

Introducción

El virus de la Hoja Blanca del Arroz (RHBV) es una de las principales enfermedades que afecta el cultivo de arroz *Oryza sativa* L a través en la América tropical (Morales y Niessen, 1983). Esta enfermedad se observó por primera vez en Colombia en 1935 y cuando la epidemia se presenta, las pérdidas en el rendimiento pueden alcanzar hasta un 80 % (Fig. 1A). La resistencia a este virus es conferida por uno o dos genes pero las plantas que poseen el gen de resistencia son susceptibles antes de los 25 días de edad. La incertidumbre de una epidemia hace que los agricultores recurran al empleo masivo de químicos para combatir al vector, un insecto saltahojas conocido como *Tagosodes orizicolus* (Muir) (Fig. 1B). El RHBV es un miembro del grupo de los tenuivirus. La caracterización molecular del virus y la preparación de librerías de ADN copia (ADNc) ha conducido a diseñar estrategias de resistencia al virus mediante la ingeniería genética en variedades comerciales de arroz. El genoma de RHBV consiste de cuatro especies de ARN de cadena sencilla (Ramírez et al., 1992 y 1993) (Fig. 1C). La caracterización molecular ha permitido establecer la secuencia del ARN3 y ARN4 del RHBV, y determinar que estos genomas codifican dos genes cada uno de manera ambisentido (Ramírez et al., 1993). La secuencia del ARN3 del RHBV codifica para la nucleoproteína (N), la cual se refiere en otros tipos de virus como proteína de la cubierta (Fig. 1D). La expresión de esta proteína en plantas transgénicas ha demostrado ser un mecanismo útil para producir resistencia viral en plantas (Beachy et al., 1987). La protección mediada por el gen de la nucleoproteína, N-proteína ha tenido éxito para el tenuivirus del rayado del arroz RStV (Hayakawa et al., 1992).

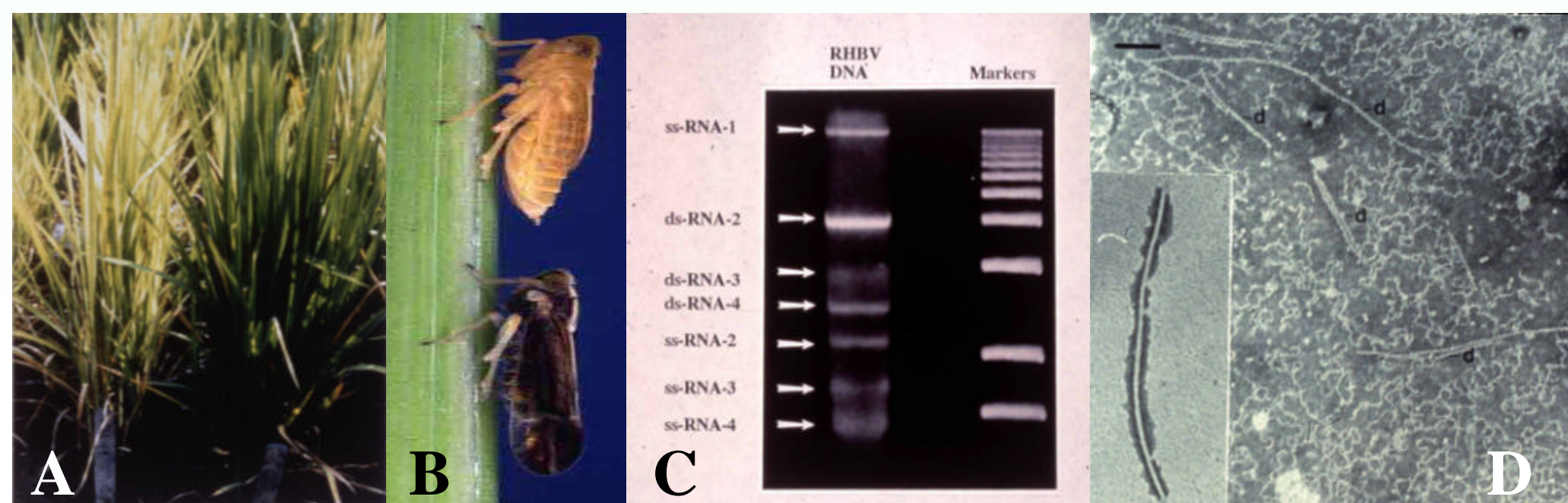


Figura 1. (A) Síntomas de la enfermedad RHBV. (B) Vector RHBV *T. orizicolus*. (C) Genoma del RHBV (D) Partículas virales en forma de filamento del RHBV.

Objetivo

El objetivo principal de este proyecto es proveer una nueva fuente de resistencia que complementa la resistencia simple presente en algunas de las variedades comerciales de arroz sembradas en América latina.

