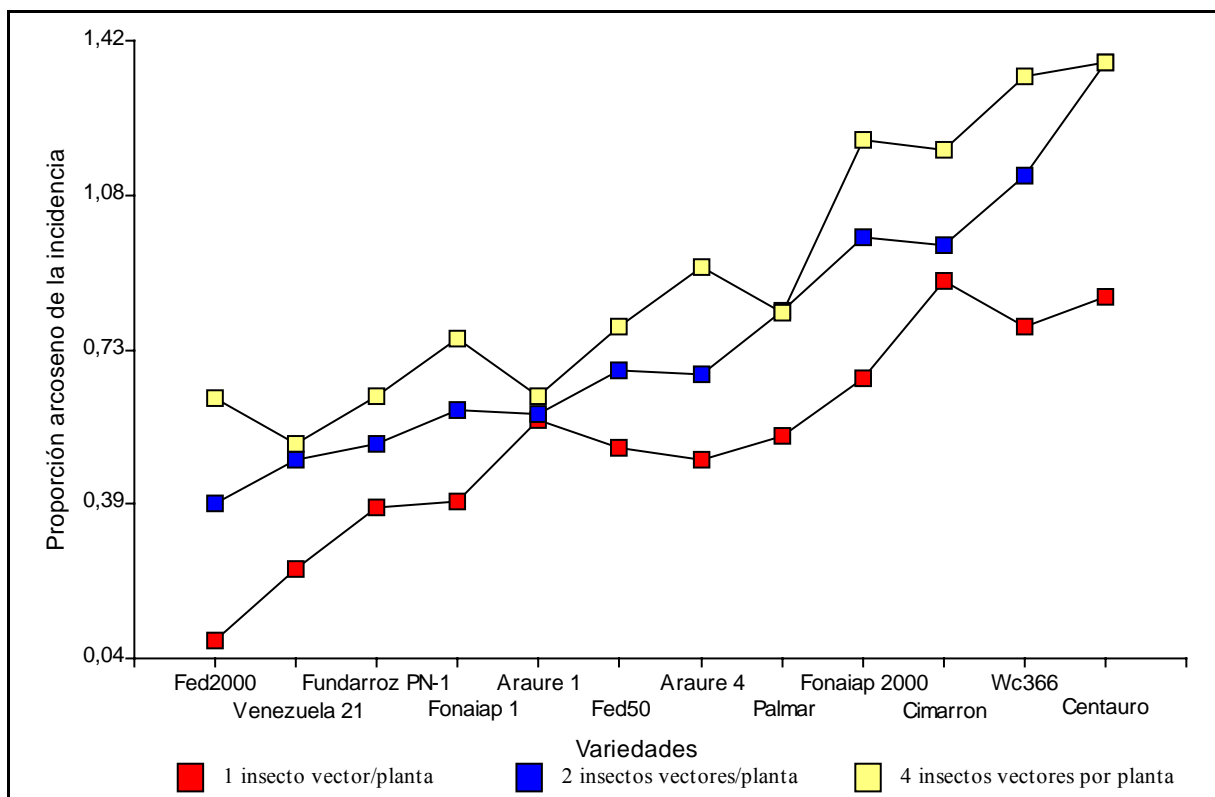


Figura 12: Reacción fenotípica de variedades de arroz venezolanas ante el RHBV en condiciones de invernadero usando diferentes niveles de dosis del virus. CIAT. Cali, Colombia, junio 2006.

La prueba de comparación múltiple de R-E-G-W entre el promedio de la incidencia de las variedades por nivel de presión del virus mostró la formación de tres grupos bien diferenciados, donde 4 vectores por planta fue la dosis que causó la incidencia más alta de la enfermedad y 1 insecto vector por planta causó la incidencia más baja (Cuadro 18).

Cuadro 18: Prueba de comparaciones múltiples R-E-G-W entre el promedio de la proporción arcoseno de la incidencia de las variedades ante tres niveles de presión del virus. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Dosis	N	X	R-E-G-W
4 insectos/planta	48	0,89781	A
2 insectos/planta	48	0,76722	B
1 insecto/planta	48	0,53242	C

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$)

Las variedades que presentaron mayor susceptibilidad con la menor presión de infestación (1 insecto vector/planta) fueron ‘Cimarrón’ y ‘Centauro’ con 59,4% y 55,0% de plantas enfermas respectivamente. Por otra parte, las variedades más resistentes ante este nivel

de infestación fueron ‘Fedearroz 2000’, ‘Venezuela 21’, ‘Fundarroz PN-1’, ‘Fonaiap 1’ y ‘Fedearroz 50’. Las variedades ‘Araure 1’, ‘Palmar’, ‘Araure 4’ y ‘Fonaiap 2000’ presentaron una incidencia intermedia comprendida entre 27 y 39%.

Diversos autores señalan que el comportamiento de las variedades usadas en una zona tiene importantes implicaciones epidemiológicas, ya que si se cultivan variedades susceptibles en zonas con altos porcentajes de vectores virulíferos (activos y potenciales) pueden servir como fuente de inóculo para que se inicie una nueva epidemia, o si se siembran cerca de los cultivos establecidos con variedades resistentes podrían presentar una alta incidencia de la enfermedad (Reyes *et al.* 1997, Calvert *et al.* 1998, Reyes *et al.* 1998a). Por otra parte, Calvert *et al.* (1998) señalan que las evaluaciones de variedades ante el virus de la hoja blanca, con diferentes niveles de presión, ayudan a desarrollar recomendaciones de variedades para aquellas zonas que están en riesgo de presentar brotes del virus.

La variedad ‘Cimarrón’ es hasta nuestros días una de las más cultivadas en Venezuela, especialmente en el estado Guárico, la cual a su vez es la región arrocera más importante en el ciclo Norte-Verano, donde se presenta la mayor incidencia del RHBV y la mayor presión de insectos portadores del virus (Alvarez 1997, Velásquez *et al.* 1998), por lo tanto, su uso continuo e intensivo podría incrementar las pérdidas en producción y los riesgos de un nuevo brote de la enfermedad.

La reacción resistente e intermedia de ‘Fonaiap 1’, ‘Fedearroz 50’, ‘Araure 1’, ‘Palmar’, ‘Araure 4’ y ‘Fonaiap 2000’ indica que estas variedades podrían ser recomendadas para zonas con bajos niveles de presión de la enfermedad, como el estado Portuguesa donde su incidencia es menor (Alvarez 1997).

En el segundo nivel de presión (2 insectos vectores/planta) las variedades ‘Fedearroz 2000’, ‘Venezuela 21’ y ‘Fundarroz PN-1’ reaccionaron como resistentes. Las variedades ‘Centauro’, ‘WC366’, ‘Cimarrón’, ‘Fonaiap 2000’ y ‘Palmar’ fueron las más susceptibles con 92,5%, 75,0%, 67,5%, 67,5% y 53,61% respectivamente. Finalmente las variedades ‘Araure 1’, ‘Araure 4’, ‘Fedearroz 50’ y ‘Fonaiap 1’ fueron las variedades con reacción intermedia.

Las variedades ‘Fonaiap 1’, ‘Araure 4’, ‘Fedearroz 50’ y ‘Araure 1’ son variedades que podrían ser usadas en zonas con un mayor nivel de presión, sin embargo, estas variedades no presentan resistencia temprana por lo que sería necesario controlar el insecto vector los primeros 25 días después de la emergencia (dde) con una aplicación de insecticida de bajo impacto ambiental (Calvert *et al.* 1998). Además, es recomendable aplicar estrategias de

manejo integrado de plagas (MIP) tales como sembrar antes del 15 de diciembre, ya que de esta forma los cultivos llegan a los meses de mayor presión insectil con una edad que les permite un poco más de resistencia contra sogata y RHBV (Reyes *et al.* 1998b, Velásquez *et al.* 1998).

En caso de que la preferencia de los agricultores sea sembrar las variedades ‘Palmar’, ‘Fonaiap 2000’, ‘Cimarrón’ y ‘Centauro’ en zonas de alta presión, su uso implicaría la aplicación de control químico durante los 50 dde, lo cual genera un aumento de los costos de producción, incrementa los riesgos de mayores pérdidas causadas por la reducción de rendimiento de plantas enfermas y causa un mayor impacto ambiental (Cuevas-Pérez *et al.* 1992a, Reyes *et al.* 1998b).

En la evaluación realizada con 4 insectos vectores/planta, únicamente la variedad ‘Venezuela 21’ fue resistente con 25% de plantas enfermas. Las variedades ‘Fedearroz 2000’, ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Araure 4’ resultaron intermedias. El resto de las variedades resultaron susceptibles ante el máximo nivel de presión evaluado.

Los resultados obtenidos indican que el grado de resistencia observado en las variedades depende del número de vectores empleados, es decir, de la presión de inóculo.

Las variedades ‘Venezuela 21’, ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Fedearroz 2000’ fueron en general las variedades evaluadas más resistentes al RHBV, por lo tanto son variedades que podrían ser usadas en zonas con alto riesgo de brotes del virus. Sin embargo, aunque existen reportes de la resistencia temprana que presentan estas variedades (Reyes *et al.* 2001a), su uso debe ir acompañado de un adecuado MIP.

Otra variedad que resultó muy interesante es ‘Araure 4’ ya que mantuvo una reacción intermedia ante los tres niveles de presión evaluados. Esta variedad fue liberada en 1984 (Martínez y Cuevas-Pérez 1995), luego de una fuerte epidemia del virus que se presentó en el país en 1981 (Zeigler *et al.* 1994). Es probable que durante su proceso de selección y mejoramiento halla estado sometida a condiciones de alta presión de la enfermedad, por lo cual se favoreció la selección de genes de resistencia.

Centauro, variedad más susceptible en el nivel de presión intermedio y máximo evaluado, es una variedad prometedora en rendimiento que próximamente será liberada al uso comercial⁵. Sin embargo, si su uso se masifica en zonas con alta presión de inóculo y su

⁵ Torres, E. 2006. Variedades de arroz más importantes en Venezuela (comunicación personal). Cali, CO, FLAR.

siembra se acompaña con un inadecuado manejo de insecticidas, podría llevar aún a mayores poblaciones del insecto y desarrollo de resistencia por parte del vector (Reyes *et al.* 1998b, Vergara 2001). Por lo tanto, sería aconsejable que no se siembre este cultivar en épocas de alta presión de inóculo y que su uso en zonas de baja presión de infestación sea acompañado de MIP y monitoreo de las poblaciones de vectores virulíferos (activos y potenciales) ya que éste es uno de los muchos factores que predisponen el desarrollo de una epidemia de RHBV (Reyes *et al.* 1998a).

Alvarez (1997) indica que el umbral económico de infestación de sogata se alcanza cuando se detectan en los monitoreos 30 adultos de sogata en pase doble de red. Por otra parte, Vivas (2006) reduce los parámetros del umbral económico recomendando la aplicación de control químico cuando se colecten 15 a 20 adultos de sogata y/o ninfas por pase sencillo de red en 12 puntos evaluados por lote.

Cuevas-Pérez *et al.* (1992a) señalan que con un buen manejo que limite el aumento de la población de sogata, la siembra de variedades intermedias y resistentes podrían conllevar a una reducción proporcional del riesgo de una epidemia de hoja blanca.

4.1.3 Evaluación de la variabilidad genética en variedades de arroz venezolanas a través de marcadores microsatélites asociados con resistencia al RHBV

Trece microsatélites, identificados previamente como *QTL* asociados a la resistencia del RHBV y su vector, se evaluaron en nueve variedades venezolanas y tres testigos. El 100% de los loci evaluados fueron polimórficos, lo cual concuerda con lo reportado por diversos autores para los microsatélites evaluados (Angulo *et al.* 2005, Romero 2005, Calvert *et al.* 2006). Los tamaños de las bandas observadas se encontraron dentro o cerca del rango que ha sido reportado por diversos autores (Romero 2005, Angulo 2005) y lo publicado en la base de datos GRAMENE (2006) (Anexo 9).

Los 13 microsatélites aplicados revelaron en total 165 alelos en las 12 variedades de arroz evaluadas (venezolanas y testigos), de los cuales 77 alelos pertenecieron al CR4, 12 al CR5, 36 al CR7, 27 al CR11 y 13 al CR12. El número de alelos por locus varió entre dos (RM234) y siete (RM11), siendo el promedio de alelos por locus de 3,77, lo cual es superior al valor reportado por Angulo *et al.* (2006) quienes obtuvieron 2,42 alelos promedios por locus al

evaluar 17 microsatélites en 12 variedades venezolanas. Aunque inferior a lo reportado por Junjian *et al.* (2002) quienes al evaluar 111 microsatélites en 10 variedades Indicas encontraron una diversidad alélica de 4,4 alelos por locus.

Aunque en el CR7 se encontró el microsatélite con mayor número de alelos (siete) en un locus, fue en el CR11 donde se encontró el mayor número de alelos en promedio por locus entre todos los cromosomas evaluados, con un promedio de 4,5 alelos por locus. Este resultado se asemeja a lo reportado por Junjian *et al.* (2002) quienes encontraron que en el CR11 de los arroces tipo Indica se presentaba el mayor nivel de variación genética.

El PIC máximo se encontró en el CR7 con un valor de 0,82 correspondiente al microsatélite RM11 seguido por el RM21 ubicado en el CR11, lo que significa que estos microsatélites fueron los que presentaron mayor poder discriminatorio. El resto de los microsatélites evaluados presentaron un PIC que varió entre 0,15 y 0,67, siendo el microsatélite RM234, ubicado en el CR7, el que presentó el poder discriminatorio más bajo (Cuadro 19). El PIC promedio observado fue de 0,58, inferior a lo reportado por Junjian *et al.* (2002) quienes encontraron un PIC promedio de 0,609.

Cuadro 19: Contenido de información polimórfica por microsatélite evaluado. CIAT. Cali, Colombia 2006.

