

UNIVERSIDAD CENTRAL DE VENEZUELA
FACULTAD DE AGRONOMIA
COMISION DE ESTUDIOS DE POSTGRADO
DOCTORADO EN CIENCIAS AGRICOLAS

**CARACTERIZACION MORFOANATÓMICA, MOLECULAR Y GENÉTICA
DE LA RESISTENCIA AL DAÑO MECÁNICO PRODUCIDO POR SOGATA
(*Tagosodes orizicolus* Muir) EN ARROZ.**

ROSALIA VELASQUEZ SALAZAR
TUTOR: DRA. NELLY DELGADO

Enero, 2012

Tesis Doctoral presentada como Requisito Final para optar al título de Doctor en Ciencias Agrícola.

COMITÉ CONSEJERO

Dra. Nelly Delgado

Tutora

Dra. Catalina Ramis

Asesora

Dr. Carlos Ascanio

Asesor

Dedicatoria

A Dios quien me ha guiado en la vida

A mis hijas, Rosalys y Daniela

AGRADECIMIENTO

Agradezco a Dios Todopoderoso por acompañarme en cada uno de los momentos de mi vida personal y profesional.

A mis Padres: Aurelio y Rosalía por brindarme siempre la mano para seguir adelante, los amo mucho.

A mis hijas, Rosalys Valeria y Daniela Elvira, por motivarme a seguir luchando por un mejor país y poderles brindar lo mejor de mí. Son mi vida, las adoro.

A Luis por siempre estar allí y darme animo en los momentos que más lo necesitaba, te quiero mucho.

A mis hermanos y cuñados por ser ejemplo a seguir y brindarme su apoyo y comprensión.

A mis sobrinos por ser fuente de aprendizaje, risas y buenos momentos, los quiero mucho.

A la Universidad Central de Venezuela, *la Casa que Vence la Sombras*, y al Consejo de Desarrollo Científico y Humanístico (CDCH) por darme la oportunidad de realizar mis estudios de Doctorado.

A Nelly Delgado por ser mí tutora y amiga y haberme apoyado en todo momento.

A Catalina Ramis por sus múltiples consejos en la realización de esta investigación.

A Luis Angulo por su ayuda y apoyo incondicional prestado en los análisis del laboratorio y en el análisis estadístico de los resultados, te estaré agradecida siempre.

A Diego Diamont, fuiste mi estudiante durante mis inicios en la Facultad y después te convertiste en mi profesor guía durante el montaje de las muestras anatómicas.

A Rosana Figueroa-Ruiz y Mayela Parra por el apoyo estadístico y sus consejos oportunos.

A la Fundación DANAC por brindarme la oportunidad de realizar mis ensayos en sus instalaciones y facilitarme los recursos necesarios para la ejecución de los mismos.

Al personal que labora en el laboratorio de Protección Vegetal de la Fundación Danac, en especial a Alex González, Brígida Borges y a Carlitos, siempre le estaré agradecida por el apoyo brindado.

A José Ignacio Askue por brindarme su ayuda en el manejo del analizador de imágenes microscópicas.

A mis compañeros de trabajo Antonio, Mauren, Paola y María Cecilia por su solidaridad y el apoyo brindado en todo momento.

Al personal administrativo y obrero del Instituto de Genética y del CIBA: Damaris, Jhoamel, Julia, Félix, Hermen, José, Ángel, Yisel y Katusca, por su colaboración en la ejecución de algunas tareas que indirectamente estuvieron relacionadas con mi trabajo.

A mi amigo y profesor Jonás Mata por tu amistad, solidaridad y apoyo prestado en todo momento, gracias PARTNER

A Tibayde Sánchez, mi amiga y compañera de estudio del Doctorado, con quien pase momentos de angustias y de alegrías durante el trajinar académico, como nos reíamos amiga.

A Orlando De Sousa por su apoyo en la corrección del manuscrito y brindarme tu amistad en todo momento.

A Carmen mi compañera de los proyectos de CDCH, a mis tesisas y estudiantes por su solidaridad cuando les he pedido ayuda y comprensión.

Y a ti por estar allí.....

"No puedo responder otra cosa que gracias y gracias." (William Shakespeare)

TABLA DE CONTENIDO

DEDICATORIA	iii
AGRADECIMIENTOS	iv
TABLA DE CONTENIDOS	vi
INDICE DE CUADROS	viii
INDICE DE FIGURAS	ix
INDICE DE ANEXOS	x
RESUMEN	xi
ABSTRACT	xii
INTRODUCCION	14
OBJETIVOS	16
REVISION DE LITERATURA	17
1. Consideraciones del Cultivo	17
• Clasificación Botánica	17
2. Características del Insecto	17
• Características Morfológicas del Insecto Sogata	17
• Importancia Económica	18
3. Resistencia a Insectos	19
4. Mecanismos de resistencia Sogata y otros insectos	22
5. Anatomía foliar y su relación con la resistencia al ataque de herbívoros	24
6. Marcadores Genéticos	27
• Marcadores Morfológicos	27
• Marcadores Moleculares	27
MATERIALES Y METODOS	31
Fase I. Obtención de las generaciones F_1 y F_2 provenientes del cruce entre cultivares resistentes y susceptibles al daño mecánico producido por sogata	31
Fase II. Evaluación del daño mecánico y mecanismo de resistencia a nivel de invernadero	33
• Mecanismos de resistencia a daño mecánico de los parentales	33
• Antixenosis empleando la metodología de la alimentación con alternativa en círculo	34
• Antibiosis para sobrevivencia	35
• Antibiosis para ovoposición	35
Fase III. Caracterización morfoanatómica de los parentales	35
Fase IV. Identificación de los marcadores de ADN (SSR) para la tipificación molecular del carácter	37
• Evaluación del Polimorfismo entre los Progenitores	37
• Obtención del ADN Genómico de los Cinco Progenitores	37
• Condiciones de Amplificación Reacción en Cadena de la Polimerasa	38
• Electroforesis y Revelado con Nitrato de Plata	42
• Análisis de ADN de los cinco progenitores	42
• Herencia de la resistencia al daño mecánico en familias $F_2:3$	42

RESULTADOS Y DISCUSIONES	43
Fase I. Obtención de las generaciones F_1 y F_2 provenientes de los cruces entre cultivares resistentes y susceptibles al daño mecánico producido por sogata	43
Fase II. Evaluación del daño mecánico y mecanismo de resistencia a nivel de invernadero de las familias $F_{2:3}$	44
• Mecanismos de Resistencia	45
• Antixenosis empleando la metodología de alimentación con alternativa en círculo	45
• Antibiosis para sobrevivencia	46
• Antibiosis para ovoposición	47
Fase III. Caracterización morfoanatómica de los parentales	49
• Número de Micropelos	52
• Número de Macropelos	54
• Longitud de los Macropelos	55
• Presencia de cuerpos silíceos	58
Analisis de Regresion por pasos (Step Wise Regresion)	60
Fase IV. Uso de microsatélite como marcador de ADN para la tipificación molecular del carácter	61
• Calidad y concentración de ADN	61
• Polimorfismo entre los parentales	62
Herencia de la resistencia al daño mecánico	67
Número de plantas muertas en las familias $F_{2:3}$	69
CONCLUSIONES	72
RECOMENDACIONES	74
REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS	75
ANEXOS	85

INDICE DE CUADROS

Cuadro		Página
1	Escala de daño mecánico producida por sogata en arroz de acuerdo con el manual del IRRI (2002)	22
2	Cultivares de arroz utilizado en el ensayo y reportado como resistente y susceptible a daño mecánico producido por sogata	33
3	Evaluación en las familias F _{2,3} y Parentales de daño mecánico a Sogata	35
4	Marcadores microsatélites empleados en la evaluación molecular para la determinación del polimorfismo de las variedades de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	41
5	Coctel para la amplificación SSR-PCR en Arroz (<i>Oryza sativa</i> L.)	43
6	Condiciones de Amplificación (PCR)	44
7	Número de semillas F ₁ obtenidas por cruces	45
8	Cantidad de familias F _{2,3} obtenidas por cruce, peso promedio/familia (gr/familia) y número de familias seleccionadas para evaluar resistencia	46
9	Análisis de varianza para la variable escala de daño mecánico en los parentales de arroz	46
10	Comparación de medias de Duncan para la variable escala de daño mecánico en los parentales de arroz	46
11	Análisis de Varianza para la variable Número de plantas muertas	47
12	Comparación de media de Duncan para la variable número de plantas muertas en familias F _{2,3} . (p<0,05)	47
13	Análisis de la Varianza para la variable número de insectos posados a las 24, 48, 72 y 96hdi. ($\alpha= 0,1$)	48
14	Comparación de medias de Duncan para la variable número de insectos posados a las 96hdi	48
15	Análisis de la Varianza para la variable Número de huevos	49
16	Prueba de comparación de media de Duncan para la variable número de huevos	50
17	Análisis de la Varianza para la variable grosor de la cutícula (μm) de la cara adaxial y abaxial del tejido foliar	51
18	Comparación de medias de Duncan grosor de la cutícula (μm) cara adaxial del tejido foliar	53
19	Prueba de comparación de medias de Duncan variable grosor de la cutícula (μm) cara abaxial del tejido foliar	53

20	Análisis de la Varianza para la variable numero de micropelos/mm ² en la cara adaxial y abaxial del tejido foliar	54
21	Comparación de medias de Duncan para la variable numero de micropelos/mm ² en la cara adaxial del tejido foliar	55
22	Comparación de medias de Duncan para la variable numero de micropelos/mm ² en la cara abaxial del tejido foliar	56
23	Análisis de la Varianza para la variable numero de macropelos/mm ² en la cara adaxial del tejido foliar	57
24	Análisis de la Varianza para la variable longitud de los macropelos (µm) en la cara adaxial del tejido foliar	57
25	Comparación de medias de Duncan para la variable longitud de los macropelos (µm) en la cara adaxial del tejido foliar	60
26	Comparación de medias de Duncan para la variable longitud de los macropelos (µm) en la cara abaxial del tejido foliar	60
27	Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para la variable presencia de cuerpos silíceos. ($p \leq 0,05$)	61
28	Prueba de medianas de Kruskal y Wallis para la variable presencia de cuerpos silíceos	62
29	Análisis de regresión por pasos (Stepwise regresson)	63
30	Cantidad de ADN obtenido para los progenitores y algunos cruces seleccionados al azar	64
31	Porcentaje de microsatélites (SSR) polimórficos entre los cruce realizados	65
32	Número y porcentaje de microsatélites polimórficos entre los progenitores utilizados en los cruces y su distribución por cromosoma	66
33	Numero de microsatelites polimórficos evaluados en los parentales involucrados en los cruces, indicando alelos y ubicación en el cromosoma	68
34	Frecuencia fenotípica observada para los genotipos resistentes, intermedios y susceptibles al daño mecanico de sogata (<i>Tagosodes orizicolus</i> Muir) obtenidos en las familias F _{2:3}	69
35	Analisis de varianza para la variable número de plantas muertas en las familias F _{2:3}	69

INDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Identificación de a) Machos, b) Hembras y c) postura de huevos de Sogata en plantas de arroz	20
2	Numero de huevos de sogata contabilizados por cultivar	50
3	Huevos de sogata en la nervadura principal de la hoja de arroz	51
4	Grosor de la cutícula en la cara abaxial, incluye grosor de la pared celular externa, de los cultivares: a. Cimarrón, b. D-sativa, c. Venezuela 21, d. Makalioka, e. ZETA 15, f. BB-50	54
5	Número de micropelos y presencia de agujones en cultivares de arroz: a. ZETA 15; b. Venezuela-21; c. D-sativa; d. Makalioka; e. Cimarrón; f. BB-50	59
6	Presencia de cuerpos Silíceos en el tejido foliar de a. Cimarrón; b. Venezuela-21; c. Makalioka; d. ZETA 15	62
7	Cantidad y calidad del ADN. A) Progenitores y algunas familias F _{2:3} , en gel de agarosa 1%, tinción bromuro de etidio. (1) Fago Lambda 100ng.μL ⁻¹ , (2) Control negativo (vacío), (3) ZETA 15, (4) Venezuela 21, (5) Cimarrón, (6) D-Sativa, (7) BB-50, (8) Makalioka, (9) ZV-4, (10) ZV-10, (11) ZB-4, (12) ZB-1, (13) DV-29, (14) CB-13. B) Familias F _{2:3}	64
8	Dendrograma obtenido del análisis de agrupamiento para seis genotipos de arroz (<i>Oryza sativa</i> L.), distancia genética de Dice	67
9	Porcentaje de familias F _{2:3} agrupadas de acuerdo a la escala IRRRI para resistencia al daño mecánico producido por sogata	71
10	Número de plantas muertas por familias F _{2:3} . A. D-sativa x Venezuela 21 (DV); B. Cimarrón x BB50 (CB); C. Z15 x BB50 (ZB); D. Z15 x Venezuela 21 (ZV)	73

INDICE DE ANEXOS

Anexo		Pagina
1	Prueba de Normalidad de Shapiro y Wilks para la variable daño mecánico en los cultivares de arroz	88
2	Prueba de Normalidad de Shapiro y Wilks para la variable daño mecánico en los cultivares de arroz	88
3	Prueba de Normalidad de Shapiro y Wilks para la variable daño mecánico en los cultivares de arroz	88
4	Estadística descriptiva para la variable número de plantas muertas en los cultivares de arroz	88
5	Estadística descriptiva para la variable número de huevos en los cultivares de arroz	88
6	Estadística descriptiva para la variable insectos posados a las 24, 48, 72 y 96h después de la infestación	89
7	Estadística descriptiva para la variable sobrevivencia	89
8	Estadística descriptiva para las variables morfoanatomuicas	89
9	Prueba de Normalidad de Shapiro y Wilks para la variable daño mecánico en las familias $F_{2:3}$	89
10	Estadística descriptiva para la variable daño mecánico en las familias $F_{2:3}$	89
11	Análisis de varianza para la variable daño mecánico en las familias $F_{2:3}$	90
12	Comparacion de medias de Duncan para la variable daño mecánico en las familias $F_{2:3}$	91
13	Prueba de Normalidad de Shapiro y Wilks para la variable número de plantas muertas en las familias $F_{2:3}$	92
14	Estadística descriptiva para la variable número de plantas muertas en las familias $F_{2:3}$	92
15	Comparación de medias de Duncan para el numero de plantas muertas en las familias $F_{2:3}$	94
16	Análisis de Correlación entre las variables estudiadas	95

CARACTERIZACION MORFOANATÓMICA, MOLECULAR Y GENÉTICA DE LA RESISTENCIA AL DAÑO MECÁNICO PRODUCIDO POR SOGATA (*Tagosodes orizicolus* Muir) EN ARROZ.

RESUMEN

El arroz es afectado directa e indirectamente por el insecto sogata (*Tagosodes orizicolus*). El daño mecánico o daño directo es producto del efecto de la alimentación y ovoposición del tejido foliar joven, y como daño indirecto se tiene la trasmisión del virus de hoja blanca. Durante agosto del 2010 se llevó a cabo la investigación en los invernaderos de la Fundación DANAC con la finalidad de caracterizar morfoanatómica, genética y molecularmente el daño mecánico producido por el insecto en seis cultivares de arroz, incluidos los testigos de resistencia y susceptibilidad (Makalioka y Bluebonnet 50) y las familias F_{2:3}. La evaluación de la resistencia al daño mecánico y de los mecanismos de resistencia fue realizada a través del método de libre alimentación y alimentación forzada. Grosor de la cutícula, presencia de macropelos y micropelos en la lámina foliar y presencia de cuerpos silíceos fueron las características morfoanatómicas evaluadas. Se evaluaron 151 marcadores microsatélites que cubrían todo el genoma. Los resultados mostraron una resistencia intermedia al daño mecánico de sogata, producto de la acción de varios genes. Se determinó antixenosis o no preferencia después de 96h de la infestación por el insecto, encontrándose una correlación negativa con el grosor de la cutícula en la cara abaxial. D-sativa y Venezuela 21 mostraron antibiosis intermedia para oviposición. Se detectó una correlación significativa entre el número de macropelos presentes en la cara abaxial e insectos posados a las 96h, así como entre los cuerpos silíceos y el número de micropelos presentes en el tejido foliar. El análisis de Regresión por Pasos se determinó que las variables que están estrechamente relacionadas con la resistencia al daño mecánico son: macropelos en la cara adaxial y postura a las 96h. Se identificaron 92 marcadores polimórficos y el análisis de agrupamiento generó tres grupos, donde D-sativa fue separada del resto de los cultivares. Herencia transgresiva fue observada en la descendencia F_{2:3} de los cruces realizados, especialmente entre D-sativa y Venezuela 21, determinándose la presencia de dos genes mayores con efecto aditivo como los responsables de la resistencia al daño mecánico producido por sogata.

Palabras claves: antixenosis, antibiosis, sogata, arroz, anatomía, microsatélite.

**MORPHO-ANATOMIC, MOLECULAR AND GENETIC
CHARACTERIZATION OF MECHANICAL DAMAGE RESISTANCE
CAUSED BY PLANTHOPPER (*Tagosodes orizicolus* Muir) IN RICE.**

ABSTRACT

Rice is affected directly and indirectly for the insect *sogata* (*Tagosodes orizicolus*). The mechanical damage or direct loss is produced by feeding and ovoposition on the young leaves tissue and as indirect damage is the transmission of Rice Hoja Blanca virus. During August, 2010 an investigation was carried out in the greenhouses of the Foundation DANAC with the purpose of characterizing morpho-anatomic, genetics and molecularly the mechanical damage produced by the insect in six cultivated rice, the control for resistance and susceptibility (Makalioka and Bluebonnet 50) and the F_{2,3} families. The resistance to mechanical damage and mechanisms of resistance were evaluated through the methods of free feeding and forced feeding. Thickness of the cuticle, presence of macrohair and microhair in the leaves and presence of silica bodies were evaluated as morpho-anatomic characteristics. 151 microsatellites covering the whole genome were evaluated. The results showed an intermediate resistance to the mechanical damage of *sogata* as the action of several genes. Antixenosis or not preference after 96h of the infestation was determined submitting a negative correlation to the thickness of the cuticle in the abaxial face. D-sativa and Venezuela 21 showed intermediate antibiosis for ovoposition. A significant correlation was detected between the number of macrohair in the abaxial face and posed insects at 96h, as well as silica bodies and the number of microhair observed on the foliar lamella. The Stepwise Regression showed a close relationship between mechanical damage and macrohair in the adaxial face and posed insect at 96h. 92 polymorphic markers were identified and the analysis of grouping generated three groups, where D-sativa was separated from the rest cultivated rice cultivars. Transgressive segregation was observed in F_{2,3} offspring obtained between D-sativa x Venezuela 21, which showed the best transgressive segregation, two mayor genes with additives effect was determined like responsible to resistance to *sogata* mechanical damage

Keywords: *Oryza sativa*, antixenosis, antibiosis, planthopper, rice, foliar anatomy, microsatellite.

INTRODUCCIÓN

El arroz (*Oryza sativa* L.) además de ser considerado el segundo cereal de mayor producción y consumo a nivel mundial, después del trigo, constituye la fuente alimenticia de mayor importancia por la superficie cultivada, incorporación de la población activa y aportes nutricionales (Franquet y Borrás, 2011).

En Venezuela, el arroz constituye uno de los cereales más importantes en la dieta de los venezolanos y su cultivo es de gran importancia económica para las principales zonas agrícolas del país. La mayor parte de la producción está concentrada en dos regiones, los Llanos Occidentales (Estados Portuguesa, Barinas y Cojedes) y los Llanos Centrales (Estado Guárico). Fedegro (2012) reporta que para el 2011 se cosecharon 165.334 ha con una producción de 845.254 Tn para un rendimiento de 5.100Kg.ha⁻¹.

Tanto el hombre como los insectos compiten en la mayoría de los casos por los mismos rubros agrícolas como fuente de alimento y medio de sobrevivencia; sin embargo, los insectos pueden causar un nivel de daño a los cultivos que afectan tanto la calidad del producto final como las condiciones económicas del productor, debido al uso excesivo de pesticidas, entre otros.

Los Delphacidae son un grupo de insectos plagas que producen estragos importantes en los cereales (arroz, maíz, trigo, sorgo, entre otros) a nivel mundial. Estas pérdidas son ocasionadas durante la puesta de huevos, alimentación o transmisión de diferentes fitopatógenos (Vivas y Astudillo, 2008; Remes, 2001). *Tagasodes orizicolus* pertenece a esta familia de insectos, la cual puede ocasionar dos tipos de daño, uno proveniente del insecto, llamado “daño directo o mecánico” y otro por ser trasmisor del virus de la hoja blanca en arroz (VHB) o daño indirecto. El primero es producido por las incisiones que hacen los insectos en las hojas para alimentarse u ovipositar, por otro lado el daño indirecto es producido por el insecto al inocular a la planta el virus, siendo esta una de las enfermedades virales que afecta al cultivo del arroz en América Latina, siendo

reportada por primera vez en Colombia a mediados de 1930, resurgiendo en forma epidémica en 1950, los rendimientos mermaron causando grandes pérdidas en las zonas arroceras del Caribe, América Central y al norte de América del Sur. En Venezuela el primer registro fue realizado por Malaguti en 1957 (Vivas y Astudillo, 2008; Triana y col., 2004; Vivas, 1997; Jennigs y col., 1981).

Actualmente el mejoramiento genético del cultivo ha estado orientado principalmente hacia la obtención de cultivares tolerantes al daño mecánico producido por sogata y hacia el estudio de los mecanismos de resistencia presentes en las cultivares o líneas evaluadas. Con respecto a este último aspecto, es necesario conocer los factores que están asociados con los mecanismos de resistencia de las plantas postulados por Painter (1951), en este sentido los factores de resistencia permiten identificar el compuesto químico, características morfológica o razón realmente responsable de esa resistencia (Granados y Paliwal, 2005).

Adicionalmente se ha señalado que la caracterización anatómica de la hoja es de gran importancia para los estudios básicos de Ecología y Fisiología, y aplicados en las áreas de Fitopatología y Mejoramiento de las plantas (Granado-Sánchez y col., 2008).

Con relación a la herencia de la resistencia a sogata se ha reportado que es simple y duradera (Jennigs y col., 1981), sin embargo, algunos investigadores indican que la misma es incierta y probablemente involucra genes mayores y genes menores (Alfonzo y col., 2000; Orellana, 1982).

Desde hace aproximadamente 10 años se vienen utilizando en los distintos programas de mejoramiento de cultivos el uso de marcadores moleculares como una alternativa confiable y precisa de selección de genotipos promisorios (Pérez y col., 2011; Arnao y col., 2007; Triana y col., 2004; Tanaka, 1999). El uso de estos marcadores ha brindado un gran apoyo para la identificación de loci cuantitativos (QTLs) para la resistencia a insectos y patógenos, además de la selección de genotipos o materiales deseables agrónomicamente. En el Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), se han realizado estudios preliminares de asociación

entre los marcadores de ADN y la resistencia a *Tagasodes orizicolus* de las líneas de arroz desarrolladas en los programas de mejoramiento de Colombia. El objeto de esa investigación fue encontrar una herramienta que facilitará la selección de genotipos resistentes y a su vez estudiar la genética de esa característica (Triana y col., 2004).

Por lo anteriormente señalado, es muy importante considerar las características morfoanatómicas de las plantas de arroz resistentes y/o tolerantes al daño mecánico producido por sogata, y poder establecer la relación con los diferentes mecanismos de resistencia reportados, los cuales pudieran ser utilizados en los distintos programas de mejoras hacia la resistencia a este insecto. Igualmente es de destacar la importancia que tiene el uso de marcadores moleculares tipo microsatélites para la detección de genes de resistencia al daño mecánico a sogata entre parentales, con finalidad de seleccionar, en estado temprano de desarrollo, los genotipos con resistencia a la plaga, pudiéndose además correlacionarlas con las características morfoanatómicas y los mecanismos de resistencia.

OBJETIVO GENERAL

Caracterizar morfoanatómica, genética y molecularmente la resistencia al daño mecánico producido por sogata (*Tagosodes orizicolus* Muir) en arroz (*Oryza sativa* L.).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar el nivel de resistencia al daño mecánico causado por sogata en los cultivares de arroz tolerantes y susceptibles y en poblaciones segregantes.
- Determinar el mecanismo de resistencia al daño mecánico producido por sogata en los cultivares de arroz seleccionados.
- Identificar y caracterizar morfoanatómicamente el tejido foliar de los cultivares de arroz tolerantes y susceptibles al daño mecánico producido por sogata.
- Analizar estadísticamente las características morfoanatómicas de los cultivares con la finalidad de estudiar su correlación con el grado de tolerancia al daño mecánico producido por el insecto.
- Seleccionar el o los marcadores moleculares (microsatélite) que permitan identificar la presencia de genes asociados a la resistencia o tolerancia al daño mecánico de sogata.

REVISIÓN DE LITERATURA

1. Consideraciones del Cultivo

Clasificación Botánica del arroz

Pertenece a la clase Monocotiledóneas

Orden: Poales

Familia: Poaceae

Subfamilia : Bambusoideae

Tribu: *Oryzae*

Género: *Oryza*

Es una planta diploide ($2n=24$) y autógena y las diferentes formas y cultivares de arroz cultivado pertenecen a las especies *O. sativa* L. cuyo centro de diferenciación originario se considera el sudeste Asiático (la India o la Península Indochina) y *O. glaberrima* S., originaria del Delta Central Nigeriano. (Álvarez, 1997; López, 1997; Tinarelli, 1989).

2. Características del Insecto

- **Nombre científico:** *Tagosodes orizicolus* (Muir)
- **Nombre vulgar:** Sogata
- **Otros nombres:**
Sogatodes orizicola, Sogata orizicola, Sagatella.
- **Orden:** Homóptera
- **Familia:** Delphacidae

Se han reportado más de 20 especies del género *Tagosodes* distribuidos en áreas tropicales y subtropicales del mundo (Remes, 2001).

