

## Identificación de marcadores SSR asociados a la resistencia de arroz a *Rhizoctonia solani*

## Identification of SSR markers linked to resistance of rice to *Rhizoctonia solani*

## Identificação de marcadores SSR associados à resistência do arroz a *Rhizoctonia solani*

Reinaldo Cardona y Nelly Delgado\*

INIA-Portuguesa Km 5 autopista Araure-Barquisimeto, Araure estado Portuguesa, 3303. Correos electrónicos: rcardonaster@gmail.com; delgado.nelly@gmail.com.

### Resumen

Con el fin de investigar la asociación de la resistencia a *Rhizoctonia solani*, causante de la pudrición de la vaina en arroz (PDV), con marcadores microsateles SSR (Simple Sequence Repeats), se realizaron dos cruces entre cultivares comerciales de arroz (Palmar x Fonaiap 1 y Jefferson x Fonaiap 2000). Las plantas fueron inoculadas al comienzo de la emergencia de la panícula y después se colocaron en cámara húmeda durante una semana. Luego, se determinó el porcentaje del área afectada por la enfermedad (0= sin lesión, hasta 9= 100% de área afectada), las plantas se agruparon de acuerdo a la escala de evaluación. Los marcadores SSR fueron evaluados una vez realizada la extracción de ADN de hojas por el método descrito por Zambrano, amplificando sus fragmentos usando la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) y visualizados los productos de la PCR por electroforesis en geles de agarosa al 3%. Para la detección de QTL que confirió resistencia a PDV, se utilizó el método de mapeo por intervalos compuestos, decretando la presencia de QTL con umbral LOD > 2,4. En La progenie de los cruces Palmar x Fonaiap 1 se detectaron 3 QTLs localizados en los cromosomas 1, 4 y 12 flanqueado por los marcadores RM 572 y RM 449, RM 273 y RM 3471, RM 3472 y RM 309, respectivamente. No se detectaron QTLs en la progenie de cruces entre Jefferson X Fonaiap 2000. Los QTLs encontrados en el presente trabajo, son una valiosa contribución al estudio de la resistencia en el arroz a *R. solani*.

**Palabras clave:** *oryza sativa*, pudrición de la vaina, QTL, resistencia varietal.

---

Recibido el 11-03-2017 • Aceptado el 21-09-2018.

\*Autor de correspondencia. Correo electrónico: delgado.nelly@gmail.com

## Abstract

In order to investigate rice resistance to *Rhizoctonia solani*, which causes rice sheath rot (PDV), by use of microsatellite SSR markers (Simple Sequence Repeats), two crossbreeding were made between commercial rice cultivars (Palmar x Fonaiaip 1 and Jefferson x Fonaiaip 2000). The plants were inoculated at the beginning of the emergence of the panicle and then placed in a humid chamber for a week. Afterwards, the area affected by the disease was determined (0 = no lesions, up to 9 = 100% affected area); the plants were grouped according to the evaluation scale. The SSR markers were evaluated once DNA was extracted from leaves following methodology described by Zambrano, but using larger fragments obtained by the polymerase chain reaction (PCR); PCR products were observed by electrophoresis in agarose gels to 3%. To determine QTL, which measures the resistance to PDV, the composite interval mapping method was used; the threshold LOD > 2.4 indicated that QTL was present. The progeny of Palmar x Fonaiaip 1 crossbreeding showed 3 QTL located on chromosomes 1, 4 and 12; they were outflanked by the markers RM 572 and RM 449, RM 273 and RM 3471, RM 3472 and RM 309, respectively. No QTL were detected in the progeny from Jefferson x Fonaiaip 2000 crossbreeding. The QTL founds in this work are a valuable contribution to study the rice resistance to *R. solani*.

**Key words:** *oryza sativa*, sheath rice, QTL, varietal resistance.

## Resumo

A fim de investigar a associação de resistência à *Rhizoctonia solani*, causando podridão bainha do arroz (PDV), com marcadores microssatélites (SSR Sequência simples Repete), dois cruzamentos entre cultivares de arroz (palmar x Fonaiaip 1 e Jefferson x Fonaiaip 2000). As plantas foram inoculadas no início do surgimento da panícula e colocadas em câmara úmida por uma semana. Em seguida, a percentagem da área afectada pela doença (0 = nenhuma lesão para 9 = 100% de área afectada) é determinado, as plantas foram agrupados de acordo com a escala de classificação. SSR foram avaliadas directamente após a extracção do ADN a partir de folhas pelo método descrito por Zambrano, amplificando fragmentos utilizando a reacção em cadeia da polimerase (PCR) e visualizou-se os produtos de PCR por electroforese em géis de agarose a 3%. o método de mapeamento de intervalo composto foi utilizado para a detecção de QTL que confere resistência ao PDV, adoptar a presença de limiar QTL LOD > 2,4. Na progenia de cruces Palmar x Fonaiaip 1 3 QTLs localizados nos cromossomas 1, 4 e 12 flanqueadas por RM RM 572 e 449, RM 273 e RM 3471, 3472 e RM RM 309, respectivamente, foram detectados marcadores. Não foram detectados QTLs na progénie dos cruzamentos entre Jefferson X Fonaiaip 2000. Os QTLs encontrados no presente trabalho são uma contribuição valiosa para o estudo da resistência em arroz a *R. solani*

**Palavras-chave:** *oryza sativa*, podridão podre, QTL, resistência varietal.

## Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.) es uno de los cereales más importante cultivado en Venezuela. Entre los factores bióticos que afectan al cultivo del arroz se encuentra el añublo de la vaina o pudrición de la vaina (PDV), enfermedad causada por el hongo habitante del suelo *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Anam: *Rhizoctonia solani* Kühn) (Ogoshi, 1987) e identificada por primera vez en Venezuela por Malaguti (1951). El agente causal del añublo de la vaina del arroz en Venezuela se ubica en el grupo de anastomosis AG-1 IA (Cedeño *et al.*, 1996), caracterizado también usando microsatélites por González-Vera *et al.* (2010).

Las plantas de arroz manifiestan los síntomas de la enfermedad en la fase de máximo macollamiento, aproximadamente 50-60 días después de la germinación. Las infecciones comienzan al entrar en contacto los tallos con los esclerocios que sobrenadan en el agua de riego, estos germinan, desarrollan hifas que crecen en los tejidos de la planta y de estas hifas se desarrollan otras lobadas conocidas como cojín infeccioso de donde emergen las hifas de penetración (Rodríguez *et al.*, 1999).

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

## Introduction

Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important cereals grown in Venezuela. Among biotic factors affecting the rice crop is pod rot (PDV), which is a disease caused by the soil-dwelling fungi *Thanatephorus cucumeris* (Frank) Donk (Anam: *Rhizoctonia solani* Kühn) (Ogoshi, 1987); this fungi was identified for the first time in Venezuela by Malaguti (1951). The causal agent of rice sheath rot in Venezuela is located in the AG-1 IA anastomosis group (Cedeño *et al.*, 1996); González-Vera *et al.* (2010) also characterized this anastomosis group by using microsatellites.

Rice plants show disease symptoms at the tillering stage, approximately 50-60 days after germination. The infections begin when stems come in contact with the sclerotia found in the irrigation water; sclerotia germinate and develop hyphae in the tissues of plant, producing other lobes known as the infectious cushion from which the penetration hyphae emerge (Rodríguez *et al.*, 1999).

Most of the symptoms in the plants are observed at the base of the stems always humid by the irrigation water; the symptoms begin with an aqueous, circular, oblong or ellipsoidal spot, olive green color, approximately 1 cm in length. Then the spots develop to reach 2-4 x 1-1,5 cm in length, with a pale or whitish brown center, surrounded by a brown or purple halo with an irregular border (Correa-Victoria, 1993). In favorable conditions, the disease can affect upper leaves, producing similar

marrón claro o blanquecino, rodeada de un halo de color marrón o morado con un borde irregular (Correa-Victoria, 1993). En condiciones favorables, la enfermedad puede afectar las hojas superiores, produciendo síntomas similares a los que ocurren en las vainas y si estas condiciones persisten las lesiones pueden unirse y provocar el secamiento de las hojas y tallos, las pérdidas en rendimiento pueden llegar de un 5% hasta un 50% (Nass *et al.*, 1995).