CR	Microsatélite	PIC
4	RM261	0,60
	RM349	0,57
	RM518	0,54
	RM6770	0,56
	RM1305	0,69
	RM7200	0,49
5	RM13	0,67
7	RM11	0,82
	RM234	0,15
	RM346	0,49
11	RM21	0,79
	RM202	0,50
12	RM19	0,67

El valor de heterocigocidad observado fue de 0,115 evidenciando la poca diversidad genética existente en los materiales evaluados, lo cual coincide con lo expuesto por Angulo *et al.* (2006) quienes al evaluar la amplitud genética de 12 variedades de arroz venezolanas con 17 microsatélites obtuvieron resultados similares (0,116).

Los resultados obtenidos del análisis de coordenadas principales explican un 64% de la variabilidad molecular presente en el componente 1 y componente 2, indicando que la variedad más distante del resto del grupo es ‘WC366’ proveniente de Asia. Por otra parte, se observó la formación de otro grupo más cercano entre sí compuesto por ‘Fedearroz 50’, ‘Palmar’, ‘Centauro’, ‘Fedearroz 2000’, ‘Fundarroz PN-1’, ‘Venezuela 21’ y más distante ‘Fonaiap 2000’. Finalmente, se forma un tercer grupo constituido por ‘Cimarrón’, ‘Araure 4’, ‘Araure 1’ y ‘Fonaiap 1’ (Figura 13).

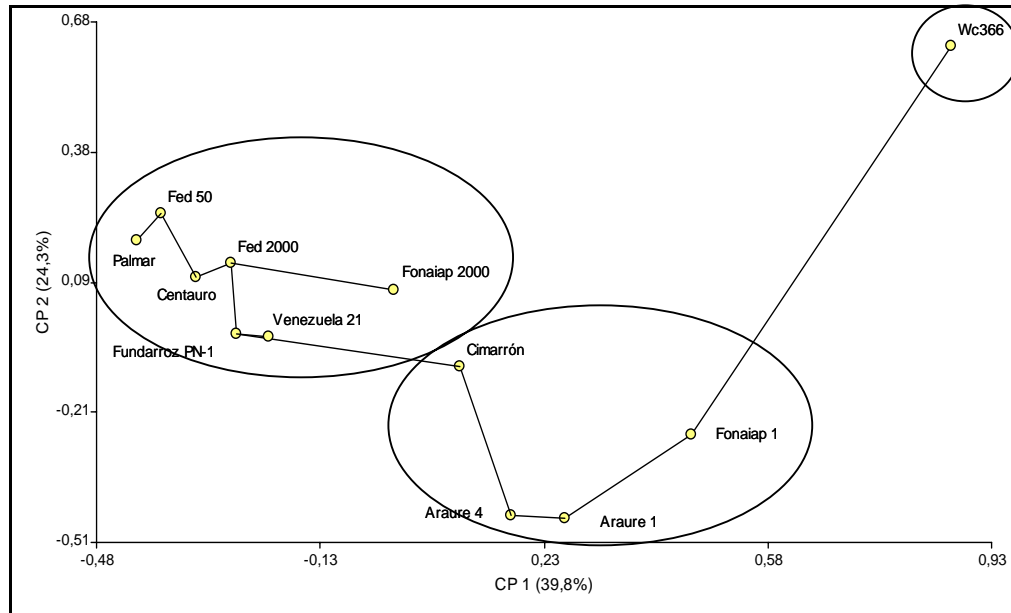


Figura 13: Plano de coordenadas principales de distancia genética entre variedades evaluadas. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Las teorías de la genética de la resistencia al RHBV, publicadas hasta nuestros días, señalan que es de tipo aditiva controlada por pocos pares de genes mayores (uno o dos) y la acción de genes menores (Zeigler 1988, Vergel 1991, Borrero *et al.* 2002, Calvert *et al.* 2006). Considerando la poca diversidad genética presente entre las variedades evaluadas, es probable que estas compartan en su composición genética genes menores cuyo aporte a la resistencia no sea significativo y que la resistencia observada en la minoría de las variedades evaluadas, bajo condiciones de invernadero, sea conferida por unos pocos genes mayores de resistencia.

El alto grado de consanguinidad de las variedades puede ser explicado porque la mayoría de los programas de mejoramiento genético, en su búsqueda de materiales con buenas características agronómicas, han utilizado un limitado grupo de progenitores en sus cruzamientos reduciendo la base genética de los cultivares (Graterol 2000). Cuevas-Pérez *et al.* (1992b) al analizar la base genética de los arroces irrigados liberados en América Latina y el Caribe, durante el período 1971 – 1989, detectaron que comparten en su genealogía 14 cultivares provenientes de siete países, los cuales contribuyeron en 69% a su constitución genética.

Por lo tanto, si los programas de mejoramiento de arroz en América Latina y el Caribe desean incrementar verdaderamente el grado de tolerancia o resistencia al RHBV en las variedades, se requerirá ampliar la base genética de las futuras variedades. Graterol (2000) señala que en Venezuela (Fundación DANAC) se están realizando esfuerzos por ampliar la base genética de las nuevas variedades, a través del desarrollo de poblaciones adaptadas a las condiciones de producción de arroz en el país - principalmente mayor resistencia a piricularia, sogata y RHBV - utilizando nuevos acervos genéticos provenientes del *Centre de coopération internationale en recherche agronomique pour le développement* (CIRAT, por sus siglas en francés) y CIAT. Sin embargo, es probable que se requiera realizar mayores esfuerzos para buscar nuevas fuentes de resistencia que aporten genes mayores diferentes y permitan obtener una mayor ganancia genética a la resistencia del virus y su vector. Recientemente, Carabalí *et al.* (2006) encontraron en la zona del Pacífico Colombiano una planta de *Oryza latifolia* altamente resistente a piricularia, RHBV y sogata, abriendo la posibilidad de utilizar nuevos genes silvestres para incrementar la resistencia a estas importantes plagas.

4.1.4 Análisis de asociación entre respuestas fenotípicas y moleculares

Se realizó un análisis de Procrustes generalizado con la finalidad de estudiar el consenso existente entre la información fenotípica obtenida en condiciones de invernadero y la genotípica. Los resultados obtenidos demuestran que existe un consenso del 70% entre ambas respuestas, lo cual es bastante significativo y explican un 80,3% de la variabilidad presente en el componente 1 (respuesta fenotípica) y componente 2 (respuesta molecular) (Figura 14).

El consenso entre la información fenotípica y molecular agrupan claramente a un extremo las variedades más susceptibles ante el RHBV: ‘Centauro’, ‘Cimarrón’, ‘WC366’ y ‘Fonaiap 2000’. Al otro extremo se agrupan las variedades más resistentes: ‘Fedearroz 2000’,

‘Venezuela 21’ y ‘Fundarroz PN-1’, quedando en el centro las variedades intermedias. Indicando existe una alta asociación entre ambas respuestas.

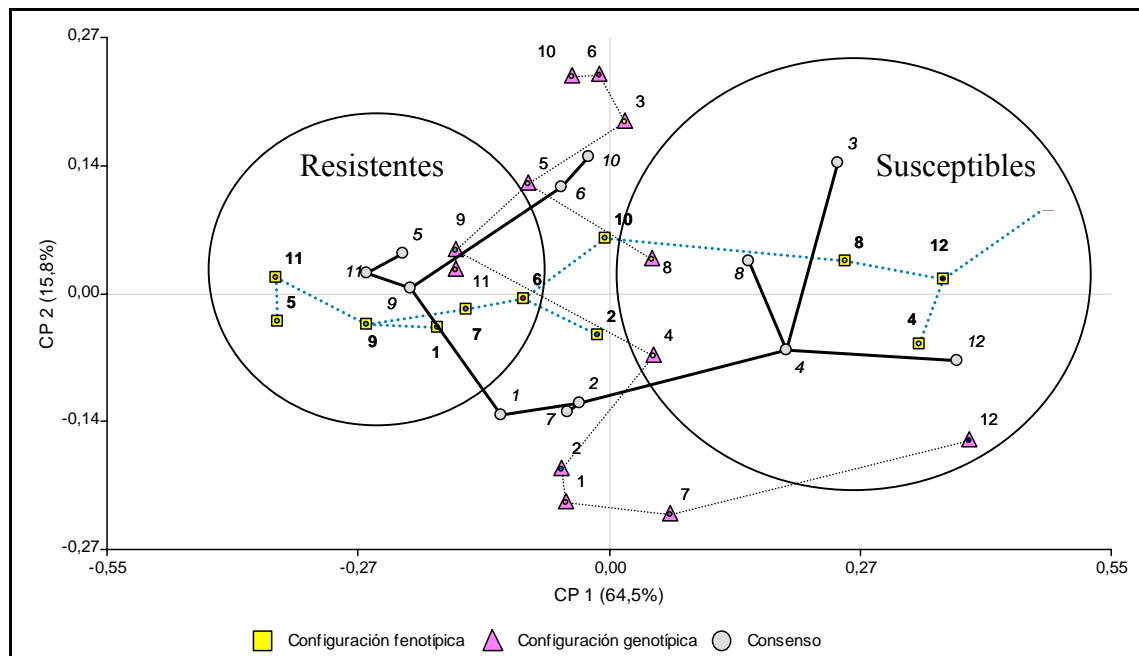


Figura 14: Prueba de procrustes generalizado para las respuestas fenotípicas y genéticas. CIAT, Cali, Colombia 2006. Leyenda: 1) ‘Araure 1’, 2) ‘Araure 4’, 3) ‘Centauro’, 4) ‘Cimarrón’, 5) ‘Fedearroz 2000’, 6) ‘Fedearroz 50’, 7) ‘Fonaiap 1’, 8) ‘Fonaiap 2000’, 9) ‘Fundarroz PN-1’, 10) ‘Palmar’, 11) ‘Venezuela 21’ y 12) WC366.

Los resultados arrojados por la prueba de χ^2 confirman lo observado en la prueba de procrustes generalizado, ya que se detectó que no hay independencia ($\alpha=0,05$) entre la reacción fenotípica de las variedades y los microsatélites RM6770, RM1305, RM7200, RM13, RM11, RM346, RM202 (Cuadro 20).

Calvert *et al.* (2006) señalan que en el análisis molecular de los microsatélites RM6770 y RM1305 del CR4 y el RM13 del CR5 se presenta una asociación significativa con la resistencia al RHBV la cual coincide con los resultados obtenidos en esta investigación. Sin embargo, también señalan una asociación con la resistencia de los microsatélites RM518 y RM261, ubicados en el CR4, lo cual no concuerda con los resultados obtenidos. Una razón que podría explicar estos resultados es que estos microsatélites se encuentren más distanciados genéticamente del gen de resistencia y por ende existan mayores probabilidades de recombinación al momento del sobrecruzamiento.

Los microsatélites RM11 y RM346, ubicados en el CR7, han sido asociados con la resistencia a Sogata (Calvert *et al.* 2006), lo cual es contrario a lo obtenido en este trabajo

donde se encontraron asociados a la resistencia del virus. Sin embargo, los mismos autores señalan que aún no está clara la importancia de la resistencia al virus frente a la resistencia del vector y que algunos genes de resistencia al vector podrían conferir alguna resistencia al virus.

Cuadro 20: Prueba de independencia entre la reacción fenotípica de las variedades y los microsatélites evaluados. CIAT. Cali, Colombia 2006.

CR	Microsatélite	X² MV-G2	p (0,05)
4	RM518	4,03	0,1336
4	RM6770	9,57	0,0084*
4	RM7200	6,77	0,0339*
4	RM1305	6,99	0,0303*
4	RM261	3,00	0,2230
4	RM349	2,39	0,3034
5	RM13	6,99	0,0303*
7	RM11	6,99	0,0303*
7	RM346	6,77	0,0339*
7	RM234	2,39	0,3034
11	RM202	10,27	0,0059*
11	RM21	4,73	0,0941
12	RM19	5,41	0,0670

Valores seguidos por () se encuentran asociados a la resistencia del RHBV ($\alpha=0,05$)*

Los marcadores RM6770, RM1305, RM13 y RM11 se encontraron asociados principalmente a la reacción de resistencia, mientras el RM7200, RM346 y RM202 se encontraron asociados principalmente a una respuesta intermedia y susceptible de las variedades evaluadas ante el RHBV. Tomando en consideración los diversos reportes que indican que la resistencia al virus está dominada por la acción de genes mayores y menores, no es recomendable descartar estos marcadores candidatos hasta que sean analizados en futuras poblaciones venezolanas.

4.2 Evaluación de la reacción fenotípica de la F₁ de los cruces ‘WC366’ x ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’ x ‘Fundarroz PN-1’ en condiciones de invernadero

Dos cruces obtenidos entre una variedad donadora de resistencia (‘Fundarroz PN-1’) y dos variedades susceptibles (‘WC366’ y ‘Centauro’), así como sus parentales y testigos, se evaluaron en condiciones de invernadero ante el RHBV utilizando una dosis de 4 insectos vectores/planta. Los resultados obtenidos en la prueba no paramétrica de Klustal Wallis indicaron diferencias significativas ($\alpha= 0,05$) entre las poblaciones evaluadas (Cuadro 21).

Cuadro 21: Prueba de Klustal Wallis de la evaluación fenotípica de cruces y parentales ante el RHBV en condiciones de invernadero. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Variable	Poblaciones	N	χ	H	P
Incidencia	‘Fundarroz PN-1’	40	45,0	16,13	<0,0001
Incidencia	‘WC366’	40	65,0		
Incidencia	‘Centauro’	40	87,5		
Incidencia	‘WC366 x Fundarroz PN-1’	50	88,0		
Incidencia	‘Centauro x Fundarroz PN-1’	50	76,0		
Incidencia	‘Fedearroz 2000’ (testigo resistente)’	20	45,0		
Incidencia	‘Bluebonnet 50’ (testigo susceptible)	20	85,0		

La F₁ del cruce ‘WC366’ x ‘Fundarroz PN-1’ desarrollo 88% de plantas con síntomas del RHBV y la F₁ del cruce ‘Centauro’ x ‘Fundarroz PN-1’ presentó un 76% de plantas enfermas (Cuadro 22), es decir, la población que presentó la mayor resistencia al RHBV fue ‘Centauro’ x ‘Fundarroz PN-1’ con 24% de plantas sin síntomas, seguido por ‘WC366’ x ‘Fundarroz PN-1’ con 12%.