Características Morfológicas del insecto

Existen diferencias morfológicas entre los machos y las hembras de sogata, los primeros son de menor tamaño que las hembras, miden aproximadamente 2mm de

longitud y son de color pardo oscuro a negro (Fig. 1a), mientras que la longitud de las hembras oscila entre 3,33 – 3,35mm, su color es ámbar (Fig. 1b), y en el dorso del tórax hasta la quilla se puede observar un color más pálido que se extiende hasta el ápice de la cabeza (Vivas y Clavijo, 2000; Meneses y col., 1998).

La duración de los estados de desarrollo del insecto está ampliamente influenciado por la temperatura y época del año, variando en cada uno de los períodos de desarrollo: la incubación de los huevos oscila entre 7-19 días, las ninfas entre 14 a 21 días y los adultos pueden vivir entre 15 a 31 días aproximadamente. Las condiciones de temperatura favorables para el incremento de la densidad de la población son entre 25 a 27°C; temperaturas más bajas, así como las grandes oscilaciones afectan de forma negativa el crecimiento y desarrollo del insecto (Meneses y col., 1998).

La sogata puede encontrarse en los diferentes estados de desarrollo de la planta de arroz; sin embargo, los mayores niveles de la población insectil se han observado en plantas jóvenes (desde la germinación hasta la fase de ahijamiento activo), por ser tejidos tiernos y adecuados para su alimentación (Triana y col., 2004; Vivas y Clavijo, 2000; Meneses y col., 1998).

Los machos son más activos en el vuelo que las hembras; sin embargo, éstas y las ninfas poseen una actividad de alimentación más agresiva y son sedentarias, esto debido a que las hembras poseen una gran cantidad de huevos en su abdomen, lo que las incapacita a volar largas distancias. Además, se ha reportado que en las colonias existe un alto porcentaje de hembras braquípteras o ápteras que no pueden volar (Meneses y col., 1998).

Los insectos producen incisiones en las hojas para alimentarse u ovipositar ocasionando el daño directo. Las hembras hacen de 8 a 10 incisiones de 1 a 5 mm de longitud en las hojas y en cada incisión depositan de 2 a 8 huevos (Fig. c), pudiendo colocar hasta 200 en 3 días (Vivas, 1997).

Importancia Económica

El insecto, al alimentarse de las plantas recién germinadas, ocasiona la disminución del área fotosintética y en consecuencia disminuye el rendimiento. El daño mecánico se presenta con síntomas de avanzada senescencia, amarillamiento y necrosis de las hojas y ocurre en forma basípeta (desde el ápice a la base de la hoja) pudiendo afectar el crecimiento y producción de la planta afectada (Álvarez y col., 2000).



Figura 1. Identificación de a) Machos, b) Hembras y c) postura de huevos de Sogatana en plantas de arroz. Fuente Triana y col. 2003 (a y b); c. Autor.

Paralelamente al daño mecánico, la sogata causa un daño indirecto y es la inoculación del agente causal de la enfermedad del virus de la hoja blanca en arroz (VHB) (Meneses y col., 1998; Jennings y col., 1981). Los síntomas de la presencia del virus se observan en las hojas que emergen después que ocurre la inoculación, observándose áreas cloróticas en las hojas, que se van tornando de un color amarillento hasta una coloración chocolate claro. Otro síntoma del virus es la presencia de fumagina en las hojas (Vivas y Astudillo, 2008; Vivas, 1997).

Esta enfermedad fue reportada por primera vez en Colombia a mediados de 1930, resurgiendo en forma epidémica en 1950, disminuyendo los rendimientos, causando grandes pérdidas en las zonas arroceras del Caribe, América Central y el norte de América del sur. En Venezuela el primer registro fue realizado por Malaguti en 1957 (Vivas y Astudillo, 2008).

3. Resistencia a Insectos

Las plantas expresan su resistencia a los insectos plagas de diferentes maneras, unas en forma más estable que otras. Entre las primeras están las estructuras anatómicas, morfológicas y químicas que impiden que los insectos y patógenos se establezcan en la planta. Adicionalmente a estos factores, las plantas disponen de genes mayores y menores que impiden el establecimiento y el avance de las plagas. (Bustamante y Patiño, 2001)

La resistencia al ataque de insectos ha sido definida por Granados y Paliwal (2005) como la cantidad relativa de elementos heredables que influyen sobre el daño hecho por los insectos, donde el grado de resistencia a nivel de campo puede ser evaluado a través de las siguientes categorías:

Inmunidad: cuando un insecto específico nunca llega a consumir o dañar a la planta bajo ninguna condición.

Resistencia Moderada: nivel intermedio de resistencia que tiene una cultivar al ataque de un insecto.

Baja resistencia o susceptibilidad: el grado de daño o infestación por un insecto son mayores en relación con el promedio.

Alta susceptibilidad está reportada muy por encima del daño causado por el insecto en consideración, ocasionando la muerte de la planta.

Dentro del manejo integrado de plagas (MIP), la resistencia de una planta al ataque de un insecto es un componente que puede ser manejado mediante los programas convencionales de mejoramiento genético o a través de las técnicas modernas de la biotecnología, estos programas de mejoramiento genético por lo general están asociados a su vez con características agronómicas deseables.

Por otro lado, para conocer las causas del nivel de resistencia observado en el campo es necesario entender los mecanismos y factores que actúan en la resistencia. Painter (1951) definió las categorías o mecanismos de defensa de la planta ante el ataque de un insecto, desde entonces se han venido utilizando tres categorías definidas como: antibiosis, tolerancia y antixenosis.

La antibiosis representa las características físicas o químicas de las plantas que actúan contra la biología del insecto afectándole la vida. Se ha reportado que

compuestos químicos, producto del metabolismo secundario, y la presencia de tricomas en hojas y tallos afectan el desarrollo y la reproducción de los insectos. (Painter, 1951)

La tolerancia está definida como el mecanismo por el cual la planta demuestra una cierta capacidad para crecer y reproducirse o para reparar en cierta medida los daños ocasionados, a pesar de soportar una población de insectos igual a aquella que ocasionaría daños a un hospedante susceptible. (Granados y Paliwal, 2005).

La antixenosis se define como el grupo de caracteres de las plantas que hacen que los insectos la acepten o la rechacen para la ovoposición, alimentación, refugio o combinación de ellos. (Granados y Paliwal, 2005)

De acuerdo con el Sistema de Evaluación Estándar del Instituto Internacional de Investigación en Arroz (IRRI, por sus siglas en inglés) (2002) los daños causados por sogata son similares a los producidos por el “Whitebacked Planthopper” (WBPH) representado por el insecto *Sogatella fucifera*, es por ello que se utiliza la misma escala de evaluación (Cuadro 1), la cual está basada en los síntomas presentados en la lámina foliar, que comprenden desde un parcial a un pronunciado amarillamiento de la hoja y un achaparramiento de la planta por cese del crecimiento de la misma. El número de plantas muertas en el campo pudiera ser considerado el parámetro final de evaluación.

Cuadro 1. Escala de Evaluación al daño mecánico producida por sogata en arroz (*O. sativa* L.).

Escala	Descripción daño	Grado de resistencia
0	Sin daño	Resistente
1	Ligero amarillamiento y daño	Tolerantes o Resistencia Intermedia
3	Amarillamiento 1era. y 2da. hoja	
5	Amarillamiento pronunciado en las hojas, leve achaparramiento, <50% plantas muertas	Susceptibles
7	Achaparramiento y amarillamiento altamente pronunciado, >50% plantas muertas	
9	Todas la plantas muertas	

Fuente: IRRI (2002)

Bajo condiciones de invernadero, el insecto ataca principalmente en estado de plántula, y bajo condiciones de campo el insecto ataca desde el estado de plántula hasta el estado de formación y llenado de panícula.

4. Mecanismos de Resistencia a sogata y otros insectos

El mecanismo de resistencia a sogata ha sido identificado en algunos cultivares desarrollados en los programas de mejoramiento genético a nivel nacional e internacional (González y col., 2012; Calvert y col. 2004), asimismo los trabajos de mejora en el cultivo se han encaminado hacia la utilización y liberación de cultivares con tolerancia al daño mecánico ocasionado por el insecto y con resistencia al virus de hoja blanca (VHB) (Calvert y col., 2005).

Se han realizado estudios dirigidos a determinar los mecanismos de resistencia a *Tagosodes orizicolus* en varias líneas promisorias del Fondo Latinoamericano de Arroz (FLAR), encontrándose resistencia del tipo antibiosis y de antixenosis (Álvarez y col., 2000).

Kummar y col., (2007) reportan la presencia de antixenosis por ovoposición en ocho genotipos de sorgo debido al ataque de barrenador del tallo (*Chilo partellus*), adicionalmente encontraron diferencias significativas en el porcentaje de sobrevivencia y longitud del desarrollo postembriogénico de las larvas, asociado con un mecanismo de antibiosis por parte de esos genotipos.

Por otro lado, en Asia investigaciones realizadas sobre los mecanismos de resistencia a *Orseolia oryzae* (Wood-Mason) (Diptera: Cecidomyiidae, mosquito) en arroz, demostraron que la antibiosis fue el mecanismo de resistencia que predominó, observándose sobrevivencia del primer instar del gusano (larvas); adicionalmente se reporta que existe una cantidad de fenoles y aminoácidos específicos en los ápices de las plantas que le confieren una resistencia selectiva al cultivo (Vijaykumar y col., 2009).

Estudios realizados bajo condiciones de laboratorio para medir los mecanismos de resistencia por antixenosis (no preferencia) y antibiosis al saltahoja marrón del arroz *Nilaparvata lugens* Stål demostraron que la cultivar PTB33 resultó ser altamente

resistente ya que el número de insectos posados fue menor debido a la poca preferencia para posarse y que la cantidad de huevos colocados fue baja en comparación con la cultivar susceptible TN1, por otro lado las cultivares PTB33 y IR64 mostraron una alta resistencia por antibiosis al insecto debido a la baja población encontrada, descenso en el porcentaje de sobrevivencia de las ninfas y baja tasa de alimentación en comparación con las susceptibles (Senguttuvan y col., 2003). Labrin (2008) trabajando con *Tagosodes orizicolus* en cultivares de arroz venezolanos determinó que el mecanismo de resistencia presente fue del tipo antibiótica y que a partir de ese mecanismo se puede inducir una resistencia genética al insecto.

Eickhoff y col., (2008) trabajando con diferentes cultivares de grama (*Paspalum vaginatum*.) reportan que el aumento del nivel de tolerancia al ataque de chinches es debido a los factores antibióticos y antixenóticos, indicando además que esta tolerancia está asociada a las características químicas y morfológicas presentes en las cultivares, como son pubescencia, presencia de ceras, tamaño y ancho de la hoja, los cuales afectan el comportamiento del insecto (ovoposición, postura, ciclo de vida y mortalidad).

Hasta el presente, no existe claridad sobre la causa real de las alteraciones fisiológicas que sufre el tejido foliar de las plantas de arroz cuando es objeto de alimentación por parte del *Tagosodes*, sin embargo, estudios realizados con otros homópteros que causan daño similar al de sogata, reportan que la misma es debida a la obstrucción del floema de la planta por efecto de la solidificación de los compuestos lipoprotéicos que contiene la saliva cuando es secretada por el estilete del insecto durante la penetración del tejido (Bakus, 1988).

Flinn y col., (1990) reportan que la interrupción del floema trae como consecuencia la acumulación de sustancias elaboradas en las hojas afectadas, cierre de los estomas y disminución de la tasa fotosintética, afectando el desarrollo de la planta.

5. Anatomía foliar y su relación con la resistencia al ataque de herbívoros

La resistencia en las plantas hospederas ha sido clasificada en términos de características anatómicas, morfológicas, fisiológicas y bioquímicas, las cuales son responsables de su expresión, epidemiología, modo de herencia y durabilidad (Picca y col., 2004). En este sentido Guerreira-Filho (2006) reporta que la expresión y el tipo de resistencia que presentan las plantas de café al minador de la hoja está relacionada directamente con la anatomía foliar de la especie.

Estudios realizados sobre la relación existente entre la anatomía y la producción vegetal demuestran que las condiciones ambientales y nutricionales, así como los estreses a que son sometidas las plantas por efecto de ataque de insectos y/o microorganismos afectan las características estructurales de los vegetales, haciendo que la planta desarrolle algunos mecanismos morfológicos y fisiológicos que le permitan sobrevivir a esas condiciones. Entre esos mecanismos se pueden mencionar: tamaño de la hoja, presencia o no de tricomas, forma y tamaño de tricomas, acumulación de mucílagos u otros metabolitos secundarios (resinas, ceras, celulosa), aumento de la compactación del mesófilo, organización de las células epidérmicas, orientación de las nervaduras, tipos de estomas y profundidad de los mismos, presencia o no de cristales de oxalato de calcio y compuestos silicios, entre muchas otras (Silva y col., 2005).

En las Poaceas, el tejido epidérmico presenta características particulares que han sido utilizadas con fines taxonómicos; sin embargo, muchas de estas estructuras celulares tienen función de protección contra los insectos herbívoros, entre los que se pueden mencionar: presencia de papilas, pelos simples o micropelos y cerdas o aguijones (Nasca, 2011).

En el mismo orden de ideas, varios autores coinciden al reportar que existen mecanismos que dificultan la digestibilidad por parte de algunos microorganismos y la ovoposición de los insectos, y que los mismos están asociados con el grosor de la cutícula y con la presencia y tipo de tricomas (Lovinger y col., 2000; Camacho de Torres y Subero, 1991).

Entre las teorías que se han propuesto en defensa a los depredadores herbívoros, existe una que abarca tres aspectos importantes como son la protección mecánica en la superficie de la planta, la presencia de cuerpos de sílice y la presencia de tóxicos vegetales que matan o repelen a los insectos. Los cristales de sílice generalmente inhiben la digestión debido a que algunos animales no poseen las enzimas que permiten degradarlos. En pastos, la presencia de sustancias silíceas en las hojas disuade el ataque de todo depredador herbívoro (Granado-Sánchez y col., 2008).

Los cuerpos silicios presentan diferentes localizaciones, los cuales se pueden presentar como frágiles revestimientos de las paredes celulares, realizando sustituciones de la pared celular por ganchos, espinas y tricomas silicificados. Adicionalmente se ha demostrado que la presencia de cuerpos silicios incrementa la estabilidad mecánica de los tejidos y suministra protección contra microorganismos y herbívoros (Herrera- Giraldo y col., 2009; Belanger y col., 1995; Hoyas y col., 1990).

En especies del género *Guadua* perteneciente a las Bambusoideae, los cuerpos silíceos presentan la típica forma de silla de montar, verticalmente elongadas, con una longitud que varía entre 11,8 μ m y 18,2 μ m y un ancho entre 5,2 μ m y 7,5 μ m. Mientras que en las hojas de bambú (*Phyllostachys heterocycla*) los cuerpos de sílice se distribuyen en la epidermis en filas sobre las nervaduras, con la misma forma de silla de montar y con una longitud que oscila entre 4,89 μ m y 10,21 μ m y un ancho que varía entre 11,25 μ m y 17,58 μ m (Herrera-Giraldo y col., 2009).

En relación al tamaño y forma de los tricomas, Levin (1973) reporta que este criterio ha sido usado principalmente con propósitos taxonómicos; sin embargo, el papel principal de ellos está asociado a la defensa contra insectos fitófagos, asociándolo a su vez con una defensa química por presentar en sus glándulas exudados tipo terpenos, fenoles, alcaloides y otras sustancias que repelen desde el punto de vista olfativo y gustativo. Además poseen paredes celulósicas, recubiertas de cutícula, o paredes secundarias lignificadas. Por otro lado, son muchos los estudios que han reportado una correlación positiva entre el número de tricomas glandulares y el grado de resistencia al ataque de insectos fitófago en plantas, afirmando además que

este podría ser un criterio de selección para la obtención de cultivares resistentes (Maluf y col. 2007).

Molina-Montenegro y col. (2006) reportan que tanto la densidad estomática y el grosor de las hojas son factores relevantes para definir el patrón de alimentación de algunas lepidópteras pertenecientes al género de *Actinotes*, indicando que la planta es más apetecible por insectos herbívoros en la medida que la cantidad de estomas por área foliar sea menor y que la cutícula sea más delgada. Estos resultados coinciden con los reportados por Tuff-Santos y col., (2008) trabajando con siete especies de Eucaliptus.

Ramiro y col., (2004) buscando la correlación entre los mecanismos de resistencia al minador del café y la caracterización anatómica de las hojas, encontraron que no existe tal correlación; sin embargo, reportan diferencias significativas entre el espesor del parénquima de empalizada y el grosor de la cutícula de la epidermis abaxial. Resultados similares fueron reportados por Rodríguez y col., (2009) al indicar que dentro de las características anatómicas foliares estudiadas, el grosor de la cutícula abaxial y la densidad estomática son las variables con mayor grado de asociación a la condición de resistencia o susceptibilidad a sigatoka en clones de *Musa*.

En algunas plantas resistentes al ataque de insectos, se ha encontrado la presencia de cristales de oxalato de calcio afectando el comportamiento de alimentación por la presencia de tales minerales en el floema. Los cristales de oxalato de calcio juegan un papel importante en la clasificación taxonómica de las especies, así como mecanismos de defensa de las plantas al ataque de insectos y patógenos. Existen diferentes tipos de cristales de oxalato de calcio, siendo los más abundantes en monocotiledóneas los estiloides, rafidios y drusas (Prychid y Rudall, 1999; Ronald, 1997). Londoño (2002) indica que la cutícula en las Poaceas puede ser lisa o esculturada y que sus paredes están impregnadas de sílice o carbonato de calcio, lo que les da resistencia al ataque de algunos insectos fitófagos.

6. Marcadores Genéticos

Son definidos como cualquier característica heredable asociada o correlacionada con una característica o rasgo de interés. Los marcadores genéticos permiten determinar grupos de ligamiento a partir del análisis hereditario de las diferentes características, el análisis de estos grupos de ligamiento conforman un mapa genético.

Un mapa genético no es más que la representación física del genoma de una planta. El objetivo de un programa de mapeo es obtener una resolución fina de la estructura del genoma, con el fin de poder seleccionar, con marcadores asociados, la característica de interés en el cultivo, además de identificar los genes responsables de las diferentes características, pudiendo así superar las limitaciones de costo y tiempo de los programas de mejoramiento (Dávalos, 1997).

Entre los marcadores genéticos utilizados tenemos:

- **Marcadores Morfológicos**

Los marcadores morfológicos fueron los primeros en ser mapeados, son fácilmente observables y segregan de manera mendeliana, por lo general controlados por un solo gen, dependen del estado de desarrollo de la planta, dificultando su incorporación en los programas de mejoramiento. Estos marcadores están ampliamente influenciados por el ambiente, lo que afecta la expresión genética, siendo ésta una de sus mayores desventajas.

Se han realizado mapas de ligamiento en arroz a partir de uso de marcadores morfológicos, bioquímicos y fisiológicos, los cuales han permitido determinar al menos un grupo de ligamiento por cromosoma. (Krush y col., 2005).

Sherwood (1996) determinó, utilizando marcadores morfológicos, que existe una relación entre la resistencia al manchado foliar producido por *Pyrenophora bromi* en *Bromus inermis* y la formación de la pared celular y la arquitectura de la nervadura foliar.

- **Marcadores Moleculares**

Las características genéticas de los individuos de una especie y la relación que pueda existir entre ellos ha sido determinada por la combinación de características

morfológicas, agronómicas o bioquímicas, sin embargo, todas ellas están afectadas por las condiciones ambientales y es por ello que su validez ha sido muy debatida en los últimos años. Los marcadores de ADN han generado un gran polimorfismo lo que provee un buen estimado de la diversidad genética de las poblaciones (Ferreira y Grattapaglia, 1998; Ferch, 1987).

Los distintos marcadores moleculares ampliamente utilizados en arroz, han permitido mapear en forma rápida el genoma, donde se han utilizado más de 18000 microsatélites, de los cuales 2400 son únicos para el cultivo. Además, se han utilizado otros marcadores como RAPD, RFLP, AFLP, CAPS y SNPs, estos últimos se han utilizado con mucho énfasis para determinar el polimorfismo de un nucleótido en la secuencia del ADN. (Lorieux, 2005).

La aplicación de estas técnicas moleculares en los programas de mejoramiento convencional, permiten determinar con mayor precisión el genotipo correspondiente a un determinado individuo o fenotipo. Los marcadores moleculares ayudan no solo a mejorar la eficiencia del proceso de selección, sino que además permiten seleccionar para múltiples caracteres en poblaciones segregantes y construir mapas de ligamiento (Lorieux, 2005; Picca y col., 2004; Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Los marcadores de ADN basados en la técnica de la PCR (Reacción en Cadena de la Polimerasa) están fundamentados en la síntesis enzimática de millones de copias de un segmento específico del ADN en presencia de una polimerasa de ADN estable. Para ello se utilizan uno o dos oligonucleótidos o primers que se hibridizan por complementariedad en cada uno de los extremos de segmento de ADN a amplificar (Picca y col., 2004).

Los microsatélites o SSR son regiones genómicas muy variables formadas por un grupo de pares repetidas (1-4) en secuencia de copia única. La base genética del polimorfismo de los microsatélites viene dada por la variabilidad del número de repeticiones en tándem y en consecuencia del tamaño del microsatélite amplificado. Son ampliamente utilizados en especie autógamas por el alto polimorfismo presente por locus. La separación de esos alelos es posible mediante la electroforesis en geles

de poliacrilamida y son visualizados través de la tinción con bromuro de etidium o nitrato de plata (Ferreira y Grattapaglia, 1998; McCouch y col., 1997).

El genoma del arroz está cubierto en casi su totalidad por los marcadores de microsatélites (aproximadamente 1 cada 15-20cM) siendo usados en dactiloscopia de ADN, protección vegetal, conservación y uso de germoplasma, análisis de caracteres cuantitativos (QTL's), identificación de genes y mejoramiento asistido por marcadores (Arnao, 2003).

El análisis de los QTL's se basa en la teoría del ligamiento y recombinación, para ello se requiere de poblaciones segregantes en desequilibrio de ligamiento. Desde el punto de vista molecular los QTL's son definidos como la región del genoma de una especie donde el polimorfismo de un marcador molecular está estrechamente asociado con la expresión del carácter de naturaleza cuantitativa (Campos y Salvo, 1995).

Se han encontrado QTL's en varios cultivos asociados con características de rendimiento, caracteres agronómicos de tipo morfológicos y de calidad del producto final, resistencia a plagas y enfermedades, entre otros. (Ferreira y Grattapaglia, 1998).

Actualmente el Departamento de Agricultura de los Estados Unidos (USDA, por sus siglas en Inglés) junto con Investigadores de la Universidad de Purdue (Indiana, USA) desarrollan diferentes estrategias que permitan prolongar la resistencia del trigo al ataque de la mosca Hessian (*Mayetiola destructor*). Para lograr estas estrategias, mejoradores y biólogos moleculares se encuentran realizando investigaciones en la búsqueda de genes de resistencia en los distintos genotipos del trigo, estudiando los diferentes mecanismos de resistencia involucrada, así como la identificación a través de los marcadores de ADN. Entre una de las metas propuestas por este grupo de investigadores está la identificación de marcadores moleculares asociados con resistencia a insectos tanto en el genoma del arroz como del trigo, con el objeto de hacer coincidir los genes individuales de resistencia y crear una resistencia múltiple (www.btny.purdue.edu/USDA-ARS/Williams_lab/Williams_lab.html).

Desde 1991, Katiyar y col., (1998) reportan que se ha introducido una variante en los métodos de identificación molecular basados en PCR. Esta variante ha sido el uso

de poblaciones segregantes, con la finalidad de mapear genes de interés agrícola con mayor precisión y eficiencia en el uso de las técnicas.

Los mapas de ligamiento son constituidos sobre la base de datos obtenidos de una población segregante, para ello es importante seleccionar líneas parentales genéticamente divergentes o polimórficas para los marcadores a evaluar, realizar los cruzamientos para la obtención de poblaciones segregantes (F2, RC, líneas doblehaploides y líneas recombinantes), analizar la segregación de la descendencia y la presencia de grupos de ligamiento mediante programas estadísticos tales como Joinmap 3 o MapMaker. (Waugh, 1997).

Los progresos de la genética arroceras comprenden la descripción de más de 400 genes mutantes que influyen en caracteres morfológicos, fisiológicos, bioquímicos y de reacción al ataque de insectos, enfermedades y estrés abiótico, igualmente se han establecido doce grupos de ligamiento en los 12 cromosomas a través de marcadores moleculares (Krush y col., 2005).

Estudios conducidos por Jena y col., (2005) sobre la selección de un marcador asociado a genes de resistencia al saltahojas marrón en arroz (*Nilaparvata lugens*) en arroz, demostraron que los marcadores ADN basados en PCR han sido rápidamente aplicables en un programa de mejoramiento para resistencia a *Tagasodes orizicolus* en diez accesiones del Banco de Germoplasma del CIAT, y poder así mejorar la eficiencia de selección en los programas de mejoramiento genético del cultivo (Triana y col., 2004).

MATERIALES Y MÉTODOS

El ensayo fue llevado en cuatro fases:

Fase I. Obtención de las generaciones F_1 y F_2 provenientes del cruce entre cultivares resistentes y susceptibles al daño mecánico producido por sogata.

Fase II. Evaluación del daño mecánico y mecanismos de resistencia a nivel de invernadero.

Fase III. Caracterización Morfoanatómica de los parentales.

Fase IV. Selección de los marcadores de ADN (SSR) para la tipificación molecular del carácter.

Fase I. Obtención de las generaciones F_1 y F_2 provenientes del cruce entre cultivares resistentes y susceptibles al daño mecánico producido por sogata.

Esta fase se llevó a cabo en el campo Experimental del Instituto de Genética de la Universidad Central de Venezuela (UCV), para ello, se sembraron cinco materiales, seleccionados con base a las características morfológicas y agronómicas reportadas por Aproscello (2001) y de acuerdo con los resultados reportados por Álvarez y col., (2000) sobre el grado resistencia al daño mecánico producido por sogata bajo condiciones de campo. En el Cuadro 2 se muestran los materiales seleccionados.