Para el control de la enfermedad, se han usado prácticas culturales, entre ellas el uso de productos químicos (Nass *et al.*, 1995), pero en los últimos años, por su impacto ambiental negativo, ha generado preocupación por el abuso del uso de agroquímicos en campos comerciales de arroz. Por ello, una alternativa duradera, económica y amigable con el ambiente es la obtención de cultivares de arroz resistentes a *R. solani* (Graterol *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 2004), siendo necesaria la identificación de genes que confieren resistencia a la enfermedad.

Aun cuando, *R. solani* afecta a un amplio rango de hospedantes, no se han identificado cultivares comerciales de arroz o especies silvestres relacionadas que presenten resistencia completa. Sin embargo, se han observado diferencias importantes en la susceptibilidad a *R. solani* entre los cultivares de arroz. Por lo anterior, se cree que la resistencia en el arroz está controlada por múltiples genes o loci de rasgos cuantitativos [QTL] (Jia *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2014).

symptoms to those that occur in the pods and if these conditions persist, the lesions can join together and cause of the drying of the leaves and stems; the yield can fall between 5% to 50% (Nass *et al.*, 1995).

For the control of the disease, agronomic practices have been used, among them, chemical products application (Nass *et al.*, 1995); however, in recent years, the abusive use of agrochemicals in commercial rice fields has produced a negative environmental impact, generating concern. Therefore, obtaining rice cultivars resistant to *R. solani* would allow an alternative production lasting, economical and respectful with the environment (Graterol *et al.*, 1996; Delgado *et al.*, 2004), being necessary the genes identification for resistance to this disease.

Even though, *R. solani* affects a wide range of hosts, no commercial rice cultivars or related wild species have been identified to show complete resistance. However, the rice cultivars have showed important differences in susceptibility to *R. solani*. Therefore, it is believed that the resistance in rice is controlled by multiple genes or quantitative trait loci [QTL] (Jia *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2014).

A technique to detect genetic resistance is the Molecular Marker Assisted Selection (SAM), which helps save time, resources and effort in plants improvement programs. This technique can be applied in seedling stage, being useful when the characteristics of interest are manifested in advanced stages of plant development, allowing to discard the

Una técnica para detectar genes de resistencia es la Selección Asistida por Marcadores Moleculares (SAM) que ayuda ahorrar tiempo, recursos y esfuerzo en los programas de mejoramiento de plantas. Esta técnica se puede aplicar en etapa de plántula, siendo útil cuando las características de interés se manifiestan en etapas posteriores de desarrollo de la planta, eliminando los genotipos no deseados en etapas tempranas, reduciendo el número de líneas a evaluarse en las etapas avanzadas del programa y aumenta la eficiencia del mejoramiento por realizarse la selección cuando existe mayor probabilidad de ligamiento entre el marcador y el QTL seleccionado. La SAM es una vía rápida por seleccionar plantas según su genotipo, al ser difícil distinguir por fenotipo las plantas homocigotas de las heterocigotas para el carácter deseado (Akhtar *et al.*, 2010).

Para el uso de la SAM se requiere que los marcadores sean co-segregarse o mapearse lo más cerca posible del gen objetivo. Para mayor exactitud con el uso de la SAM deben usarse dos marcadores que flanquean el gen objetivo (Peng *et al.*, 2000), los marcadores deben expresar polimorfismo entre los genotipos que presentan o no el gen objetivo. Se necesita que los marcadores PCR sean simples y económicos garantizando el poder de genotipiado para el cribado de grandes poblaciones.

Entre los marcadores moleculares están los denominados microsatélites, también llamados marcadores de secuencias simples repetidas (SSR), son actualmente la herramienta

unwanted genotypes in early stages, reducing the number of lines to be evaluated in the advanced stages and increasing the efficiency to perform selection when there is a greater likelihood of linkage between the marker and the selected QTL. SAM is a fast way to select plants according to their genotype, due to the difficulties to distinguish the desired character in homozygous and heterozygous plants through its phenotype (Akhtar *et al.*, 2010).

For the SAM application, markers must be co-segregated or mapped as close as possible to the target gene. For greater accuracy, two markers flanking the target gene should be used (Peng *et al.*, 2000); markers must express polymorphism between genotypes that present or not the target gene. It is necessary that PCR markers be simple and economical, ensuring the power of genotyping for the screening of large populations.

Among molecular markers are the so-called microsatellites or the simple sequences repeated markers (SSR); they are currently the most complete tool for SAM. There are large collections of SSR markers located in both the uncoded and expressed portions of the rice genome (Mohler and Singrun, 2004, Srinivasachary *et al.*, 2011).

To achieve the goal with SAM, it is important to understand the resistance mechanisms to PDV, to have a detailed map of the selected genes and the cloning of them. There are two common problems with SAM technic using resistant QTL to PDV, (i) the identified DNA markers may

más completa para el SAM. Existen grandes colecciones de marcadores SSR ubicados tanto en la porción no codificada como expresada del genoma del arroz (Mohler y Singrun, 2004; Srinivasachary *et al.*, 2011).

Para lograr el objetivo con la SAM, es importante comprender los mecanismos de resistencia a la PDV, tener un mapa detallado de los genes de interés y la clonación de los mismos. Existen dos problemas comunes para el uso de SAM con QTL de resistencia al PDV, (i) los marcadores de ADN identificados pueden no estar asociados a la resistencia a PDV en un germoplasma diferente al evaluado, y (ii) los métodos de evaluación fenotípica deben ser precisos para verificar la resistencia genética (Pan *et al.*, 2005). De allí que el objetivo de esta investigación fue determinar en dos poblaciones segregantes de arroz, los marcadores moleculares polimórficos y su asociación con los genes de resistencia a *R. solani*.

## Materiales y métodos

El estudio se localizó en las instalaciones del INIA-Portuguesa, Araure, estado Portuguesa (9°36' N y 69°13' O; altitud de 200 msnm), donde se conformaron las poblaciones experimentales a partir de los cultivares de arroz Palmar, Jefferson, Fonaiap 1 y Fonaiap 2000, se utilizaron como progenitores resistentes los cultivares Palmar y Jefferson y como susceptibles los cultivares Fonaiap1 y Fonaiap 2000, estos parentales fueron elegidos de acuerdo con los resultados obtenidos por Delgado y Rodríguez

not be associated with the resistance to PDV in a germplasm different from the one evaluated, and (ii) phenotypic evaluation methods should be accurate to verify genetic resistance (Pan *et al.*, 2005). Hence, the objective of this research was to determine in two segregating populations of rice, the polymorphic molecular markers and their association with the genes of the resistance to *R. solani*.

## Materials and methods

The study was located at the INIA-Portuguesa, Araure, Portuguesa state (9°36' N and 69°13' W, altitude of 200 m above sea level); the experimental populations were formed from the rice cultivars Palmar, Jefferson, Fonaiap 1 and Fonaiap 2000; Palmar and Jefferson cultivars were used as resistant parents and Fonaiap 1 and Fonaiap 2000 were used as susceptible cultivars. These parentals were chosen according to the results obtained by Delgado and Rodríguez (2005), making the crossbreeding between Fonaiap1 x Palmar and Fonaiap 2000 x Jefferson. While the parents DNA extraction and their offspring, as well as the amplification and evaluation of the different SSR selected, was carried out in the Biotechnology Laboratory of INIA-CENIAP.

The segregating plants and their progenitors were placed in pots separately, commercial fertilizers application was made, manual weed control, insect pest control with insecticides and fungicides were applied for disease control except *R. Solani*, when it was necessary.

(2005), realizándose los cruces entre Fonaiap 1 x Palmar y Fonaiap 2000 x Jefferson. Mientras que la extracción del ADN de los progenitores y su descendencia, así como también la amplificación y evaluación de los diferentes SSR seleccionados, se efectuó en el Laboratorio de Biotecnología del INIA-CENIAP.

Las plantas segregantes y sus progenitores se mantuvieron en potes cada una por separado, realizándose la fertilización comercial, desmalezado a mano y control de insectos plagas con insecticidas, los controles de enfermedades, de ser necesarios, se realizaron con fungicidas específicos no recomendados para *R. solani*.

De la descendencia  $F_2$  de cada cruce se tomaron 100 plantas, evaluándose la reacción a *R. solani*, tanto en los progenitores como en sus descendencias, mediante inoculaciones artificiales realizadas en 3 macollos.planta<sup>-1</sup> en condiciones de umbráculo y cultivadas en potes de 11.775 cm<sup>3</sup> contentivos de suelo estéril. Se usó como inoculante de *R. solani* el aislamiento 101-18, recolectado de plantas enfermas en campos de producción comercial, registrado, identificado y preservado en el laboratorio de Fitopatología del INIA-Portuguesa.