Los resultados obtenidos sugieren que la resistencia de ‘Fundarroz PN-1’ es incompleta y que el gen que domina su resistencia al RHBV se encuentra en estado heterocigoto. Si el gen de resistencia se encuentra en estado heterocigoto su descendencia presentará mayor incidencia de la enfermedad que él mismo, ya que existirán hijos con la tendencia del homocigoto recesivo e hijos iguales a él (heterocigotos), los cuales tienen una reacción al RHBV mayor que los homocigotos dominantes (Vergel 1991). Por lo cual, una de las opciones para incrementar la resistencia es realizar retrocruces con el padre donador de resistencia, lo cual facilite alcanzar el estado homocigoto del gen.

Cuadro 22: Porcentaje de plantas mostrando síntomas de RHBV en cruces entre un padre resistente ('Fundarroz PN-1') y dos padres susceptibles ('WC366' y 'Centauro'). CIAT. Cali, Colombia 2006.

Poblaciones	Cruces			
	'WC366' x 'Fundarroz PN-1'		'Centauro' x 'Fundarroz PN-1'	
	Nº de plantas	% RHBV	Nº de plantas	% RHBV
Madre	40	45,0a	40	45,0a
Padre	40	65,0ab	40	87,5b
F ₁	50	88,0b	50	76,0b

Media seguida por la misma letra en cada cruce, pertenece al mismo grupo de reacción de acuerdo al método de comparaciones múltiples de Conover.

Otra explicación de los resultados podría ser la alta presión de inóculo utilizada en la evaluación, ya que diversos autores indican que cuando la resistencia es de tipo incompleta controlada por un gen dominante, como la propuesta para la línea Japónica 'Takao Iku 18', principal donador de resistencia de 'Colombia 1' y esta a su vez de 'Fundarroz PN-1', podría ser vencida bajo condiciones de alta presión de infestación. (Zeigler *et al.* 1988, Vergel 1991, Reyes *et al.* 2001a).

Finalmente, un último factor que pudo haber estado involucrado en los resultados obtenidos podría ser el bajo número de plantas evaluadas. Borrero *et al.* (2000) obtuvieron resultados similares de resistencia al evaluar el primer ciclo de poblaciones recurrentes ante el RHBV, señalando que podría ser causado por el bajo número de plantas evaluadas. Sin embargo, Zeigler *et al.* (1994) sugirieron que la expresión también puede ser afectada por la acción de genes modificadores, antibiosis parcial o variabilidad inducida por el medio ambiente.

4.3 Clonación de un gen candidato de resistencia al RHBV, ubicado en el cromosoma 4, en dos variedades venezolanas: 'Fundarroz PN-1' y 'Centauro'

Un gen candidato de resistencia con función putativa en mecanismos de *PTGS*, ubicado en el CR4, se clonó y secuenció en dos variedades venezolanas de arroz: 'Fundarroz PN-1' como resistente y 'Centauro' como susceptible. Los iniciadores diseñados para la amplificación de los seis segmentos que completan el gen de interés permitieron obtener la amplificación de todos los segmentos en las dos variedades, con la excepción del primer

segmento de ‘Centauro’ en el cual ninguna de las combinaciones permitió obtener su amplificación.

La estandarización de los iniciadores se realizó sobre todas las variedades incluidas en las secciones anteriores y no solo sobre ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Centauro’, adicionalmente también se incluyó la variedad ‘Colombia 1’. La excepción señalada anteriormente en ‘Centauro’ para el primer segmento también se presentó en las variedades ‘Araure 1’, ‘Araure 4’ ‘Cimarrón’, ‘Fonaiap 1’. ‘Fonaiap 2000’ y ‘WC366’ (Figura 15).

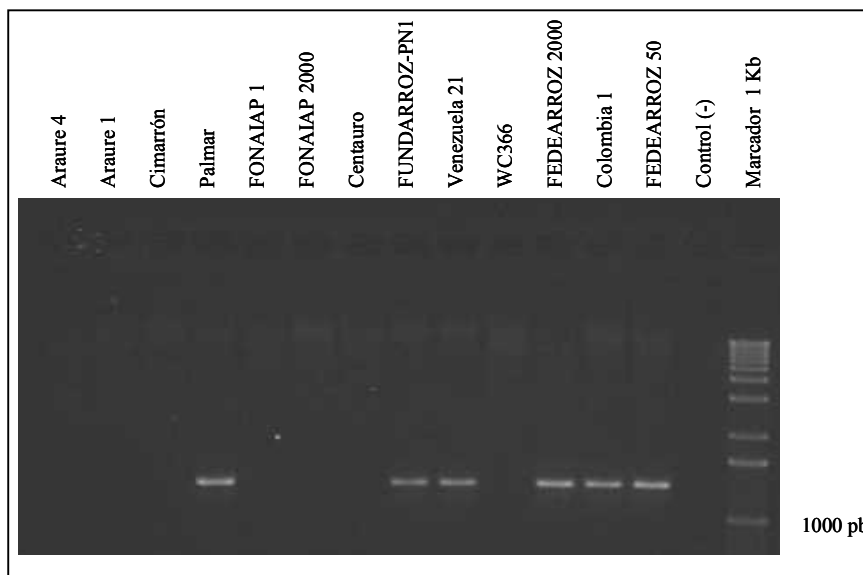


Figura 15: Productos de PCR obtenidos en el primer segmento de las variedades evaluadas. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Todos los fragmentos obtenidos tuvieron un tamaño promedio de 1400 nt para todos los segmentos en todas las variedades, con excepción del segundo segmento en ‘Centauro’, ‘Araure 1’, ‘Araure 4’ ‘Cimarrón’, ‘Fonaiap 1’. ‘Fonaiap 2000’ y ‘WC366’, donde los productos de *PCR* obtenidos presentaron un menor tamaño que los obtenidos en ‘Palmar’, ‘Fedearroz 50’, ‘Fundarroz PN-1’, ‘Venezuela 21’ y ‘Fedearroz 2000’ (Figura 16).

La amplificación del primer segmento de ‘Centauro’ se realizó a través del uso del iniciador sentido del primer segmento y el iniciador antisentido del segundo segmento. Los resultados obtenidos de la secuenciación en ‘Centauro’ permitieron obtener el 83,5% de la secuencia total del gen (exones e intrones). Esto se debe a limitaciones en cuanto al tamaño de secuencias obtenidas en el secuenciador automático, el cual solo permitió obtener secuencias máximas efectivas de 600 a 700 nt por cada extremo de los segmentos. Por lo tanto, en la

región central de todos los segmentos quedó una región sin secuenciar de aproximadamente 150 pb o menos.

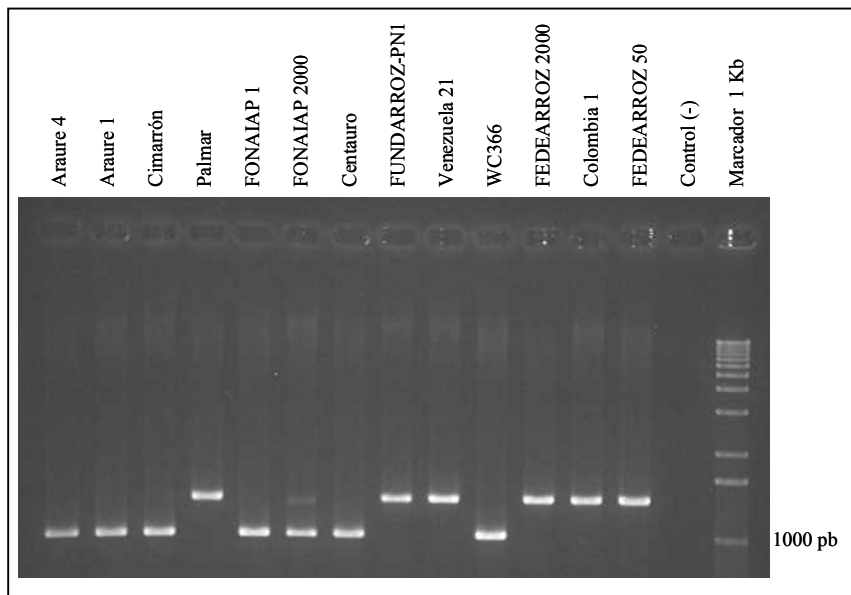


Figura 16: Productos de PCR obtenidos en el segundo segmento de las variedades evaluadas. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Posteriormente, se realizaron los *contings* de las secuencias que se solaparon entre sí y las regiones donde no se obtuvo secuencia se completaron con “n” con el objetivo de no cortar el marco abierto de lectura (Figura 17), lo cual permitió realizar los alineamientos de todo el gen (secuencia total, codificante a nivel de nucleótidos y aminoácidos) utilizando las secuencias obtenidas y las secuencias de las variedades ‘Nipponbare’ y ‘BGI-9311’, la primera de origen Japónica y la segunda de origen india publicadas en Gramine (2006) por el grupo *TIGR*.

La secuencia total obtenida de ‘Centauro’ (5809 nt/6954 nt) tuvo mayor similitud a nivel de tamaño total con la secuencia de ‘BGI-9311’ que con ‘Nipponbare’, ya que sus secuencias totales publicadas son de 6950 nt y 7300 nt, respectivamente.

Las diferencias a nivel de tamaño del gen de ‘Centauro’ y ‘BGI-9311’ se deben a que en sus secuencias existe una delección de 350 nt con respecto a ‘Nipponbare’, esta delección se encuentra ubicada entre el nucleótido 1252 y el 1602, lo cual corresponde a la sección final de nuestro primer segmento. Al analizar la secuencia de ‘Centauro’ se logró detectar que a nivel de esta delección se encontraba ubicado el iniciador antisentido del primer segmento, razón por la cual no se logró amplificar el primer segmento para esta variedad. Por otra parte, es

importante mencionar que las secuencias obtenidas permitieron detectar que en la zona de delección no se encontraban secuencias codificadoras (exones).

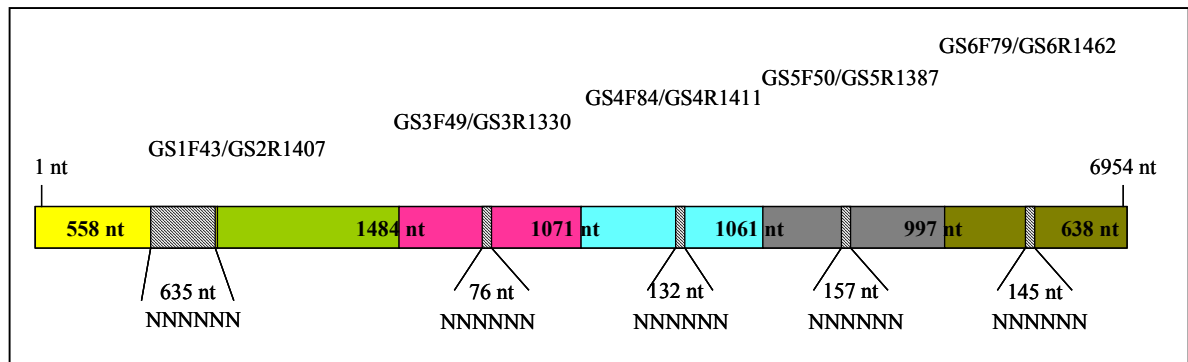


Figura 17: Esquema de iniciadores, segmentos, regiones secuenciadas y regiones sin secuencia para el gen candidato de resistencia en 'Centauro'. CIAT. Cali, Colombia 2006.

La ausencia de producto amplificado en el primer segmento también se observó en las variedades 'Araure 1', 'Araure 4' 'Cimarrón', 'Fonaiap 1'. 'Fonaiap 2000' y 'WC366'. Aunque no se obtuvieron secuencias de estas variedades, se podría sugerir que todas ellas junto con 'Centauro' son variedades que presentan un patrón asociado con arroces tipo Indica, la cual es la subespecie adaptada en zonas tropicales y por ende en Venezuela (Alvarez 1997).

La estrategia de solapamiento de iniciadores sentido y antisentido de segmentos continuos, permitió que al amplificar el segundo segmento de 'Centauro' se amplificara la zona de delección, esta es la razón por la cual los productos obtenidos de este segmento en las variedades 'Centauro', 'Araure 1', 'Araure 4' 'Cimarrón', 'Fonaiap 1'. 'Fonaiap 2000' y 'WC366' presentaran menor tamaño en comparación con las variedades 'Palmar', 'Fedearroz 50', 'Fundarroz PN-1', 'Venezuela 21', 'Fedearroz 2000' y 'Colombia 1' (Figura 18). Estos resultados ratifican que las variedades mencionadas anteriormente presentan un patrón asociado con arroces tipo Indica.

Las secuencias obtenidas de 'Fundarroz PN-1' permitieron obtener el 90,1% (6579 nt/7300 nt) de la secuencia total del gen (exones e intrones), las razones por la cual no se obtuvo la secuencia completa es la mencionada anteriormente para 'Centauro' (Figura 19). El tamaño de la secuencia indicada para 'Fundarroz PN-1' es igual al tamaño reportado para la variedad tipo Japónica 'Nipponbare' y superior a lo reportado para la variedad tipo Indica 'BGI-9311'.