Cuadro 2. Cultivares de arroz utilizado en el ensayo y reportado como resistente y susceptible al daño mecánico producido por sogata

Resistentes/Tolerantes	Susceptibles
Cimarrón	Venezuela 21
D-Sativa	Bluebonnet 50
Zeta 15	

Se utilizaron cruces en una sola dirección, ya que no se ha reportado efecto materno para este carácter, tomando como parental femenino a los materiales resistentes y el masculino a los materiales susceptibles.

Para la obtención de la F_1 se siguió el método simplificado para cruzamiento en arroz de acuerdo al FLAR (1996), sembrando en forma escalonada con el objeto de sincronizar la floración de los parentales. Plántulas de 25-30 días de germinadas fueron trasplantadas a melgas de aproximadamente 5m de largo, utilizando cinco hileras por material con el objeto de seleccionar las hileras centrales y así evitar el efecto de bordura.

El proceso de polinización se realizó a primera hora de la mañana, cuando ocurre la anthesis o liberación del polen, previa emasculación de las florecillas femeninas, sacudiendo sobre ellas el polen del parental masculino seleccionado. Inmediatamente se identificó el cruce y se cubrió la panícula con una bolsa; a la semana de haber realizado la polinización, se destaparon las panículas para evitar la pérdida de semillas F_1 por exceso de humedad y temperatura.

Después de 25-30 días de la fertilización, se contó el número de semillas normales F_1 ; se requieren entre 30-50 semillas para generar una población F_2 abundante (FLAR, 1996).

Las semillas F_1 fueron sembradas en semilleros y luego trasplantadas al campo en melgas de $50m^2$ para obtener la población F_2 por autofecundación de las plantas F_1 , cosechando solo las hileras centrales de cada cruce. Debido a la poca cantidad de semillas F_2 cosechada, se procedió a multiplicar los materiales y así obtener semillas de las familias $F_{2,3}$, obteniéndose semillas solo de los cruces Cimarrón x BB50; ZETA 15 x BB50, Zeta15 x Venezuela 21 y D-Sativa x Venezuela 21 (Cuadro 3). Se aplicaron las prácticas culturales (fertilización y control de plagas y enfermedades) necesarias para el cuidado y desarrollo de las plantas.

Fase II. Evaluación del daño mecánico y mecanismos de resistencia a nivel de invernadero

La evaluación sobre el grado de resistencia al daño mecánico causado por sogata se realizó de acuerdo con la metodología seguida por el Laboratorio de Protección Vegetal de la Fundación DANAC, San Javier, Edo. Yaracuy. Para ello, se utilizaron los parentales y descendientes de la generación F_{2:3} así como también los testigos universales para resistencia y susceptibilidad, Makalioka y Blue Bonnett 50, respectivamente (Cuadro 3).

Para la evaluación del daño mecánico se utilizaron insectos provenientes de una colonia sana, la cual fue formada a partir de insectos recolectados en campos de arroz del estado Portuguesa y evaluados de manera individual con la finalidad de observar si las plantas utilizadas para la alimentación estaban sanas o presentaban síntomas de daño ocasionado por el virus de hoja blanca. Los insectos de las plantas sanas se seleccionaron y criaron en jaulas de 1 x 0,8 x 0,8 m, durante varios ciclos. (Triana y col. 2003)

Las familias fueron sembradas en bandejas plásticas colocadas en hileras de aproximadamente 12 cm de longitud, a razón de 15 semillas/hilera. A los 15 días se realizó el raleo dejando 10 plantas por hilera, las que constituyeron la unidad experimental. La infestación se realizó, siguiendo la metodología propuesta por Triana y col. (2003), con ninfas del 4to y 5to instar y adultos provenientes de una colonia sana, a razón de 5 insectos por planta. La evaluación fue realizada de acuerdo a la escala del IRRI (Cuadro 1), cuando el testigo susceptible Bluebonnet 50 presentaba un nivel de daño igual a 7 (>50% plantas muertas). El ensayo fue sembrado bajo un diseño completamente al azar con tres repeticiones.

Mecanismos de resistencia a daño mecánico de los parentales

Los mecanismos de resistencia fueron evaluados únicamente en los parentales, debido a la complejidad de las evaluaciones en poblaciones segregantes, para ello se procedió a evaluar los siguientes parámetros: antixenosis empleando la metodología

de la alimentación con alternativa en círculo; antibiosis para sobrevivencia y antibiosis para ovoposición con alimentación forzada.

Cuadro 3. Evaluación en las familias F_{2:3} y Parentales de daño mecánico a Sogata.

Parentales	Cruzamiento	Identificación de familias	Número de familias F _{2:3}
Cimarrón	Cimarrón x BB-50	CB	17
D-Sativa	Zeta 15 x BB-50	ZB	12
Zeta 15	Zeta 15 x Vzla 21	ZV	17
Venezuela 21	D-Sativa x Vzla 21	DV	31
Makalioka	Testigo Resistente	Total de familias	77
Bluebonnet-50	Testigo Susceptible		

Antixenosis empleando la metodología de la alimentación con alternativa en círculo

Semillas de los parentales Cimarrón, D-Sativa, Venezuela 21, Zeta 15, Bluebonnet-50 y Makalioka fueron sembrados en invernadero, a razón de 10 semillas por cada material, en materos de 7,5cm de alto x 9,0cm de ancho, bajo condiciones de invernadero y un diseño de bloques completos al azar con cuatro repeticiones. A los ocho días después de la siembra (dds) se raleó a cinco plantas por matero y se fertilizó con urea (46% N).

Veinticinco días después de la siembra, los parentales fueron colocados, siguiendo una disposición circular, en jaulas entomológicas de 80cm de alto x 100cm de ancho, donde cada jaula corresponde a un bloque del diseño experimental. Posteriormente se procedió a recolectar y contabilizar los insectos entre el 4to y 5to estado ninfal, proveniente de una colonia sana, empleando una dosis de cinco insectos por plantas, para un total de 600 insectos. Para el momento de la infestación, se liberaron 150 insectos por jaula, los mismos fueron colocados en el centro del círculo formado por los materos que contenían los materiales. La evaluación del número de insectos posados sobre las plantas fue realizada a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la infestación (hdi).

Antibiosis para sobrevivencia

Diez semillas de cada parental y testigo fueron colocadas en materos de 9,5cm de alto x 11,5cm de diámetro, bajo condiciones de invernadero y un diseño completamente al azar con tres repeticiones. El raleo se realizó a los 8 dds dejando cinco plantas por matero y se fertilizó con urea (46%N). A los 15 dds las plantas fueron cubiertas con unas microjaulas elaboradas con botellas de plástico transparente de 2l, inmediatamente cada microjaula fue infestada con 10 parejas de adultos jóvenes, para un total de 180 parejas, evaluándose diariamente el número de insectos muertos por parcela durante 21 días o hasta que todos hayan muerto en Bluebonnet-50.

Antibiosis para ovoposición

Para esta prueba de antibiosis para ovoposición se empleó la metodología de alimentación forzada. Para ello, cinco semillas de cada parental fueron sembradas en el invernadero en materos de 9,5 cm de alto x 11,5 cm de diámetro, bajo un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones. A los 8 dds se procedió a ralear a razón de una planta por matero y se fertilizó con urea (46%N). A los 29 dds los materos fueron cubiertos con microjaulas plásticas elaboradas con botellas de plástico transparente de 2l, seguidamente se liberó una pareja de insectos jóvenes adultos por matero, por parental y por repetición, para un total de de 24 parejas de insectos (48 insectos), los cuales provenían de una colonia secuencial sana establecida para tal fin. Después de siete u ocho días de la inoculación se procedió a realizar el conteo de los huevos colocados en la nervadura principal de cada hoja, utilizando para ello una aguja de disección y con la ayuda de una lupa estereoscópica (10X) se realizó el conteo por planta.

Fase III. Caracterización morfoanatómica de los parentales

Con la finalidad de observar las diferencias anatómicas entre los parentales, y tomando en consideración que a nivel de invernadero el insecto se alimenta principalmente de plantas de arroz jóvenes, ya que los tejidos son más tiernos y apetecibles, se procedió a tomar muestras de tejido foliar proveniente del ensayo de

antixenosis, después de ocho días de la infestación. Para ello se seleccionó la tercera hoja y de ella se tomó el tercio medio para el análisis histoquímico.

Las muestras fueron fijadas en una solución de FAA 70% (formalina, ácido acético y etanol 70%) hasta que fueran procesadas en el Laboratorio de Anatomía Vegetal del Centro de Investigaciones en Biotecnología Agrícola del Instituto de Genética (CIBA-IGen) de la UCV.

El estudio de las epidermis en vista paradérmica se realizó luego de someter el material vegetal a un proceso de macerado parcial con una solución de agua destilada e hipoclorito de sodio al 2,5% (V:V), la tinción se realizó con azul de toluidina acuosa (0,5%) y el montaje se hizo en una solución glicerina-agua (V:V), preparándose láminas semipermanentes. Los cortes de las secciones transversales fueron realizados a mano alzada, y teñidos con azul de toluidina acuosa al 1%. Las observaciones fueron realizadas en un microscopio marca Nikon Eclipse E200, equipado con una cámara digital Pixelink Capture SC.

Se evaluaron las características anatómicas asociadas con la resistencia al daño mecánico producido por el insecto, entre ellas: grosor de la cutícula (incluye grosor de la pared celular externa), presencia y tipo de tricomas (macro y micropelos y agujones), presencia de cuerpos silicios y cristales de oxalato de calcio, todas estas observaciones fueron realizadas en la epidermis adaxial y abaxial del tercio medio de la tercera hoja formada.

Con la finalidad de disminuir el error experimental al momento de realizar las mediciones, el grosor de la cutícula fue medido en el área comprendida entre el haz vascular de la nervadura principal y el haz vascular siguiente. Se utilizó un diseño completamente al azar con cuatro repeticiones, donde los tratamientos estuvieron representados por cada uno de los parentales. Dentro de cada repetición se montaron cinco láminas microscópicas por tratamiento. Cinco observaciones fueron realizadas por lámina, obteniéndose 25 observaciones por tratamiento o cultivar por repetición.

Para el análisis de los datos se efectuó un análisis de varianza (ANAVAR) previa revisión del cumplimiento de los supuestos, utilizando la media de cada repetición. La diferencia entre medias se evaluó a través de la prueba de Duncan. En el caso de

las variables que no cumplieron con los supuestos del ANAVAR, el análisis se realizó vía no paramétrica, empleando la prueba de Kruskal-Wallis.

Fase IV. Identificación de los marcadores de ADN (SSR) para la tipificación molecular del carácter

Las actividades correspondientes a la evaluación molecular se realizaron en el Laboratorio de Genética Molecular del CIBA-IGen de la UCV.

Evaluación del Polimorfismo entre los Progenitores

La evaluación del polimorfismo entre los progenitores de cada uno de los cruces, fue realizada mediante el uso de 151 marcadores microsatélites del arroz, distribuidos a lo largo de los doce cromosomas del genoma (Cuadro 4).

Obtención del ADN Genómico de los Cinco Progenitores

El ADN de cada progenitor fue obtenido siguiendo los pasos de la metodología descrita por Risterucci y col., (2000) y modificado por Pérez-Almeida y col., (2011), como se detalla a continuación:

1. En tubos de 30mL se colocó 0,5g del tejido macerado y se agregó 5mL del tampón de extracción (100mM Tris-HCl pH 8.0, 1,4M NaCl, 20mM EDTA, 2% CTAB, 1% polietilen-glicol y 0,5% de sulfito de sodio), precalentado a 74°C. Se aplicó vortex por 3s. En el protocolo original se utilizan 75 °C para el precalentamiento e incubación.
2. Los tubos fueron incubados a 74°C durante 20min, se les aplicó vortex por 10s y se dejaron enfriar a temperatura ambiente. Se agregaron 5mL de cloroformo: alcohol isoamílico (24:1) a cada tubo y se agitaron por inversión unas 50 veces, para ser centrifugados a 10.000 rpm durante 15 min.
3. El sobrenadante se transfirió a un tubo nuevo con 5mL de isopropanol frío, agitando suavemente hasta observar la formación del pelet de ADN.

4. Los tubos fueron colocados un mínimo de 2h a -20°C. Con la ayuda de una pipeta Pasteur se transfirió el pelet a un tubo de microcentrífuga de 1,5mL y se resuspendió entre 500 a 1.000µL de TE (50mM Tris-HCl, 0,7M NaCl, 10mM EDTA).

Otras modificaciones realizadas al protocolo de Risterucci *et al.*, (2000):

5. Al pelet resuspendido se le agregaron 500uL de TE 1X y 50µL de acetato de sodio 3M pH 5,2, para mezclar por inversión de los tubos.
6. Se agregaron 500µL de isopropanol frío, mezclando por inversión los tubos y colocándolos sobre hielo durante 20 min. Los tubos fueron centrifugados a 14.000 rpm por 10 min, el sobrenadante descartado y el pelet se lavó dos veces con 500µL de etanol 70%.
7. El etanol fue descartado y se dejó secar el tubo a temperatura ambiente.
8. Se le agregaron 100 – 500µL TE 1X y se dejó resuspender el ADN a 4°C, para su posterior almacenamiento a -20°C
9. La calidad y cantidad del ADN obtenido fueron verificadas mediante electroforesis en gel de agarosa 0,8%, teñido con Bromuro de etidio 0,05%. Los geles fueron visualizados en un transiluminador UV y fotografiados con un analizador de imágenes BIO-RAD Gel DocTM XR.

Condiciones de Amplificación Reacción en Cadena de la Polimerasa

Las condiciones de amplificación por PCR utilizadas fueron descritas por Arnao (2003), con algunas modificaciones del Laboratorio de Genética Molecular del CIBA (Cuadro 5) y los ciclos y las temperaturas para la amplificación en arroz se especifican en el Cuadro 6.

Cuadro 4. Microsatélites empleados en la evaluación molecular para la determinación del polimorfismo de las cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.).

Nº	SSR	C	Motivo repetido	pb	Secuencia del Iniciador		T
					Sentido	Antisentido	
1	RM1	1	(GA)26	113	GCGAAAACACAATGCAAAAA	GCGTTGGTTGGACCTGAC	55
2	RM5	1	(GA)14	113	TGCAACTTCTAGCTGCTCGA	GCATCCGATCTTGATGGG	55
3	RM9	1	(GA)15GT(GA)2	136	GGTGCCATTGTGCTCCTC	ACGGCCCTCATCACCTTC	55
4	RM14	1	(GA)18	191	CCGAGGAGAGGAGTTGCGAC	GTGCCAATTTCTCGAAAAA	55
5	RM23	1	(GA)15	145	CATTGGAGTGGAGGCTGG	GTCAGGCTTCTGCCATTCTC	55
6	RM1117	1	(AG)12	143	TTCCGGTACCTCCTGACATC	ACCAGAACTTCTGTTAGCGC	55
7	RM165	1	(CT)13	185	CCGAACGCCTAGAAGCGCGTCC	CGGCGAGGTTTGCTAATGGCGG	67
8	RM212	1	(CT)24	136	CCACTTTCAGCTACTACCAG	CACCCATTTGCTCTCATTATG	55
9	RM220	1	(CT)17	127	GGAAGGTAAGTGTTCACAC	GAAATGCTTCCCACATGTCT	55
10	RM226	1	(AT)38	274	AGCTAAGGTCTGGGAGAAACC	AAGTAGGATGGGGCACAAGCTC	55
11	RM237	1	(CT)18	130	CAAATCCCAGACTGCTGTCC	TGGGAAGAGAGCACTACAGC	55
12	RM283	1	(GA)18	151	GTCTACATGTACCCTGTTGGG	CGGCATGAGAGTCTGTGATG	55
13	RM306	1	(GT)18(AT)8CT(GT)6	155	CAAGGTCAAGAAATGCAATGG	GCCACTTTAATCATTGCATC	55
14	RM315	1	(AT)4(GT)10	133	GAGGTACTTCCCTCCGTTTAC	AGTCAGCTCACTGTGCAGTG	55
15	RM243	1	(CT)18	116	GATCTGCAGACTGCAGTTGC	AGCTGCAACGATGTTGTCC	55
16	RM259	1	(CT)17	162	TGGAGTTTGAGAGGAGGG	CTTGTTCATGGTGCCATGT	55
17	RM490	1	(CT)13	101	ATCTGCACACTGCAAAACACC	AGCAAGCAGTGCTTTCAGAG	55
18	RM499	1	(TA)22	116	TACCAAACACCAACACTGCG	ACCTGCAGTATCCAAGTGTACG	55
19	RM543	1	(GCG)10	98	CTGCTGCAGACTCTACTGCG	AAATATTACCCATCCCCCCC	55
20	RM572	1	(TC)14	159	CGGTTAATGTATCTGATTGG	TTCGAGATCCAAGACTGACC	55
21	RM575	1	(AG)24	201	CAATTTCCATAGGCTGCATG	GCTTGGGTTAGCGACGAC	55
22	RM580	1	(CTT)19	221	GATGAAGTCAAAATTTGCATCC	CACTCCCATGTTTGGCTCC	55
23	RM582	1	(TC)20	231	TCTGTTGCCGATTTGTTCCG	AAATGGCTTACCTGCTGTCTC	55
24	RM6	2	(AG)16	163	GTCCCCCTCACCCAATTC	TCGTCTACTGTTGGCTGCAC	55
25	RM8	2	(GA)14C(GA)2	252	CACGTGGCGTAAATACACGT	GGCCAAACCCTAACCCCTG	55
26	RM29	2	(GA)7	250	CAGGGACCACCTGTCCATAC	AACGTTGGTCATATCCGTTGG	55
27	RM53	2	(GA)14	182	ACGTCTCGACGCATCAATGG	CACAAGAACTTCTCCGGTAC	55
28	RM174	2	(AGG)7(GA)10	208	AGCGACGCCAAGACAAGTCGGG	TCCACGTCGATCGACACGACGG	67
29	RM203	2	(AT)21	203	CCTATCCCATTAGCCAACATTGC	GATTTACCTCGACGCCAACCTG	55
30	RM207	2	(CT)25	118	CCATTGCTGAGAAAGATCTGA	CACCTCATCCTCGTAACGCC	55
31	RM211	2	(TC)3A(TC)18	161	CCGATCTCATCAACCAACTG	CTTCACGAGGATCTCAAAGG	55
32	RM213	2	(CT)17	139	ATCTGTTTGCAGGGGACAAG	AGGTCTAGACGATGCTGTGA	55
33	RM221	2	(TC)4T3C3(TC)(CT)2	192	ACATGTCAGCATGCCACATC	TGCAAGAATCTGACCCGG	55
34	RM236	2	(CT)18	191	GCGCTGGTGGAAAATGAG	GGCATCCCTCTTTGATTCTC	55
35	RM290	2	(GA)12	142	ACCCTTATTCCTGCTCTCCTC	GTGCTGTAGATGGAAGGGAG	55
36	RM300	2	(GTT)14	121	GCTTAAGGACTTCTGCGAACC	CAACAGCGATCCACATCATC	55
37	RM322	2	(CAT)7	112	CAAGCGAAAAATCCAGCAG	GATGAAACTGGCATTGCCTG	55
38	RM324	2	(CAT)21	175	CTGATTCACACACTTGTGC	GATTCCACGTCAGGATCTTC	55
39	RM240	2	(CT)21	132	CCTTAATGGGTAGTGTGCAC	TGTAACCATTCCCTCCATCC	55
40	RM241	2	(CT)21	132	CCTTAATGGGTAGTGTGCAC	TGTAACCATTCCCTCCATCC	55
41	RM250	2	(CT)17	153	GGTTCAAACCAAGCTGATCA	GATGAAGGCTTCCACGCAG	55
42	RM450	2	(AG)17	143	AAACCACAGTAGTACGCCGG	TCCATCCACATCTCCCTCTC	55
43	RM498	2	(CA)10	213	AATCTGGGCCTGCTCTTTTC	TCCTAGGGTGAAGAAAGGGG	55
44	RM525	2	(AAG)12	131	GGCCCGTCCAAGAAATATTG	CGGTGAGACAGAATCCTTACG	55
45	RM526	2	(TAAT)5	240	CCCAAGCAATACGTCCCTAG	ACCTGGTCATGACAAGGAGG	55
46	RM550	2	(CCT)8	231	CTGAGCTCTGGTCCGAAGTC	GGTGGTGAAGAAGCAGGAAG	55
47	RM555	2	(AG)11	223	TTGGATCAGCCAAAGGAGAC	CAGCATTGTGGCATGGATAC	55
48	RM561	2	(GA)11	190	GAGCTGTTTTGGACTACGGC	GAGTAGCTTCTCCACCCC	55

Cuadro 4. Continuacion

Nº	SSR	C	Motivo repetido	pb	Secuencia del Iniciador		T
					Sentido	Antisentido	
49	RM7	3	(GA)19	180	TTCCGCATGAAGTCTCTCG	CCTCCCATCAITTCGTTGT	55
50	RM16	3	(TCG)5(GA)16	181	CGCTAGGGCAGCATCTAAA	AACACAGCAGGTACCGCC	55
51	RM114	3	(GA)7	209	CAGGGACGAATCGTCGCCGAG	TTGGCCCCCTTGAGGTTGTCGG	55
52	RM186	3	(CGG)5	124	TCCTCCATCTCCTCCGCTCCCG	GGGCGTGGTGGCCCTCTCGTC	61
53	RM200	3	(GA)16	122	CGCTAGGGAATTTGGATTGA	CGATGAGCAGGTATCGATGAGAAG	55
54	RM231	3	(CT)16	182	CCAGATTATTTCTGAGGTC	CACTTGCATAGTTCTGCATTG	55
55	RM232	3	(CT)24	158	COGGTATCCTTCGATATTGC	CCGACTTTTCTCCTCTGACG	55
56	RM282	3	(GA)15	136	CTGTGTCGAAAGGCTGCAC	CAGTCTGTGTTGCAGCAAG	55
57	RM251	3	(CT)29	147	GAATGGCAATGGCGCTAG	ATGCGGTTCAAGATTTCGATC	55
58	RM489	3	(ATA)8	271	ACTTGAGACGATCGGACACC	TCACCCATGGATGTTGTCAG	55
59	RM523	3	(TC)14	148	AAGGCATTGACAGTAGAAGC	GCACCTGGGAGGTTTCGATG	55
60	RM532	3	(CA)9	180	TCTATAATGTAGCCCCCCC	TTTCAGGGGCTTCTACCAAC	55
61	RM545	3	(GA)30	226	CAATGGCAGAGACCCAAAAG	CTGGCATGTAACGACAGTGG	55
62	RM554	3	(GA)14	259	GTTCTGTCCTCTCTCTCTCTC	CCCAAAAATCTGTGCTCTCTC	55
63	RM569	3	(CT)16	175	GACATTTCTCGTTGCTCCTC	TGTCCCCTCTAAAACCCCTCC	55
64	RM142	4	(CGG)7	240	CTCGCTATCGCCATCGCCATCG	TCGAGCCATCGCTGGATGGAGG	67
65	RM261	4	C9(CT)8	125	CTACTTCTCCCCTTGTGTCG	TGTACCATCGCCAAATCTCC	55
66	RM185	4	(AGG)9	197	AGTTGTTGGGAGGGAGAAAGGCC	AGGAGGCGACGGCGATGTCCTC	61
67	RM317	4	(GC)4(GT)18	155	CATACTTACCAGTTCACCGCC	CTGGAGAGTGTACAGTAGTTGA	55
68	RM335	4	(CTT)25	104	GTACACACCCACATCGAGAAAG	GCTCTATGCGAGTATCCATGG	55
69	RM349	4	(GA)16	136	TTGCCATTCGCGTGGAGGGCG	GTCCATCATCCCTATGGTCTG	55
70	RM273	4	(GA)11	207	GAAGCCGTCGTGAAGTTACC	GTTTCTACTCTGATCGCGAC	55
71	RM252	4	(CT)19	216	TTGCTGACGTGATAGGTTG	ATGACTTGTATCCCGAGAAGC	55
72	RM518	4	(TC)15	171	CTCTTCACTCACTCACCATGG	ATCCATCTGGAGCAAGCAAC	55
73	RM551	4	(AG)18	192	AGCCCACTAGCATGATTG	GAAGGCGAGAGGATCACAG	55
74	RM13	5	(GA)6-(GA)16	141	TCCAACATGGCAAGAGAGAG	GGTGGCATTCGATTCAG	55
75	RM26	5	(GA)15	112	GAGTCGACGAGCGGACAGA	CTGCGAGCGACGGTAACA	55
76	RM31	5	(GA)15	140	GATCACGATCCACTGGAGCT	AAGTCCATTACTCTCCTCCC	55
77	RM164	5	(GT)16TT(GT)4	246	TCTTGGCCGTCACCTGCAGATATCC	GCAGCCCTAATGCTACAATTTCTTC	55
78	RM169	5	(GA)12	167	TGGCTGGCTCCGTGGGTAGCTG	TCCGTTGCGGTTGATCCCTCC	67
79	RM173	5	(GA)9	186	CCTACTCAGCATCCCCCCTC	CCATGAGGAGGAGCGGGGATC	67
80	RM178	5	(GA)5(AG)8	117	TCGCGTAAAGATAAGCGGGCGC	GATCACCCTTCCCTCCGCTGTC	67
81	RM208	5	(CT)17	173	TCTGCAAGCCTTGTCTGATG	TAAGTCGATCATTGTGTGGACC	55
82	RM541	5	(TC)16	158	TATAACCGACCTCAGTGCCC	CCTTACTCCCATGCCATGAG	55
83	RM563	5	(CCT)6	185	CGACCCTAGGGTTTCTCC	CTCGACGTCGTGGAAGC	55
84	RM3	6	(GA)2GG(GA)25	145	ACACTGTAGCGGCCACTG	CCTCCACTGCTCCACATCTT	55
85	RM30	6	(AG)9A(GA)12	105	GGTTAGGCATCGTACCGG	TCACCTACCACACGACACG	55
86	RM400	6	(ATA)63	321	ACACCAGGCTACCCAAACTC	CGGAGAGATCTGACATGTGG	55
87	RM170	6	(CCT)7	121	TCGCGCTTCTCCTCGTGCAGC	CCCGCTTGCAGAGGAAGCAGCC	55
88	RM190	6	(CT)11	124	CTTTGTCTATCTCAAGACAC	TTGCAGATGTTCTTCTGATG	55
89	RM204	6	(CT)44	169	GTGACTGACTTGGTCATAGGG	GCTAGCCATGCTCTCGTACC	55
90	RM225	6	(CT)18	140	TGCCCATATGGTCTGGATG	GAAAGTGGATCAGGAAGGC	55
91	RM238	6	(CT)15	147	GATGGAAAGCAGTGCACATA	ACAGGCCAATCCGTAGACTCG	55
92	RM527	6	(GA)17	233	GGCTCGATCTAGAAAATCCG	TTGCACAGGTTGCGATAGAG	55
93	RM528	6	(AGAT)9	232	GGCATCCAATTTTACCCCTC	AAATGGAGCATGGAGGTCAC	55
94	RM539	6	(TAT)21	272	GAGCGTCTTGTAAAACCG	AGTAGGGTATCACGCATCCG	55
95	RM2	7	(GA)1	150	ACGTGTACCCGCTTCTCT	ATGTCCGGATCTCATCG	55
96	RM10	7	(GA)15	159	TTGTCAAGAGAGGATCG	CAGAATGGAAAATGGGTCC	55
97	RM11	7	(GA)17	140	TCTCCTTCTCCCCGATC	ATAGCGGGCAGGGCTTAG	55
98	RM51	7	(GA)13	142	TCTCGATTCAATGTCTCCTCG	CTACGTCATCATGCTTCTCC	55
99	RM134	7	(CCA)7	93	ACAAGGCCGCGAGAGGATTCCG	GCTCTCCGGTGGCTCCGATTGG	55
100	RM70	7	(ATT)33	170	GTGGACTTCAATTTCACTCG	GATGTATAAGATAGTCCC	55
101	RM3743	7	(GA)17	180	TAGCCTTGTTCATCCATCC	CTTCTCCCTCTCTCTTCC	50
102	RM5420	7	(TC)16	127	CCTGATCTCAACACACACGC	GAACTCTTGTGGCGGATG	55
103	RM214	7	(CT)14	112	CTGATGATAGAACTTCTCTC	AAGAACAGCTGACTTCAAA	55
104	RM248	7	(CT)25	102	TCCTTGTGAAAATCTGGTCCC	GTAGCCTAGCATGGTGCATG	55
105	RM542	7	(CT)22	113	TGAATCAAGCCCTCACTAC	CTGCAACGAGTAAGGCAGAG	55