Las hojas de las plantas de arroz se enumeraron del 1 al 5, siendo la número 1 la hoja bandera, evaluándose las lesiones en la segunda, tercera, cuarta y quinta hoja por ser estas las más indicadas para determinar la severidad de la infección (Eizenga *et al.*, 2002). Las plantas se inocularon en el estado de crecimiento R4 (inicio de la

From the  $F_2$  offspring of each crossing, 100 plants were taken to evaluate the effect of *R. solani* on the parents and their offspring in a greenhouse, using artificial inoculations carried out in 3 tillers.plant<sup>-1</sup> cultivated in pots of 11,775 cm<sup>3</sup> with sterile soil. It was used as inoculant the isolation 101-18 of *R. solani*, collected from diseased plants in fields of commercial production, registered, identified and preserved in the laboratory of Phytopathology of INIA-Portuguesa.

The leaves of the rice plants were listed from 1 to 5, of which the number 1 was the flag leaf, and the lesions were evaluated in second, third, fourth and fifth leaves, as these are the most indicated to determine the severity of the infection (Eizenga *et al.*, 2002). The plants were inoculated in the growth stage R4 (start of the panicle), placing an agar disk containing mycelium of *R. solani* in the knot inside sheath; after inoculation the plants were placed in a humid chamber and they were incubate for a week (Eizenga *et al.*, 2002).

After this time, the evaluations were carried out in the three inoculated tillers.plant<sup>-1</sup>; the values were averaged and compared with the scale of the standard evaluation system of the International Rice Research Institute (IRRI, 2002), to measure the progress of the lesions or the percentage of the PDV-affected area in the plants (Progress (%) = (AM / AP) \* 100), where AM is the sum of the PDV-affected area length in the inoculated tiller and AP is the height of the tiller, measured from the ground

ejecución de la panícula), colocando un disco de agar contentivo de micelio del *R. solani* en el nudo dentro de la vaina de la hoja, después de la inoculación las plantas se llevaron a una cámara húmeda y se dejaron incubadas por una semana (Eizenga *et al.*, 2002).

Luego de este tiempo, se realizaron las evaluaciones en los 3 macollos. planta<sup>-1</sup> inoculados y se promedió su valor, utilizando la escala del sistema estándar de evaluación del Instituto Internacional de Investigación del Arroz (IRRI, 2002), midiendo el avance de las lesiones (Avance (%) = (AM/AP)\*100), donde AM= es la suma de la longitud del área afectada por la PDV en el macollo inoculado y AP= altura del macollo, medido desde el suelo hasta el nudo de la segunda hoja, determinándose así el porcentaje de área afectada de las plantas por la enfermedad PDV (Yadav *et al.*, 2015). Posteriormente las plantas se agruparon según la escala de 0 a 9 donde 0 = sin lesión y 9 = lesiones cubriendo del 90 al 100% del área. La escala se basa en la altura relativa de la lesión, pero por realizarse en el presente trabajo inoculaciones artificiales y proveer mejores condiciones para el desarrollo de la enfermedad, la escala se modificó en 10 valores con intervalos de 10%, es decir 0, 10 y 20% y así sucesivamente.

Las plantas inoculadas se clasificaron según la escala de evaluación en resistentes (R) y susceptibles (S), representándose en una matriz. El criterio para dicha clasificación fue el siguiente, todas las plantas con valores entre 0 y 4 fueron consideradas resistentes, mientras

to the second leaf knot (Yadav *et al.*, 2015). Later the plants were grouped according to the scale from 0 to 9 where 0 = no lesions and 9 = lesions covering 90 to 100% of the area. The scale was based on the relative size of the lesion, but it was modified in 10 values with intervals of 10%, that is, 0, 10 and 20% and so on, because the artificial inoculations carried out in the current work, improved the conditions for the development of the PDV.

The inoculated plants were classified in resistant (R) and susceptible (S), according to the scale; this classification was represented in a matrix. All plants with values between 0 and 4 were considered resistant (R), while those with values between 5 and 9 were considered susceptible (S); likewise, plants were considered resistant (R) when affected area reach up to 45%, but if the value was higher the plants were considered susceptible (S) (Yadav *et al.*, 2015). To analyze the segregation of the resistance to *R. solani*, the chi-squared test ( $\chi^2$ ) was used.

Before the plants inoculation, they were placed in a greenhouse and when they reached the maximum tillering (45-60 dds), 7 leaves.plant<sup>-1</sup> were collected to extract DNA, according to the methodology described by Zambrano *et al.* (2002). The quality and quantity of DNA were determined in 0.8% agarose gel stained with ethidium bromide, using UV light and comparing with commercial standards of known concentration.

To determine the association between microsatellites and at the same time, their association with



que las que tuvieron valores entre 5 y 9 se consideraron susceptibles, se consideran resistentes hasta un valor de 45% de área afectada, superior a este valor se consideró susceptible (Yadav *et al.*, 2015). Para el análisis de la segregación de la resistencia a *R. solani*, se usó la prueba de bondad de ajuste Chi-cuadrado ( $\chi^2$ ).

Antes de la inoculación de las plantas para su evaluación, estas se colocaron en umbráculo y cuando alcanzaron el máximo macollamiento (45-60 dds), se recolectaron 7 hojas. planta<sup>-1</sup> para la extracción del ADN, realizado según el método de Zambrano *et al.* (2002). La calidad y cantidad del ADN fueron observadas en gel de agarosa 0,8% teñido con bromuro de etidio, bajo luz UV, comparando con estándares comerciales de concentración conocida.

Para determinar la asociación entre los microsatélites y su asociación con el gen o los genes de resistencia presentes en los cultivares progenitores y sus segregantes, se seleccionaron las secuencias y posición de 100 marcadores SSR polimórficos en los cuatro progenitores y con una separación de 10 cM aprox de la base de datos GRAMENE y fueron sintetizados en IDT, Inc. (Coralville, IA, EE.UU).

Los extractos de ADN obtenidos, se sometieron a PCR usando los iniciadores de los microsatélites o de secuencias simples repetidas (SSR) seleccionados, bajo las siguientes condiciones de reacción: volumen final 15  $\mu$ L, extracto de ADN 1,5  $\mu$ L (10 ng.mL<sup>-1</sup>), cebadores (primers) 0,6  $\mu$ L (10  $\mu$ M, sentido y contrasentido),

the resistant gene or genes present in the parental cultivars and their segregates, the sequences and position of 100 polymorphic SSR markers were selected in the four progenitors, with an approximate separation of 10 cM of the GRAMENE database and synthesized in IDT, Inc. (Coralville, IA, USA).

The DNA extracts obtained were analyzed in the PCR using the initiators of the microsatellites or selected simple repeat sequences (SSR), under the following reaction conditions: final volume 15  $\mu$ L, DNA extract 1.5  $\mu$ L (10 ng.mL<sup>-1</sup>), initiator, 0.6  $\mu$ L (10  $\mu$ M, sense and contradictory), mixture of 0.3  $\mu$ L dNTPs (10 mM), buffer 10X PCR/MgC<sub>12</sub> 1.5  $\mu$ L, Taq polymerase 0.15  $\mu$ L and deionized and sterile water 10.95  $\mu$ L (Pérez-Almeida *et al.*, 2011).

The amplification program was carried out in a thermocycler PTC-100 Programmable Thermal Controller MJ Research, Inc., for 34 cycles at an alignment temperature of 55 °C (Pérez-Almeida *et al.*, 2011). Once DNA was amplified, the samples were analyzed by electrophoresis on agarose gels at 3% using the buffer TBE 1X in a horizontal electrophoresis chamber, in order to observe the polymorphism of the microsatellite. Only the amplified PCR products greater than 50 bp were observed (figure 1). The PCR products were visualized in a UV transilluminator, (brand BIORAD model CHEMIDOC, using the Quantity One v. 4.2® program, California USA) after electrophoresis, in 3% agarose gels in TBE and staining with ethidium bromide.

mezcla de dNTPs 0,3  $\mu\text{L}$  (10 mM), Tampón 10X PCR/MgCl<sub>2</sub> 1,5  $\mu\text{L}$ , Taq polimerasa 0,15  $\mu\text{L}$  y agua desionizada estéril 10,95  $\mu\text{L}$  (Pérez-Almeida *et al.*, 2011)

El programa de amplificación se realizó en un termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller MJ Research, Inc., durante 34 ciclos a una temperatura de alineación de 55 °C (Pérez-Almeida *et al.*, 2011). Una vez amplificado el ADN, las muestras se sometieron a corridas electroforéticas en geles de agarosa a una concentración del 3% usando el tampón de corrida TBE 1 X en una cámara de electroforesis horizontal, con el fin de observar el polimorfismo de los microsatélites evaluados. Se observaron los productos de PCR amplificado que fueron mayores de 50 pb (figura 1). Los productos de la PCR fueron visualizados en un transiluminador UV, (marca BIORAD modelo CHEMIDOC, utilizando el programa Quantity One v. 4.2®, California USA) previa electroforesis en geles de agarosa al 3% en TBE y tinción con bromuro de etidio.