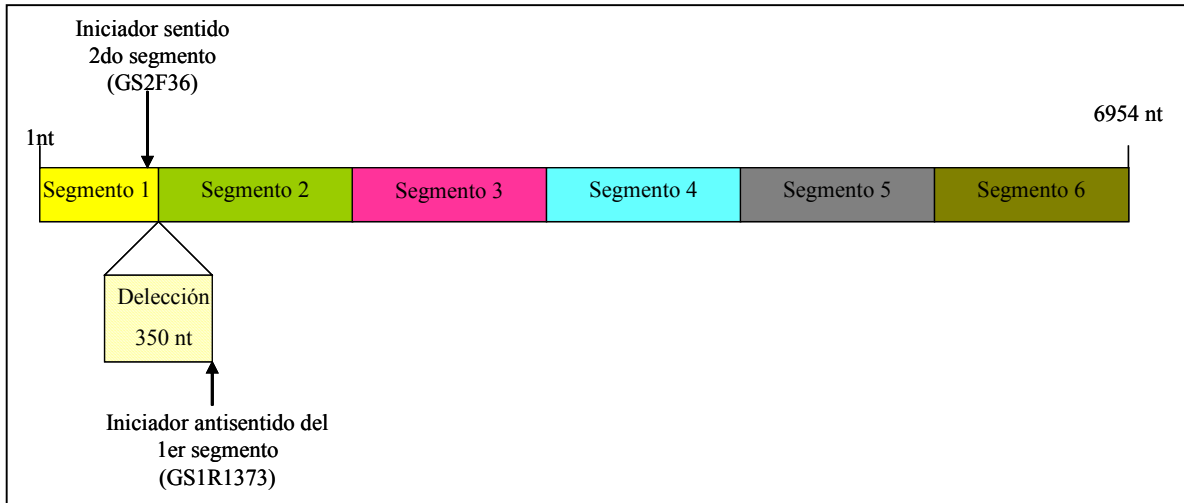


Figura 18: Ubicación de la delección identificada en 'Centauro' e iniciadores del primer y segundo segmento en 'Centauro'. CIAT. Cali, Colombia 2006.

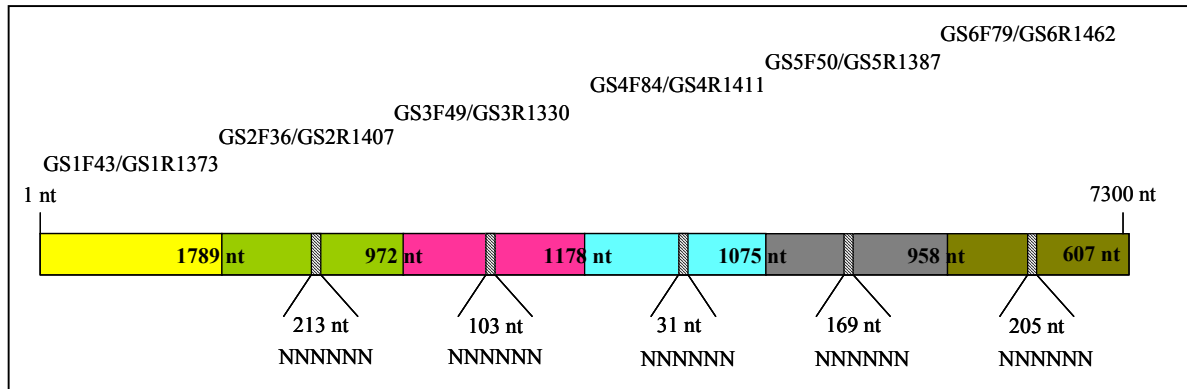


Figura 19: Esquema de iniciadores, segmentos, regiones secuenciadas y regiones sin secuencias para el gen candidato de resistencia en 'Fundarroz PN-1'. CIAT. Cali, Colombia 2006.

La ausencia de delecciones en el primer segmento de 'Fundarroz PN-1', específicamente en la zona de anillamiento del iniciador antisentido, explica el porque se logró amplificar el producto en esta variedad y no así en 'Centauro' (Figura 15). Por otra parte, esta también es la razón por lo cual esta variedad presentó un patrón de banda diferente a 'Centauro' en el segundo segmento (Figura 16). El patrón de bandas observado en 'Fundarroz PN-1' también se presentó en las variedades 'Palmar', 'Fedearroz 50', 'Venezuela 21' y 'Fedearroz 2000' y 'Colombia 1', lo cual indica que aunque no se obtuvieron secuencias en estas últimas, en conjunto presentan un patrón de bandas asociado con arroz tipo Japónica, por lo cual se podría presumir que posiblemente estas variedades presenten una introgresión en sus genomas.

Diversos autores señalan que la resistencia al RHBV presente en las variedades cultivadas en el trópico (tipo Indicas) proviene de introgresiones de líneas tipo Japónica, las cuales han sido incorporadas a través de retrocruces en los diferentes programas de mejoramiento de América Latina (Atkins y Adair 1957, Zeigler *et al.* 1988).

Por otra parte, es importante mencionar que el patrón observado en la variedad ‘Colombia 1’, donador principal de la resistencia al RHBV en ‘Fundarroz PN-1’ y ‘Fedearroz 2000’ (Reyes *et al.* 2001a), fue el mismo que el observado en las variedades ‘Palmar’, ‘Fedearroz 50’, ‘Fundarroz PN-1’, ‘Venezuela 21’ y ‘Fedearroz 2000’, las cuales han sido reportadas como intermedias y resistentes ante el virus por la literatura y en este trabajo. Por el contrario, Las variedades ‘Centauro’, ‘Araure 1’, ‘Araure 4’ ‘Cimarrón’, ‘Fonaiap 1’. ‘Fonaiap 2000’ y ‘WC366’ han sido reportadas como susceptibles e intermedias ante el RHBV.

Los resultados moleculares obtenidos de los iniciadores GS2F36 y GS2R1407 junto con los resultados fenotípicos se sometieron a una prueba χ^2 para determinar la independencia entre ambas variables, prueba que demostró una asociación estadísticamente significativa ($\alpha = 0,0037$) entre ellas. Finalmente, se realizó un nuevo análisis de procrustes generalizado entre los resultados fenotípicos y moleculares, esta vez incluyendo en la variable genotípica los resultados obtenidos con los iniciadores GS2F36 y GS2R1407. La agrupación de las variedades fue igual al primer análisis realizado (únicamente con microsatélites), con la diferencia que en este último se detectó un incremento de 1,1% en la asociación entre la variable fenotípica y molecular (72,1%) lo cual explica un 81,6% de la variabilidad presente en el componente 1 (respuesta fenotípica) y el componente 2 (respuesta molecular) (Figura 20).

Los resultados obtenidos permiten proponer el uso de los iniciadores GS2F36 y GS2R1407 dentro de programas de selección asistida de mejoramiento poblacional como marcadores tipo *SCAR*, con la finalidad de que permitan identificar la presencia del gen de interés en poblaciones segregantes.

Por el momento, es necesario continuar secuenciando para obtener la secuencia completa del gen en ‘Centauro’, ‘Fundarroz PN-1’ y nuevas variedades resistentes y susceptibles; así como evaluar poblaciones segregantes con la finalidad de obtener mayores evidencias que fortalezcan esta propuesta.

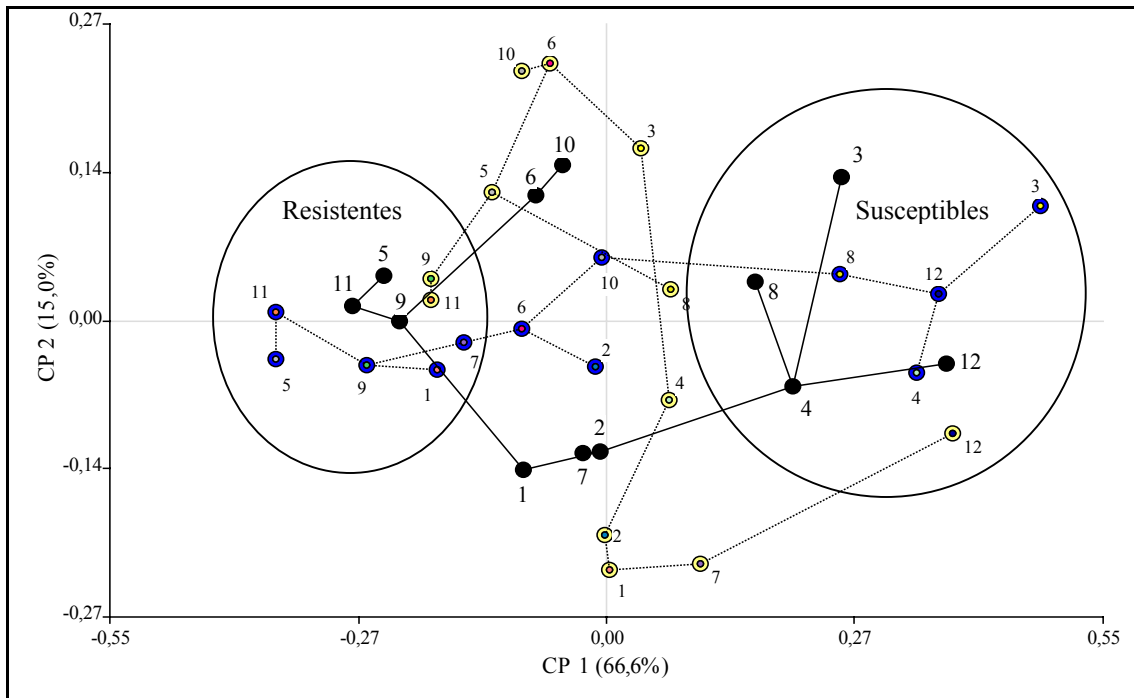


Figura 20: Prueba de procrustes generalizado para las respuestas fenotípicas y genéticas. CIAT, Cali, Colombia 2006. Leyenda: 1) 'Araure 1', 2) 'Araure 4', 3) 'Centauro', 4) 'Cimarrón', 5) 'Fedearroz 2000', 6) 'Fedearroz 50', 7) 'Fonaiap 1', 8) 'Fonaiap 2000', 9) 'Fundarroz PN-1', 10) 'Palmar', 11) 'Venezuela 21' y 12) WC366.

A nivel de alineamiento de secuencias nucleotídicas totales se obtuvo que la variedad 'Centauro' presentó mayor identidad con la secuencia de 'BGI-9311' que con 'Nipponbare', 83% y 79%, respectivamente. Si se tiene en consideración que sólo se obtuvo acceso al 83,5% de la secuencia total del gen, se puede observar que a nivel de la secuencia obtenida la identidad es alta con las dos fuentes.

Con relación a la secuencia nucleotídica total de 'Fundarroz PN-1' presentó mayor identidad con 'Nipponbare' que con 'BGI-9311' con 90% y 85% respectivamente, tomando en consideración que de 'Fundarroz PN-1' se logró secuenciar únicamente el 90,1% de la secuencia total, se puede considerar que la similitud con 'Nipponbare' es significativamente alta.

La región codificante del gen presentó un tamaño total de 2736 nt distribuido en 22 exones. En las variedades 'Centauro' y 'Fundarroz PN-1' se logró secuenciar 95% (2599 nt) y 94% (2572 nt) respectivamente. A nivel de nucleótidos la secuencia codificante de 'Centauro' presentó identidad similar con 'BGI-9311' y 'Nipponbare', siendo ligeramente mayor con la primera con 94,9% y 94,4% respectivamente. Tomando en consideración que para 'Centauro'

se logró amplificar 95% de la región codificante se puede decir que sólo presentó diferencias de 0,1% y 0,6% con ‘BGI-9311’ y ‘Nipponbare’ respectivamente.

Las diferencias detectadas de ‘Centauro’ con ‘Nipponbare’ se deben a siete cambios en la secuencia: cinco sustituciones (C→T, A→G, T→C, C→T y G→A), una delección (A en el nucleótido 1223) y una inserción (C en el nucleótido 1319). Los cambios detectados en esta secuencia con respecto a ‘BGI-9311’ se debieron únicamente a dos eventos: una delección (A en el nucleótido 1223) y una inserción (C en el nucleótido 1319).

‘Fundarroz PN-1’ presentó, a nivel de la secuencia codificante, una identidad total con la secuencia de ‘Nipponbare’ y una diferencia de 0,2% con la secuencia de ‘BGI-9311’. Las diferencias a nivel de nucleótidos con ‘BGI-9311’ se debieron a cinco sustituciones (T→C, G→A, C→T, T→C, A→G).

A nivel de la secuencia de aminoácidos se logró obtener el 94,8% de ‘Centauro’ (864/911 aminoácidos) y 93,8% de ‘Fundarroz PN-1’ (855/911 aminoácidos). Al realizar un alineamiento múltiple de las dos secuencias obtenidas y las secuencias de aminoácidos de ‘Nipponbare’ y ‘BGI-9311’ se encontró una identidad de 96,36%.

En general, ‘Centauro’ presentó una identidad total de 824 aminoácidos con ‘Fundarroz PN-1’, 2 aminoácidos de similar función y 16 distintos. Estos últimos se presentaron en los aminoácidos 408 - 410, 413 - 415, 429, 431-438 y 443 (Figura 21).