Cuadro 4. Continuación

Nº	SSR	C	Motivo repetido	pb	Secuencia del Iniciador		T
					Sentido	Antisentido	
106	RM15	8	(CGT)6(CGG)5	0	CACGACGACGACGAGCAGCAGC	GCTCGAGGGAGAGCGACCTGCC	61
107	RM44	8	(GA)16	99	ACGGGCAATCCGAACAACC	TCGGGAAAACCTACCCATACC	55
108	RM137	8	(CT)7	218	GACATCGCCACCAGCCACCAC	CGGGTGGTCCCCGAGGATCTTG	55
109	RM149	8	(AT)10	253	GCTGACCAACGAACCTAGGCCG	GTTGGAAGCCTTTCCTCGTAACACG	55
110	RM210	8	(CT)23	140	TCACATTCGGTGGCATTG	CGAGGATGGTTGTTCACTTG	55
111	RM223	8	(CT)25	165	GAGTGAGCTTGGGCTGAAAC	GAAGGCAAGTCTTGGCACTG	55
112	RM230	8	AGG)4(GA)9A(AG)13	257	GCCAGCCGTGGATGTTCC	CACCGCAGTCACTTTCAAG	55
113	RM310	8	(GT)19	105	CCAAAACATTTAAAATATCATG	GCTTGTGGTCAATACCATTC	55
114	RM256	8	(CT)21	127	GACAGGGAGTGATTGAAGGC	GTGATTCGCCAAGGGC	55
115	RM160	9	(GAA)23	131	AGTAGCAGCTATAGCTTAGCTGGAGAT	TCTCATCGCCATGCGAGGCCTC	55
116	RM201	9	(CT)17	158	CTCGTTTATTACTACAGTACC	CTACCTCCTTCTAGACCGATA	55
117	RM205	9	(CT)25	122	CTGGTCTGTATGGGAGCAG	CTGGCCCTTACGTTTCAGTG	55
118	RM215	9	(CT)16	148	CAAAATGGAGCAGCAAGAGC	TGAGCACCTCCTTCTCTGTAG	55
119	RM219	9	(CT)17	202	CGTCGGATGATGTAAGCCT	CATATCGGCATTCGCCTG	55
120	RM285	9	(GA)12	205	CTGTGGGCCAATAATGTCCAC	GGCGGTGACATGGAGAAAG	55
121	RM316	9	(GT)8-(TG)9(TTTG)4(TG)4	192	CTAGTTGGGCATACGATGGC	ACGCTTATATGTTACGTCAAC	55
122	RM409	9	(AGC)8	96	CCGTCTTCTGCTAGGGATTTC	GGGGTGTITGCTTCTCTG	55
123	RM242	9	(CT)26	225	GGCCAACGTGTGTATGTCTC	TATATGCCAAGACGGATGGG	55
124	RM245	9	(CT)14	150	ATGCCGCCAGTGAATAGC	CTGAGAATCCAATTATCTGGGG	55
125	RM566	9	(AG)15	239	ACCCAACACGATCAGCTCG	CTCCAGGAACAGCTCTTTC	55
126	RM184	10	(CA)7	219	ATCCCATTCGCCAAACCCGGCC	TGACACTGGAGAGCGGTGTGG	55
127	RM216	10	(CT)18	146	GCATGGCCGATGGTAAAG	TGTATAAAACACACGGCCA	55
128	RM222	10	(CT)18	213	CTTAAATGGGCCAATGCGC	CAAAGCTTCCGGCCAAAAG	55
129	RM228	10	(CA)6(GA)36	154	CTGGCCATTAGTCCTTGG	GCTTGGGGCTCTGCTTAC	55
130	RM311	10	(GT)3(GTAT)8(GT)5	179	TGGTAGTATAGGACTAAACAT	TCCTATACATACAACATAC	55
131	RM239	10	(AG)5TG(AG)2	144	TACAAAATGCTGGGTACCCC	ACATATGGGACCCACCTGTC	55
132	RM258	10	(GA)21(GGA)3	148	TGCTGTATGTAGCTCGACC	TGGCCTTTAAAGCTGTGCG	55
133	RM4	11	(GA)16	159	TTGACGAGGTACAGCACTGAC	AGGGTGTATCCGACTCATCG	55
134	RM21	11	(GA)18	157	ACAGTATTCCTAGGCACGG	GCTCCATGAGGGTGGTAGAG	55
135	RM139	11	(CT)5	386	GAGAGGGAGGAAGGGAGGCGGC	CTGCCATGGCAGAGAAGGGGCC	55
136	RM144	11	(ATT)11	237	TGCCCTGGCGCAAATTTGATCC	GCTAGAGGAGATCAGATGGTAGTCATC	55
137	RM332	11	(CTT)5-12-(CTT)14	183	GCGAAGGCCGAAGGTGAAG	CATGAGTATCTCACTACCCC	55
138	RM167	11	(GA)16	128	GATCCAGCGTGAGGAACAGCT	AGTCCGACCACAAGGTGCGTTGTC	55
139	RM187	11	(AT)29(GT)7	146	CCAAGGGAAAGATGCGACAATTG	GTGGACGCTTTATATTATGGG	55
140	RM202	11	(CT)30	189	CAGATTGGAGATGAAGTCTCC	CCAGCAAGCATGTCAATGTA	55
141	RM209	11	(CT)18	134	ATATGAGTGTCTGTCTGCG	CAACTTGATCTCCCTCC	55
142	RM224	11	(AAG)8(AG)13	157	ATCGATCGATCTTACGAGG	TGCTATAAAAGGCATTCGGG	55
143	RM229	11	(TC)11(CT)5C3(CT)5	116	CACTCACACGAACGACTGAC	CGCAGGTTCTTGTGAAATGT	55
144	RM254	11	(TC)6ATT(CT)11	165	AGCCCCGAATAAATCCACCT	CTGGAGGAGCATTTGGTAGC	55
145	RM12	12	(GA)21	184	TGCCCTGTTATTTTCTTCTCTC	GGTGATCCTTTCCCATTTCA	55
146	RM6869	12	(TG)8	126	GAGCTCCTTGTAGTGACCCG	ATCAGCCTCGCCAGCTTC	61
147	RM235	12	(CT)24	124	AGAAGCTAGGGCTAACGAAC	TCACCTGGTCAAGCTCTTTC	55
148	RM309	12	(GT)13	169	GTAGATCACGCACCTTCTG	AGAAGGCTCCGGTGAAG	55
149	RM247	12	(CT)16	131	TAGTGCCGATCGATGTAACG	CATATGGTTTGACAAAGCG	55
150	RM519	12	(AAG)8	122	AGAGAGCCCTAAATTTCCG	AGGTACGCTCACCTGTGGAC	55
151	RM453	12	(TC)10	178	CGCATCTCTCCCTTATCG	CTCTCCTCTCGTTGCTGC	55

Cuadro 5. Coctel para la amplificación SSR-PCR en arroz (*O. sativa* L.)

Reactivo	Concentración Final
ADN	1,33ng.µL ⁻¹
MgCl ₂	3,33mM
Buffer	1X
SSR (F y R)	0,2µM
dNTP's	0,33µM
Taq comercial	0,033U. µL ⁻¹
Volumen Final	15

Cuadro 6. Condiciones de Amplificación (PCR)

PASO	TEMPERATURA	TIEMPO
1	95°C	4min
2	94°C	15s
3	55, 61 ó 67°C	15s
4	72°C	15s
5	Ir al paso 2	(34 veces)
6	72°C	5 min
7	10°C	30 min
8	FIN	-----

Electroforesis y Revelado con Nitrato de Plata

Se siguieron los pasos del protocolo detallado por Arnao (2003), para la preparación, condiciones electroforéticas en geles desnaturizantes y tinción con nitrato de plata.

Análisis de ADN de los cinco progenitores

A partir de las bandas observadas en los geles de poliacrilamida, se realizó el análisis de los alelos de cada cruce para cada progenitor. Con la información de las evaluaciones de los ADN, de cada uno de los materiales y los perfiles electroforéticos obtenidos en los geles de poliacrilamida, se generó una matriz de presencia ($p = 1$) y ausencia ($a = 0$) por cada alelo detectado en cada progenitor para cada microsatélite utilizado. La matriz obtenida con todos los marcadores fue analizada con el programa estadístico PAST versión 1.42, mediante análisis multivariado de conglomerados jerárquicos, este análisis generó un árbol de clasificación jerárquica ascendente, utilizando el análisis de agrupamiento UPGMA y la distancia de Dice.

Herencia de la resistencia al daño mecánico en Familias F_{2,3}

Se realizó una prueba de χ^2 con los valores de daño mecánico observados en cada una de las familias evaluadas con la finalidad de determinar la herencia del carácter.

RESULTADOS Y DISCUSIONES

Fase I. Obtención de las generaciones F₁ y F₂ provenientes de los cruces entre cultivares resistentes y susceptibles al daño mecánico producido por sogata.

Después de repetir el proceso de polinización de los materiales en dos períodos diferentes, se encontró un bajo porcentaje de semillas F₁ llenas, quizás producto de algún tipo de incompatibilidad gamética entre los materiales, como ha sido reportado por Lin e Ikehashi (1993). A pesar de ello y tomando en consideración lo postulado por el FLAR (1996) sobre el número de semillas F₁ requeridas para iniciar una población F₂, se procedió a contabilizar el número de semillas llenas obtenidas en cada cruce; encontrándose valores muy bajos de semillas llenas por panícula (Cuadro 7).

Cuadro 7. Número de semillas F₁ obtenidas por cruces

Cruce	Num. de semillas F ₁
Cimarrón x Bluebonnet 50	17
D-Sativa x Venezuela 21	65
Cimarrón x Venezuela 21	6
Zeta 15 x Bluebonnet 50	57
Zeta 15 x Venezuela 21	28

La cantidad de semillas F₂ obtenida fue muy baja debido a que durante el proceso de llenado de las panículas hubo un ataque de pájaros, que posiblemente afectó el llenado de los granos en algunos cruces, razón por la cual el peso promedio de semillas no estuvo basado en el peso de 100 semillas, sino en el promedio de semillas obtenidas por familia.

Las familias F_{2,3} constituidas por la progenie de los cruces Zeta 15 x BB50 y Zeta 15 x Venezuela-21 mostraron además de una gran cantidad de semillas vanas, la presencia de aristas y cariósipide oscura; razón por la cual se seleccionaron solo aquellas familias que presentaron una cantidad considerable de semillas, sin arista y cariósipide amarilla para ser utilizadas en las evaluaciones de resistencia al daño mecánico. Para el cruce de Cimarrón x BB50 todas las semillas

fueron viables y en el caso de D-Sativa x Venezuela-21 solo el 47,6% fueron viables (Cuadro 8).

Cuadro 8. Cantidad de familias F_{2:3} obtenidas por cruce, peso promedio/familia (g/familia) y número de familias seleccionadas para evaluar resistencia.

Cruce	Identificación del cruce	Cantidad de familias F _{2:3}	Peso X (g/familia)	Num. Familias seleccionadas
Cimarrón x BlueBonnet 50	CB	17	24.0	17
D-Sativa x Venezuela 21	DV	65	18.89	31
ZETA 15 x Bluebonnet 50	ZB	46	9.04	12
ZETA 15 x Venezuela 21	ZV	25	5.85	17
Total de familias		153		77

Fase II. Evaluación del daño mecánico y mecanismo de resistencia a nivel de invernadero de cultivares de arroz.

Se encontraron diferencias significativas ($p < 0,5$) para la resistencia al daño mecánico a sogata (Cuadro 9) y el número de plantas muertas (Cuadro 11) entre los cultivares de arroz evaluados, donde la prueba de comparación de medias de Duncan arrojó la formación de dos grupos en cada caso, uno constituido por las cultivares cultivadas y el testigo de resistencia Makalioka y el otro grupo formado únicamente por el testigo susceptible Bluebonnet 50 (Cuadros 10 y 12).

Cuadro 9. Análisis de varianza para la variable escala de daño mecánico para los parentales de arroz.

F.V.	gl	CM
Genotipo	5	20,23 (0.0259)
Error	12	4.83
Total	17	
CV	62.81	

Cuadro 10. Comparación de medias de Duncan para la variable escala de daño mecánico de los cultivares de arroz.

Genotipo	Medias	n	
MAKALIOKA	1,33	3	A
D-SATIVA	1,67	3	A
Venezuela-21	2,33	3	A
Cimarrón	3,0	3	A
Zeta 15	4,33	3	A
BB50	8,33	3	B

Cuadro 11. Análisis de Varianza para la variable número de plantas muertas de los cultivares de arroz.

F.V.	GI	CM
Genotipo	5	26 (0,0013)
Error	12	3,11
Total	17	
CV	54,7	

Cuadro 12. Comparación de medias de Duncan para la variable número de plantas muertas de los cultivares de arroz.

Genotipo	Medias	n	
Venezuela21	1,33	3	a
D-Sativa	1,33	3	a
Makalioka	1,67	3	a
Cimarrón	2,67	3	a
Zeta 15	3,33	3	a
BB50	9	3	b

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

MECANISMOS DE RESISTENCIA

Antixenosis empleando la metodología de alimentación con alternativa en círculo.

No se encontraron diferencias significativas ($p < 0,10$) para la variable número de insectos posados a las 24, 48 y 72 hdi sobre los cultivares evaluados (Cuadro 13), por lo que no hubo ninguna preferencia de los insectos en posarse, siendo todos los cultivares, incluyendo el testigo de resistencia Makalioka, igualmente atractivos para los insectos durante las primeras 72hdi; sin embargo, se observaron diferencias en el número de insectos posados a las 96hdi (Cuadro 13).

Los altos valores en los coeficientes de variación están asociados con la variabilidad natural debida al uso de insectos con diferentes grados de desarrollo (4to y 5to instar y adultos), dando así una alta variabilidad en los datos analizados.

La prueba de medias de Duncan (Cuadro 14) para la variable número de insectos posados a las 96 hdi mostró la formación de tres grupos bien diferenciados, donde el primer grupo estuvo constituido por el testigo de resistencia Makalioka y el cultivar D-Sativa, el segundo grupo compuesto por Cimarrón, Venezuela-21 y Zeta 15 y el último grupo formado solamente por el

testigo de susceptibilidad BB50. Estos resultados demostraron que las plantas ubicadas en los grupos A y AB presentan un mecanismo de no preferencia y de preferencia intermedia respectivamente al daño mecánico producido por el insecto, el cual puede estar asociado con alguna característica física-química de las plantas que produce que el insecto no se pose sobre ellas, impidiendo su alimentación y postura de huevos, tal como lo señalan varios autores en arroz y otros cultivos de interés agrícola (Dildar y col., 2010; Hassan, 2010; Pathak, 1977).

Cuadro 13. Análisis de la Varianza para la variable número de insectos posados a las 24, 48, 72 y 96hdi. ($\alpha= 0,1$)

F.V	gl	CM			
		24di	48hdi	72hdi	96hdi
Genotipo	5	51,54(0,60)	69,87 (0,689)	136,7(0,454)	157,8(0,099)
Repetición	3	11,49	6,11	37,44	5,78
Error	18	70,57	113,4	138,9	71,61
CV		65,67	74,31	69,33	56,42

Los resultados hallados difieren del reportado por González-Vera y col. (2012) cuando se refieren a que la cultivar D-Sativa exhibe una antixenosis intermedia reflejada por una baja preferencia de los insectos a medida que pasa el tiempo y a la cultivar Venezuela 21 como un material altamente antixenótico.

Cuadro 14. Comparación de medias de Duncan para la variable número de insectos posados a las 96hdi.

Genotipo	Medias	n	Grupo
Makalioka	7,75	4	a
D-Sativa	9,75	4	a
Cimarrón	12,25	4	ab
Venezuela-21	16	4	ab
Zeta 15	20,25	4	ab
BB50	24	4	b

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0,10$)

Antibiosis para sobrevivencia

No se observaron diferencias significativas de sobrevivencia de los insectos entre los cultivares, lo que indica que los cultivares utilizados no presentan un mecanismo antibiótico para sobrevivencia, ya que los insectos fueron capaces de

alimentarse aún de las plantas resistentes. Estos resultados coincidieron con los reportados por Erckhoff y col. (2008) trabajando con los mecanismos de resistencia presentes en el pasto búfalo, al chinche (*Blissus occiduus* Barber), indicando ninguna diferencia significativa para sobrevivencia entre los materiales resistentes y susceptibles, señalando que la antibiosis para sobrevivencia no fue un factor importante de resistencia al daño mecánico producido por la chinche y que la resistencia presente en el pasto búfalo fué debida a la presencia de antixenosis.

Sin embargo, estos hallazgos difieren de los encontrados por González-Vera y col. (2012), quienes reportan una antibiosis intermedia para sobrevivencia de los cultivares D-Sativa y Venezuela 21, lo cual se asocia con el biotipo de sogata utilizado, ya que los insectos utilizados provenían de una recolecta realizada en Calabozo, Edo. Guárico.

Antibiosis para ovoposición

Al utilizar la metodología de alimentación forzada para ovoposición, se detectaron diferencias significativas ($\alpha = 0,05$) entre los genotipos (Cuadro 15), lo que indica la presencia de un mecanismo de antibiosis para ovoposición.

La prueba de comparación de medias de Duncan (Cuadro 16) mostró la formación de tres grupos. Un primer grupo formado por la cultivar Makalioka (testigo universal de resistencia), la cual presentó los niveles más bajos de ovoposición como era de esperarse e indicativo de un alto nivel antibiótico. Un segundo grupo formado por D-Sativa y Venezuela-21, los cuales mostraron niveles intermedio de antibiosis para la postura de huevos por parte del insecto y un tercer grupo conformado por aquellos materiales (Zeta 15 y Cimarrón) que mostraron un alto número de huevos en su tejido foliar y similares a los encontrados en el material susceptible (BB50) demostrando su bajo nivel antibiótico.

Cuadro 15. Análisis de la Varianza para la variable Número de huevos

F.V.	gl	CM
Genotipo	5	2886,97 (0,0565)
Error	18	1036,01
Total	23	
CV	50,03	

En la Figura 2 podemos notar el número de huevos contabilizados por cultivar, obsérvese la relación inversa con el grado de antibiosis encontrado, ya que a menor número de huevos mayor antibiosis o repelencia a la ovoposición como ocurre con el cultivar Makalioka.

Cuadro 16. Comparación de medias de Duncan para la variable número de huevos.

Genotipo	Medias	n	Grupo
Makalioka	27,25	4	a
D-Sativa	41,5	4	ab
Venezuela-21	55,5	4	ab
Zeta 15	84	4	b
Bluebonnet 50	84,25	4	b
Cimarrón	93,5	4	b

Letras distintas indican diferencias significativas ($p \leq 0.05$)

Los resultados de este ensayo coinciden con los reportados por González-Vera y col. (2012) y Pardley y col. (1996), quienes concordaron en el comportamiento de los testigos de resistencia (Makalioka) y susceptibilidad (BB50), al presentar alta y baja antibiosis para ovoposición respectivamente. Por otro lado, el número de huevos encontrados en D-Sativa y Venezuela 21, están muy cercanos a los valores encontrados por González-Vera y col. (2012), siendo catalogadas con antibiosis intermedia para ovoposición por parte del insecto sogata.

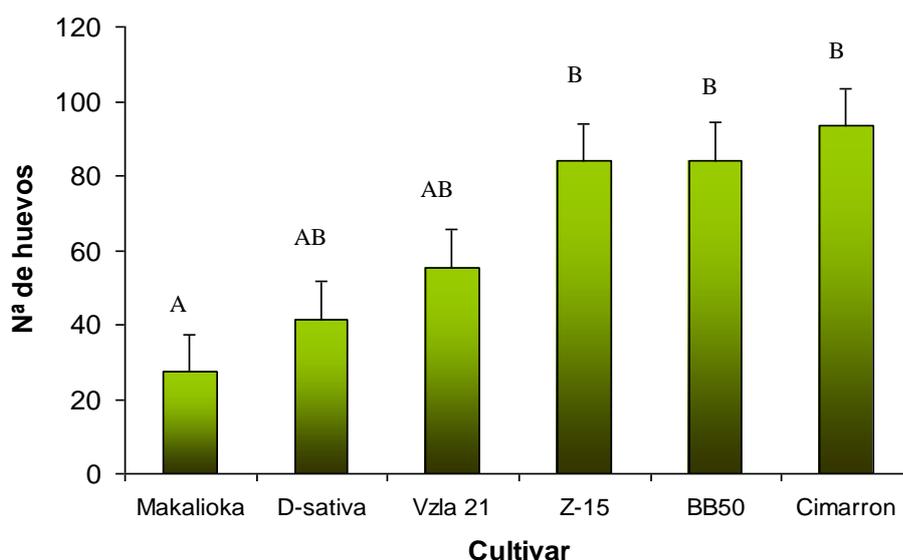


Figura 2. Número de huevos de sogata contabilizados por cultivar.

En la Figura 3 podemos notar la presencia de huevos en la nervadura principal de las hojas de las plantas afectadas.

El efecto observado en los cultivares con alta e intermedia antibiosis puede deberse a diferencias morfo-anatómicas del tejido foliar, como son: presencia de micropelos y grosor de las cutículas adaxial y abaxial, como también a la activación de algún mecanismo bioquímico debido a la presencia del insecto y que estos mecanismos se expresan constitutivamente como factores que mejoran la resistencia ya que se inducen una vez que ataca el insecto (Cardozo y col. 2009; Howe y Schaller, 2008).



Figura 3. Huevos de sogata en la nervadura principal de la hoja de arroz (40X).

Los resultados aquí hallados coinciden con los reportados por Senguttuvan y col. (2003) quienes trabajando bajo condiciones de laboratorio para medir el impacto de los mecanismos de resistencia de antixenosis (preferencia) y antibiosis para ovoposición al saltahoja marrón del arroz *Nilaparvata lugens* Stål, demostraron que la resistencia de la cultivar PTB33 estuvo asociada con la menor cantidad de huevos colocados en comparación con el material susceptible TN1.

Fase III. Caracterización morfoanatómica de los parentales

El análisis estadístico para la variable grosor de la cutícula, cara adaxial y abaxial, mostró diferencias altamente significativas entre los genotipos (Cuadro 17), estos resultados demuestran una asociación con los mecanismos de resistencia al daño mecánico que presentan los parentales al ataque de sogata.

De acuerdo con lo reportado por varios autores (Rodríguez y col., 2009; Ramiro y col., 2004), el grosor de la cutícula es una de las características que

afecta el comportamiento de los insectos herbívoros y patógenos para alimentarse y ovoposicionar, siendo este un mecanismo de resistencia al ataque de plagas y la transmisión de enfermedades.

Cuadro 17. Análisis de la Varianza para la variable grosor de la cutícula (μm) de la cara adaxial y abaxial del tejido foliar.

F.V.	gl	CM	
		Cara Adaxial	Cara Abaxial
Genotipo	5	0,79 (0,0001)	0,67 (<0,0001)
Error	18	0,07	0,05
Total	23		
CV		9,18	9,76

La prueba de medias de Duncan para el grosor de la cutícula de la cara adaxial (Cuadro 18) arrojó la formación de tres grupos diferenciados: Un primer grupo formado por el parental BB50, testigo universal de susceptibilidad al daño mecánico producido por sogata, el cual presentó el valor más bajo de grosor de la cutícula (1,96 μm), esto demuestra la facilidad que presenta el insecto para alimentarse y colocar sus posturas sobre el tejido foliar en este cultivar. Un segundo grupo constituido por Zeta 15 y Makalioka, esta última a pesar de ser el testigo de resistencia, presentó un valor medio de grosor de la cutícula (2,34 μm) en comparación con la media observada en el grupo tres que oscilo entre 2,74 y 3,07 μm para Venezuela-21, Cimarrón y D-Sativa, esta diferencia en el grosor de la cutícula ocasiona una mayor resistencia al insecto a penetrar su estilete en el tejido y poder alimentarse.