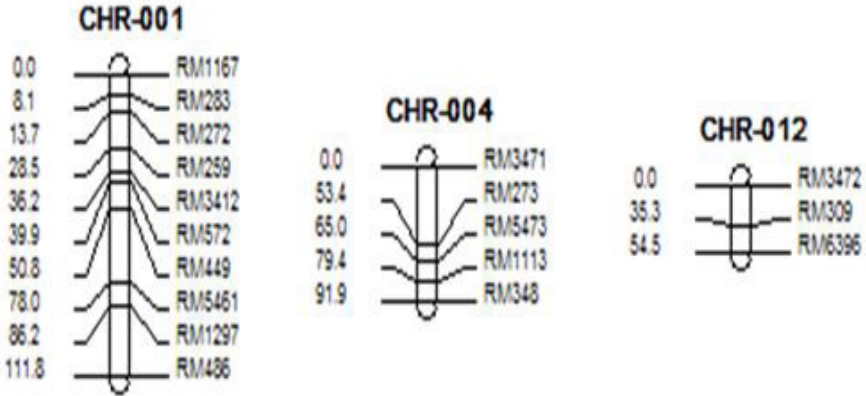
Para detectar la asociación entre los genes de resistencia a *R. solani* en arroz y los 100 marcadores SSR evaluados, se usó el programa Windows QTL Cartographer®, versión 2.5 (Wang *et al.*, 2007), utilizando los productos de PCR visualizados en los geles de agarosa se preparó una matriz para asignarle el alelo correspondiente a cada SSR seleccionado a cada progenitor y progenie F<sub>2</sub>. El promedio del porcentaje de área afectada de cada individuo de la población F<sub>2</sub> y la función de Kosambi fueron utilizados

To detect the association between the rice *R. solani* resistance genes and the 100 SSR markers evaluated, the Windows QTL Cartographer® program, version 2.5 (Wang *et al.*, 2007) was used; a matrix was made using the PCR products visualized in the agarose gels, to assign the corresponding allele to each selected SSR, progenitor and progeny F<sub>2</sub>. The average of affected area in each plant of the F<sub>2</sub> population and the Kosambi function were used to determine the distance of mapping by composite interval technic (CIM) (Díaz, 2005).

The Windows QTL Cartografer® program was used with the default parameters of model 6, standard model, with five previously set markers, associated with the character, through the step-by-step regression method and a window length of 10 cM at the sides of the interval. To declare the association between phenotype and marker, the LOD threshold  $\geq 2.4$  ( $P = 0.05$ ) was used.

## Results and Discussion

According to the scale, the Palmar (11%) and Jefferson (32%) cultivars were resistant, while the Fonaiap 1 (60%) and Fonaiap 2000 (67%) cultivars were susceptible; this results agreed with those explained by Delgado and Rodríguez (2005). The effect of PDV on the fathers showed differences of 49 % in the affected-area between the Palmar and Fonaiap 1 cultivars, whereas Jefferson and Fonaiap 2000 presented a difference of 35 % in the affected-area. The effect of PDV on F<sub>2</sub> segregating population



**Figura 1** Cromosomas (CHR) 1, 4 y 12 donde se localizan los QTLs identificados para resistencia a la PDV.  
**Figure 1.** Chromosomes (CHR) 1, 4 and 12 where the QTL identified for the resistance to PDV were found.

para determinar la distancia de mapeo por intervalo compuesto (CIM) (Díaz, 2005).

El programa Windows QTL Cartografer®, se usó con los parámetros predeterminados del modelo 6, modelo estándar, con cinco marcadores fijados previamente asociados al carácter a través del método de regresión paso a paso y una longitud de ventana de 10 cM a los lados del intervalo. Para declarar la asociación entre el fenotipo y el marcador se usó el umbral de LOD  $\geq 2,4$  ( $P= 0,05$ ).

### Resultados y discusión

De acuerdo con la escala de evaluación los cultivares Palmar (11%) y Jefferson (32%), resultaron resistentes, mientras que los cultivares

obtained by crossbreeding of Palmar x Fonaiaip 1 showed a phenotypic variation of 83 %, with a maximum value of 91% and a minimum value of 8%. On the other hand, the effect of PDV on  $F_2$  segregating population obtained by crossbreeding of the Jefferson x Fonaiaip 2000 showed a phenotypic variation of 68%, being the minimum value 12%, and the maximum of 80% (Table 1).

The progenies ( $F_2$ ) showed a continuous variation in the phenotypic reaction because the artificial inoculation of *R. solani*; in addition, both populations presented a transgressive segregation, which was determined in the offspring by phenotypic reaction, exposing more resistant or susceptible individuals than their parents; the transgressive

Fonaiap 1 (60%) y Fonaiap 2000 (67%) resultaron susceptibles, resultados que concordaron con los señalados por Delgado y Rodríguez (2005). La variación fenotípica a la reacción PDV entre los progenitores, medida por la diferencia del área afectada, fue de 49% entre los cultivares Palmar y Fonaiap 1 y de 35% entre los progenitores Jefferson y Fonaiap 2000. La población segregante  $F_2$  del cruce entre Palmar x Fonaiap 1 mostró una variación fenotípica a la reacción PDV de 83%, con un valor máximo de 91% y un valor mínimo de 8%. Mientras que en la población segregante  $F_2$  del cruce Jefferson x Fonaiap 2000 la variación fenotípica a la reacción PDV de 68%, siendo el valor mínimo 12%, y el máximo de 80% (cuadro 1).

En las progenies ( $F_2$ ) evaluadas se observó una variación continua en la reacción fenotípica producto de la inoculación artificial del

inheritance is considered the main effect, caused by the complementary action of the genes present in both parents; this quantitative characteristic is conditioned by several genes.

In this same sense, the absence of the rice complete resistance to *R. solani* has been determined (Pan *et al.*, 1999, Mew *et al.*, 2004, Jia *et al.*, 2012), considering that the rice resistance to the fungus is multigenic, therefore, it is difficult to evaluate the individual effect of this genes (Che *et al.*, 2003). In addition, Srinivasachary *et al.* (2011) proposed that there are two different mechanisms improving resistance to PDV; the first mechanism is the physiological resistance, which is independent of the morphological characteristics, and the second mechanism is attributed to morphological characteristics of the plant, which allow it to avoid the

### Cuadro 1. Estadística descriptiva de las poblaciones experimentales evaluadas.

Table 1. Descriptive statistics of evaluated experimental populations.

Población	Media	Desviación muestral	Varianza muestral	Valor mínimoa	Valor máximoa	Variación fenotípica
Palmar x Fonaiap1 Jefferson x	47,50	17,54	307,80	8%	91%	83%
Fonaiap 2000	48,62	13,55	183,48	12%	80%	68%

a= porcentaje de área afectada por la PDV

hongo *R. solani*, además, ambas poblaciones mostraron segregación transgresiva, determinada en la descendencia por la reacción fenotípica que mostró individuos más resistentes o más susceptibles que los respectivos parentales; la herencia transgresiva es considerada el efecto principal, producto de la acción complementaria de genes presentes en ambos progenitores, siendo esta una característica cuantitativa condicionada por varios genes.