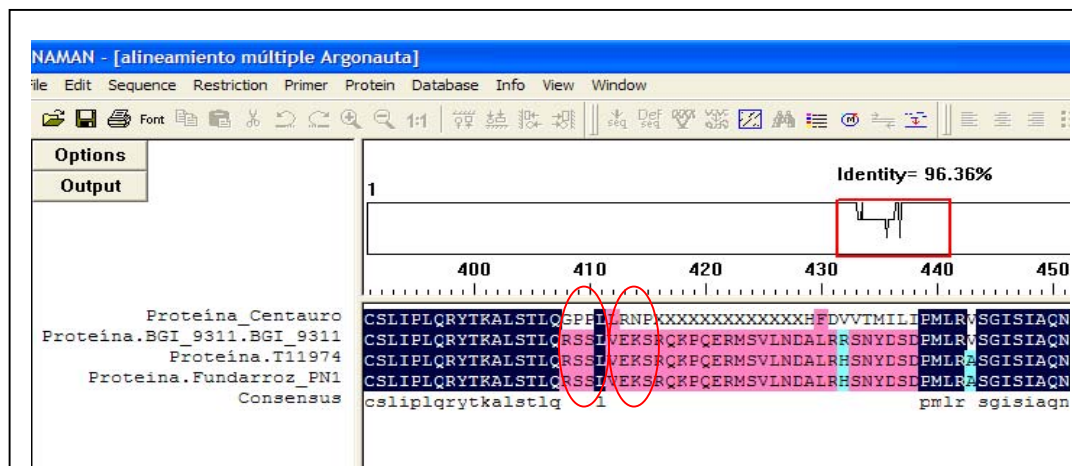


Figura 21: Alineamiento múltiple de las secuencias de aminoácidos de ‘Centauro’, ‘BGI-9311’, ‘Nipponbare’, ‘Fundarroz PN-1’ y cambios detectados en la región del dominio PAZ en ‘Centauro’. CIAT. Cali, Colombia 2006.

La secuencia publicada del gen candidato de resistencia por TIGR (Gramene 2006) señala que los dominios PAZ y Piwi de la proteína se encuentran ubicados entre los aminoácidos 280-419 y 565-872 respectivamente. Por lo tanto, seis de los 16 aminoácidos

distintos que se encontraron en la secuencia de ‘Centauro’ en comparación con la obtenida en ‘Fundarroz PN-1’ (G→R, P→S, P→S, R→E, N→K, P→S) se encuentran ubicados dentro de la región predicha para el dominio *PAZ*.

Song *et al.* (2003) indican que aunque el dominio *PAZ* - presente en la proteína Argonauta - no sea el responsable directo del clivaje del ARNm en *RISC*, contribuye a la incorporación específica y productiva de los *siRNA* en el sistema. Por tanto, los cambios detectados en la secuencia de aminoácidos a nivel del dominio *PAZ* de ‘Centauro’ podrían estar provocando una limitación en la función de la proteína Argonauta y por ende afectar la eficiencia del mecanismo de *PTGS*. Sin embargo, se deben realizar otras pruebas que permitan fortalecer esta hipótesis, para lo cual es necesario continuar secuenciando este gen a nivel de otras variedades resistentes y susceptibles, realizar pruebas de expresión temporal del gen, entre otras.

Al realizar un Blast X (McGinnis y Madden 2004) de las secuencias codificantes de ‘Centauro’ y ‘Fundarroz PN-1’ se detectó una alta homología con secuencias de proteínas putativas de arroz que presentan dominio *PAZ* y *Piwi* y con las proteínas *AGO4-2* y *AGO4-1*; también se encontró homología con *AGO1-1*, pero con menor similitud (Cuadro 23).

Cuadro 23: BlastX de ‘Centauro’ y ‘Fundarroz PN-1’. CIAT. Cali, Colombia 2006.

Secuencias homologas	‘Centauro’		‘Fundarroz PN-1’	
	Score	E-value	Score	E-value
Proteína putativa con dominio <i>PAZ</i> y <i>Piwi</i> de <i>O. sativa</i> CR4 (Os04g0151800)	1548	0,0	1563	0,0
Proteína putativa con dominio <i>PAZ</i> y <i>Piwi</i> de <i>O. sativa</i> CR4 (H0820c10.3)	1550	0,0	1559	0,0
Proteína putativa con dominio <i>PAZ</i> y <i>Piwi</i> de <i>O. sativa</i> CR1 (H0820c10.3)	1259	0,0	1268	0,0
<i>AGO4-2</i> (<i>Nicotiana benthamina</i>)	1139	0,0	1139	0,0
<i>AGO4-1</i> (<i>Nicotiana benthamina</i>)	1114	0,0	1120	0,0
Proteína con dominio <i>PAZ</i> y <i>Piwi</i> de <i>Medicago truncatula</i>	1077	0,0	1083	0,0
<i>AGO4</i> (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	1040	0,0	1045	0,0

La proteína *AGO4* es una de las cuatro proteínas de tipo *AGO* que ha sido caracterizada y cuya función ha sido asociada con la producción endógena de *siRNA* e implicada con cambios epigenéticos como la metilación del ADN a nivel nuclear. Recientemente, Jones *et al.* (2006) encontraron que las proteínas *AGO4-1* y *AGO4-2* son necesarias para la señal sistémica del silenciamiento postranscripcional, en el cual se requiere de eventos a nivel nuclear.

Los resultados obtenidos permiten inferir que la proteína defectuosa que se está generando en Centauro posiblemente esté afectando el mecanismo de resistencia con el cual está relacionada. El *PTGS* ha sido señalado con un mecanismo de degradación de secuencia específica y diversos autores indican que las plantas que desarrollan un mecanismo de *PTGS* deficiente son más susceptibles al ataque de virus (Voinnet *et al.* 1999, Vance y Vaucheret 2001). Por otra parte, Morel *et al.* (2002) trabajaron con un mutante de la proteína *ago1* demostrando que las plantas con este gen resultaron ser altamente susceptibles a la infección viral.

5 CONCLUSIONES Y RECOMENDACIONES

En la evaluación de campo se empleó una metodología que no permitió detectar diferencias estadísticamente confiables en la reacción fenotípica de las variedades evaluadas ante el RHBV debido a la alta variabilidad entre repeticiones, por lo tanto estos resultados deben ser considerados como una evaluación preliminar.

La metodología empleada en la evaluación de invernadero permitió detectar diferencias significativas en la reacción fenotípica de las variedades de arroz venezolanas evaluadas ante tres niveles de presión del RHBV, siendo en general las variedades venezolanas más resistentes ‘Venezuela 21’ y ‘Fundarroz PN-1’ y las más susceptibles ‘Cimarrón’ y ‘Centauro’. Sin embargo, el comportamiento de las variedades evaluadas bajo estas condiciones fue diferente con relación a la presión del virus. Se recomienda desarrollar nuevos ensayos con al menos dos niveles de presión del virus, que tengan mayor número de repeticiones en tiempo y espacio además de un diseño experimental en bloques que reduzca la variabilidad ambiental, de esta forma se podrían obtener resultados que corroboren las reacciones de resistencia encontradas en esta investigación.

La evaluación fenotípica de los cruces permite presumir que la resistencia presente en la variedad ‘Fundarroz PN-1’ es de tipo incompleta y que el gen que la domina se encuentra en estado heterocigoto. Se recomienda continuar evaluando las generaciones futuras de las poblaciones obtenidas con el objetivo de poder realizar un modelo de herencia del gen y realizar retrocruzas con el padre donador de resistencia o incorporar un nuevo donador.

La variedad recientemente liberada ‘Centauro’ presentó alta susceptibilidad al RHBV. Se recomienda realizar esfuerzos para incrementar su nivel de resistencia al virus a través del mejoramiento convencional y la selección asistida con los marcadores aplicados en esta investigación, de esta forma se podría evaluar en un cruce comercial la aplicabilidad de los mismos.

Los resultados moleculares obtenidos a través de los microsatélites indican que a nivel de los loci evaluados existe baja diversidad genética entre las variedades, lo cual refleja la estrecha base genética entre las variedades bajo estudio.

Los resultados obtenidos de la prueba de Procrustes generalizado permitieron detectar un consenso relativamente alto entre los resultados fenotípicos y moleculares, lo cual demuestra que los dos métodos de evaluación son adecuados para clasificar satisfactoriamente

las variedades y que ambos deben ser considerados como pruebas de apoyo en la selección de nuevas variedades en programas de mejoramiento genético.

Se comprueba la existencia de dependencia de los microsatélites RM6770, RM7200, RM1305, RM13, RM11, RM346, RM202 con la respuesta fenotípica observada, lo cual corrobora los reportes de estudios previos en donde se señalan a estos microsatélites como *QTL* asociados a resistencia al RHBV y su vector. Se recomienda su evaluación en poblaciones comerciales venezolanas.

Se detectó una delección de 350 nucleótidos a nivel de la secuencia de ‘Centauro’ con respecto a ‘Fundarroz PN-1’, la cual también está presente en la variedad tipo Indica ‘BGI-9311’ y ausente en la variedad tipo Japónica ‘Nipponbare’. Los iniciadores GS2F36 y GS2R1407 permitieron amplificar la región señalada y obtener bandas únicas claramente diferenciadas entre sí, por lo cual se propone el uso de los iniciadores GS2F36 y GS2R1407 como marcadores tipo *SCAR*. Se recomienda continuar secuenciando esta región en otras variedades que presenten ambos patrones así como su evaluación en poblaciones segregantes que permita comprobar su uso como marcadores moleculares en programas de selección asistida.

Las secuencias de aminoácidos obtenidas para ‘Centauro’ y ‘Fundarroz PN-1’ presentaron una alta homología con las proteínas putativas de arroz que exhiben dominios *PAZ-Piwi* y con las proteínas *AGO4-2* y *AGO4-1*, estas últimas han sido identificadas en trabajos recientes como responsables de la señal sistémica en el *PTGS*.

Se detectaron diferencias en las secuencia de aminoácidos a nivel del dominio *PAZ* en ‘Centauro’ con respecto a ‘Fundarroz PN-1’, lo cual podría estar afectando la función proteína codificada y por ende la disfunción del mecanismo de resistencia de *PTGS*. Se recomienda continuar la secuenciación del gen en estas variedades para completar el 100% de la secuencia, secuenciar el gen en otras variedades resistentes – susceptibles y realizar pruebas de expresión del gen.

6 BIBLIOGRAFÍA

- ACA (Asociación cultivadores de arroz). 2005. El arroz en la alimentación (en línea). Arroz (35). Consultado el 18 may. 2005. Disponible en: <http://www.aca.com.uy/alimentacion/arrozenlaalimentacion.htm>
- Ahlquist, P. 2002. RNA-dependent RNA polymerases, virus and RNA silencing. *Science* 296:1270-1273.
- Alvarez, L. 1997. Producción de arroz en los llanos occidentales de Venezuela. Barinas, VE, UNELLEZ. 246 p.
- Alvarez, R; Gamboa, C; Triana, M; Duque, M, Silva, J. 2000. Mecanismo de resistencia a *Tagosodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae) de tipo anti-iótico y no preferencia en algunas líneas de arroz (*Oryza sativa*) (en línea). VE, Investigación Agrícola (5). Consultado 5 jun. 2005. Disponible en: <http://www.redpav-fpolar.info.ve/danac/viewarticle.php?id=22&layout=html>
- Angulo, L; Arnao, E; Kouefati, E; Jayaro, Y; Faria, Y de; Ramis, C; Galindo, I. 2005. Avances del proyecto de identificación de *QTL* para rendimiento y sus componentes, en el cruce ínterespecífico entre *Oryza sativa* y *Oryza rufipogon* (en línea). II Congreso Venezolano de Mejoramiento Genético. Caracas, VE. Consultado 8 nov. 2006. Disponible en: <http://www.danac.org.ve/ocs/viewabstract.php?id=48>
- _____; Catalina, R; Perdomo, MC; Pérez, I. 2006. Estudio de la base genética de las variedades de arroz de Venezuela (en línea). IX Congreso Latinoamericano de Botánica. Santo Domingo, DO. Consultado 8 nov. 2006. Disponible en: <http://www.fundacite.arg.gov.ve/proyectos/proyecto2.shtml?codigo=2374>
- Arregoces, O; Rosero, M; González, J. 2005. Guía de estudio: Morfología de la planta de arroz (en línea). Cali, CO, CIAT. Consultado 20 oct. 2005. Disponible en: http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/pdfs/morfologia_planta_arroz.pdf
- Atkins, JG; Adair, CR. 1957. Recent discovery of hoja blanca, a new rice disease in Florida and varietal resistance test in Cuba and Venezuela. *Plant Disease Reporter* 41(11):911-915.
- Bisaro, DM. 2006. Silencing suppression by geminivirus proteins. *Virology* 334:158-168.
- Borrero, J; Chatel, M; Trina, M. 2000. Mejoramiento poblacional del arroz irrigado con énfasis en el virus de la hoja blanca. In Guimarães, EP. ed. Avance en el mejoramiento poblacional en arroz. Santo Antônio de Goiás, BR, EMBRAPA. p. 105-118.
- Bucher, E; Sijen, T; Haan, P de; Goldbach R; Prins, M. 2003. Negative-strand Tospoviruses y Tenuiviruses carry a gene for a suppressor or gene silencing at analogous genomic position. *Journal of Virology* 77(2):1329-1336.
- Calvert, L; Lozano, I; Morales, FJ. 1992. Caracterización molecular del virus de la hoja blanca del arroz (RHBV). *Fitopatología Colombiana* 16(1-2):139-147.