Estudios anatómicos realizados por Melo y col. (2002) demostraron la presencia de una cutícula más gruesa en la cara adaxial de plantas de Asteraceae las cuales no fueron atacadas por larvas de lepidópteros en comparación con las plantas afectadas, indicando además la presencia de compuestos fenólicos en aquellas plantas que siendo atacadas no se vieron afectadas por el ataque del minador.

Cuadro 18. Comparación de medias de Duncan para la variable grosor de la cutícula (μm) cara adaxial.

Genotipo	Medias	n	
BB50	1,96	4	a
Zeta 15	2,34	4	b
Makalioka	2,34	4	b
Venezuela-21	2,74	4	c
Cimarrón	3,05	4	c
D-Sativa	3,07	4	c

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

En la cara abaxial se observó la formación de seis grupos, donde el primer grupo estuvo formado por el testigo de susceptibilidad BB50 y Zeta 15, y a partir del segundo grupo mostraron un mayor grosor de la cutícula, haciendo la diferencia con el testigo de resistencia Makalioka (Cuadro 19), este carácter pudiera estar asociado a una diferencia taxonómica; Sin embargo, Se observó una correlación negativa entre el grosor de la cutícula de la cara abaxial y el número de insectos posados a las 96h (Anexo 16), este análisis permitió confirmar la preferencia de los insectos por el cultivar Bluebonnet 50 debido a la poca resistencia anatómica que tuvo el insecto para alimentarse.

La correlación del grosor de la cutícula entra ambas caras fue altamente significativa, demostrando que los insectos pueden posarse indistintamente sobre la cara adaxial y abaxial, como fue observado durante la ejecución del ensayo (Anexo 16).

Cuadro 19. Comparación de medias de Duncan para la variable grosor de la cutícula (μm) cara abaxial del tejido foliar.

Genotipos	Medias	n	
BB50	1,95	4	a
ZETA 15	2,01	4	a
Makalioka	2,38	4	b
Venezuela 21	2,57	4	bc
D-Sativa	2,75	4	cd
Cimarrón	2,99	4	d

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

Número de Micropelos

En el Cuadro 20 se observan las diferencias altamente significativas entre los genotipos para la variable número de micropelos/mm² en la cara adaxial y abaxial del tejido foliar, siendo este una variable que pudiera indicar el nivel de resistencia del cultivar, al daño directo e indirecto producido por sogata.

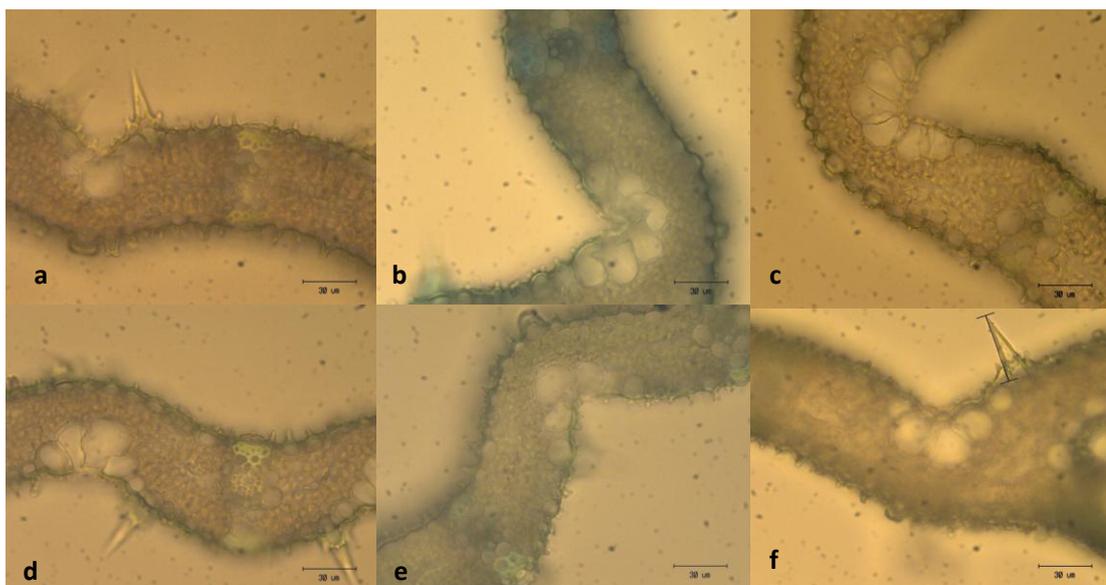


Figura 4. Grosor de la cutícula en la cara abaxial, incluye grosor de la pared celular externa, de los cultivares: a. Cimarrón, b. D-Sativa, c. Venezuela 21, d. Makalioka, e. Zeta 15, f. BB-50. (10x)

Cuadro 20. Análisis de la Varianza para la variable número de micropelos/mm² en la cara adaxial y abaxial del tejido foliar.

F.V.	gl	CM	
		Cara adaxial	Cara abaxial
Genotipo	5	4471,71 (<0,0001)	6309,31(<0,0001)
Error	18	192,18	150,76
Total	23		
C.V		20,58	19,8

Al analizar las pruebas de medias de Duncan para el número de micropelos/mm² presentes en la cara adaxial y abaxial, se puede observar la formación de cinco (Cuadro 21) y cuatro (Cuadro 22) grupos bien diferenciados, donde el cultivar

BB50 (testigo de susceptibilidad) presenta la menor cantidad de micropelos por cara (21,92 micropelos/mm² en la cara adaxial y 0 micropelos/mm² en la cara abaxial) y Makalioka (testigo de resistencia) con valores intermedios en el número de micropelos presentes por cara (66,89 micropelos/mm² en la cara adaxial y 64,62 micropelos/mm² en la cara abaxial). Estos cultivares se encuentran ubicados en los grupos uno y tres, respectivamente.

La tendencia de los otros cultivares para formar grupos de medias, fue similar en ambas epidermis, lo que quiere decir que Cimarrón se ubica en el grupo dos en ambas epidermis con un número promedio de 54,97 micropelos/mm² en la cara adaxial y 30,57 micropelos/mm² en la abaxial. D-Sativa comparte el grupo tres con Makalioka con valores intermedios en ambas caras, mientras que Venezuela-21 y Zeta 15 se ubican en dos grupos diferentes en la cara adaxial y en mismo grupo en la cara abaxial, con los mayores números de micropelos por unidad de área.

En la Figura 5 se puede visualizar las diferencias observadas entre los cultivares en relación al número de micropelos y presencia de aguijones en la cara adaxial del tejido foliar, corroborando así la hipótesis planteada por varios autores quienes reportan la influencia que estas estructuras poseen para desarrollar resistencia al ataque de insectos (Howe y Schaller, 2008; Ellis, 1986)

Cuadro 21. Comparación de medias de Duncan para la variable número de micropelos/mm² en la cara adaxial del tejido foliar.

Genotipo	Medias	n	
BB50	11,72	4	a
Cimarrón	54,97	4	b
Makalioka	66,89	4	bc
D-Sativa	71,42	4	bc
Venezuela 21	88,35	4	c
Zeta 15	110,75	4	d

Letras distintas indican diferencias significativas(p<=0,05)

Estos resultados nos indican, que los genotipos que presentaron un número de micropelos por unidad de área superior a la observada en Makalioka con 66,89 en la cara adaxial o 64,62 en la abaxial, presentan una mayor resistencia al ataque del

insecto, afectando así su comportamiento para ovoposición, coincidiendo con lo reportado por Singh y Singh (2005), quienes señalaron una estrecha asociación entre resistencia del insecto a posarse en la planta hospedera y la cantidad de pelos o pubescencia presente en el tejido foliar; indicando además que en algodón, el ataque de *Empoasca spp* estuvo asociado de manera consistente al número de pelos presentes en el tejido foliar, a mayor número de pelos mayor fue la resistencia al ataque del insecto.

Cuadro 22. Prueba de comparación de medias de Duncan para la variable número de micropelos/mm² en la cara abaxial del tejido foliar.

Genotipos	Medias	<u>n</u>	
BB50	0,00	4	a
Cimarrón	30,57	4	b
Makalioka	64,62	4	c
D-Sativa	78,40	4	c
Zeta 15	98,52	4	d
Venezuela21	100,02	4	d

Letras distintas indican diferencias significativas(p<=0,05)

Por otro lado, Showler (2009) refirió este carácter morfológico asociado como un mecanismo de no preferencia al ataque del picudo del algodón (*Anthonomus grandis*), similarmente Erckhoff y col (1998) indicaron que la presencia de micropelos en el tejido foliar de los cultivares de pasto búfalo resistentes a la chinche (*Blissus occiduus* Barber) es debida a un mecanismos de antixenosis que afectan el comportamiento del insecto.

Calatayud y Munera (2000) reportaron que el mecanismo de resistencia en yuca al ataque de trips, se debió a la alta pilosidad encontrada en las hojas de las plantas resistentes, ya que estas afectaron el establecimiento y la alimentación sostenida de la plaga en la planta.

A pesar de los resultados aquí observados, el análisis de correlación no detectó relación alguna entre los micropelos y los mecanismos de resistencia (Anexo 16).

Número de Macropelos

Para la característica número de macropelos en la cara adaxial y abaxial (Cuadro 23) no se encontraron diferencias entre los genotipos. Sin embargo, se

observó una correlación significativa entre el número de macropelos en la cara abaxial y los insectos posados a las 96h (Anexo 16), estos resultados coinciden con lo reportado por varios autores (Dildar y col., 2010; Hassan, 2010; Pathak, 1977) al indicar que la antixenosis es producto de la acción de caracteres físicos presentes en el tejido foliar.

La presencia de macropelos parece estar asociada mas a una clasificación taxonómica que a un carácter indicativo de mecanismo de resistencia. Pathak (1977) indicó que aunque la vellosidad en la hoja bandera podría actuar como una barrera física a la postura de huevos del barrenador en arroz (borer moth), la no presencia o poca cantidad de macropelos observados en la cultivar resistente TKM-6 no la hace menos atractiva para que el insecto coloque sus huevos y esto está asociado con el desarrollo de nuevos biotipos de insectos.

Cuadro 23. Análisis de la Varianza para la variable número de macropelos/mm² en la cara adaxial del tejido foliar.

F.V	gl	CM	
		Cara adaxial	Cara abaxial
Genotipo	5	780,59(0,4897)	40,91(0,2334)
Error	18	840,35	26,38
Total	23		
CV		164,07	47,73

Longitud de los Macropelos

Se observó diferencias significativas para la longitud de los macropelos en ambas epidermis para cada uno de los materiales evaluados (Cuadro 24).

Cuadro 24. Análisis de la Varianza para la variable longitud de los macropelos (µm) en la cara adaxial del tejido foliar.

F.V.	gl	CM	
		Cara adaxial	Cara abaxial
Genotipo	5	61611,76 (0,0062)	37213,77 (0,0013)
Error	18	13026,6	5728,21
Total	23		
CV		70,35	49,01

La prueba de comparación de medias para la longitud de los macropelos presentes en la cara adaxial (Cuadro 25), permitió observar la formación de tres grupos bien diferenciados. Un primer grupo donde se encontraba tanto el material usado como testigo de resistencia Makalioka como el parental BB50 (testigo de susceptibilidad) además de Cimarrón y Venezuela-21. Un segundo grupo formado por Zeta 15 y un tercer grupo constituido por la cultivar D-Sativa. Estos resultados indican que la variable longitud del macropelo en la cara adaxial no es un carácter significativo para medir el grado de resistencia o susceptibilidad al daño mecánico producido por el insecto en arroz.

Por el contrario, en la cara abaxial, se observaron diferencias significativas entre los genotipos para la longitud de los macropelos, formándose seis grupos durante la comparación de medias de las longitudes (Cuadro 26). Un primer grupo donde estuvieron ubicados el cultivar Makalioka, Cimarrón y Venezuela-21, los cuales tuvieron un similar comportamiento para el tamaño de los macropelos, con valores comprendidos entre 52,45 y 90,26 μm . Un segundo grupo formado únicamente por Zeta 15 (169,9 μm). El cultivar BB50 está ubicado en el tercer grupo con una longitud promedio del macropelo de 226,75 μm y el último grupo constituido por D-Sativa con una longitud media de 301,97 μm , la cual presentó los tricomas más largos.

A pesar de las diferencias observadas entre los cultivares para la longitud del macropelo, este carácter pareciera no estar asociado con ningún mecanismo de resistencia, ya que estos macropelos son unicelulares, no secretores, tal como lo clasifica Ellis (1986) y han sido utilizados con fines taxonómicos dentro de las Poaceas.

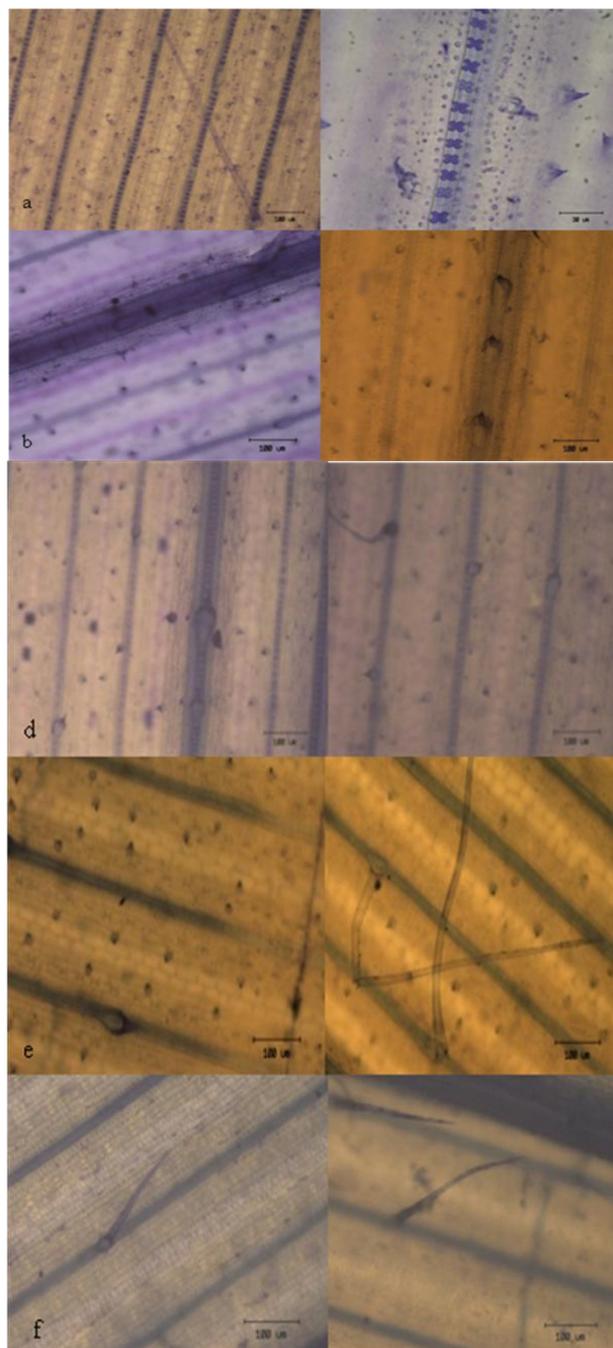


Figura 5. Número de micropelos y presencia de agujones en cultivares de arroz: a. ZETA 15; b. Venezuela-21; c. D-Sativa; d. Makalioka; e. Cimarrón; f. BB-50.

Cuadro 25. Comparación de medias de Duncan para la variable longitud de los macropelos (μm) en la cara adaxial del tejido foliar.

Genotipo	Medias	n	
Makalioka	61,07	4	a
Cimarrón	72,95	4	a
BB50	81,80	4	a
Venezuela21	149,83	4	a
Zeta 15	226,20	4	ab
D-Sativa	381,54		b

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

Cuadro 26. Comparación de medias de Duncan para la variable longitud de los macropelos (μm) en la cara abaxial del tejido foliar.

Genotipo	Medias	n	
Makalioka	52,45	4	a
Cimarrón	85,38	4	a
Venezuela 21	90,26	4	a
Zeta 15	169,69	4	ab
BB50	226,76	4	bc
D-Sativa	301,97	4	c

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

Esta característica de longitud del macropelo impide que los insectos se posen con facilidad sobre la epidermis de las plantas resistentes dificultando su alimentación y colocación de huevos.

Presencia de cuerpos silíceos

El análisis no paramétrico (Cuadro 27) para la variable presencia de cuerpos silíceos, mostró diferencias altamente significativas entre los cultivares evaluados, lo que demuestra que estos compuestos químicos interfieren con el comportamiento del insecto en los cultivares de arroz evaluados. Se detectó una correlación positiva significativa entre los cuerpos silíceos y la presencia de micropelos y macropelos en la cara adaxial y abaxial (Anexo 16). Giraldo-Cañas (2001) reportó que las células de sílice y las de corcho presente en las células cortas del tejido epidérmico de plantas de arroz están llenas de SiO_2 , este compuesto ha sido considerado por algunos autores como el principal mecanismo de defensa de las plantas a los insectos herbívoros, porque reduce la digestibilidad

y da mayor dureza y abrasividad al tejido (Mantener y Meyer, 2009; Granado-Sánchez y col. 2008; Massey y col. 2006).

Con el análisis de diferencia de medianas (Cuadro 28) se encontró la formación de dos grupos, donde un grupo estuvo solamente conformado por BB-50 (susceptible) y el otro grupo por el resto de los cultivares incluyendo Makalioka, testigo de resistencia a daño mecánico, esto explica por qué la mayoría de los materiales aquí evaluados presentaron cierto grado de resistencia al daño mecánico que produjo el insecto, aunado a los mecanismos de resistencia presentes y las características anatómicas de cada material. En la Fig. 8 se muestra las hileras de sílice presentes en el tejido epidérmico de los materiales evaluados.

Es de resaltar que la presencia de cuerpos silicios, aunado a un gran número de estructuras anatómicas (micropelos, papilas y aguijones) en el tejido epidérmico de la hoja, juega un papel importante al momento de seleccionar, para un programa de mejoramiento, materiales resistentes al daño mecánico que produce la sogata en arroz, coincidiendo con lo reportado por Nasca de Zamora (2011) y Howe y Jander (2001) al trabajar con otras especies de Poaceas.

La presencia de cuerpos silíceos estuvo correlacionada significativamente de forma positiva con la presencia de micropelos en el tejido epidérmico y negativamente con la presencia de macropelos en la cara adaxial (Anexo 16). Ellis (1979) reporta mayor contenido de sílice en las células presentes en el tejido intercostal (micropelos y aguijones) de la lamina foliar y en mayor proporción en la cara abaxial, coincidiendo con los resultados aquí reportados.

Cuadro 27. Prueba no paramétrica de Kruskal Wallis para la variable presencia de cuerpos silíceos. ($p \leq 0,05$)

Trat	N	Medias	D.E.	Medianas	H	p
BB-50	8	0,13	0,35	0	14,51	<0,0001
Cimarrón	8	0,75	0,46	1		
D-Sativa	8	1	0	1		
Makalioka	8	1	0	1		
Venezuela-21	8	1	0	1		
Zeta 15	8	1	0	1		

Cuadro 28. Prueba de medianas de Kruskal y Wallis para la variable presencia de cuerpos silíceos.

Trat.	Medianas	
BB-50	0	a
Cimarrón	1	b
Zeta 15	1	b
Venezuela-21	1	b
Makalioka	1	b
D-Sativa	1	b

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

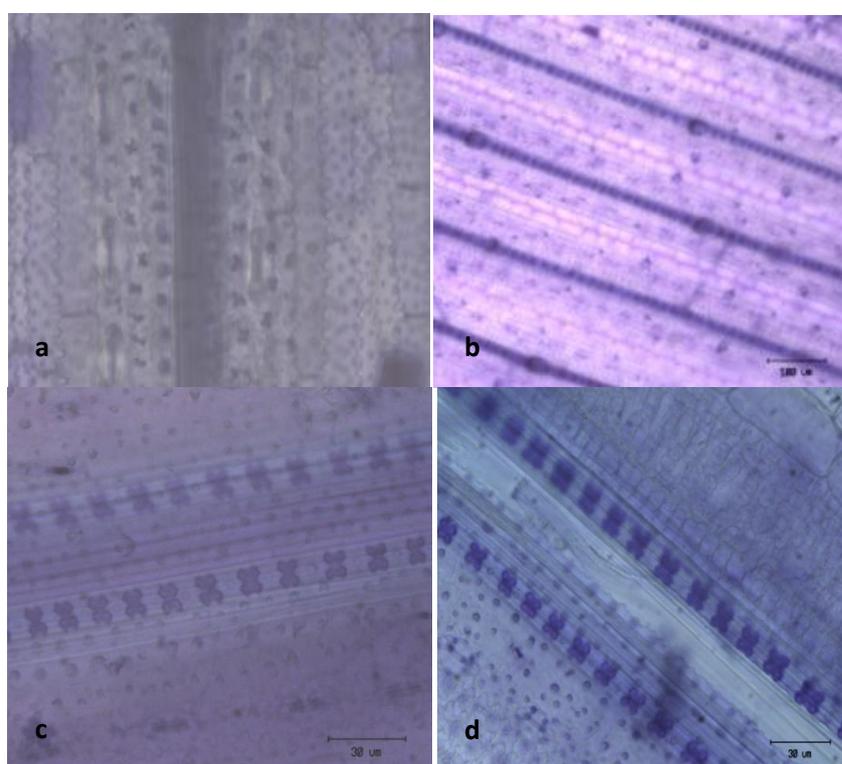


Figura 6. Presencia de cuerpos Silíceos en el tejido foliar de a. Cimarrón (10x); b. Venezuela-21 (10x); c. Makalioka (40x); d. D-Sativa (40x).

Análisis Regresión por paso (Step Wise Regresion) de las variables estudiadas.

Con la finalidad de seleccionar aquellas variables que estuvieran asociadas con el grado de resistencia al daño mecánico en arroz se procedió a realizar el análisis de regresión por pasos (Cuadro 29) con todas las variables independientes evaluadas, encontramos que las variables que estuvieron estrechamente

relacionadas fueron: número de insectos posados a las 96h, número de huevos y presencia de macropelos en la cara adaxial.

Cuadro 29. Análisis de Regresión por Pasos (Step Wise Regression) con intercepto.

Step	Variable	F Prob>F	Seq SS	R ²	Cp	p
1	96h	0,0015	26,1256	0,3732	3,6133	2
2	NHuevos	0,0734	6,345739	0,4639	2,198	3
3	Macad	0,0255	8,466393	0,5848	-0,359	4
4	GroAbx	0,2070	2,395459	0,6190	0,3521	5

A pesar que el grosor de la cara abaxial presentó un valor del determinante R² superior al 60%, este no fue significativo ($p < 0,05$), lo que indica que este valor no variaría si los mismos fueran colocados al azar. Las variables que realmente pudieran estar relacionada con la susceptibilidad al daño mecánico producido por el insecto son la presencia de macropelos en la cara adaxial y sobrevivencia a las 96h, las cuales fueron altamente significativas y con un valor de determinación de 58,48% y 37,32% respectivamente. Es de hacer resaltar que la variable sobrevivencia a las 96h fue la que mejor se adaptó al modelo ya que presentó el valor del coeficiente Cp (3,6133) más cercano al número de variables independientes seleccionadas que entraron a la ecuación de regresión resultante.

$$Y = 3.6566 - 0.066 (96h) - 0.016 (NHuevos) - 0.022 (Macad) + 0.9231 (GroAbx)$$

Fase IV. Uso de los microsatélites como marcador de ADN para la tipificación molecular del carácter resistencia al daño mecánico a sogata.

Calidad y concentración de ADN

La integridad del ADN extraído de los parentales (Figura 7) fue corroborada mediante electroforesis en geles de agarosa. En la mayoría de las muestra se observó ADN de calidad y concentraciones comprendidas entre 25 y 175ng.μL⁻¹ (Cuadro 30), así como la presencia de ARN en muchas de ellas. El ARN en las muestras fue degradado agregando ARNasa (Promega: RNase ONETM Ribonuclease M4265) bajo una dilución de 1:10 y dejándola actuar por una hora.

La excelente cantidad y concentración del ADN, permitió realizar diluciones para la PCR a concentraciones de ADN comprendidas entre 5 y 8 ng.μL⁻¹.

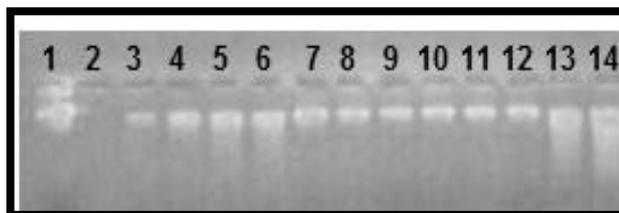


Figura 7. Cantidad y calidad del ADN. A) Progenitores y algunas familias F_{2,3}, en gel de agarosa 1%, tinción bromuro de etidio. (1) Fago Lambda 100ng.μL⁻¹, (2) Control negativo (vacío), (3) Zeta 15, (4) Venezuela-21, (5) Cimarrón, (6) D-Sativa, (7) BB-50, (8) Makalioka, (9) ZV-4, (10) ZV-10, (11) ZB-4, (12) ZB-1, (13) DV-29, (14) CB-13. B) Familias F_{2,3}

Cuadro 30. Cantidad de ADN obtenido para los progenitores y algunos cruces seleccionados al azar.