En este mismo sentido, se ha determinado la ausencia de resistencia completa en arroz a *R. solani* (Pan *et al.*, 1999; Mew *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2012), considerándose que la resistencia en arroz al hongo es multigénica, siendo difícil evaluar el efecto individual de los genes que confieren esta resistencia (Che *et al.*, 2003). Además, Srinivasachary *et al.* (2011) señalaron como hipótesis que existen dos mecanismos principales y distintos que contribuyen a la resistencia a la PDV, una es la resistencia fisiológica, que es independiente de los rasgos morfológicos y la segunda es el escape de la enfermedad atribuida a caracteres morfológicos, especialmente la altura de la planta, o la fecha de emisión de panícula. En el presente trabajo se establece la resistencia fisiológica por haberse hecho inoculaciones artificiales a las plantas en la misma etapa de crecimiento (R4).

Además, la existencia de herencia transgresiva en ambas progenies segregantes, explicó por qué en estas poblaciones se observó una segregación no ajustada a las leyes de herencia de Mendel, siendo la

disease, such as the height or date of the emission of the panicle. In the present work the physiological resistance was determined by artificial inoculations of the plants in the same growth stage (R4).

In addition, a segregation not adjusted to Mendel's inheritance laws was observed in these populations, caused by the transgressive inheritance in both segregating progenies; the proportion determined was 1 resistant: 1 susceptible (1: 1); therefore, resistance to the PDV was conditioned by several genes.

The phenotypic reaction of both F<sub>2</sub> segregating populations to *R. solani* was adjusted to a normal distribution (figure 2 and 3). The F<sub>2</sub> population derived from the crossbreeding of Palmar x Fonaiaip 1 showed a continuous variation with a value of W = 0.9862 and P (W) = 0.4084, while the population F<sub>2</sub> obtained from the Jefferson x Fonaiaip 2000 crossbreeding presented a value of W = 0.9757 and a value of P (W) = 0.1052, being the W value greater than the P (W) value for both populations, Which is consistent with a normal distribution, according to Shapiro-Wilk's probability for normality formula. Therefore, the analysis to allocate QTL was carried out retaining the percentage of affected area in each plant (severity).

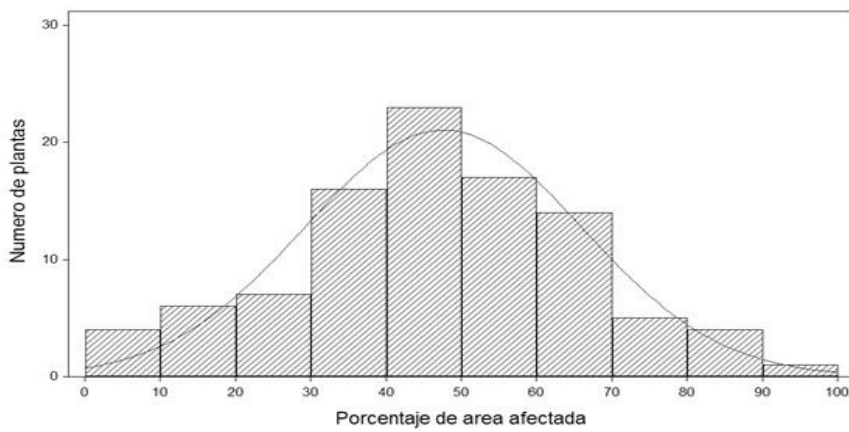
Both segregating populations showed polymorphism for the SSR analyzed, being polymorphic 70 SSR in the offspring of Palmar x Fonaiaip 1 and 69 SSR in the offspring of Jefferson x Fonaiaip 2000. The distribution is shown in tables 2 and 3, respectively.

proporción determinada 1 resistente:1 susceptible (1:1); por esto la resistencia a PDV estuvo condicionada por varios genes.

La reacción fenotípica de las dos poblaciones segregantes  $F_2$  al hongo *R. solani* se ajustaron a una distribución normal (figura 2 y 3). La población  $F_2$  derivada del cruce Palmar x Fonaiap 1 mostró, de acuerdo a la fórmula de probabilidad para normalidad de Shapiro-Wilk, una variación continua con un valor de  $W= 0,9862$  y  $P(W)= 0,4084$ , mientras que la población  $F_2$  obtenida del cruce Jefferson x Fonaiap 2000 presentó un valor de  $W= 0,9757$  y un valor de  $P(W)= 0,1052$ , siendo para ambas poblaciones el valor  $W$  mayor que el valor  $P(W)$ , por lo tanto se ajustaron a una distribución normal. Por lo

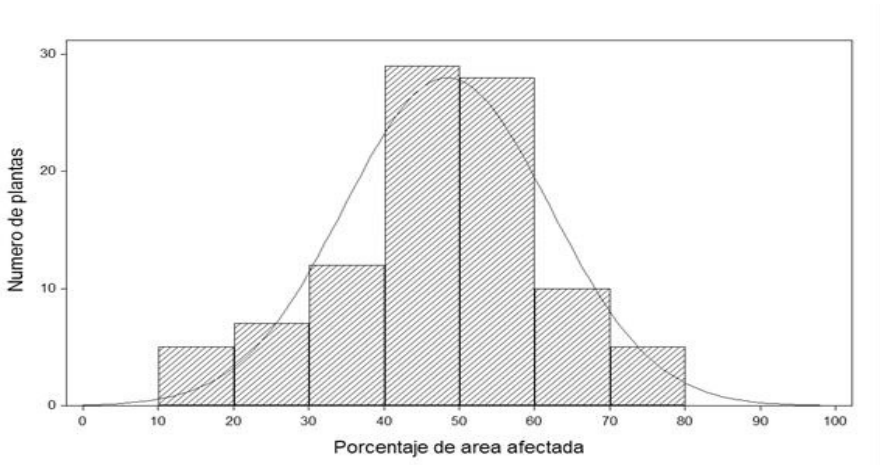
In all polymorphic SSR markers, segregation for both populations was 1:2: 1, so the inheritance was in agreement with the laws of Mendel for the co-dominance, being possible to distinguish the homozygous plants of the heterozygotes for each SRR marker.

QTL was not detected in the segregating offspring from crossover of Jefferson x Fonaiap 2000, because the association between the SSR markers and the PDV resistance was below the LOD limit = 2.4 ( $P = 0.05$ ). While an association was detected between the SSR markers and the resistance to *R. solani* in the segregating population from crossbreeding of Palmar x Fonaiap 1.



**Figura 2. Distribución modal del porcentaje de área afectada por el hongo *R. solani* en la población segregante  $F_2$  Palmar x Fonaiap 1.**

**Figure 2. Modal distribution of the percentage of area affected by the *R. solani* fungus in the segregating population  $F_2$  Palmar x Fonaiap 1.**



**Figura 3. Distribución modal del porcentaje de área afectada por el hongo *R. solani* en la población segregante  $F_2$  Jefferson x Fonaiap 2000.**

**Figure 3. Modal distribution of the percentage of area affected by the *R. solani* fungus in the segregating population  $F_2$  Jefferson x Fonaiap 2000..**

anterior, el análisis para la asignación de QTL se realizó manteniendo para cada planta su valor en porcentaje de área afectada (severidad).

Las dos poblaciones segregantes evaluadas mostraron polimorfismo para los SSR analizados, resultando polimórficos en la descendencia de Palmar x Fonaiap1 70 SSR y para Jefferson x Fonaiap 2000 69 SSR de los 100 SSR seleccionados. Se muestra la distribución en los cuadros 2 y 3, respectivamente.

En todos los marcadores SSR polimórficos evaluados, la segregación para ambas poblaciones fue 1:2:1 siguiendo una herencia de acuerdo con las leyes de Mendel para co-

This results can be explained by the phenotypic divergence presented by the segregating population of Jefferson x Fonaiap 2000, which was lower than that showed by the segregating population of Palmar x Fonaiap 1 (Table 1). In addition, when comparing the statistical results with those obtained in the segregating population of Palmar x Fonaiap1, it was observed a little standard deviation, indicating that the data were grouped close to the mean with a smaller variance; so it is necessary to increase the size of the the experimental population to be able to detect the QTL with  $LOD > 2.4$ , such as Semagn *et al.* (2006) explained it.