- _____ ; Reyes, LA; Cruz, M. 1998. Variedades recomendadas para áreas con riesgo de epidemias de virus de la hoja blanca. Cali, CO, CIAT. 5 p.
- _____ ; Reyes, LA. 1999. Manejo del complejo “sogata-virus de la hoja blanca” en el cultivo del arroz. Plegable. CO, CORPOICA – FEDEARROZ - CIAT.
- _____ ; Meneses, R; Lozano, I; Triana, M. 2001. Caracterización del complejo del virus de la hoja blanca (VHB) y *T. orizicolus*: comprendiendo la genética de la resistencia en arroz a *Tagosodes orizicolus* y al virus de la hoja blanca. Informe anual. Cali, CO, CIAT. p.110-117.
- _____ ; Lozano, I; Villarreal, N; Reyes, L; Romero, L; Lorieux, M; Garavito, A; Duque, M; Martínez, C. 2005a. Hacia la comprensión de la base genética de la resistencia al complejo del virus de la hoja blanca y *Tagosodes orizicolus* en arroz. XLV Reunión Anual APS. San José, CR.
- _____ ; Villarreal, N; Frohlich, D. 2005b. Using molecular techniques to analyse whitefly species and biotypes in Latin America. *In* Anderson, P; Morales, F. eds. Whitefly and white-borne virus in the tropics: building a knowledge base for global action. Cali, CO, CIAT. p. 251-262.
- _____ ; Lozano, I; Villarreal, N; Romero, E; Reyes, L; Lorieaux, M; Duque, MC; Garavito, A; Martínez, C. 2006. Molecular analysis of the genetics of resistance to rice hoja blanca virus and its vector *Tagosodes orizicolus*. *Sin publicar*.
- Chen, J; Li, WX; Xie, D; Peng, JR; Ding, SW. 2004. Viral virulence protein suppresses RNA silencing-mediated defense but upregulates the role of microRNA in host gene expression. *The Plant Cell* 16:1302-1313.
- Chen, X; Cho, YG; McCouch, SR. 2002. Sequence divergence of rice microsatellites in *Oryza* and other plant species. *Molecular Genetic Genomics* 268:331-343.
- Cuevas-Pérez, F; Berrío, LE; Lema, G; Rubiano, M. 1992a. Caracterización de variedades de arroz ante virus de la hoja blanca. *Turrialba* 42(2):249-257.
- _____ ; Guimarães, EP; Berrío, LE; González, DI. 1992b. Genetic base of irrigated rice in Latin América and the Caribbean: 1971 to 1989. *Crop Science* 32:1054-1059.
- Dávalos, L. 1997. Marcadores moleculares asociados a resistencia al virus de la hoja blanca en arroz, (*Oryza sativa* L). Tesis Lic. Biólogo. Cali, CO, Universidad del Valle. 106 p.
- Daviewala, A; Ramakrishna, W; Chowdari, V; Ranjerkar, PK; Gupta, VS. 2001. Potential of (GATA)n microsatellites from rice for inter-variability studies. *BMC Evolutionary Biology* 1:7.
- Espinoza, AM. 1996. Epidemiología de la enfermedad de la hoja blanca del arroz. X Congreso Nacional Agronómico. III Congreso de Fitopatología. CR.

- Falk, BW; Tsai, JH. 1998. Biology and molecular biology of virus in the *Tenuivirus*. Annual Review of Phytopathology 36:139-163.
- FAO (Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, IT). 2004a. El arroz es la vida (en línea). Roma, IT, FAO. Consultado 17 de oct. 2006. Disponible en: <http://www.fao.org/newsroom/es/focus/2004/36887/index.html>
- _____. 2004b. Rice and nutrition (en línea). Roma, IT, FAO. Consultado 17 de oct. 2006. Disponible en: <http://www.fao.org/rice2004/en/rice2.htm>
- _____. 2006. Seguimiento del mercado del arroz (en línea). Roma, IT, FAO. Consultado 17 de oct. 2006. Disponible en: <ftp://ftp.fao.org/docrep/fao/009/ag068s/ag068s00.pdf>
- FAOSTAT. 2006. PROSTAT (en línea). Roma, IT, FAO. Consultado 17 de oct. 2006. Disponible en: <http://faostat.fao.org/site/567/default.aspx>
- Ferreira, ME; Grattapaglia, D. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. Brasilia, BR, EMBRAPA. 220 p.
- Fory, L; Tabares, E; Lozano, I; Mora, A; Delgado, G; Agrono, T; Ordoñez, C; Duque, MC; Calvert, L; Lentini, Z. 2002. Arroz transgénico con resistencia al virus de la hoja blanca del arroz (RHBV) en campo (en línea). Cali, CO, CIAT. Consultado 1 nov. 2006. Disponible en: http://www.ciat.cgiar.org/riceweb/esp/pdf/poster_transgenico.pdf
- Frankham, R; Ballow, JD; Briscoe, DA. 2003. Introduction of conservation genetics. 3 ed. UK. Universidad de Cambridge. p. 45-93.
- Galvéz, GE. 1968. Transmission studies of the hoja blanca virus with highly active, virus free colonies of *Sogatodes orizycola*. Phytopathology 58:818-821.
- Garavito, AM. 2003. Asociación del silenciamiento génico post-transcripcional de genes y la reacción de hipersensibilidad, con la resistencia transgénica al virus de la hoja blanca del arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis Mag. Sc. Bogotá, CO, Universidad de los Andes. 91 p.
- Gramene. 2006. Gramene species: cereal statistic (en línea). US. Consultado 17 oct. 2006. Disponible en: <http://www.gramene.org/species/cereals.html>
- Graterol, EJ. 2000. Caracterización de poblaciones e introducción de variabilidad genética para iniciar un programa de mejoramiento poblacional del arroz en Venezuela. In Guimarães, EP. ed. Avance en el mejoramiento poblacional en arroz. Santo Antônio de Goiás, BR, EMBRAPA. p. 87-103.
- Goff, SA; Ricke, D; Lan, TH; Presting, G; Wang, R; Dunn, M; Glazebrook, J; Sessions, A; Oeller, P; Varma, H; Hadley, D; Hutchison, D; Martín, C; Katagiri, F; Lange BM; Moughamer, T; Xia, Y; Budworth, P;

- Zhong, J; Miguel, T; Paszkowski, U; Zhang, S; Colbert, M; Sun, WL; Chen, L; Cooper, B; Park, S; Wood, TC; Mao, L; Quail, P; Wing, R; Dean, R; Yu, Y; Zharkikh, A; Shen, R; Sahasragubhe, S; Thomas, A; Cannings, R; Gutin, A; Pruss, D; Reid, J; Taytigian, S; Mitchell, J; Eldredge, G; Scholl, T; Millar, RM; Bhatnagar, S; Adey, N; Rubano, T; Tusneem, N; Robinson, R; Felhaus, J; Macalma T; Oliphant, A; Briggs, S. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. japonica). *Science* 296(5565):72-92.
- Goldbach, R; Bucher, E; Prins, M. 2003. Resistance mechanism to plant virus: an overview. *Virus Research* 92:207-212.
- Hamilton, A; Voinnet, O; Chappel, L; Baulcombe, D. 2002. Two classes of short interfering RNA in RNA silencing. *The EMBO Journal* 21(17): 4671-4679.
- Hancock, JP. 2004. Plant evolution and the origin of crop species. CABI. 313 p.
- Heinrichs, EA. 2001. Manejo de los insectos plaga del arroz (en línea). Trad. J Molina-Ochoa. Nebraska, US, Universidad de Nebraska. Consultado 13 nov. 2005. Disponible en: <http://www.ipmworld.umn.edu/cancelado/Spchapters/arrozSp.htm>
- Hibino, H. 1996. Biology and epidemiology of rice virus. *Annual Review of Phytopathology* 34:249-274.
- Holton, TA. 2001. Plant genotyping by analysis of microsatellites. Lismore, AU. Southern Cross University. 13p.
- Infostat. 2004. Infostat. Versión 2004. Córdoba, AR. Universidad Nacional de Córdoba.
- IPGRI (International Plant Genetic Resource Institute). 2004. Using molecular marker technology in studies on plant genetic diversity. *Molecular Markers Learning Modules, Volumes 1-2*. Roma, IT. s/p.
- Jennings, P; Beachell, HM. 1960. Hoja blanca disease of rice found en México. *Plant Disease Reporter* 44(9):751.
- Jennings, P; Pineda, A. 1971. The effect of hoja blanca virus on its insect vector. *Phytopathology* 61(1):142-143.
- Jones, L; Keining, T; Eamens, A; Vaistij, FE. 2006. Virus-induced gene silencing of *Argonaute* genes in *Nicotiana benthamina* demonstrate that extensive systemic silencing requires *Argonaute1*-like and *Argonaute4*-like. *Plant Physiology* 141:598-606.
- León, J. 2000. Botánica de los cultivos tropicales. San José, CR, IICA. 522 p.
- Lorieux, M. 2002. Extracción de ADN de arroz en placas 96 x 1,2 ml. *In* Protocolos laboratorio de genotipificación de arroz. CIAT. p. 1.

- Ling, KC. 1972. Rice virus disease. PH, IRRI. p.69-78.
- Lingel, A; Izaurrealde, E. 2004. RNAi: finding the elusive endonuclease. RNA 10:1675-1679.
- Malaguti, G. 1956a. La “hoja blanca”, extraña enfermedad del arroz en Venezuela. *Agronomía Tropical* 6(3):141-145.
- _____, Díaz, H; Angeles, N. 1956b. La “hoja blanca” del arroz. *Agronomía Tropical* 6(4):157-163.
- Mariani, R; Remes, AM de. 2000. *Tagosodes orizicolus* (Muir, 1926), vector del “virus de la hoja blanca del arroz” (HBV) en la República Argentina (Homoptera-Delphacidae). *Revista de la Facultad de Agronomía, La Plata* 104(2):151-156.
- Martínez, C; Cuevas-Pérez, F. 1995. Registro de cruzamientos de arroz: P1 a P5617 y CT5618 a CT13800. Cali, CO, CIAT. 313 p.
- McGinnis, S; Madden, TL. 2004. Blast: at the core of a powerful and diverse set of sequence analysis tool. *Nucleic Acid Research* 32:W20-W25.
- Meneses; CR; Gutiérrez, YA; García, RA; Antigua, PG; Gómez, SJ; Correa, VF; Calvert, L. 2001. Guía para el trabajo de campo en el manejo integrado de plagas del arroz. Colombia, FLAR. 71 p.
- Miranda, J de. Hernández, M; Hull, R; Espinoza, AM. 1994. Sequence análisis of rice hoja blanca virus RNA 3. *Journal of Virology* 15:2127-2132.
- _____; Ramírez, BC; Muños, M; Lozano, I; Wu, R; Haenni, AL; Espinoza, AM. 1997. Comparison of Colombian and Costa Rica strains of rice hoja blanca Tenuivirus. *Virus Genes* 15(3):191-193.
- Morales, JF; Niessen, AI. 1983. Association of spiral filamentous viruslike particles with rice hoja blanca. *Phytopathology* 73(7):971-974.
- _____; Arrollave, J; Velasco, AC; Castaño, M. 1995. Caracterización parcial del virus del “entorchamiento” o “necrosis rayada” del arroz en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 19(1):48-54.
- _____. 1996. La hoja blanca del arroz. *Arrocero Moderno: con el mejor entorno ambiental*. Julio:48-52.
- _____; Ward E; Castaño M; Arroyave JA; Lozano I; Adams M. 1999. Emergence and partial characterization of Rice stripe necrosis virus and its fungus vector in South America. *European Journal of Plant Pathology* 105(7):643-650.
- Morel, J-B; Godon, C; Mourrain, P; Béclin, C; Boutet, S; Feuerbach, F; Proux, F; Vaucheret, H. 2002. Fertile hypomorphic *Argonaute* (*ago1*) mutants impaired in post-transcriptional gene silencing and virus resistance. *The Plant Cell* 14:629-639.

- Napoli, C; Lemieux, C; Jorgensen, R. 1990. Introduction of a Chimeric Chalcone Synthase gene into petunia result in reversible co-suppression of homologous genes in trans. *The Plant Cell* 2:279-289.
- Nguyen, M; Ramírez, BC; Goldbach, R; Haenni, AL. 1997. Characterization of the *in vitro* activity of de RNA-dependent RNA polymerase associated with the ribonucleoproteins of Rice Hoja Blanca Tenuivirus. *Journal of Virology* 71(4):2621-2627.
- Pacheco, H. 2006. Centauro: nueva alternativa arrocera (en línea). VE, FUNDARROZ. Consultado 3 nov. 2006. Disponible en:<http://www.fundarroz.org.ve/noticia014.php>.
- Pardey, C; Cuevas-Pérez, F; Baena, D; Martínez, C. 1996. Caracterización de la resistencia al daño mecánico de *Tagosodes orizicolus* (Muir) (Homoptera: Delphacidae) en doce cultivares de arroz (*Oryza sativa*). *Revista Colombiana de Entomología* 22(1):37-43.
- Quirós, EI. 2003. Evaluación morfológica y molecular de líneas avanzadas de mejoramiento genético de arroz (*Oryza sativa*) del instituto de investigación agropecuaria de panamá, (IDIAP). Tesis Mag. Sc. Turrialba, CR, CATIE. 136 p.
- Ramis, C; Carvalho, AC de; Díaz, A; Gamboa, CE. 2003. Marcadores moleculares como herramientas para el mejoramiento poblacional en arroz. In Guimarães, E. ed. Mejoramiento poblacional: una alternativa para explotar los recursos genéticos del arroz en América Latina. Cali, CO, CIAT. p. 77-98.
- Reyes, LA; Yencho, C; Velasco, AC; Calvert, L. 1997. Análisis de poblaciones de *Tagosodes orizicolus* (Muir) vector del virus de la hoja blanca en zonas arroceras de Colombia. *Revista Colombiana de Entomología* 23(3-4):165-169.
- _____ ; Yencho, C; Velasco, A.C; Calvert, L. 1998a. Comparación del porcentaje de vectores virulíferos (*Tagosodes orizicolus*) (Muir) [Homóptera: Delphacidae] en el campo con el porcentaje de insectos con capacidad genética de transmitir el virus de la hoja blanca en zonas arroceras de Colombia. Co, CIAT. 8 p.
- _____ ; Calvert, L; Velasco, AC. 1998b. Monitoreo de *Tagosodes orizicolus* en zonas arroceras de Colombia. CO, CIAT. 4 p.
- _____ ; Cruz, M; Triana, M; Holguín, J; Meneses, R; Calvert, L. 2001a. Expresión de la resistencia al virus de la hoja blanca en plántulas de arroz (*Oryza sativa*). Seminario Técnico Sobre Manejo Integrado de Insectos Fitófagos en el Cultivo de Arroz. CO, FEDEARROZ. p. 41-47.
- _____ ; Meneses, R; Holguin, J, Triana, M; Calvert, L. 2001b. Frente al virus de la hoja blanca Fedearroz 2000, la más resistente. *Arroz* 50(431):4-6.