Genotipo	Concentración ADN ng.μL⁻¹
Zeta 15	25
Venezuela-21	100
Cimarrón	150
D-Sativa	150
BlueBonnet	200
Makalioka	100
ZV4	150
ZV10	100
ZB1	200
ZB4	200
DV29	150
CB13	175

Polimorfismo entre los parentales

De los 151 microsatélites evaluados para identificar el polimorfismo entre los parentales de los respectivos cruces realizados, 92 dieron polimórficos, encontrándose que el mayor porcentaje de microsatélites polimórficos fue observado en el cruce entre los cultivares Zeta 15 y BB50 con un 23,18%, seguido por el cruce entre Cimarrón y BB50 con un 20,53% encontrándose que el menor número de microsatélites polimórficos se observó en los cruces de D-Sativa x Venezuela-21 y Zeta 15 x Venezuela 21 con un 12,58% y un 4,64% respectivamente (Cuadro 31).

Los 35 marcadores polimórficos encontrados entre Zeta 15 y BB50 estaban distribuidos a lo largo de todo el genoma de los cultivares, donde el 25,71% de

los SSR's polimórficos se ubican en el cromosoma 2, seguido con un 14,29% de los microsatélites ubicados en el cromosoma 3 (Cuadro 32), encontrándose la presencia de dos alelos (Cuadro 33).

Cuadro 31. Porcentaje de microsatélites (SSR) polimórficos entre los cruce realizados

Cruce	Progenitores	Nº SSR polimórficos	% SSR polimórficos
1	Zeta 15 x BB50	35	23,18
2	D-Sativa x Venezuela 21	19	12,58
3	Cimarrón x BB50	31	20,53
4	Zeta 15 x Venezuela 21	7	4,64

Por otro lado, entre D-Sativa y Venezuela 21 se localizaron 19 microsatélites polimórficos observándose igualmente la presencia de dos alelos (Cuadro 33), donde el 21,06% de los SSR's se encuentran en el cromosoma 2 y el 15,78% de los marcadores se hallaron en los cromosomas 6 y 9 (Cuadro 33). Este bajo polimorfismo encontrado entre estos progenitores, posiblemente sea debido a que ambos cultivares presentan un ancestro común, ya que ambas provienen del CIAT y el FLAR, tal como lo reporta Pieters y col. (2011).

Para Cimarrón y BB50 se encontró un 20,53% de microsatélites polimórficos (Cuadro 26), representados igualmente por dos alelos (Cuadro 33), donde el 19,36% de los SSR's se ubicaron en el cromosoma 2, seguido por un 12,9% de los marcadores ubicados en los cromosomas 1, 3 y 9 (Cuadro 32).

Entre los parentales Zeta 15 y Venezuela-21 se encontraron solamente 7 SSR's (4,64%) polimórficos (Cuadro 31), donde la mayoría de ellos (42,85%) se ubicaron en el cromosoma 2 con tres microsatélites asociados, el resto de los marcadores estuvo ubicado en los cromosomas 1, 4, 6 y 9 (Cuadro 32), de igual manera se identificaron dos alelos como en los cruces anteriores (Cuadro 33).

Estos resultados difieren con lo reportado por Tohme (2010) al indicar que los microsatélites asociados a la resistencia a hoja blanca y daño mecánico a sogata se encontraban ubicados mayoritariamente en los cromosomas 4, 5 y 7; sin embargo, en la presente investigación se observó la presencia de al menos un marcador polimórfico en esos cromosomas, con excepción de los progenitores Zeta 15 y

Venezuela-21 los cuales no mostraron polimorfismo para los marcadores evaluados en los cromosomas 5 y 7 (Cuadro 33).

Cuadro 32. Número y porcentaje de microsatélites polimórficos entre los progenitores utilizados en los cruces y su distribución por cromosoma.

Chr. Nº	Zeta 15/BB50		Vzla-21/Dsat		Cimarrón/BB50		Zeta 15/Vzla-21	
	Nº de SSR	% SSR	Nº de SSR	% SSR	Nº de SSR	% SSR	Nº de SSR	% SSR
1	3	8,57	1	5,26	4	12,9	1	14,28
2	9	25,71	4	21,06	6	19,36	3	42,85
3	5	14,29	1	5,26	4	12,9	0	0
4	1	2,85	1	5,26	2	6,45	1	14,28
5	1	2,85	1	5,26	2	6,45	0	0
6	1	2,85	3	15,78	0	0	1	14,28
7	3	8,57	1	5,26	2	6,45	0	0
8	1	2,85	1	5,26	1	3,23	0	0
9	3	8,57	3	15,78	4	12,9	1	14,28
10	1	2,85	0	0	1	3,23	0	0
11	4	11,43	2	10,53	3	9,67	0	0
12	3	8,57	1	5,26	2	6,45	0	0
Total	35	100	19	100	31	100	7	100

El polimorfismo encontrado entre los materiales y los testigos de resistencia y susceptibilidad, Makalioka y BB-50 respectivamente, permitió determinar el grado de disimilitud existente entre ellos.

El análisis de agrupamiento generó tres grupos. Un primer grupo constituido por BB-50 con una correlación cofenética de 0,57; el grupo dos por D-Sativa, Cimarrón, Venezuela 21 y Zeta 15, con una distancia de 0,76 y el último grupos por Makalioka con una distancia de 0,69 (Fig. 8), pudiéndose observar claramente las diferencias entre los materiales, donde los testigos de resistencia y susceptibilidad, Makalioka y BB50 respectivamente, se ubicaron en dos grupos distintos, y las cultivares comerciales venezolanas quedaron agrupadas en un mismo grupo, lo que confirma la estrecha variabilidad genética de las cultivares de arroz venezolanos (Angulo *et al.*, 2006; Arnao *et al.*, 2007; Arnao *et al.*, 2008; Pérez-Almeida, 2011).

El grupo 2, a su vez estuvo dividido en dos subgrupos (Fig. 8), un primer grupo donde se encuentra D-Sativa, la cual mostró un mecanismos de resistencia antixenótica al insecto sogata y de antibiosis intermedia para la ovoposición y un segundo subgrupo, más heterogéneo, formado por Cimarrón; Venezuela-21 y Zeta

15, los cuales mostraron diferentes respuestas antes los mecanismos de resistencia; sin embargo, todos los cultivares expresaron resistencia intermedia al daño mecánico producido por sogata.

El número de marcadores polimórficos detectados en las familias fue bajo y las distancias entre ellos no permitieron realizar la asociación entre los microsatélites con las características fenotípicas evaluadas.

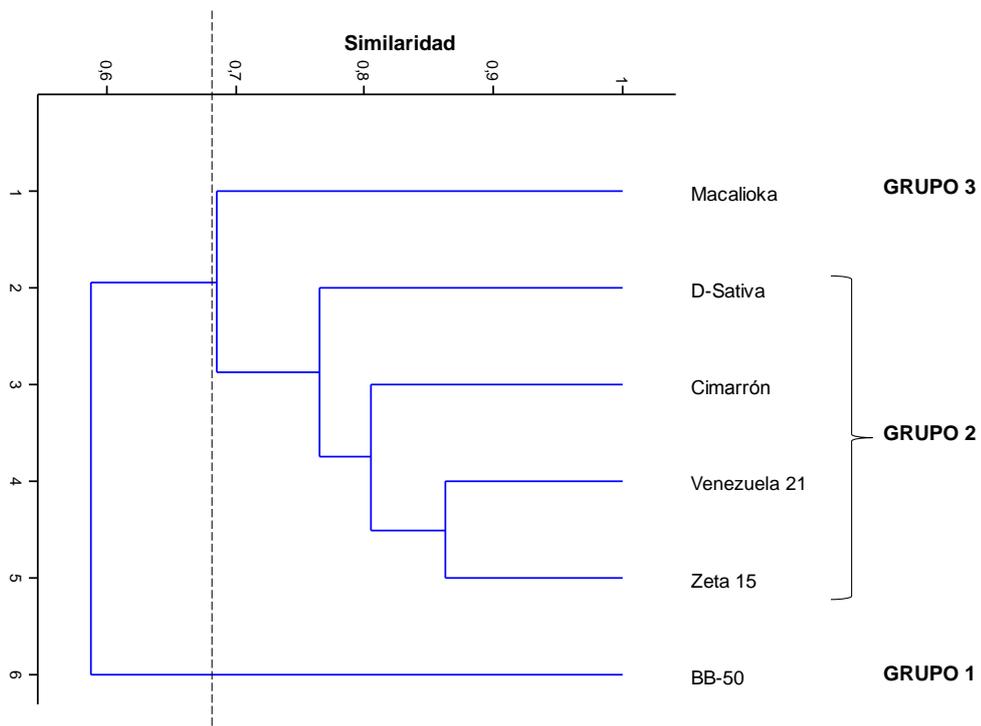


Figura 8. Dendrograma obtenido del análisis de agrupamiento para seis cultivares de arroz (*Oryza sativa* L.), distancia genética de Dice.

Cuadro 33. Número de microsatélites polimórficos evaluados por parentales involucrados en los cruces, indicando alelos y ubicación en el Chr.

N°	SSR	Zeta 15	BB50	Chr	N°	SSR	Cimarrón	BB50	Chr N°	N°	SSR	Vzla-21	D-Sat	ChrN°	N°	SSR	Zeta 15	Vzla-21	Chr
1	RM16	bb	aa	3	1	RM207	aa	bb	2	1	RM13	aa	bb	5	1	RM236	bb	aa	2
2	RM207	aa	bb	2	2	RM208	aa	bb	5	2	RM5	bb	aa	8	2	RM283	bb	aa	1
3	RM 208	aa	bb	5	3	RM209	bb	aa	11	3	RM201	bb	aa	9	3	RM518	bb	aa	4
4	RM209	aa	bb	11	4	RM21	bb	aa	11	4	RM215	bb	aa	9	4	RM525	aa	bb	2
5	RM21	bb	aa	11	5	RM210	bb	aa	8	5	RM224	bb	bb	11	5	RM527	aa	bb	6
6	M210	bb	aa	8	6	RM219	aa	bb	9	6	RM229	bb	aa	11	6	RM566	aa	bb	9
7	RM221	aa	bb	2	7	RM222	aa	bb	10	7	RM231	aa	bb	3					
8	RM222	aa	bb	10	8	RM229	bb	aa	11	8	RM236	aa	bb	2					
9	RM224	bb	aa	11	9	RM231	bb	aa	3	9	RM237	aa	bb	1					
10	RM229	bb	aa	11	10	RM236	aa	bb	2	10	RM290	bb	aa	2					
11	RM236	aa	bb	2	11	RM237	bb	aa	1	11	RM3	aa	bb	6					
12	RM240	bb	aa	2	12	RM240	bb	aa	2	12	RM30	bb	aa	6					
13	RM247	aa	bb	12	13	RM248	bb	aa	7	13	RM309	aa	bb	12					
14	RM248	bb	aa	7	14	RM26	aa	bb	5	14	RM3743	aa	bb	7					
15	RM250	aa	bb	2	15	RM282	aa	bb	3	15	RM518	aa	bb	4					
16	RM251	bb	aa	3	16	RM283	bb	aa	1	16	RM525	bb	aa	2					
17	RM282	aa	bb	3	17	RM285	aa	bb	9	17	RM526	aa	bb	2					
18	RM283	bb	aa	1	18	RM290	bb	aa	2	18	RM527	bb	aa	6					
19	RM285	aa	bb	9	19	RM309	aa	bb	12	19	RM566	bb	aa	9					
20	RM290	bb	aa	2	20	RM315	bb	aa	1										
21	RM309	aa	bb	12	21	RM316	bb	aa	9										
22	RM315	bb	aa	1	22	RM317	aa	bb	4										
23	RM316	bb	aa	9	23	RM324	aa	bb	2										
24	RM317	aa	bb	4	24	RM490	aa	bb	1										
25	RM324	aa	bb	2	25	RM498	aa	bb	2										
26	RM3743	aa	bb	7	26	RM518	aa	bb	4										
27	RM490	aa	bb	1	27	RM519	aa	bb	12										
28	RM498	aa	bb	2	28	RM532	bb	aa	3										
29	RM519	aa	bb	12	29	RM542	bb	aa	7										
30	RM525	aa	bb	2	30	RM566	aa	bb	9										
31	RM527	aa	bb	6	31	RM7	aa	bb	3										
32	RM532	bb	aa	3															
33	RM542	bb	aa	7															
34	RM566	aa	bb	9															
35	RM7	aa	bb	3															

Herencia de la Resistencia al daño mecánico.

Tomando en consideración lo reportado por Pardey y col. (2000) sobre la presencia de un gen dominante homocigota para la resistencia al daño directo producido por sogata en arroz y que la expresión de la misma está controlada por la acción de un gen modificador, se procedió analizar mediante una prueba de χ^2 los datos obtenidos sobre daño mecánico para cada una de las familias F_{2:3} evaluadas.

Cuadro 34. Frecuencia fenotípica observada para los genotipos resistentes, intermedios y susceptibles al daño mecánico de sogata (*Tagosodes orizicolus*) obtenidos en las familias F_{2:3}. ($\alpha=0,05$)

Cruce	Resistente	Intermedio	Susceptible	Segregación	χ^2
Cimarrón x BB50	9	6	1	9:6:1	0*
D-Sativa x Venezuela 21	18	9	4	9:6:1	7,25*
Zeta 15 x Venezuela 21	8	6	3	9:6:1	3,81*
Zeta 15 x BB50	9	0	3	3:1	1.0*

La prueba de χ^2 dio significancia para cada una de las hipótesis planteadas (Cuadro 34). De los cruces realizados entre un padre resistente (Cimarrón) y el padre susceptible (BB-50), o entre dos cultivares resistentes (D-Sativa x Venezuela-21 ó Zeta 15 x Venezuela-21) se encontró que la resistencia al daño mecánico producido por Sogata estuvo controlado por la acción de dos genes dominantes con efecto aditivo y la presencia de genes modificadores con un efecto menor, coincidiendo esto último con los reportado por Pardey y col. (2000). Adicionalmente, Olonju y col. (1991) señalan que la expresividad de la resistencia al áfido verde (*Schizaphis graminum* Rondani) del sorgo, en las generaciones F₂ obtenidas entre los parentales resistentes por susceptibles o resistentes por resistentes al efecto del áfido, estaba regulada por la acción de genes menores e influenciada por la naturaleza del parental femenino.

De los resultados aquí observados podemos inferir que Cimarrón posee los dos genes de resistencia (A_B_) al daño mecánico que produce el insecto, mientras que D-Sativa posee el gen A y Venezuela-21 posee el gen B. Ahora bien, al

analizar la descendencia obtenida de los cruces entre Zeta 15 x Venezuela 21 y Zeta 15 x BB50, se pueden manejar la hipótesis de que Zeta 15 posee el mismo gen de resistencia (A) que presenta D-Sativa, ya que ambos cultivares son hermanos, que al complementarse con el gen B de Venezuela -21 producen un efecto acumulativo haciendo que se intensifique el fenotipo de resistencia, ajustándose a una proporción fenotípica igual a 9:6:1. Esta hipótesis se corrobora al analizar el cruce entre Zeta 15 x BB50, encontrándose que la frecuencia fenotípica observada se ajusta a la proporción fenotípica de un gen (3:1) (Cuadro 34).

Estos resultados coinciden con los reportados por Sotelo-Cardona (2009) trabajando con la herencia de la resistencia al Virus del arrugamiento foliar del frijol (BLCrV '*Bean leaf crumple virus*') en familias F₂ de caraota, quien señala que la resistencia al mosaico producido por el virus está regida por la acción de dos genes dominantes con efectos aditivos, adaptado a una segregación mendeliana igual a 9:6:1, adicionalmente indica que dicho virus es transmitido por el biotipo B de *Bemisia tabaci* Gennadius.

De acuerdo con los resultados encontrados en el análisis de varianza (Anexo 10) y la prueba de media de Duncan (Anexo 11) se puede observar una amplia variabilidad de respuesta de las familias hacia la resistencia al daño mecánico producido por el insecto. Esto podría ser un indicativo de que aquellas familias que presentaron valores de daño, según la escala, menores a 3 pudieran ser evaluadas y seleccionadas dentro de un programa de mejoramiento para resistencia al daño mecánico que produce el insecto en arroz.

Diez de las 16 familias (Anexo 12) que mostraron valores de daño en escala menores o igual al valor observado de 1,7 por el cultivar Makalioka (testigo de resistencia) provenían del cruce entre D-Sativa y Venezuela -21 (DV), esto nos indica que estamos bajo la presencia de una segregación transgresiva positiva, debido a que los valores hallados en escala eran menores a los valores observados para el mejor padre, demostrándose además que ambos padres contribuyen aditivamente para la resistencia al daño mecánico, coincidiendo con lo señalado por Kumar y col. (2012) y Olonju y col. (1991).

En la Figura 9 podemos notar que el 63,85% de las familias $F_{2:3}$ presentaron valores de escala comprendidos entre 0 y 3, catalogados como resistentes y tolerantes, el restante 37,13% de las familias $F_{2:3}$ fueron catalogadas como susceptibles ya que presentaron una escala superior a 4,33. Ante estos resultados, sería conveniente avanzar una generación más en estas familias resistentes y tolerantes, para luego evaluarlas a nivel de campo e invernadero.

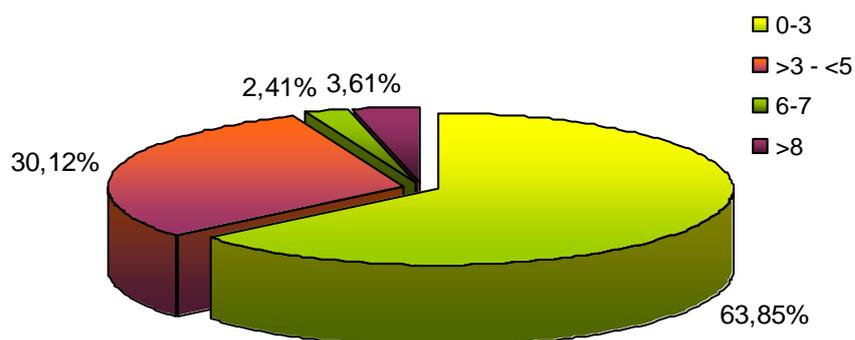


Figura 9. Porcentaje de familias $F_{2:3}$ agrupadas de acuerdo a la escala del IRRI para resistencia al daño mecánico producido por Sogata.

Número de plantas muertas en las Familias $F_{2:3}$

Se observaron diferencias altamente significativas ($p < 0,05$) en el número de plantas muertas observadas por familia (Cuadro 35).

Cuadro 35. Análisis de varianza para la variable número de plantas muertas en las familias $F_{2:3}$. ($p < 0,05$)

F.V.	gl	CM
Genotipo	82	10,9 (0,0002)
Error	164	5,6
Total	248	
CV	93,5	

La prueba de medias de Duncan (Anexo 14) arrojó la formación de 12 grupos, donde la cultivar Makalioka estuvo ubicada en el tercer grupo y el cultivar BB-50 en el último grupo correspondiendo con las categorías de resistencia y susceptibilidad respectivamente. En el mismo grupo de Makalioka se encontraban ubicados los cultivares D-Sativa y Venezuela 21 y en los grupos I y II se agruparon 22 familias provenientes de los cruces de estos dos parentales, de las

cuales ocho familias DV se encontraban en el primer grupo, las cuales representan el 25,08% de las familias DV evaluadas.

Con estos resultados podemos inferir que existe una buena combinación entre los genes de resistencia al daño mecánico producido por el insecto entre los parentales D-Sativa y Venezuela 21, resultados similares han sido señalados por Olonju y col. (1991) al indicar que la expresividad de la resistencia al áfido verde del sorgo es producida por la combinación efectiva del número de factores aportados por cada parental. Análogamente ocurre con algunas familias provenientes de los cruces Zeta 15 x BB50, Zeta 15 x Venezuela 21 y Cimarrón x BB50, las cuales se ubican dentro del grupo II y III. Esta gran variabilidad de respuesta observada en los distintos cruzamientos nos indica la presencia de una herencia transgresiva, donde la resistencia al insecto es debida a la acción de dos o más genes que poseen efecto acumulativo (Kumar y col., 2012; Garza y col., 1996; Olonju y col., 1991). En Venezuela, se ha reportado herencia transgresiva para resistencia a *Rhizoctonia* en poblaciones segregantes de arroz. (Gonzalez-Vera y col., 2011; Graterol y col. 1996)

En la Figura 10 podemos observar que el número de plantas muertas por familia $F_{2,3}$ sigue más o menos una distribución continua, donde podemos encontrar familias resistentes, tolerantes y susceptibles, tal como lo reporta Chang-Chao y col. (2006). Si tomamos en consideración la escala del IRRI donde indica que a partir de un 50% de plantas muertas el material es calificado susceptible, podemos decir que el mayor porcentaje de familias $F_{2,3}$ con plantas muertas se observó en el cruce constituido por Cimarrón x BB50 (52%), donde 9 de las 17 familias evaluadas presentaron más de cuatro plantas muertas después de los 15 días de la infestación con los insectos (Fig. 10B), seguido por las familias constituidas por los cruces de Zeta 15 x BB50 (33,3%; Fig. 10C), Zeta 15 x Venezuela-21 (29,41%; Fig. 10D) y por último con un 3% de familias $F_{2,3}$ con más de cuatro plantas muertas, proveniente de los cruces entre D-Sativa x Venezuela-21 (Fig. 10A). De las familias $F_{2,3}$ obtenidas de este cruce, solo las familias DV5 y DV20 mostraron más de 4,7 plantas muertas en promedio, siendo este valor considerado como susceptible de acuerdo con la escala IRRI (2002).

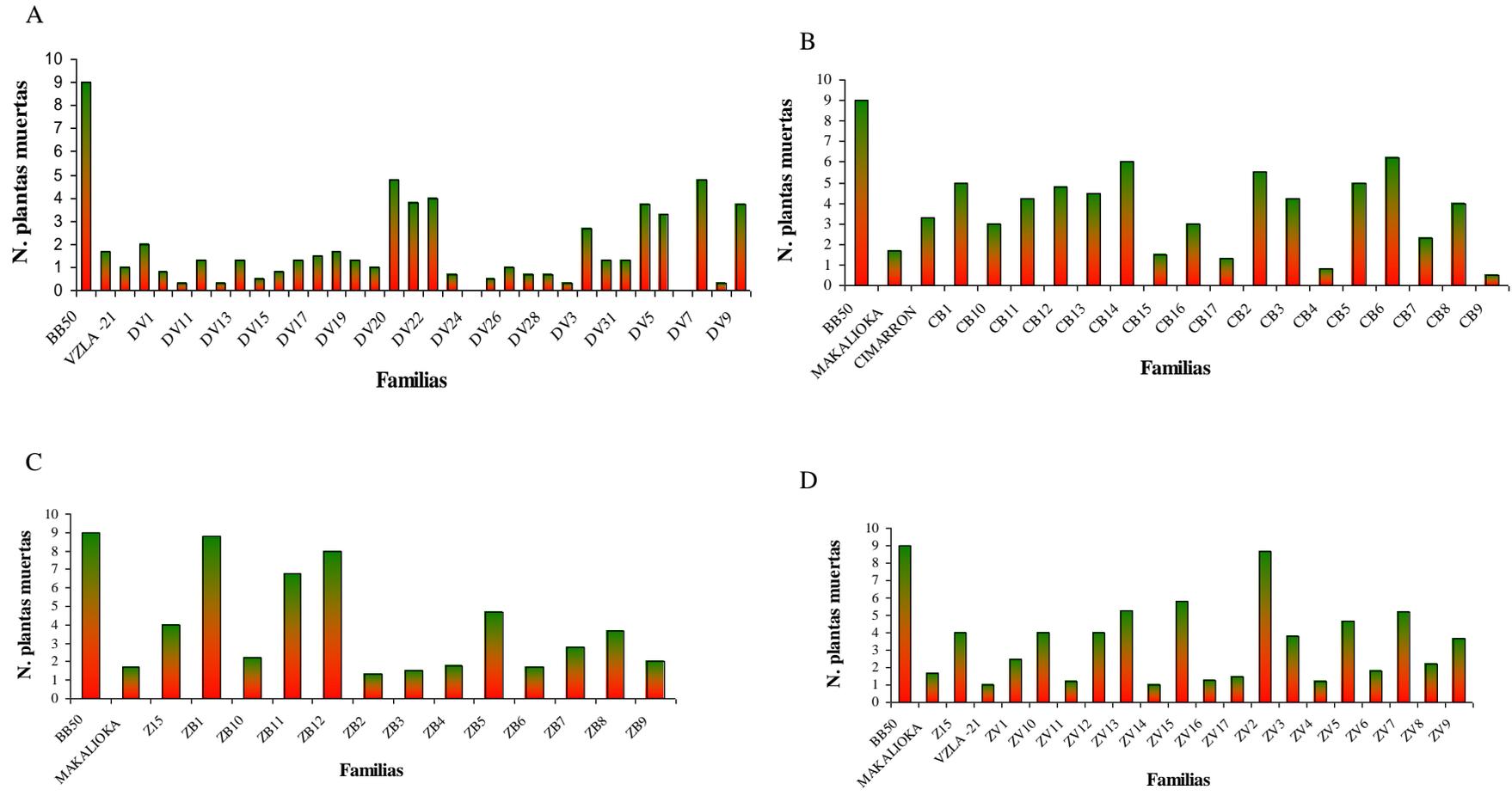


Figura 10. Número de plantas muertas por familias F_{2:3}. A. D-Sativa x Venezuela-21 (DV); B. Cimarrón x BB50 (CB); C. Zeta 15 x BB50 (ZB); D. Zeta 15 x Venezuela-21 (ZV).

CONCLUSIONES

Bajo las condiciones de estos estudios se puede concluir que:

Los cultivares D-Sativa, Venezuela-21, Cimarrón y Zeta 15 mostraron, bajo condiciones de invernadero, resistencia al daño mecánico producido por sogata. Observándose un mecanismo de antixenosis en las cultivares evaluadas después de 96h de infestación y que el mismo estuvo correlacionado negativamente con el grosor de la cutícula en la cara abaxial. Adicionalmente D-Sativa y Venezuela 21 mostraron antibiosis intermedia para ovoposición.