**Cuadro 2. Marcadores moleculares microsatélites polimórficos para cada cromosoma en la población Palmar x Fonaiap 1.****Table 2. Polymorphic microsatellite molecular markers for each chromosome in the population Palmar x Fonaiap 1.**

Cromosomas	Marcador SSR
1	RM1167, RM283, RM272, RM259, RM3412, RM572, RM449, RM5461, RM1297, RM486
2	RM5529, RM423, RM4499, RM341, RM475, RM8024, RM599, RM497, RM482, RM266
3	RM22, RM231, RM3131, RM6837, RM7, RM251, RM7395, RM338, RM2334, RM16, RM5959, RM416
4	RM3471, RM273, RM5473, RM1113, RM348
5	RM122, RM3345, RM13, RM194, RM7293, RM6645, RM6545, RM31
6	RM6917, RM225
7	RM5752, RM501, RM7110, RM3186, RM3826, RM7564, RM473C, RM248
8	RM310, RM350
9	RM444, RM3855, RM105, RM409, RM1189, RM553
10	RM474, RM244, RM5620
11	RM441, RM229, RM21
12	RM3472, RM309, RM6396

dominancia, pudiéndose diferenciar las plantas homocigotas de los heterocigotas para cada marcador SSR.

En la descendencia segregante del cruce Jefferson x Fonaiap 2000 no se detectó la presencia de QTL, por ubicarse la asociación entre los marcadores SSR y la resistencia a PDV por debajo del límite LOD= 2,4 (P= 0,05). Mientras que en la población segregante producto del cruce Palmar x Fonaiap 1 se detectó asociación entre los marcadores SSR y la resistencia a *R. solani*.

An association between SSR markers and resistance to *R. solani* was detected in the offspring from Palmar x Fonaiap 1; three QTL were identified for resistance to PDV, qShB1, qShB4 and qShB12, located on chromosomes 1, 4 and 12, respectively.

The resistant alleles from the Palmar cultivar showed that qShB1 explained 18.17% of the total phenotypic variation, with an additive effect of 11.2281; qShB4 explained 2.94% of the total phenotypic variation, with an additive effect of 4.2229, while qShB12 explained 10.5% of the



**Cuadro 3. Marcadores moleculares microsátélites polimórficos para cada cromosoma en la población Jefferson x Fonaiap 2000.**  
**Table 3. Polymorphic microsatellite molecular markers for each chromosome in the population Jefferson x Fonaiap 2000.**

Cromosoma	Marcador SSR
1	RM259, RM572, RM449, RM6334, RM488, RM6703, RM315
2	RM4499, RM341, RM475, RM8024, RM599, RM497, RM482, RM266
3	RM22, RM231, RM3131, RM6837, RM5928, RM7, RM282, RM338, RM16
4	RM3471, RM261, RM1359, RM5473, RM1113, RM348
5	RM13, RM194, RM7293, RM6645, RM164, RM31
6	RM190, RM6917, RM225, RM3431, RM541, RM5371, RM340
7	RM481, RM5752, RM214, RM3186, RM3826, RM7564, RM473C, RM248
8	RM310, RM350
9	RM3855, RM105, RM409, RM1189
10	RM474, RM244, RM239, RM5620
11	RM441, RM229, RM21, RM6440
12	RM3472, RM2935, RM309, RM270

Lo anterior, puede explicarse por la divergencia fenotípica que presentó la población segregante Jefferson x Fonaiap 2000 la cual fue menor a la mostrada por la población segregante Palmar x Fonaiap 1 (cuadro 1). Además, al compararse los resultados estadísticos con los obtenidos en la población segregante Palmar x Fonaiap 1, mostró una desviación estándar menor, lo que indicó que los datos estuvieron agrupados cerca de la media, una varianza menor, por lo que se necesita aumentar el tamaño

total phenotypic variation, with an additive effect of 9.1270 (Table 4). The microsatellite markers RM572 (36.2 cM) and RM449 (50,8 cM) flanked the QTL qShB1, the microsatellites RM3471 (0.0 cM) and RM273 (53.4 cM) flanked the QTL qShB4 and the microsatellites RM3472 (0.0 cM) and RM309 (35.3 cM) flanked the QTL qShB12 (figures 4. and 5). The alleles qShB1 and qShB12 explained 28.67% of the total phenotypic variation, with an additive effect of 20.36%; it is important to detect these two qShB in

de la población experimental para poder detectar los QTL con  $LOD > 2,4$ , lo que concordó con lo señalado por Semagn *et al.* (2006).

En la descendencia del cruce Palmar x Fonaiap 1, se detectó asociación entre marcadores SSR y la resistencia a *R. solani* t se identificaron tres QTL para la resistencia a PDV, qShB1, qShB4 y qShB12, localizados en los cromosomas 1, 4 y 12, respectivamente.

Los alelos resistentes provenientes del cultivar Palmar, mostraron los siguientes resultados, el qShB1 explicó 18,17% de la variación fenotípica total, con un efecto aditivo de 11, 2281; el qShB4 explicó el 2,94% de la variación fenotípica total, con un efecto aditivo de 4,2229, mientras que el qShB12 explicó el 10,5% de la variación fenotípica total, con un efecto aditivo de 9,1270 (cuadro 4). Los marcadores microsatélites RM572 (36,2 cM) y RM449 (50,8 cM) flanquearon el QTL qShB1, los microsatélites RM3471 (0,0 cM) y RM273 (53,4 cM) flanquearon el QTL qShB4 y los microsatélites RM3472 (0,0 cM) y RM309 (35,3 cM) flanquearon el QTL qShB12 (figura 4 y 5). Los alelos qShB1 y qShB12 explicaron el 28,67% de la variación fenotípica total, con un efecto aditivo de 20,36%; siendo importante detectar estos dos qShB en la descendencia de los cruces Palmar x Fonaiap1 .

La detección de tres QTL en la población Palmar x Fonaiap 1 ubicados en diferentes cromosomas, también constituyeron un factor que explicó el no haberse observado una segregación ajustada a las leyes de la herencia de Mendel.

the offspring from crosses of Palmar x Fonaiap 1.

The detection of three QTL in the population Palmar x Fonaiap 1 located in different chromosomes, also constituted a factor that explained the failure to observe a segregation adjusted to the laws of Mendel's inheritance.

Srinivasachary *et al.* (2011) noted two mechanisms that contributed to the resistance to the PDV, one of the mechanisms consists to avoid the disease due to morphological characters, and the second mechanism explains the resistance independent of these traits. The artificial inoculation of *R. solani* on R4 in controlled conditions, prevented the resistance responses from being associated with environmental variables (Lu *et al.*, 1996), the height of the plant and the emission of the panicle, which can confuse the association between resistance response and quantitative genes (Zou *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2014). Likewise, it was pointed out that the QTL for resistance to PDV and several QTL for morphological characters in rice were located in the same interval (Pan *et al.*, 2005); therefore, the inadequate evaluation of the plant's reponse to the PDV is probably the main reason for inconsistent results between reports (Han *et al.*, 2003).

Zuo *et al.* (2008) demonstrated the potential of molecular markers for the cloning and implementation of the use of QTL resistance genes in the improvement of rice germplasm among subspecies. In addition, it has been

**Cuadro 4. Sumario del análisis de QTLs para la Resistencia a pudrición de la vaina usando mapeo por intervalos compuestos.**

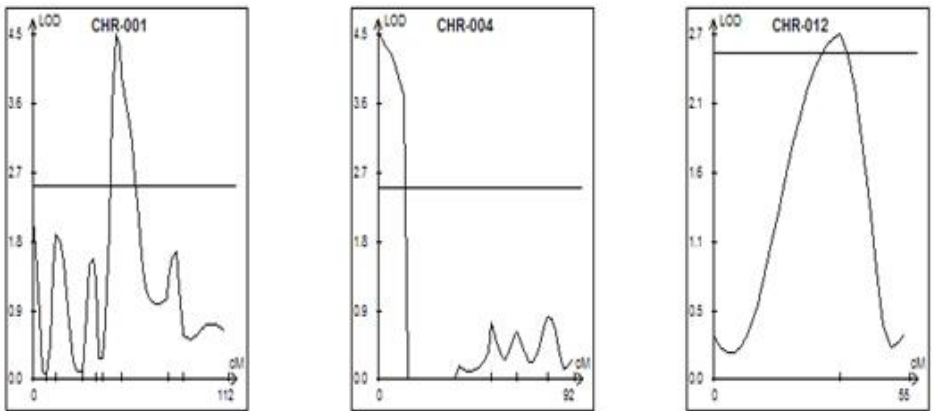
**Table 4. Table 4. Summary of QTLs analysis for resistance to the rice crop pod rot (PDV) using composite mapping.**

QTL <sup>a</sup>	Cromosoma	SSR en intervalo	SSR cercano al locus	LOD <sup>b</sup>	Efecto aditivo <sup>c</sup>	% de variacion genotipica
qShB1	1	RM572 RM449	RM572	4.3670	11.2281	18.17
qShB4	4	RM3471 RM273	RM3471	2.3119	4.2229	2.94
qShB12	12	RM3472 RM309	RM3472	2.2951	9.1270	10.50

a QTL: Loci de caracteres cuantitativos.