- Rico, G. 1974. Estado de la industria arrocera en Venezuela. *In* Trabajo presentados en la VI reunión anual del programa nacional de arroz. Memoria. Villavicencio, CO. p.60-63.
- Ribeiro, FX; Parlevliet, JE; Zambolim, L. 2001. Concepts in plant disease resistance. *Fitopatologia Brasileira* 26(3):577-589.
- Romero, LE. 2005. Aproximación hacia la identificación de marcadores moleculares microsátélites en arroz (*Oryza sativa* L.) (Gramíneae) para la resistencia a *Tagosodes orizicolus* M. (Homoptera-Delphacidae). Tesis Lic. Biología. Cali, CO, Universidad del Valle. 99 p.
- Stage, C. 2006. Interacción planta-virus durante el proceso infeccioso. *Ciencia e Investigación Agraria* 33(1):3-21.
- Song, F; Goodman, RM. 2001. Molecular biology of disease in rice. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 59:1-11.
- Song, J-J; Liu, J; Tolia, NH; Schneiderman, J; Smith, SK; Martienssen, RA; Hannon, GJ; Leemor, J-T. 2003. The crystal structure of the Argonaute2 PAZ domain reveals an RNA binding motif in RNAi effector complexes. *Nature Structure Biology* 10(12):1026-1032.
- Song, JJ; Smith, SK; Hannon, GJ; Leemor, JT. 2004. Crystal structure of Argonaute and its implication for RISC slicer activity. *Science* 305:1434-1437.
- Stage, C. 2006. Interacción planta-virus durante el proceso infeccioso. *Ciencia e Investigación Agraria* 33(1):3-21.
- Stuber, ChW; Polacco, M; Lynn, M. 1999. Synergy of empirical breeding, marker-assisted selection and genomics to increase crop yield potential. *Crop Science* 39:1571-1583.
- Triana, M; Cruz, M; Meneses, R; Calvert L. 2003. Metodologías para la cría y evaluación de *Tagosodes orizicolus* (Muir): manual técnico. Cali, CO. CIAT-FLAR. 28 p.
- Torrealba, GT; Delgado, N; Alvarez, R; Moreno, O; Castillo, W; Reyes, E; Torres, O; Navas, M; Salazar, M; Acevedo, M; Abreu, P; Rodríguez, M; Sánchez, M; Urdaneta, M; Ramos, A. 2005. Variedades de arroz en Venezuela desde 1969 al 2005 (en línea). Caracas, VE, II Congreso venezolano de mejoramiento genético y biotecnología agrícola. Consultado 5 oct. 2006. Disponible en: <http://www.danac.org.ve/ocs/viewpaper.php?id=57&print=1>
- Torres, D; Capote, D. 2004. Agroquímicos un problema ambiental: uso del análisis químico como herramienta para el monitoreo ambiental (en línea). *Ecosistemas: revista científica y técnica de ecología y medio ambiente* (3). Consultado 11 nov. 2005. Disponible en: <http://www.revistaecosistemas.net/pdfs/50.pdf>

- Valera, WJ. 2001. Variedades de semillas de arroz (en línea). VE, APROSCELLO. Consultado el 30 ene. 2006. Disponible en: www.aproscello.org.ve.
- Vance, V; Vaucheret, H. 2001. RNA silencing in plants: defense and counterdefense. *Science* 292(22):2277-2280.
- Velásquez, A; Funes, E; López, L. 1998. Evaluación de la incidencia del virus de la hoja blanca en arroz (en línea). Calabozo, VE, FUNDARROZ. Consultado el 19 nov. 2005. Disponible en: <http://www.fundarroz.org.ve/boletin/11-98/page4.html>.
- Vergara, RA. 2001. Posibilidades y retos del manejo ecológico de insectos fitopatógenos en agroecosistemas: caso arrocero. Seminario Técnico Sobre Manejo Integrado de Insectos Fitófagos en el Cultivo de Arroz. FEDEARROZ. Co. p. 8-20.
- Vergel, DM. 1991. Caracterización de la resistencia genética al virus de la hoja blanca del arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis Ing. Agr. Montería, CO, Universidad de Córdoba. 134 p.
- Vivas, L; Clavijo, S; González, H. 2001. Distribución temporal y espacial en poblaciones de sogata (*Tagosodes orizicolus* [Muir 1926] Homoptera: Delphacidae) y número óptimo de muestras para su estimación en el cultivo de arroz, en Calabozo, estado Guárico, Venezuela (en línea). VE, Investigación Agrícola (6). Consultado 20 jun. 2005. Disponible en: <http://www.redpav-fpolar.info.ve/danac/viewarticle.php?id=25&layout=html>
- _____; Lugo, L; Acevedo, M; Clavijo, S. 2002. Determinación de la preferencia de *Tagosodes orizicolus* (MUIR) 1926 (Homoptera: Delphacidae) sobre variedades de arroz en Calabozo, estado Guárico, Venezuela (en línea). VE, Investigación Agrícola (7). Consultado: 19 may. 2005. Disponible en: <http://www.redpav-fpolar.info.ve/danac/viewarticle.php?id=33>.
- _____. 2006. Plagas agrícolas de Venezuela: artrópodos y vertebrados: Saltahojas del arroz *Tagosodes orizicolus* Muir 1926 (en línea). VE, Sociedad Venezolana de Entomología. Consultado 3 nov. 2006. Disponible en: <http://www.plagas-agricolas.info.ve/fichas/ficha.php?hospedero=58&plaga=55>
- Voinnet, O; Pinto, YM; Balbucombe, DC. 1999. Suppression of gene silencing: A general strategy used by diverse DNA and RNA virus of plant. *Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America* 96(24): 14147-14152.
- Volpe, TA; Kidner, C; Hall, IM; Teng, G; Grewal, SI; Martienssen, RA. 2002. Regulation of heterochromatic silencing and histone H3 Lysine- methylation by RNAi. *Science* 297:1833-1837.
- Watanabe, Y. 1997. Genomic constitution of genus *Oryza*. In: Matsuo, T; Futsuhara, Y; Kikuchi, F; Yamaguchi, H. eds. *Science of the rice plant: genetics*. Tokio, JP, FAPCR. p. 29-39.

- Waterhouse, PM; Graham, MW; Wang, MB. 1998. Virus resistance and gene silencing in plants can be induced by simultaneous expression of sense and antisense RNA. *Proceeding of the National Academy of Science of the United State of America* 95:13959-13964.
- Wisser, RJ; Sun, Q; Hulbert, SH; Kresovich, S; Nelson, RJ. 2005. Identification and characterization of regions of the rice genome associated with broad-spectrum, quantitative disease resistance. *Genetics* 169:2277-2293.
- Yu, J; Wang, J; Hu, S. 2002. A draft sequence of the rice genome (*Oryza sativa* L. ssp. *Indica*). *The Rice Genome* 296:79-91.
- _____ ; Wang, J; Lin, W; Li, S; Li, H; Zhou, J; Ni, P; Dong, W; Hu, S; Zeng, C; Zhang, J; Zhang, Y; Li, R; Xu, Z; Li, Sh; Li, X; Zheng, H; Cong, L; Lin, L; Yin, J; Geng, J; Li, G; Shi, J; Liu, J; Lv, H; Li, J; Wang, J; Deng, Y; Ran, L; Shi, X; Wang, X; Wu, Q; Li, C; Ren, X; Wang, J; Wang, X; Li, D; Liu, D; Zhang, X; Ji, Z; Zhao, W; Sun, Y; Zhang, Z; Bao, J; Han, Y; Dong, L; Ji, J; Chen, P; Wu, S; Liu, J; Xiao, Y; Bu, D; Tan, J; Yang, L; Ye, C; Zhang, J; Xu, J; Zhou, Y; Yu, Y; Zhang, B; Zhuang, S; Wei, H; Liu, B; Lei, M; Yu, H; Li, Y; Xu, H; Wei, S; He, X; Fang, L; Zhang, Z; Zhang, Y; Huang, X; Su, Z; Tong, W; Li, J; Tong, Z; Li, S; Ye, J; Wang, L; Fang, L; Lei, T; Chen, C; Chen, H; Xu, Z; Li, H; Huang, H; Zhang, F; Xu, H; Li, N; Zhao, C; Li, S; Dong, L; Huang, Y; Li, L; Xi, Y; Qi, Q; Li, W; Zhang, B; Hu, W; Zhang, Y; Tian, X; Jiao, Y; Liang, X; Gao, L; Zheng, W; Hao, B; Liu, S; Wang, W; Yuan, L; Cao, M; McDermott, J; Samudrala, R; Wang, J; Wong, K; Yang, H. 2005. The genome of *Oriza sativa*: A history of duplications. *Plos Biology* 3(2):0266-0281
- Yuan, Q; Liang, F; Hsiao, J; Zismann, V; Benito, MI; Quackenbush, J; Wing, R; Buell, R. 2000. Anchoring of rice BAC clones to the rice genetic map *in silico*. *Nucleic Acids Research* 28(18):3636-3641.
- Zambrano, AY; Demey, JR; Fuchs, M; González, V; Rea, R; Sousa, O de. 2003. Selection of sugarcane plants resistant to SCMV. *Plant Science* 165:221-225.
- Zavaleta-Mejía, E. 1999. Alternativas de manejo de las enfermedades de las plantas. *Terra* 17(3):201-207.
- Zeigler, RS; Rubiano, M; Pineda, A. 1988. A field screening method to evaluate rice breeding lines for resistance to hoja blanca virus. *Annals of Applied Biology* 112:151-158.
- _____ ; Morales, FJ. 1990. Genetic determination of replication of rice hoja blanca virus within its planthopper vector, *Sogatodes orizicola*. *Phytopathology* 80(6):559-566.
- _____ ; Pantoja, A; Duque, MC; Weber, W. 1994. Characteristics of resistance in rice to rice hoja blanca virus (RHBV) and its vector *Tagosodes orizicolus* (Muir). *Annals of Applied Biology* 124:429-440.

Anexo 1: Metodología empleada para la obtención de cruzamientos

Siembra de progenitores. Para la siembra de los progenitores se tomó en cuenta el periodo de floración de cada una de los materiales usados en los cruces, con la finalidad de que coincidieran las floraciones de las plantas receptoras y donadoras de polen. Para ello, se realizaron tres siembras sucesivas con intervalos de 15 días. En cada siembra se sembraron 5 gramos de semilla en dos surcos y se mantuvieron en casa de malla. Treinta dds se transplantaron, la primera siembra se transplanto en materos de 30 cm de diámetro y se conservo en casa de malla, las dos segundas se llevaron a campo.

Preparación de las panículas madres. Teniendo en cuenta el tiempo apropiado para efectuar los cruces, se seleccionaron las panículas madres las cuales habían emergido entre cinco y diez centímetro de la hoja bandera. Las plantas que contenían las panículas seleccionadas, se sacaron, se transplantaron en materos de 30 cm de diámetro y se llevaron al área de emasculación donde se marcaron las panículas que serían emasculadas. La selección de las panículas se realizó en horas de la mañana para evitar la deshidratación del material y aprovechar la escasa actividad de la florcilla.

Emasculación. La remoción de las anteras en los progenitores femeninos se realizó en horas de la tarde después de que ocurriera la antesis o liberación natural del polen (1:30 pm aproximadamente).

Con unas tijeras pequeñas se eliminaron las espiguillas de la parte inferior (inmaduras) y las de la parte superior que ya estuvieran polinizadas (anteras descubiertas). Luego con la ayuda de la tijera se procedió a cortar la parte apical de cada florcilla, a nivel de la mitad o las tres cuartas partes desde la base, procurando que el sitio de corte estuviera por encima de las anteras.

Con la ayuda de una pipeta Pasteur conectada a través de una manguera con una bomba de vacío, accionada por un motor de cuatro caballos de fuerza, se extrajeron las anteras de cada florcilla. Luego que todas las florcillas estuvieron emasculadas se cubrió la panícula con un glasin sobre la cual se escribió el día de emasculación.

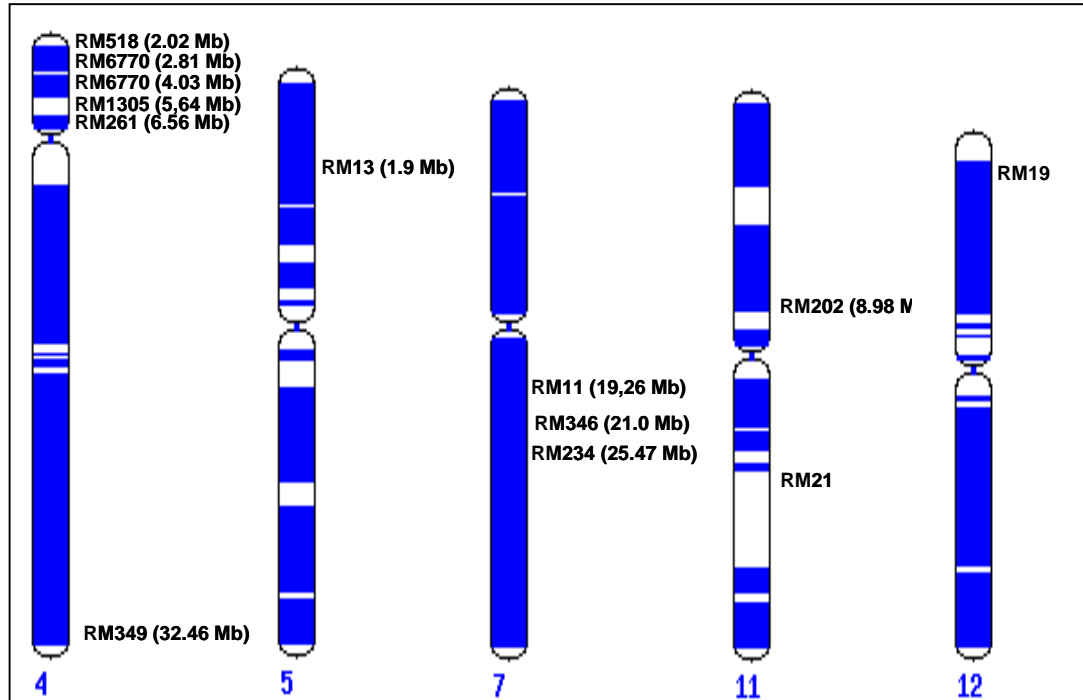
Polinización. Al día siguiente después de la emasculación se revisaron cuidadosamente cada una de las florcillas para asegurarse que no quedaran florcillas sin emasculadas. A la hora de antesis, las panículas emasculadas se acercaron hasta los materos en donde se encontraban las plantas de 'Fundarroz PN-1' elegidas como padres. Se colocaron las panículas emasculadas muy cercanas y un poco por debajo a las panículas padres y se agitaron suavemente para permitir la caída del polen en las florcillas emasculadas.