Dentro de las características morfoanatómicas evaluada, se observó diferencias significativas para el grosor de la cutícula entre los genotipos, donde el material susceptible (BB-50) presentó los valores más bajos en comparación con el resto de los materiales y el testigo universal de resistencia (Makalioka), siendo esta variable una barrera física que impide que el insecto se alimente y ovoposicione sobre la planta. Igualmente se determinó que la presencia de micropelos en ambas caras del tejido epidérmico asociado con un grado de resistencia al ataque del insecto ya que se observaron diferencias significativas lo que permitió separar el material susceptible con el resto de los cultivares evaluados. No se detectó diferencias significativas para el número de macropelos en el tejido foliar; Sin embargo, se detectó una correlación significativa entre el número de macropelos presentes en la cara abaxial y el número de insectos posados a las 96h.

La longitud de los macropelos no es un carácter significativo a medir para evaluar el grado de resistencia o susceptibilidad al daño mecánico producido por sogata.

La presencia de cuerpos silicios en los cultivares comerciales y en el testigo de resistencia (Makalioka) indica que este compuesto químico juega un papel importante en arroz como mecanismo de defensa al ataque de sogata. Adicionalmente, se observó una correlación significativa entre los cuerpos silíceos y el número de micropelos presentes en la cara adaxial y abaxial del tejido foliar, y una correlación negativa con el número de macropelos presentes en la cara adaxial.

Una alta variabilidad de respuesta fue observada para la resistencia al daño mecánico dentro de las familias evaluadas, siendo esto un indicativo de la presencia de una herencia transgresiva, lo que demostró una buena combinación de los genes de resistencia presente en los parentales. Adicionalmente, se determinó el modo de herencia de la característica de resistencia al daño mecánico producido por sogata, dicho carácter está controlado por la acción de dos genes mayores de efecto acumulativo.

La familia que mostró mayor resistencia al daño mecánico fueron aquellas provenientes del cruce entre D-Sativa x Venezuela 21.

El análisis molecular demostró una vez más la estrecha variabilidad genética entre los materiales evaluados. Identificándose 92 microsatélites polimórficos entre los parentales utilizados, para ello se identificaron 35 marcadores entre Zeta 15 y BB50, 19 entre Venezuela 21 y D-Sativa, 31 entre Cimarrón y BB50 y 7 entre Zeta 15 y Venezuela-21, que pudieran ser utilizados para seleccionar materiales dentro de un programa de mejora para resistencia al insecto.

El análisis de agrupamiento generó la formación de tres grupos, el primero constituido por BB-50, el segundo por D-Sativa, Cimarrón, Venezuela 21 y Zeta 15 y el último grupo constituido por Makalioka. Dentro del segundo grupo se pudo observar la formación de dos grupos que separaron D-Sativa del resto de los cultivares.

El análisis de Regresión por Pasos determinó que las variables que están más relacionadas con la resistencia al daño mecánico producido por sogata en arroz son: postura a las 96h, número de huevos y presencia de macropelos en la cara adaxial.

RECOMENDACIONES

Evaluar los mecanismos de resistencia, las características morfoanatómicas y moleculares de las familias que resultaron ser resistentes al daño mecánico producido por sogata.

Evaluar morfo anatómicamente muestras de tejido foliar proveniente de materiales sembrados en campo previo a ser sometidos al ataque natural de insectos con el objeto de comparar las diferencias observadas con las aquí encontradas, adicionalmente se podría corroborar que las mismas son producto de una respuesta genética inducida por la planta ante el ataque del insecto y no a caracteres taxonómicos.

Cuantificar la cantidad de sílice presente en el tejido foliar de cada una de las cultivares evaluadas.

Determinar si las colonias sanas de sogata presente en la Fundación DANAC pertenecen a un mismo biotipo.

REFERENCIAS BIBLIOGRAFICAS

- Angulo, L.; C. Ramis; M. Perdomo; I. Pérez-Almeida. 2006. Estudio de la Base Genética de las cultivares de arroz de Venezuela a través de microsatélites. Trabajo presentado en el IX Congreso Latinoamericano de Botánica. Santo Domingo-República Dominicana.
- Alfonzo, R.; E. Suárez; A. Hernández; R. Pérez; J. Ávila; A. Ginarte; J. Hernández; P. Orellana. 2000. La resistencia genética de las cultivares como elemento básico en el manejo integrado de plagas y preservar el medio ambiente en el cultivo del arroz. *Fitosanidad*. 4:1-3.
 - Álvarez, L. 1997. Producción de arroz en los llanos occidentales de Venezuela. Ediciones de la Universidad Ezequiel Zamora, Barinas, Venezuela. 23p.
 - Álvarez, R.; C. Gamboa; M. Triana; M. Duque; J. Silva. 2000. Mecanismo de resistencia a *Tagasodes orizicolus* Muir (Homoptera: Delphacidae) de tipo antibiótico y no preferencia en algunas líneas de arroz (*Oryza sativa* L.). *Investigación Agrícola* N° 5:1-12.
 - APROCELLO. 2001. Revisado 23 de Septiembre 2005. www.Aprocello.org/cultivares arroz venezolano.htm.
 - Arnao, E. 2003. Selección Asistida por marcadores moleculares en un programa de retrocruzas en arroz. Tesis de Maestría. Facultad de Agronomía, UCV. Maracay. 65p.
 - Arnao, E.; N. Rodríguez; P. Hinrinsen; Y. Jayaro; C. Ramis; I. Pérez-Almeida. 2007. Evaluación de la diversidad genética de subespecies de arroz usando marcadores microsatélites y AFLP. *Agronomía Tropical*. 57 (1): 45-50.
 - Arnao, E.; Y. Jayaro; P. Hinrinsen; C. Ramis; C. Marín; I. Pérez-Almeida. 2008. Marcadores AFLP en la evaluación de la diversidad genética de

- cultivares y líneas éliticas de arroz en Venezuela. *Interciencia*. 33 (5): 359-364 .
- Bakus, E. 1988. Sensory system and behaviors which mediate hemipteran plant feeding: a taxonomy overview. *J. Insect Physiol.* 34:151-165..
- Belanger R.; P.A. Bowen; D. Ehret; J. Menzies. 1995. Soluble silicon. Its role in crop and disease management of greenhouse crops. *Plant disease*. 79: 329-336.
- Bustamante Rojas E.; L. Patiño. 2001. En búsqueda de un sistema de resistencia estable en plantas cultivadas. *Manejo Integrado de Plagas (Costa Rica)* No. 60: 3 - 14.
- Calvert, L.; C. Pardey; M. Triana; R. Meneses. 2004. Avances en la búsqueda de mecanismos de resistencia a *Tagosodes orizycolus* (Muir) Plaga del arroz en America Latina. Simposio de Manejo Agroecológico de plagas en la agricultura tropical. *Rev. Protección Veg.* 19:3-4.
- Calvert, L.; I. Lozano; N. Villareal; L. Reyes; L. Romero; M. Lorieux; A. Garabito; M Duque; C. Martinez. 2005. Hacia la comprensión de la base genética de la resistencia al complejo virus de la hoja blanca y *Tagosodes orizycolus* (Muir) en arroz. XLV Reunion Anual APS, San José, Costa Rica.
- Camacho de Torres, E. F.; L. Subero. 1991. Características anatómicas foliares de interés fitopatológico en tres cultivares de maní (*Arachis hipogea*). *Ernstia* 1(2): 61-72.
- Campos de Q., H.; H. Salvo. 1995. Marcadores moleculares aplicado al mejoramiento genético de las plantas. *AgroSur* 23(2): 173-185.
- Cardozo, D.; M. Cristiano; L. Morales; T. Martins. 2009. Does thricomes on plant epidermis surface disturb ant locomotion?. *American Journal of Agriculture and Biological Science*. 4(1):1-6.
- Catalayud, P.; D. Munera. 2000. Defensa Natural de la yuca a las plagas artrópodos. *Memorias XXVIII Congreso SOCULEN*, Cali-Colombia.
- Chang-Chao, Su; Z. Hu-Qu; W.Chung-Ming; S. Li-Hong; W. Jain-Min. 2006. SSR mapping of Brown Planthopper Resistance gene *Bph9* in

- Kaharamana, an *Indica* rice (*Oryza sativa* L.). *Acata Genetica Sinica*. 33(3):262-268.
- Dávalos, L. M. 1997. Marcadores moleculares asociados a resistencia al virus de la hoja blanca en arroz (*Oryza sativa* L.). Tesis de Ingeniero Agrónomo. Universidad de Bogotá. Pp. 8-15.
 - Eickhoff Thomas; T. Heng-Moss; F. Baxendale; J. Foster. 2008. Levels of Tolerance, Antibiosis, and Antixenosis among Resistant Buffalo grasses and Zoysia grasses. *J. Econ. Entomol.* 101(2): 533-540.
 - Ellis, R.P. 1979. A procedure for standardizing comparative leaf anatomy in the Poaceae II. The epidermis as seen in surface view. *Bothalia*. 12:641-647.
 - Ellis, R.P. 1986. A review comparative leaf blade anatomy in the Systematics of the Poaceae: The past twenty-five years. *Grass Systematics and Evolution*. Capitulo I. Editado por: T. R. Soderstrom, K. Hilu, C. Campbell y M. Barkworth. P 3-10.
 - FEDEAGRO. 2012. Revisado Abril 2012. En línea <http://www.fedeagro.org/consumo/cereales.asp>.
 - Ferh. W. 1987. Principles of cultivar development. Theory and Technique. Vol. 1 MacMillan Publishing Company. New York. 536p.
 - Ferreira, M.E.; D. Grattapaglia. 1998. Introducao ao uso de marcadores moleculares em análise genética. 3er. Edición. EMBRAPA. Brasilia. 220p.
 - Flinn, P.; A. Hower; D. Knievel. 1990. Physiological response of alfalfa to injury by *Empoasca fabae* (Homoptera: Cicadellidae). *Environ Entomol.* 19:176-181.
 - Fondo Latino Americano de Arroz de Riego (FLAR). 1996. Un método simplificado para cruzamientos en arroz Manual Técnico. CIAT, Colombia. 35p.
 - Franquet Bernis, J.M.; C. Borrás Pamies. 2011. Economía del arroz: Cultivares y Mejora. Revisado Enero 2011. En línea <http://www.eumed.net/libros/2006a/fbbp/1g.htm>.

- Garza R.; C. Cardona; S.P. Singh. 1996. Inheritance of resistance to the vean-pod weevil (*Apion godmani* Wagner) in common beans from Mexico. *Theor. Appl. Genet.* 92:357-362.
- Granados, G.; R.L. Paliwal. 2005. Revisado 10-11-2005. Mejoramiento para resistencia a los insectos. En línea [www.fao.org/document respository_archivos/x7550s18.html](http://www.fao.org/document/respository_archivos/x7550s18.html).
- Granado-Sánchez D; P. Ruiz Puga; H. Barrera-Escorcía. 2008. Ecología de la herviboría. *Revista Chapingo serie Ciencias Forestales y de Ambiente* 14(1): 51-63.
- Graterol, E.; O. Borges; H. Nass; A. Salih. 1996. Herencia transgresiva para la Resistencia a *Rhizoctonia* spp. En poblaciones segregantes de arroz (*Oryza sativa* L.). *Revista de Investigacion Agrícola DANAC* 1: 1-9.
- González-Vera A.; E. Graterol; B. Borges; F. Hernández. 2011. Métodos de evaluación y reacción de cultivares para resistencia al añublo de la vaina del arroz causado por *Rhizoctonia solani* AG-1 IA. *Bioagro* 23(1): 3-12.
- González-Vera, Alex; N. Labrín; R. M. Álvarez; Y. Jayaro; C. Gamboa[†]; V. Barrientos; E. Reyes. 2012. Mechanisms of *Oryza sativa* (Poaceae) resistance to *Tagosodes orizicolus* (Homoptera: Delphacidae) under greenhouse condition in Venezuela. *Rev. Biol. Trop.* 60 (1): 105-117.
- Guerreiro-Filho, O. 2006. Coffee leaf miner resistance. *Journal of Plant Physiology.* 18(1): 109-117.
- Gutiérrez G, Camarena. 2009. Señales en la interacción planta insecto. *Revista Chapingo. Serie Ciencias Forestales y del ambiente.* 15(1):81-85.
- Herrera-Giraldo Carolina; M. Gómez Barrera; M. Saavedra Hernández; G. Fonthal Rivera; V. Gonzalez Ceballos; H. Calderón. 2009. Cuantificación de sílice presente en el follaje de *guadua angustifolia* del departamento del Quindío. *Rev. Invest. Univ Columbia* (19): 14- 17.
- Howe Gregg; G. Hander. 2008. Plant immunity to insect herbivorous. *Annu Rev. Plant Biol.* 59:41-66.

- Howe G.; A. Schaller. 2008. Direct defense in plants and their induction by wounding and insect herbivores. Induce plant resistance to herbivory. Chapter I. Springer-Germany. 7-29.
- Hoyas C; J. Palet; E. Villate. 1990 Análisis de fitolitos de ópalo y pseudomorfos de oxalato calcico en calcita como indicadores de arqueobotánicos. Cuaternario y Geomorfología 4: 147-154
- INIA. 2005. Revisado, 15-07-2005. Programa de arroz. En línea www.inia.gov.ve.
- IRRI. 2002. Standard Evaluation System for Rice (SES). 50p.
- Jairin, Jirapon; K. Sansen; W. Wongboon ; J. Kotcharerk. 2010. Detection of a brown planthopper resistance gene bph4 at the same chromosomal position of Bph3 using two different genetics backgrounds of rice. Breeding Science. 60:71-75.
- Jena, K.K; J.U. Jerung; J. Lee; H. Choi; D.S. Brar. 2005. High resolution mapping of a new brownplanthopper (BPH) resistance gene, BPH 18(t) and marker assisted selection for BPH resistance in rice (*Oryza sativa* L.). Theor. Appl. Genet. 21:1-10.
- Jennings, P.R.; W.R. Coffman; H. Kauffman. 1981. Mejoramiento de Arroz. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT). Colombia. 237p.
- Katiyar, S.K., Y. Tan, Y. Zhang, B. Huang, Y. Xu, L. Zhao, N. Huang, G.S. Khush, J. Bennett. 1998. Identification of RAPD marker linked to the gene controlling gall midge resistance against all biotypes in China. Rice Genetics Newsletter 11:31-34.
- Krishnan, H. B.; V. Franceschi. 1988. Anatomy of some leaf galls of rosa woodsii (Rosaceae). Amer. J. Bot. 75:369-376.
- Krush, G.; J. Bennet; S.K. Datta; D.S. Brar, Z. Li. 2055. Revisado 21-02-2005. Avances en Genética y Biotecnología del arroz. www.fao.org/DOCREP/003/x2243t04.html.
- Kumar Varma C. M.; P. Gouda; S. Saikumar; V. Shenoy; H. Eshwarappa; S. Sarla 2012. Transgressive Segregation for Yield Traits in *Oryza sativa*

IR58025B X *Oryza meridionalis* Ng. Bc2F3 Population under Irrigated and Aerobic Conditions. J. Crop Sci. Biotech.15 (3): 231- 238.

- Kumar Kishore; K Dharma Reddy; H.C. Sharma. 2007 Expression of antixenosis and antibiosis components of resistance to spotted stem borer *Chilo partellus* in sorghum under greenhouse conditions. An Open Access Journal published by ICRISAT December 3(1). Revisado Enero 2011. On line
[http://www.icrisat.org/journal/mpii/v3i1/Sorghu_Millet%20other_Cereals/ISMN%2014_Expression%20of...%20\(HC%20Sharma%20et%20al.\).pdf](http://www.icrisat.org/journal/mpii/v3i1/Sorghu_Millet%20other_Cereals/ISMN%2014_Expression%20of...%20(HC%20Sharma%20et%20al.).pdf)
- Labrín N. 2008. Evaluación del mecanismo de antibiosis en germoplasma de arroz frente a *Tagosodes orizicolus*. (Evaluation of the antibiosis resistance mechanism to *Tagosodes orizicolus* in rice germoplasm). **Fundacion DANAC**
- Levin, Donald. 1973. The role of trichomes in plant defense. The quarterly Review of Biology. 48(1):3-15.
- Lin, S.H.; H. Ikehashi. 1993. A gamete abortion locus detected by segregation distortion of isozymes locus Est-9 en wide crosses en rice (*Oryza sativa* L) . Euphytica. 67:35-40.
- Londoño P. Ximena. 2002. Distribución, Morfología, Taxonomía, Anatomía, Silvicultura y Usos de los Bambues del Nuevo Mundo. Online www.hof-landlust.de/scb/taller.html. Revisado Junio 2010
- López, L. 1997. El origen del arroz. Revista de desarrollo tecnológico del arroz (Redta)-Fundación Polar. Vol. 2:3-4.
- Lorieux, M. 2005. Marcadores Moleculares aplicados en el mapeo genómico del arroz. Curso de Herramientas Moleculares aplicadas al estrés abiótico. IVIC-INIA-CIAT. Caracas. 5 al 8 Julio.
- Lovinger, A.; D. Liewehr; W. Lamp. 2000. Glandular trichomes on alfalfa impede searching behavior of the potato leafhopper parasitoid. Biological Control 18:187-192.

- Maluf, W. I.; I. Fumi; R. Duarte F.; L. A. Gomes; E. Mauro de Castro; M. Cardoso. 2007. Higher glandular trichome density in tomato leaflets and repellence to spider mites. *Pesq. Agropec. Bras.* 42(9):1227-1235.
- Massey, Fergus P.; A. Roland Ennos; S. Hartley. 2006. Silica in grasses as a defense against insect herbivorous; contrasting effects on folivorous and a phloem feeder. *Journal of animal ecology.* 75:595-603.
- McCough, S.; X. Chen; O. Panaud; S. Temnykh; Y. Xu; Y. Cho; N. Huang; T. Ishii; M. Blair. 1997. Microsatellites marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding. *Plant Molecular Biology* 35:89-99.
- Melo De Pinna, G. F. A.; J.E. Kraus; N.L Menezes. 2002. Morphology and anatomy of leaf mine in *Richterago Riparia* Roque (Asteraceae) in the Campos Rupestres Of Serra Do Cipó, Brazil. *Braz. J. Biol.* 62(1): 179-185
- Meneses C. R.; Y. Gutiérrez; A. García; G. Antigua; J. Gómez; F. Correa. 1998. Guía para el trabajo de campos en el manejo integrado de plagas del arroz. IIA –CIAT –FLAR Cali, Colombia. pp.5-7.
- Molina-Montenegro Marco A.; P. Ávila; R. Hurtado; A. I. Valdivia; E. Gianoli. 2006. Leaf trichome density may explain herbivory patterns of *Actinote* sp. (Lepidoptera: Acraeidae) on *Liabum mandonii* (Asteraceae) in a montane humid forest (Nor Yungas, Bolivia). *Acta Ecologica.* 30: 147-150.
- Nasca de Zamora Patricia. 2011. Histología Vegetal. En línea: <http://ecaths.s3.amazonaws.com/planta/1910772263.histologia&202011.pdf> . Consultado Julio 2011.
- Olonju Dixon A.G; P.J. Bramel-Cox; T.I Harvey. 91. Complementarity of genes for resistance to greenbug (*Schizaphis graminum* (Rondani)), biotype E in sorghum (*Sorghum bicolor* L.). *Theor. Appl Genet.* 81:105-110.
- Orellana P. A. 1981. Aspectos relacionados con la resistencia genética del arroz (*Oryza sativa* L.) al insecto *Sogatodes orizicola*, hoja blanca y *Pyricularia oryzae*. *Agrotécnia de Cuba* 13 (1): 37-45.

- Orona-Castro Fermín; V. Pecina-Quintero; M. Cadena-Hinojosa; M. A. Rocha-Peña; F. Tucuch-Cauich; I. H. Almeyda-León. 2009. Marcadores moleculares asociados con resistencia a la enfermedad Punta Morada en Papa. *Agronomía mesoamericana* 20(1): 31-39.
- Painter, R.H. 1951. *Insect Resistance in crop plants*. The University Press of Kansas, USA. 520p.
- Pardey, C.; D. Baena; F. Cuevas. 1996. Caracterización de la resistencia al daño mecánico de *Tagosodes orizicolus* (Muir) (Homoptera: Delphacidae) en doce cultivares de arroz (*Oryza sativa*). *Acta Agron.* 46(1):9-14.
- Pathak M. D. 1977. Defense Of The Rice Crop Against Insect Pests *Annals of the New York Academy of Sciences* 287 (1) , 287–295
- Pérez-Almeida, I.; L. Angulo; G. Osorio; C. Ramis; A. Bedoya; R. Figueroa-Ruiz; S. Molina; I. Diógenes. 2011. Método modificado de obtención de ADN genómico en orquídeas (*Cattleya* spp.) para amplificación con marcadores moleculares. *Bioagro.* 23 (1): 27-34.
- Pérez-Almeida, I.; E. Torres; L. Angulo; M. Acevedo. 2011. Diversidad genética entre cultivares de arroz de Venezuela con base a la estimación del coeficiente de parentesco y análisis con marcadores moleculares microsatélites (SSR). *Interciencia.* 36 (7): 545-551.
- Picca, A., M.; N. Helguera; A. Salomón; A. Carrera. 2004. *Marcadores Moleculares en Biotecnología y Mejoramiento Genético Vegetal*. Editores Echenique, V., C. Rubinstein y L. Mogridki. Ediciones INTA. Argentina. 462p.
- Prychid, C.; P. Rudall. 1999. Calcium oxalate in Monocotyledons: A review of their structure and systematics. *Annals of Botany.* 84: 725-739.
- Remes, Mariani. 2001. *Tagosodes orizicolus* (Muir, 1926) vector del virus de la hoja blanca del arroz (HBV) en la Republica Argentina (Homoptera-Delphacidae). *Rev. Fac. Agronomía La Plata.* 104(2): 151-156.
- Reyes, L.; M. Triana; A. Ginarte; L. Calvert. 1997. Desarrollo de estrategias para el control del virus de la hoja blanca del arroz causado por *Tagosodes orizicolus* Muir. *Memorias X Conferencia Internacional del Arroz*. Acarigua- Venezuela.

- Ramiro Daniel Alvis; F. Oliveiro – Guerrero; R. Quiroz-Voltan; S. Chebabi Matthiesen. 2004. Caracterização anatômica de folhas de cafeeiros resistentes e susceptíveis ao bicho-mineiro. *Campinas* 63(3): 363-372.
- Rodríguez Gustavo; M. Negrín; M. García. 2009. Evaluación de algunas variables de la epidermis foliar en tres clones de Musa y su relación con resistencia a sigatoka (*Mycosphaerella* sp.). *Rev. Fac. Agron. UCV-Maracay*. 35(3): 100 -105.
- Ronald, P. 1997. The molecular basis of disease resistance in rice. *Plant Molecular Biology* 35:1709-186.
- SAS Institute. 2006. JMP Version 6.
- Senguttuyan T.; M. Gopalan and S. Chelliah. 2003. Impact of resistance mechanisms in rice against the brown planthopper, *Nilaparvata lugens* Stål (Homoptera: Delphacidae). *Crop protection*. 10(2): 125-128.
- Sherwood, R.T. 1996. Anatomical and Physiological mechanisms of resistance to Brown Leaf Spot in smooth bromegrass. *Crop Sci*. 36:239-242.
- Silva, L. M.; Y. Alquidini; V.J. Cavallet. 2005. Inter-relacoes entre a anatomía vegetal e a producao vegetal. *Acta Bot. Bras*. 19 (1): 183-194.
- Smith, C.M. 1989. Plant resistance to insect, a fundamental approach. A Wiley Interscience Publication, USA. 286p.
- Singh D.P.; A. Singh. 2005. Disease and Insect Resistance in Plants. Science Publisher Ed. 428pp.
- Showler, Allan T. 2009. Roles of Host Plants in Boll Weevil Range Expansion beyond Tropical Mesoamerica. *American Entomology*. 55 (4): 234-242.
- Sotelo-Cardona, P. 2009. Herencia de la Resistencia a un nuevo *Begomovirus* en habichuela (*Phaseolus vulgaris* L.) en el Valle del Cauca. Trabajo de Grado para obtener la Maestría en Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Colombia. 88p.

- Tanaka, K. 1999. Quantitative genetic analysis of biotypes of the brown planthopper *Nilaparvata lugens*: heritability of virulence to resistant rice varieties. *Entomología Experimentalis et Applicata* 90:279-287.
- Triana, M.; I. Lozano; L. Calvert; R. Meneses; C. Martínez. 2004. Marcadores Moleculares asociados con la resistencia a *Tagosodes orizicolus* (Muir). En línea: www.CIAT.cgiar.org . Revisado julio 20, 2005.
- Tohme, Joe. 2010. Las perspectivas desde la genómica hacia la reconstrucción del genoma del arroz. XI Conferencia Internacional del Arroz. CIAT. Cali-Colombia.
- Tuff-Santos, L.D.; M. Thadeo; L. Iarema; R. Strozi; F.A. Ferreira. 2008. Foliar anatomy and histochemistry in seven species of Eucalyptus. *Rev. Arvore.* 32(4):769-779.
- Vijaykumar, L.; A. K. Chakravarthy; S. U. Patil and D. Rajanna. 2009. Resistance Mechanism in Rice to the Midge *Orseolia oryzae* (Diptera: Cecidomyiidae). *Journal of Economic Entomology* 102(4):1628-1639.
- Vivas C. Luís E.; D. Astudillo. 2008. Enfermedades virales transmitidas por la familia Delphacidae con énfasis en el insecto sogata (*Tagosodes orizicolus*). *INIA Hoy.1:1-19*
- Vivas C., L.E.; S. Clavijo. 2000. Fluctuación Poblacional de *Tagosodes orizicolus* (Muir) 1926 (Homoptera-Delphacidae) en el sistema de riego del Río Guárico, Venezuela. *Bol Entomol Venez* 15 (2): 217-227.
- Vivanco, J.M.; E. Cosio; V. Loyola-Vargas; H.E. Flores. 2005. Mecanismo químicos de defensa de las plantas. *Investigación y Ciencia.* 2:68-75.
- Waugh, R. 1997. Analysis use for genome Characterization tagging traits and mapping. In *Plant Molecular Biology a Laboratory Manual*. Melody Clark Editor. Springer. Germany. 305-333pp.
- Yan, Z., T. Yujuan; C. Bingchao; C. Jianwei, X. Lisia; Z. Yankang; Q. Xudong, Qian; Z. Dali. 1998. The inheritance to resistance to gall midge en the rice variety Duokang 1. *Rice Genetics Newsletter* 13:20-23.