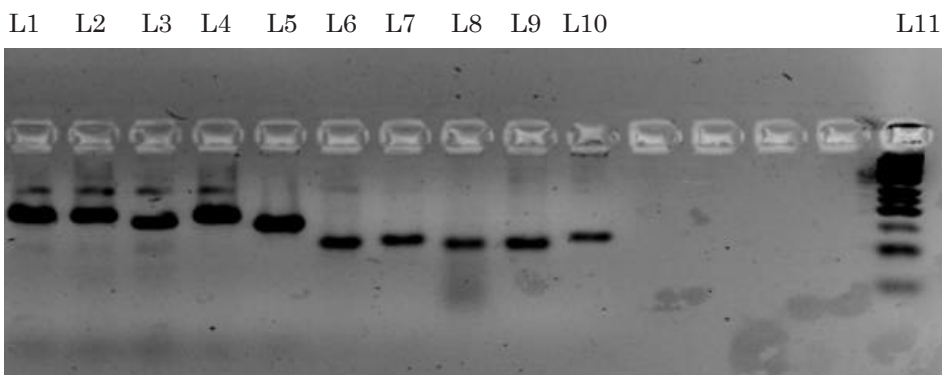
b. qShB-QTLs fueron determinados usando un valor de probabilidad (LOD) de 2.4.

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



**Figura 4. Gráficas de los cromosomas (CHR) 1,4 y 12 donde se detectaron QTL.**

**Figure 4. Graphics of the chromosomes (CHR) 1, 4 and 12 where the QTL were detected.**



**Figura 3. Corrida electroforética en geles de agarosa al 3% observándose la amplificación del SSR 22 en los parentales. L1-L2 Palmar, L3-L4-L5 Fonaiap1, L6-L7 Fonaiap 2000, L8-L9-L10 Jefferson, L11 marcador de número de bases.**

**Figure 3. Electrophoretic analysis in 3% agarose gels, observing the amplification of SSR 22 in the parental. L1-L2 Palmar, L3-L4-L5 Fonaiap1, L6-L7 Fonaiap 2000, L8-L9-L10 Jefferson, L11 Baseboard Number Marker.**

Srinivasachary *et al.* (2011) señalaron dos mecanismos que contribuyeron a la resistencia a PDV, una fue el escape de la enfermedad, atribuida a caracteres morfológicos y la segunda fue la resistencia que fue independiente de estos rasgos. La inoculación artificial de *R. solani* bajo condiciones controladas en R4, evitó que las respuestas de resistencia se asociaran con otras variables como las ambientales (Lu *et al.*, 1996), la altura de la planta y la emisión de la panícula, que confundieron la asociación entre la respuesta de resistencia y los genes cuantitativos (Zou *et al.*, 2000; Sato *et al.*, 2004; Jia *et al.*, 2009; Zeng *et al.*, 2014). Así mismo, se señaló que los QTL para resistencia a la PDV y varios QTL para caracteres

reported that susceptible rice cultivars have genes that confer resistance to the PDV and the susceptible parents carrying these genes were a valuable source for the development of new lines with resistance to the PDV (Zuo *et al.*, 2011). Moreover, 11 class III chitinase genes have been identified in the QTL mapping qSBR11-1 in Tetep Rice Cultivation which were expressed after inoculation with *R. solani*, which helped in the process of improving rice (Richa *et al.*, 2016; Richa *et al.*, 2017).

The desired genotypes manifested at the end of the crossing process with the use of the SAM technique, obtaining long-lasting and broad-spectrum resistance lines. (Pastor-Corrales *et al.*, 1998). Finally, the

morfológicos en arroz se localizaron en el mismo intervalo (Pan *et al.*, 2005); siendo, probablemente, la inadecuada forma de evaluar la respuesta de la planta a la PDV, la razón principal de los resultados inconsistentes entre los reportes (Han *et al.*, 2003).

Zuo *et al.* (2008) demostraron el potencial que tienen los marcadores moleculares para la clonación e implementación del uso de genes de resistencia QTL en el mejoramiento del germoplasma en arroz entre subespecies. Además, se ha reportado que cultivares de arroz susceptibles poseen genes que confirieron resistencia a la PDV y los padres susceptibles portadores de estos genes fueron una fuente valiosa para el desarrollo de nuevas líneas con resistencia a la PDV (Zuo *et al.*, 2011). Por otro lado, han sido identificados 11 genes de quitinasa de clase III en el QTL mapeado qSBR11-1 en el cultivar de arroz Tetep que se expresaron después de la inoculación con *R. solani*, lo que ayudó en el proceso de mejoramiento del arroz (Richa *et al.*, 2016; Richa *et al.*, 2017).

Con el uso de la técnica SAM, se seleccionaron genotipos deseados manifestados al final del proceso de mejoramiento, obteniéndose líneas con resistencia durable y de amplio espectro (Pastor-Corrales *et al.*, 1998). Por último, los tres QTL detectados en el presente trabajo explicaron en total el 31,81% de la variación fenotípica total y constituyen un valioso aporte al estudio de la resistencia a la PDV.

## Conclusión

Las inoculaciones artificiales en la etapa de crecimiento del arroz R4, es

three QTL detected in this paper explained 31.81% of the total phenotypic variation, constituting a valuable contribution to the study of the resistance of the PDV.

## Conclusion

Artificial inoculation in the growth stage of R4 rice, is a very useful technique to identify the association of the phenotypic responses of the reaction to PDV in this crop with the resistance genes (QTL) present in the different cultivars. In this study, three regions in the DNA of the rice localized in chromosomes 1, 4 and 12 that allow to obtain cultivars with genetic resistance to *R. solani* were identified; this genetic resistance along with chemical control can reduce losses caused by *R. solani* and have a great impact on the stability of yield, sustainability and productivity of rice cultivation.

*End of English version*

---

una técnica muy útil para identificar la asociación de las respuestas fenotípicas de la reacción a la PDV en arroz con genes de resistencia (QTL) presentes en los diferentes cultivares, encontrándose en este estudio tres regiones del ADN del arroz ubicados en los cromosomas 1, 4 y 12 que contribuyen en la consecución de

cultivares de arroz con resistencia genética que permita junto con el control químico la disminución de las pérdidas ocasionadas por el hongo *R solani* y tendrá un gran impacto en la estabilidad del rendimiento, la sustentabilidad y la productividad del cultivo del arroz.