Inmediatamente, se volvieron a cubrir las panículas madres con los glasines, escribiendo sobre estos el nombre del padre y la fecha de polinización.

Desarrollo de la F₁. Durante la maduración de las semillas se realizo un continuo seguimiento de las panículas polinizadas con el objetivo de asegurarse el buen estado de los embriones y el éxito de las polinizaciones.

Cosecha de la F₁. Treinta días después de la polinización, las panículas se tornaron color pajiza alcanzando su madurez por lo que se procedió a coleccionar las semillas, teniendo cuidado de no mezclar las semillas de cada cruce. Estas panículas fueron desgranadas removiendo las glumas restantes, se empacaron en sobre pequeños previamente identificados con los nombres de los progenitores, la cantidad de semilla obtenida y la fecha de cosecha.

Anexo 2: Distribución y ubicación de los microsatélites evaluados en las variedades de arroz venezolanas y testigos



Anexo 3: Soluciones empleadas en la extracción de ADN

Tampón de extracción

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	1000 ml
agua destilada		Aforar	Aforar
Tris-HCl pH 8	1,0 M	0,1 M (100 mM)	100 ml
NaCl	4,0 M	1,4 M	378,96 ml
EDTA pH 8	0,5 M	0,02 M	40 ml
PEG 8000		1%	10 g
MATAB		2%	20 g
BS		0,5%	5 g

MATAB = Mixed Alkyltrimethylammonium bromide (SIGMA M7635, 500 g)

BS= Bisulfito de sodio

Nota: no guardar a la luz, no autoclavar, calendar a 74° C antes de agregar el MATAB y el BS.

Solución Cloroformo: alcohol isoamyl (24:1)

Reactivo	1000 ml
Cloroformo	960 ml
Alcohol isoamyl	40 ml

Tampón Tris-EDTA pH 8.0

Reactivo	Concentración stock	Concentración final	1000 ml
Tris-HCl pH 8	1,0 M	100 mM	100 ml
EDTA pH 8	0,5 M	10 mM	20 ml

Tris-HCl 1M pH 8.0

Diluir 12,11 g de Trizma Base en 80 ml de agua con DEPC, ajustar pH con HCl concentrado y ajustar volumen a 100 ml.

Tratamiento de agua con DEPC

Disolver 2 ml de DEPC en 18 ml de Etanol, llevar a 1 l de volumen final y autoclavar.

EDTA 0,5 M pH 8.0

Reactivo	1000 ml
EDTA	186,1 g
NaOH	18,0 g
Agua bidestilada	Aforar

Ajustar pH con NaOH y autoclavar

Anexo 4: Soluciones empleadas en la preparación de geles de poliacrilamida

Mezcla de Bind silane

Reactivo	1515 μ l
Etanol 100%	1500 μ l
Acido acético glacial	7,5 μ l
Bind silane	7,5 μ l

Mezcla de Poliacrilamida 6%

Reactivo	100,6 ml
Poliacrilamida 6% 5M Urea	100 ml
Persulfato de Amonio 10%	500 μ l
Temed	100 μ l

Solución de poliacrilamida 6% 5M Urea

Reactivo	1000 ml
Poliacrilamida Stock 30%	200,0 ml
TBE 10X	50 ml
Úrea	300,3 ml
Agua bidestilada	Aforar

Aforar y filtrar y almacenar a 4° C en un frasco ambar.

Poliacrilamida Stock 30%

Reactivo	1000 ml
Archilamida (95%)	285 g
Bisacrilamida (5%)	15 g
Agua bidestilada	Aforar

Persulfato de amonio 10%

Reactivo	10 ml
Persulfato de amonio	1 g
Agua bidestilada	Aforar

TBE 10X

Reactivo	1000 ml
Trizma base	108 g
Ácido Bórico	55 g
EDTA 0,5 M pH 8.0	40 ml

	Agua bidestilada	Aforar
Tampón de carga 2X		
Reactivo	50,05 ml	
Formamida desionizada	48 ml	
EDTA	2 ml	
Azul de bromofenol	0,025	
Xilencianol FF	0,025	

Formamida desionizada

Reactivo	50 ml
Formamida	50 ml
Amberlita	0,5 g

Ajustar a pH7 y agitar en la placa de agitación magnética dentro de la cámara de extracción de gases durante 30 min. Filtrar y almacenar a -20° C hasta tres meses.

Anexo 5: Soluciones empleadas en la tinción de plata

Solución fijadora

Reactivo	3500 ml
Ácido acético glacial	350 ml
Agua bidestilada	Aforar

Solución de tinción

Reactivo	3500 ml
Nitrato de plata	3,5 g
Formaldehído	4,5 ml
Agua bidestilada	Aforar

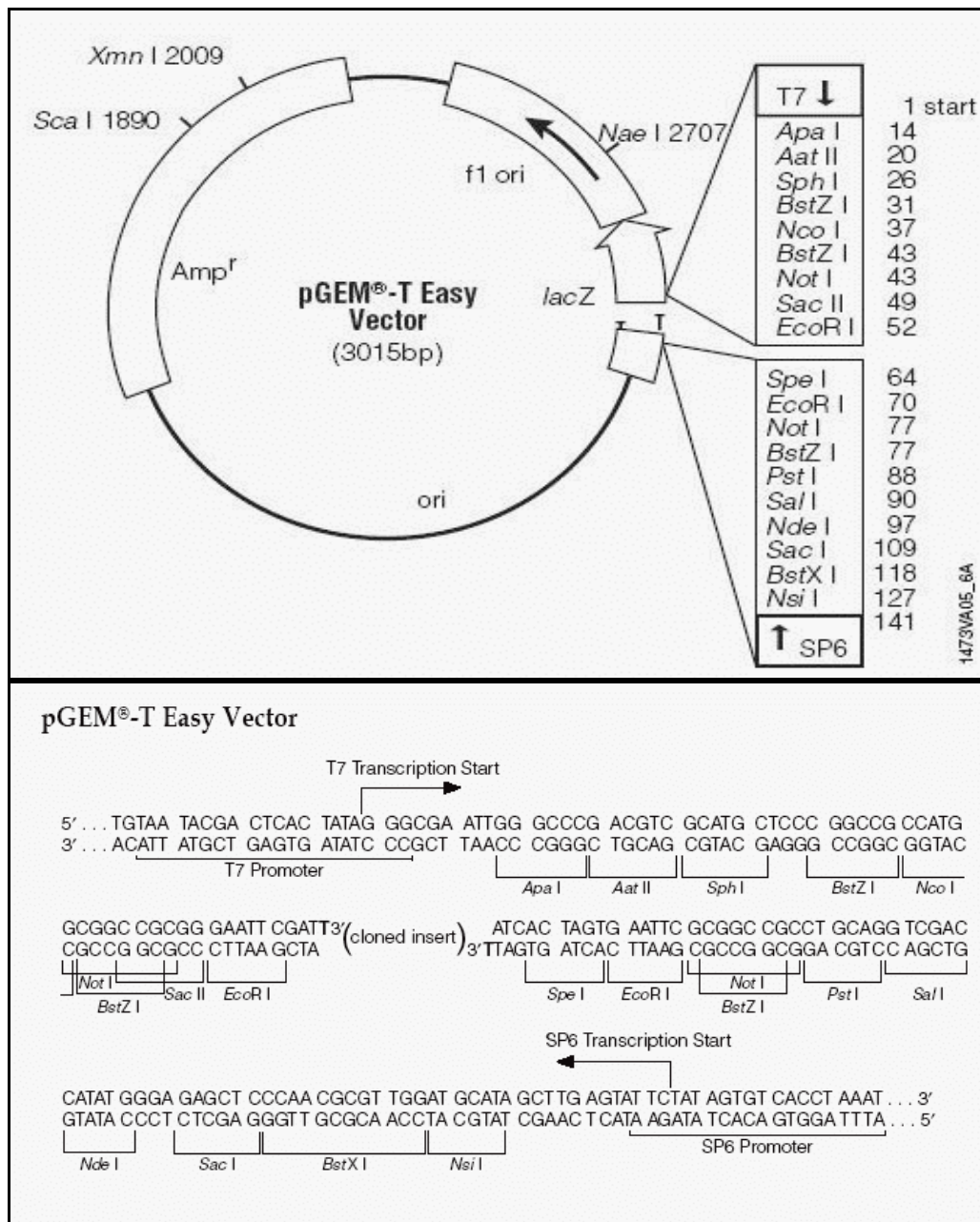
Solución de revelado

Reactivo	3500 ml
Carbonato de sodio (Na_2CO_3)	105 g
$\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$ (10 mg/ml)	650 μl
Formaldehído 37%	4,5 ml
Agua bidestilada	Aforar

Solución de parada

Reactivo	3500 ml
Ácido acético glacial	350 ml
Agua bidestilada	Aforar

Anexo 6: Mapa del vector PGEM T-Easy® de Promega



Anexo 7: Soluciones y reactivos empleados en la clonación

Medio agar LB con X-Gal, IPTG y ampicilina

Reactivo	251 ml
Medio líquido LB	250 ml
X-Gal	500 µl
Ampicilina	300 µl
IPTG	200 µl

Medio líquido LB (Luria-Bertani)

Reactivo	1000 ml
Triptona	10 g
Extracto de levadura	5 g
NaCl	10 g
Agua bidestilada	Aforar

Ajustar la solución a pH 7 con NaOH y autoclavar en ciclo líquido durante 20min a 15 lbs/pulgada².
Dejar enfriar la solución hasta 55° C.

X-Gal

Reactivo	1 ml
X-Gal	20 mg
Dimetilformamida	1 ml

Proteger la solución de la luz y almacenar a -20° C.

Ampicilina

Reactivo	10 ml
Ampicilina	1 g
Agua bidestilada estéril	aforar

Filtrar por filtro milipore de 0,22 µl, alicuotar en tubos eppendorf de 1,5 ml y almacenar a -20° C.

IPTG (Isopropylthio-β-D-galactoside)

Reactivo	10 ml
IPTG	2 g
Agua bidestilada estéril	aforar

Filtrar por filtro milipore de 0,22 µl y almacenar a -20° C.

Anexo 8: Resultados obtenidos en la evaluación fenotípica de las variedades de arroz evaluadas ante el RHBV en condiciones de campo, utilizando la escala de evaluación visual del IRRI

Variedad	1ra Repetición	2da Repetición	3ra Repetición	4ta Repetición	5ta Repetición	6ta Repetición
Araure 1	7	7	7	-	-	-
Araure 4	7	7	3	-	-	-
Centauro	9	9	5	-	-	-
Cimarrón	7	7	5	-	-	-
Fonaiap 1	7	7	3	-	-	-
Fonaiap 2000	9	9	5	-	-	-
Fundarroz PN-1	3	3	3	-	-	-
Palmar	7	7	3	-	-	-
Venezuela 21	7	7	3	-	-	-
Fedearroz 2000	1	1	1	1	1	1
Colombia 1	3	3	3	5	5	5
Fedearroz 50	3	5	5	5	7	7
Bluebonnet 50	9	9	9	9	9	9

Leyenda: (-) ausencia de tres repeticiones en variedades venezolanas.

Anexo 9: Tamaño de los alelos esperados y observados con microsatélites evaluados en las variedades de arroz venezolanas y testigos

CR	Micro.	T.EST.(pb)	Variedades de arroz venezolanas y testigos											
			'Araure 1'	'Araure4'	'Cimarrón'	'Palmar'	'Fonaiap1'	'Fonaiap2000'	'Centauro'	'Fundarroz PN-1'	'Venezuela 21'	'Fedearroz .50'	'WC366'	'Fedearroz 2000'
4	261	105-125	126	126	126	124	126	124;133	128;126	126	126	124	124	126
4	349	136	133	133	133	135;133	135	135	135	133	133	135	147	135
4	518	171	164	172;164	164	172	164	172;164	172	172	172	172	168	172
4	6770	158	155	155	155	160	155	155	155	160	160	160	146;155	160
4	1305	117	112	-	96	118	112	-	96	96;110	110	96; 118	-	96
4	7200	174	164	164	172	172	164	172	172	172	172	172	152	172
5	13	131-151	144	144	144	144	130	146	144	138	138	144	130	146
7	11	121-147	134	134	148	144	134	150	144	146	146	144	124	142
7	234	126-164	154	154	154	154	154	154	154	154	154	154	134	154
7	346	175	174	174	154	154	174	154	154	154	154	154	170	154
11	21	130-160	132	132;164	164	170	168	166	170	132	132	170	150	166
11	202	189	166;188	166;188	188	166	188	188	190	188	188	166	188	188
12	19	219-252	250	250	218	230;248	218	250	248	248	248	248	218	248