Anexos

Anexo 1. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks (modificado) para la variable daño mecánico en los cultivares de arroz.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p
Daño mecánico	18	3,5	3,09	0,85	0,01

Anexo 2. Estadística Descriptiva para la variable daño mecánico en los cultivares de arroz.

Genotipo	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis
Blue50	3	8,33	1,15	1,33	13,86	7	9	-1,73	sd
Cimarron	3	3	2	4	66,67	1	5	0	sd
DSativa	3	1,67	2,89	8,33	173,21	0	5	1,73	sd
Makalioka	3	1,33	1,53	2,33	114,56	0	3	0,94	sd
Venezuela21	3	2,33	2,31	5,33	98,97	1	5	1,73	sd
Z15	3	4,33	3,06	9,33	70,5	1	7	-0,94	sd

Anexo 3. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks (modificado) para la variable número de plantas muertas en los cultivares de arroz.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p
Nplmuertas	18	3,22	3,14	0,81	0,003

Anexo 4. Estadística Descriptiva para la variable número de plantas muertas en los cultivares de arroz.

Genotipo	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis
Blue50	3	9	1,73	3	19,25	7	10	-1,73	sd
Cimarrón	3	2,67	2,08	4,33	78,06	1	5	1,29	sd
DSativa	3	1,33	2,31	5,33	173,21	0	4	1,73	sd
Makalioka	3	1,67	1,15	1,33	69,28	1	3	1,73	sd
Venezuela21	3	1,33	0,58	0,33	43,3	1	2	1,73	sd
Z15	3	3,33	2,08	4,33	62,45	1	5	-1,29	sd

Anexo 5. Estadística descriptiva para la variable numero de huevos

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis	W*
NdeHuevos	24	64,33	43,72	1911,8	67,96	0	158	0,75	-0,09	0,9

Anexo 6. Estadística descriptiva para la variable insectos posados a las 24, 48, 72 y 96 horas después de la infestación.

Var.	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis	W*
C24h	24	12,79	8,15	66,43	63,72	3	36	1,12	1,25	0,89
C48h	24	14,33	10,2	103,97	71,14	3	46	1,63	2,89	0,84
C72h	24	17	11,77	138,43	69,21	3	56	1,76	4,15	0,86
96h	24	15	9,51	90,35	63,37	3	47	1,62	4,49	0,89

Anexo 7. Estadística descriptiva para la variable sobrevivencia (insectos muertos)

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis	W*
Insectos muertos	18	7,22	1,9	3,59	26,25	4	10	-0,07	-0,72	0,90

Anexo 8. Estadística descriptiva para las variables morfoanatómicas.

Variable	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis	W*
GroAdx	24	2,58	0,46	0,22	17,96	1,9	3,63	0,16	-0,49	0,93
GroAbx	24	2,44	0,44	0,19	17,87	1,62	3,15	-0,22	-0,96	0,94
mic/mm2adx	24	67,35	33,5	1122,51	49,75	9,67	127,1	-0,19	-0,31	0,92
macad	24	17,34	28,34	803,43	163,43	4,66	148,79	4,71	22,69	0,39
longmad	24	162,23	153,59	23588,59	94,67	35,8	702,24	2,15	5,67	0,76
mic/mm2ab	24	62,02	38,59	1489,57	62,23	0	107,63	-0,57	-1,18	0,83
macab	24	11,02	5,52	30,52	50,16	5,99	29,09	1,86	3,93	0,81
longmab	24	154,42	112,13	12572,9	72,61	33,21	429,84	0,74	-0,43	0,85
silice	24	0,83	0,38	0,14	45,68	0	1	-1,91	1,79	0,45

Anexo 9. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks (modificado) para la variable daño mecánico de las familias F_{2:3}.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p
Daño Mecánico	249	2,98	2,71	0,83	<0,0001

Cuadro 10. Análisis de Varianza para la variable daño mecánico en las familias F_{2:3}.

F.V.	gl	CM
Trat	82	10,19 (0,0018)
Error	166	5,95
Total	248	
CV	81.8	

Anexo 11. Estadística Descriptiva para la variable daño mecánico en las familias F_{2:3}

Trat	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis
BB50	3	8,33	1,15	1,33	13,86	7	9	-1,73	sd
CB1	3	3,67	4,62	21,33	126	1	9	1,73	sd
CB10	3	3,67	3,06	9,33	83,32	1	7	0,94	sd
CB11	3	4,33	3,06	9,33	70,5	1	7	-0,94	sd
CB12	3	3,67	3,06	9,33	83,32	1	7	0,94	sd
CB13	3	3	3,46	12	115,5	1	7	1,73	sd
CB14	3	4,33	4,16	17,33	96,08	1	9	1,29	sd
CB15	3	0,67	0,58	0,33	86,6	0	1	-1,73	sd
CB16	3	3	2	4	66,67	1	5	0	sd
CB17	3	3	2	4	66,67	1	5	0	sd
CB2	3	6,33	1,15	1,33	18,23	5	7	-1,73	sd
CB3	3	5	0	0	0	5	5	sd	sd
CB4	3	3	2	4	66,67	1	5	0	sd
CB5	3	3,33	3,51	12,33	105,4	0	7	0,42	sd
CB6	3	5	4	16	80	1	9	0	sd
CB7	3	3	2	4	66,67	1	5	0	sd
CB8	3	3	3,46	12	115,5	1	7	1,73	sd
CB9	3	1	0	0	0	1	1	sd	sd
CIMARRON	3	3	2	4	66,67	1	5	0	sd
D-SATIVA	3	1,67	2,89	8,33	173,2	0	5	1,73	sd
DV1	3	1,33	1,53	2,33	114,6	0	3	0,94	sd
DV10	3	0,67	0,58	0,33	86,6	0	1	-1,73	sd
DV11	3	1,33	1,53	2,33	114,6	0	3	0,94	sd
DV12	3	1,33	1,53	2,33	114,6	0	3	0,94	sd
DV13	3	1,67	1,15	1,33	69,28	1	3	1,73	sd
DV14	3	1	0	0	0	1	1	sd	sd
DV15	3	2	2,65	7	132,3	0	5	1,46	sd
DV16	3	3,67	3,06	9,33	83,32	1	7	0,94	sd
DV17	3	2,33	1,15	1,33	49,49	1	3	-1,73	sd
DV18	3	3	2	4	66,67	1	5	0	sd
DV19	3	1,67	1,15	1,33	69,28	1	3	1,73	sd
DV2	3	0,67	0,58	0,33	86,6	0	1	-1,73	sd
DV20	3	5	2	4	40	3	7	0	sd
DV21	3	4	3,61	13	90,14	0	7	-1,15	sd
DV22	3	3	3,46	12	115,5	1	7	1,73	sd
DV23	3	1,33	1,53	2,33	114,6	0	3	0,94	sd
DV24	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd
DV25	3	0,67	0,58	0,33	86,6	0	1	-1,73	sd
DV26	3	1	0	0	0	1	1	sd	sd
DV27	3	0,67	0,58	0,33	86,6	0	1	-1,73	sd
DV28	3	1,33	1,53	2,33	114,6	0	3	0,94	sd
DV29	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd
DV3	3	3	2	4	66,67	1	5	0	sd
DV30	3	1,33	1,53	2,33	114,6	0	3	0,94	sd
DV31	3	2,33	2,31	5,33	98,97	1	5	1,73	sd
DV4	3	4,33	1,15	1,33	26,65	3	5	-1,73	sd
DV5	3	5	4	16	80	1	9	0	sd
DV6	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd
DV7	3	5	4	16	80	1	9	0	sd
DV8	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd
DV9	3	3,67	4,62	21,33	126	1	9	1,73	sd
MAKALIOKA	3	1,33	1,53	2,33	114,6	0	3	0,94	sd

VZLA -21	1	1	0	0	0	1	1	sd	sd
VZLA-21	2	3	2,83	8	94,28	1	5	sd	sd
Z15	3	4,33	3,06	9,33	70,5	1	7	-0,94	sd
ZB1	3	7,67	2,31	5,33	30,12	5	9	-1,73	sd
ZB10	3	3,67	3,06	9,33	83,32	1	7	0,94	sd
ZB11	3	5,67	3,06	9,33	53,91	3	9	0,94	sd
ZB12	3	6,33	3,06	9,33	48,24	3	9	-0,94	sd
ZB2	3	1	0	0	0	1	1	sd	sd
ZB3	3	1	0	0	0	1	1	sd	sd
ZB4	3	3,67	2,31	5,33	62,98	1	5	-1,73	sd
ZB5	3	3	3,46	12	115,5	1	7	1,73	sd
ZB6	3	1,67	1,15	1,33	69,28	1	3	1,73	sd
ZB7	3	2,67	2,52	6,33	94,37	0	5	-0,59	sd
ZB8	3	3,67	3,06	9,33	83,32	1	7	0,94	sd
ZB9	3	2,33	2,31	5,33	98,97	1	5	1,73	sd
ZV1	3	3	2	4	66,67	1	5	0	sd
ZV10	3	2,67	3,79	14,33	142	0	7	1,6	sd
ZV11	3	1	0	0	0	1	1	sd	sd
ZV12	3	4	4,58	21	114,6	0	9	0,94	sd
ZV13	3	4,33	4,16	17,33	96,08	1	9	1,29	sd
ZV14	3	3	2	4	66,67	1	5	0	sd
ZV15	3	4,33	3,06	9,33	70,5	1	7	-0,94	sd
ZV16	3	2	2,65	7	132,3	0	5	1,46	sd
ZV17	3	1	1,73	3	173,2	0	3	1,73	sd
ZV2	3	8,33	1,15	1,33	13,86	7	9	-1,73	sd
ZV3	3	5,67	3,06	9,33	53,91	3	9	0,94	sd
ZV4	3	2,67	2,52	6,33	94,37	0	5	-0,59	sd
ZV5	3	4,33	2,31	5,33	53,29	3	7	1,73	sd
ZV6	3	1,67	1,15	1,33	69,28	1	3	1,73	sd
ZV7	3	5,67	1,15	1,33	20,38	5	7	1,73	sd
ZV8	3	3,67	2,31	5,33	62,98	1	5	-1,73	sd
ZV9	3	4,33	3,06	9,33	70,5	1	7	-0,94	sd

Anexo 12. Comparación medias para la variable resistencia al daño mecánico de las familias F_{2:3} de acuerdo con la escala del IRRI. (p≤0.05)

Genotipo	Medias	Grupo	Genotipo	Medias	Grupo
DV24	0,33	A	DV9	3,67	ABCDEFGH
DV29	0,33	A	CB1	3,67	ABCDEFGH
DV6	0,33	A	ZV12	4	ABCDEFGH
DV8	0,33	A	CB16	3	ABCDEFGH
DV27	0,67	AB	CB17	3	ABCDEFGH
DV25	0,67	AB	CIMARRON	3	ABCDEFGH
DV2	0,67	AB	ZV14	3	ABCDEFGH
DV10	0,67	AB	ZV1	3	ABCDEFGH
CB15	0,67	AB	DV18	3	ABCDEFGH
ZV17	1	ABC	DV3	3	ABCDEFGH
D-SATIVA	1,67	ABCD	CB4	3	ABCDEFGH
ZV11	1	ABCDE	CB7	3	ABCDEFGH
CB9	1	ABCDE	DV21	4	ABCDEFGH
DV14	1	ABCDE	ZB8	3,67	ABCDEFGH
ZB3	1	ABCDE	CB10	3,67	ABCDEFGH
DV26	1	ABCDE	CB12	3,67	ABCDEFGH
ZB2	1	ABCDE	DV16	3,67	ABCDEFGH
MAKALIOKA	1,33	ABCDE	ZB10	3,67	ABCDEFGH
DV12	1,33	ABCDE	ZB4	3,67	ABCDEFGH
DV23	1,33	ABCDE	ZV8	3,67	ABCDEFGH
DV28	1,33	ABCDE	ZV13	4,33	BCDEFGH
DV30	1,33	ABCDE	CB14	4,33	BCDEFGH
DV11	1,33	ABCDE	Z15	4,33	BCDEFGH
DV1	1,33	ABCDE	ZV15	4,33	BCDEFGH
DV15	2	ABCDEF	CB11	4,33	BCDEFGH
ZV16	2	ABCDEF	ZV9	4,33	BCDEFGH
DV19	1,67	ABCDEF	CB6	5	BCDEFGH
ZB6	1,67	ABCDEF	DV5	5	BCDEFGH
DV13	1,67	ABCDEF	DV7	5	BCDEFGH
ZV6	1,67	ABCDEF	ZV5	4,33	BCDEFGH
ZV10	2,67	ABCDEF	DV4	4,33	CDEFGH
DV31	2,33	ABCDEFG	DV20	5	DEFGH
VZLA-21	2,33	ABCDEFG	CB3	5	DEFGH
ZB9	2,33	ABCDEFG	ZV3	5,67	EFGH
ZB7	2,67	ABCDEFG	ZB11	5,67	EFGH
ZV4	2,67	ABCDEFG	ZV7	5,67	FGH
DV17	2,33	ABCDEFGH	ZB12	6,33	FGH
CB13	3	ABCDEFGH	CB2	6,33	FGH
ZB5	3	ABCDEFGH	ZB1	7,67	GH
CB8	3	ABCDEFGH	ZV2	8,33	H
DV22	3	ABCDEFGH	BB50	8,33	H
CB5	3,33	ABCDEFGH			

Anexo 13. Prueba de Normalidad de Shapiro-Wilks (modificado) para la variable número de plantas muertas de las familias F_{2,3}.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p
Pl Muertas	249	2,54	2,82	0,79	<0,0001

Anexo 14. Estadística Descriptiva para la variable número de plantas muertas en las familias F_{2,3}.

Trat	n	Media	D.E.	Var(n-1)	CV	Mín	Máx	Asimetría	Kurtosis
BB50	3	8,67	1,53	2,33	17,63	7	10	-0,94	sd
CB1	3	3,33	5,77	33,33	173,2	0	10	1,73	sd
CB10	3	4	3	9	75	1	7	0	sd
CB11	3	3,33	3,21	10,33	96,44	1	7	1,55	sd
CB12	3	4	2,65	7	66,14	2	7	1,46	sd
CB13	3	3,33	4,04	16,33	121,2	1	8	1,73	sd
CB14	3	4,67	4,04	16,33	86,6	1	9	0,72	sd
CB15	3	1	1,73	3	173,2	0	3	1,73	sd
CB16	3	2,33	2,31	5,33	98,97	1	5	1,73	sd
CB17	3	1,67	1,53	2,33	91,65	0	3	-0,94	sd
CB2	3	5,33	2,08	4,33	39,03	3	7	-1,29	sd
CB3	3	4	1	1	25	3	5	0	sd
CB4	3	0,67	0,58	0,33	86,6	0	1	-1,73	sd
CB5	3	3,33	5,77	33,33	173,2	0	10	1,73	sd
CB6	3	4,67	4,73	22,33	101,3	1	10	1,39	sd
CB7	3	2,33	1,15	1,33	49,49	1	3	-1,73	sd
CB8	3	3	3,46	12	115,5	1	7	1,73	sd
CB9	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd
CIMARRON	3	2,67	2,08	4,33	78,06	1	5	1,29	sd
D-SATIVA	3	1,33	2,31	5,33	173,2	0	4	1,73	sd
DV1	3	1	1	1	100	0	2	0	sd
DV10	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd
DV11	3	1	1	1	100	0	2	0	sd
DV12	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd
DV13	3	1,33	0,58	0,33	43,3	1	2	1,73	sd
DV14	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd
DV15	3	0,67	0,58	0,33	86,6	0	1	-1,73	sd
DV16	3	2,33	3,21	10,33	137,8	0	6	1,55	sd
DV17	3	1,67	0,58	0,33	34,64	1	2	-1,73	sd
DV18	3	1,67	0,58	0,33	34,64	1	2	-1,73	sd
DV19	3	1,33	0,58	0,33	43,3	1	2	1,73	sd
DV2	3	0,67	1,15	1,33	173,2	0	2	1,73	sd
DV20	3	4,33	2,08	4,33	48,04	2	6	-1,29	sd
DV21	3	3	3,61	13	120,2	0	7	1,15	sd
DV22	3	3	3,46	12	115,5	1	7	1,73	sd
DV23	3	0,67	1,15	1,33	173,2	0	2	1,73	sd
DV24	3	0	0	0	sd	0	0	sd	sd
DV25	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd
DV26	3	1	0	0	0	1	1	sd	sd
DV27	3	0,67	0,58	0,33	86,6	0	1	-1,73	sd
DV28	3	0,67	0,58	0,33	86,6	0	1	-1,73	sd
DV29	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd

DV3	3	2,33	1,53	2,33	65,47	1	4	0,94	sd
DV30	3	1	1	1	100	0	2	0	sd
DV31	3	1,33	0,58	0,33	43,3	1	2	1,73	sd
DV4	3	3,33	1,53	2,33	45,83	2	5	0,94	sd
DV5	3	4,67	4,62	21,33	98,97	2	10	1,73	sd
DV6	3	0	0	0	sd	0	0	sd	sd
DV7	3	3,67	4,73	22,33	128,9	0	9	1,39	sd
DV8	3	0,33	0,58	0,33	173,2	0	1	1,73	sd
DV9	3	3,67	4,62	21,33	126	1	9	1,73	sd
MAKALIOKA	3	1,67	1,15	1,33	69,28	1	3	1,73	sd
VZLA -21	1	1	0	0	0	1	1	sd	sd
VZLA-21	2	1,5	0,71	0,5	47,14	1	2	sd	sd
Z15	3	3,33	2,08	4,33	62,45	1	5	-1,29	sd
ZB1	3	8	2,65	7	33,07	5	10	-1,46	sd
ZB10	3	2,33	3,21	10,33	137,8	0	6	1,55	sd
ZB11	3	6	3,61	13	60,09	3	10	1,15	sd
ZB12	3	7	3	9	42,86	4	10	0	sd
ZB2	3	1	1	1	100	0	2	0	sd
ZB3	3	1,33	0,58	0,33	43,3	1	2	1,73	sd
ZB4	3	2	1	1	50	1	3	0	sd
ZB5	3	3,67	3,79	14,33	103,3	1	8	1,6	sd
ZB6	3	1,67	1,15	1,33	69,28	1	3	1,73	sd
ZB7	3	2,67	1,53	2,33	57,28	1	4	-0,94	sd
ZB8	3	3,67	2,89	8,33	78,73	2	7	1,73	sd
ZB9	3	1,67	1,53	2,33	91,65	0	3	-0,94	sd
ZV1	3	2,33	2,08	4,33	89,21	0	4	-1,29	sd
ZV10	3	2,67	4,62	21,33	173,2	0	8	1,73	sd
ZV11	3	1,33	1,53	2,33	114,6	0	3	0,94	sd
ZV12	3	3,67	4,73	22,33	128,9	0	9	1,39	sd
ZV13	3	3,67	5,51	30,33	150,2	0	10	1,67	sd
ZV14	3	1	0	0	0	1	1	sd	sd
ZV15	3	4,67	3,51	12,33	75,25	1	8	-0,42	sd
ZV16	3	2,33	3,21	10,33	137,8	0	6	1,55	sd
ZV17	3	1	1,73	3	173,2	0	3	1,73	sd
ZV2	3	8	2	4	25	6	10	0	sd
ZV3	3	4	4,36	19	109	1	9	1,63	sd
ZV4	3	1	1	1	100	0	2	0	sd
ZV5	3	4	2	4	50	2	6	0	sd
ZV6	3	1	1,73	3	173,2	0	3	1,73	sd
ZV7	3	5,33	0,58	0,33	10,83	5	6	1,73	sd
ZV8	3	2,33	0,58	0,33	24,74	2	3	1,73	sd
ZV9	3	4	3,61	13	90,14	0	7	-1,15	sd

Anexo 15. Comparación de medias de Duncan para número de plantas muertas en familias F_{2:3} (p<0,05)

Genotipo	X	n	Grupo	Genotipo	X	n	Grupo
DV24	0	3	A	CB7	2,3	3	ABCD
DV6	0	3	A	ZV8	2,3	3	ABCD
DV12	0,3	3	A	CB16	2,3	3	ABCD
DV14	0,3	3	A	ZB10	2,3	3	ABCD
DV10	0,3	3	A	ZV16	2,3	3	ABCD
DV8	0,3	3	A	ZV10	2,7	3	ABCD
DV29	0,3	3	A	CIMARRON	2,7	3	ABCD
DV25	0,3	3	A	ZB7	2,7	3	ABCD
CB9	0,3	3	A	CB8	3	3	ABCD
DV28	0,7	3	A B	DV21	3	3	ABCD
DV27	0,7	3	A B	DV22	3	3	ABCD
DV15	0,7	3	A B	CB5	3,3	3	ABCDE
DV2	0,7	3	A B	DV4	3,3	3	ABCDE
DV23	0,7	3	A B	CB13	3,3	3	ABCDE
CB4	0,7	3	A B	Z15	3,3	3	ABCDE
ZB2	1	3	A B	CB11	3,3	3	ABCDE
DV30	1	3	A B	CB1	3,3	3	ABCDE
DV26	1	3	A B	ZV13	3,7	3	ABCDE
ZV6	1	3	A B	ZV12	3,7	3	ABCDE
DV11	1	3	A B	ZB8	3,7	3	ABCDE
ZV4	1	3	A B	DV9	3,7	3	ABCDE
ZV14	1	3	A B	DV7	3,7	3	ABCDE
ZV17	1	3	A B	ZB5	3,7	3	ABCDE
DV1	1	3	A B	ZV5	4	3	ABCDEF
CB15	1	3	A B	CB3	4	3	ABCDEF
ZB3	1,3	3	ABC	ZV3	4	3	ABCDEF
DV19	1,3	3	ABC	CB10	4	3	ABCDEF
ZV11	1,3	3	ABC	CB12	4	3	ABCDEF
VZLA-21	1,3	3	ABC	ZV9	4	3	ABCDEF
DV31	1,3	3	ABC	DV20	4,3	3	ABCDEF
DV13	1,3	3	ABC	CB6	4,7	3	ABCDEF
D-SATIVA	1,3	3	ABC	DV5	4,7	3	ABCDEF
DV17	1,7	3	ABC	CB14	4,7	3	ABCDEF
DV18	1,7	3	ABC	ZV15	4,7	3	ABCDEF
CB17	1,7	3	ABC	CB2	5,3	3	BCDEF
ZB9	1,7	3	ABC	ZV7	5,3	3	BCDEF
ZB6	1,7	3	ABC	ZB11	6	3	CDEF
MAKALIOKA	1,7	3	ABC	ZB12	7	3	DEF
ZB4	2	3	ABC	ZV2	8	3	EF
DV16	2,3	3	ABCD	ZB1	8	3	EF
DV3	2,3	3	ABCD	BB50	8,7	3	F
ZV1	2,3	3	ABCD				

Anexo 16. Anexo. Análisis de Correlación entre las variables estudiadas

Variable	by Variable	Correlation	Signif Prob	Plot Corr
NHuevos	96h	0,2178	0,3066	
GroAdx	96h	-0,3993	0,0532	
GroAdx	NHuevos	-0,1098	0,6095	
GroAbx	96h	-0,5940	0,0022*	
GroAbx	NHuevos	-0,1926	0,3672	
GroAbx	GroAdx	0,7760	<,0001*	
micadx	96h	-0,0942	0,6616	
micadx	NHuevos	-0,1816	0,3958	
micadx	GroAdx	0,3001	0,1542	
micadx	GroAbx	0,0747	0,7286	
macad	96h	0,0669	0,7560	
macad	NHuevos	-0,2739	0,1952	
macad	GroAdx	-0,2642	0,2122	
macad	GroAbx	-0,0492	0,8193	
macad	micadx	-0,3834	0,0644	
longmad	96h	0,1536	0,4736	
longmad	NHuevos	-0,1173	0,5850	
longmad	GroAdx	0,3152	0,1335	
longmad	GroAbx	-0,0603	0,7795	
longmad	micadx	0,3582	0,0857	
longmad	macad	-0,2354	0,2682	
mic/mm2ab	96h	-0,1970	0,3562	
mic/mm2ab	NHuevos	-0,3077	0,1436	
mic/mm2ab	GroAdx	0,3056	0,1464	
mic/mm2ab	GroAbx	0,0996	0,6433	
mic/mm2ab	micadx	0,8636	<,0001*	
mic/mm2ab	macad	-0,3980	0,0541	
mic/mm2ab	longmad	0,4021	0,0514	
macab	96h	0,5475	0,0056*	
macab	NHuevos	0,2152	0,3126	
macab	GroAdx	-0,0064	0,9762	
macab	GroAbx	-0,0868	0,6868	
macab	micadx	-0,0343	0,8736	
macab	macad	-0,0720	0,7380	
macab	longmad	-0,2218	0,2976	
macab	mic/mm2ab	-0,2657	0,2095	
longmab	96h	0,1425	0,5064	
longmab	NHuevos	-0,0316	0,8834	
longmab	GroAdx	0,0896	0,6771	
longmab	GroAbx	-0,2287	0,2824	
longmab	micadx	-0,1455	0,4975	
longmab	macad	0,1545	0,4711	
longmab	longmad	0,4881	0,0155*	
longmab	mic/mm2ab	-0,0142	0,9474	
longmab	macab	-0,2502	0,2383	
silice	96h	-0,3244	0,1220	
silice	NHuevos	-0,1376	0,5215	
silice	GroAdx	0,3822	0,0653	
silice	GroAbx	0,2379	0,2631	
silice	micadx	0,6612	0,0004*	
silice	macad	-0,4739	0,0193*	
silice	longmad	0,2637	0,2131	
silice	mic/mm2ab	0,6198	0,0012*	
silice	macab	-0,1527	0,4764	
silice	longmab	-0,2258	0,2888	