## Literatura citada

- Akhtar, S., M.A. Bhat, S.A. Wani, K.A. Chalkoo, S. Bhat, M.R. Mir and S.A. Wani. 2010. Marker assisted selection in rice. *Journal of Phytology* 2:66-81.
- Cedeño, L., H. Nass, C. Carrero, R. Cardona, H. Rodríguez y L. Alemán. 1996. *Rhizoctonia solani* AGI-IA causa principal del añublo de la vaina en arroz. *Fitopatol. Venez.* 9:6-9.
- Che, K.P., Q.C. Zhan, Q.H. Xing, Z.P. Wang, D.M. Jin, D.J. He and B.Wang. 2003. Tagging and mapping of rice sheath blight resistant gene. *Theor. Appl. Genet.* 106:293-297.
- Correa-Victoria, F. 1993. Alternativas para el manejo del añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani*. *Arroz* 41:32-37.
- Delgado, N. and H. Rodríguez. 2005. Creating a rice population resistant to *Rhizoctonia solani* Kühn. Chapter 14. In: *Population improvement: A way of exploiting the RICE genetic resources of Latin America*. E. Perpétuo Guimarães (Ed.) 350 p.
- Delgado, N., H. Rodríguez y M. Ramon. 2004. Evaluación de métodos de inoculación de *Rhizoctonia solani* sobre germoplasma de arroz en campo. *Rev. Fac. Agron. (LUZ)*. 21:374-384.
- Díaz, A. 2005. Marcadores moleculares. Instituto de Genética Fagro - UCV. 111 p.
- Eizenga, G.C., F.N. Lee and N.S. Rutger. 2002. Screening *Oryza* species plants for rice sheath blight resistance. *Plant Dis.* 86: 808-812.
- González-Vera, A.D., J. Bernardes de Assis, M. Zala, B.A. McDonald, F. Correa-Victoria, E.J. Graterol-Matute and P.C. Ceresini. 2010. Divergence between sympatric rice- and maize-infecting populations of *Rhizoctonia solani* AG-1 IA from Latin America. *Phytopathology* 100:172-182.
- Gramene: A comparative resource for plants. Disponible en: [www.gramene.org](http://www.gramene.org).
- Graterol, E., O. Borges, H. Nass y A. Salih. 1996. Herencia transgresiva para la resistencia a *Rhizoctonia* spp. en poblaciones segregantes de arroz (*Oryza sativa* L.) *Revista Electrónica DANAC Investigación Agrícola* N° 1. Disponible en: [www.redpav-polar.info.ve/danac/volumen1/art3/index.html](http://www.redpav-polar.info.ve/danac/volumen1/art3/index.html). Fecha de consulta: Julio 2018
- Han, Y.P., Y.Z. Xing, S.L. Gu, X.B. Pan and X.L. Chen. 2003. Effect of morphological traits on sheath blight resistance in rice. *Acta Botanica Sinica* 45:825-831.
- IRRI. 2002. Reference guide-standard evaluation system for rice. International Rice Research Institute. Disponible en: <http://www.knowledgebank.irri.org/ses/>
- Jia, Y.G., S. Liu, S.L. Costanzo and Y. Dai, 2009. Current progress on genetic interactions of rice with blast and sheath blight fungi. *Front. Agric. China* 3:231-239.
- Jia, L., W.C. Yan Zhu, H.A. Agrama, A. Jackson, K. Yeater, X. Li, B. Huang, B. Hu, A. McClung and D. Wu. 2012. Allelic analysis of sheath blight resistance with association mapping in rice. *PLoS ONE* 7(3):e32703. doi:10.1371/journal.pone.0032703.
- Lu, C., L. Shen, Z. Tan, Y. Xu, P. He, Y. Chen and L. Zhu. 1996. Comparative mapping of QTL for agronomic traits of rice across environments using a doubled haploid population. *Theor. Appl. Genet.* 93:1211-1217.
- Malaguti, G. 1952. Mancha de la hoja envainadora del arroz causada por *R. solani*. *Agron. Trop.* II:41-53.
- Mohler, V. and C. Singrun. 2004. General considerations: marker-assisted

selection in biotechnology in agriculture and forestry. *Molecular Marker Systems* 55:305-317.

- Mew, T.W., H. Leung, S. Savary, C.M. Vera Cruz and J.E. Leach, 2004. Looking ahead in rice disease research and management. *CRC Crit. Rev. Plant Sci.* 23:103-127.
- Nass, H.A., L. Cedeño, C. Carrero, R. Cardona, H. Rodríguez y L. Alemán. 1995. *Rhizoctonia solani* AG1-IA importante patógeno del arroz (*Oryza sativa*) en Venezuela. *Rev. Forest. Venez.* 1:142-143.
- Ogoshi, A. 1987. Ecology and pathogenicity of anastomosis and intraspecific groups of *Rhizoctonia solani* Kühn. *Annual Review of Phytopathology* 25:125-143.
- Pan, X.B., M.C. Rush, X.Y. Sha, Q.J. Xie, S.D. Liscombe, S.R. Stelina and J.H. Oard. 1999. Major gene nonallelic sheath blight resistance from the rice cultivars Jasmine 85 and Teqing. *Crop. Sci.* 39:338-346.
- Pan, X., Y. Zhang, S. Zuo and Z. Che. 2005. Discussion on QTL identification and application for important quantitative traits in crops. *J. Yangzhou Univ. (Agric. Life Sci.)* 26:50-55. (In Chinese with an English abstract).
- Pastor-Corrales, M.A., C. Jara and S.P. Singh. 1998. Pathogenic variation in sources of and breeding for resistance to Phaseoisariopsis griseola causing angular leaf spot in common bean. *Euphytica* 103:161-171.
- Peng, J.H., T. Fahima, M.S. Röder, Y.C. Li, A. Grama and E. Nevo. 2000. Microsatellite high-density mapping of the stripe rust resistance gene YrH52 region on chromosome 1B and evaluation of its marker-assisted selection in the F2 generation in wild emmer wheat. *New Phytol.* 146:141-154.
- Pérez-Almeida, I., E. Torres, L. Angulo y 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* 36:545-551.
- Richa, K., I.M. Tiwari, M. Kumari, B.N. Devanna, H. Sonah, A. Kumari, R. Nagar, V. Sharma, J.R. Botella and T.R. Sharma. 2016. Functional characterization of novel chitinase genes present in the sheath blight resistance QTL: qSBR11-1 in rice line Tetep. *Front. Plant Sci.* 7:244.
- Richa, K., I.M. Tiwari, B.N. Devanna, J.R. Botella, V. Sharma and T.R. Sharma. 2017. Novel chitinase gene LOC\_Os11g47510 from indica rice Tetep provides enhanced resistance against sheath blight pathogen *Rhizoctonia solani* in rice. *Front. Plant Sci.* 8:596.
- Rodríguez, H., H. Nass, R. Cardona y L. Alemán. 1999. Alternativas para controlar el añublo de la vaina causado por *Rhizoctonia solani* en arroz. *Fitopatol. Venez.* 12:18-21.
- Sato, H., O. Ideta, I. Ando, Y. Kunihiro, H. Hirabayashi, M. Iwano, A. Miyasaka, H. Nemoto and T. Imbe. 2004. Mapping QTL for sheath blight resistance in the rice line WSS2. *Breed. Sci.* 54:265-271.
- Semagn, K., Å. Bjørnstad and M.N. Ndjiondjop. 2006. Principles, requirements and prospects of genetic mapping in plants. *Afr. J. Biotechnol.* 5(25):2569-2587.
- Srinivasachary, S., L. Willocquet and S. Savary. 2011. Resistance to rice sheath blight (*Rhizoctonia solani* Kühn) [(teleomorph: *Thanatephorus cucumeris* (A.B. Frank) Donk.] disease: Current status and perspectives. *Euphytica* 178(1):1-22.
- Yadav S., G. Anuradha, R.R. Kumar, L.R. Vemireddy, R. Sudhakar, K. Donempudi, D. Venkata, F. Jabeen, Y.K. Narasimhan, B. Marathi and E.A. Siddiq. 2015. Identification of QTLs and possible candidate genes conferring sheath blight resistance in rice (*Oryza sativa* L.), SpringerPlus 4:175.
- Wang, S., C.J. Basten and Z.B. Zeng. 2007. *Windows QTL Cartographer 2.5*. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh. (<http://statgen.ncsu.edu/qlcart/WQTLCart.htm>).
- Zambrano, A., J. Demey, G. Martínez, F. Fuenmayor, Z. Gutiérrez, G.

Saldaña y M. Torrealba. 2002  
Método rápido, económico y confiable  
de minipreparación de ADN para  
amplificaciones por RAPD en bancos  
de germoplasma. Agron. Trop. 52:235-  
243.

Zeng, Y., L. Xia, Z. Wen, Z. Ji, D. Zeng, Q.  
Qian and Ch. Yang. 2014. Mapping  
resistant QTLs for rice sheath blight  
disease with a doubled haploid  
population. Journal of Integrative  
Agriculture Advance Online. 14(5):  
801-810.

Zou, J.H., X.B. Pan, Z.X. Chen, J.Y. Xu, J.F.  
Lu, W. Zhai and L.H. Zhu. 2000.  
Mapping quantitative trait loci  
controlling sheath blight resistance  
in two rice cultivars (*Oryza sativa* L.)  
Theor. Appl. Genet. 101:569-573.

Zuo, S., Y. Yin, L. Zhang, Y. Zhang, Z. Chen,  
S. Gu, L. Zhu and X. Pan. 2011. Effect  
and breeding potential of qSB-11LE,  
a sheath blight resistance QTL from a  
susceptible rice cultivar. Can. J. Plant  
Sci. 91:191-198.

Zuo, S.M., L. Zhang, H. Wang, Y. J. Yin, Y. F.  
Zhang, Z. X. Chen, Y. Y. Ma and X.B.

Pan. 2008. Prospect of the QTL-qSB-9  
Tq utilized in molecular breeding  
program of japonica rice against  
sheath blight. JGG. 35: 499-505