Metodología

Preparación del plásmido y transformación de arroz con la construcción RHBV-NP

Para la incorporación del gen de la N- proteína de RHBV en arroz se usó el plásmido *pVR3*. Esta construcción presenta dos genes, el gen de selección *hph*, que confiere resistencia higromicina, y el gen de la N-RHBV que codifica para el gen de la nucleoproteína. La expresión de ambos genes fue controlada por el promotor constitutivo 35 S y la señal de terminación correspondió a la secuencia Nos Poly (A) del CaMV. Para los ensayos de transformación se utilizaron callos derivados de panículas inmaduras de la variedad *indica* Cica 8, material susceptible al RHBV. El plásmido *pVR3* fue introducido mediante la técnica de bombardeo de partículas de oro recubiertas con el ADN y aceleradas con el sistema PDS-1000/He. El material vegetal fue sometido a un proceso de selección con higromicina B hasta regeneración (Li et al., 1993).

Evaluación de plantas transgénicas bajo condiciones de invernadero y campo

Los primeros ensayos de resistencia se realizaron en invernaderos de bioseguridad usando insectos virulíferos. Se evaluó el nivel de resistencia conferido por el gen viral registrando el porcentaje de área foliar afectada, severidad de síntomas y vigor de la planta. Para confirmar la resistencia al RHBV bajo condiciones de campo, se sembraron 766 líneas transgénicas durante dos años consecutivos, siguiendo un diseño de bloques al azar con los requisitos exigidos por la Comisión de Bioseguridad de Colombia. Las plantas fueron inoculadas a los 15 días de edad con insectos portadores del RHBV provenientes de una colonia con al menos el 80 % de virulencia y con un promedio de 2 insectos por planta (Fig. 2A, 2B). Se realizaron 4 evaluaciones utilizando las escalas del IRRI, donde 0 se refiere a una planta sin síntomas y 9 indica la presencia de la enfermedad en más del 90 % del área foliar. Como controles se utilizaron: la línea transgénica Cica 8 (A3-49-78), que presenta el gen de higromicina y 13 variedades comerciales con reacción conocida al virus de la hoja blanca.



Figura 2. (A) Colonia de insectos. (B) Liberación de insectos virulíferos en el campo

Análisis molecular de las plantas transgénicas de arroz

Para confirmar la integración del gen en el genoma se empleó la técnica de Southern blot, y la transcripción y expresión del gen transgen fue evaluada mediante, Northern blot, Western y ELISA.

Resultados y Discusión

Después del proceso de selección y regeneración en higromicina se recuperaron 60 plantas Cica 8 que contenían el transgen. El análisis de herencia de la primera generación de plantas (T1) evidenció una segregación del tipo Mendeliano simple para algunas líneas y una segregación desviada para otras. Plantas derivadas de la línea A3-49, bajo condiciones de invernadero, mostraron una reducción significativa en el progreso y severidad de la enfermedad y un incremento en la producción comparada con el control no transgénico (Fig. 3). Estas líneas transgénicas también se destacaron por presentar un potencial de rendimiento entre cinco y seis veces mayor que el control no transgénico. Bajo condiciones de campo se registraron 45 líneas altamente resistentes al RHBV con evaluaciones entre 1 y 3, provenientes de generaciones avanzadas (T6 y T7) de la línea A3-49-60-12-3-3 (Fig. 3 y 4). Esta resistencia fue heredada de una manera estable, indicando que el gen de la N-proteína está fijado y protege a las plantas del RHBV a una edad temprana. Siete líneas derivadas de la línea A3-49-60-12-3-3 fueron más resistentes que Fedearroz 2000, variedad comercial altamente resistente al virus. La línea A3-49-78 la cual lleva el gen de higromicina y no el gen de la N- proteína fue igualmente susceptible que Cica 8, indicando que la resistencia obtenida en las líneas transgénicas es debida al gen viral de la N- proteína. Fedearroz 50, la principal variedad actualmente sembrada en Colombia, fue clasificada como susceptible bajo una alta presión de virulencia (Fig. 4) Se ha avanzado en la incorporación del gen de resistencia de la N- proteína a variedades comerciales como Fedearroz 50, Oryzica 1 e Iniap 12. Algunas líneas derivadas del cruzamiento han mostrado resistencia frente al virus, mientras los cruzamientos controles fueron susceptibles al RHBV. Debido a la segregación del gen de la N- proteína en estas líneas es necesario obtener generaciones avanzadas para determinar el potencial de rendimiento. Los resultados en campo indican que el transgen puede ser utilizado para complementar las fuentes de resistencia natural a través de cruzamientos convencionales. La protección conferida por la N-proteína es heredada y expresada independientemente del genotipo. Características agronómicas observadas en líneas hermanas de las transgénicas resistentes y líneas en cruzamiento mostraron un potencial similar a las variedades Fedearroz 50, Fedearroz Victoria 1 y Oryzica 1. Las líneas de arroz resistentes al RHBV expresaron el ARN del gen N-proteína a bajos niveles que podrían ser detectados solo mediante RT-PCR. Hasta el momento la presencia de la nucleoproteína no ha podido ser detectada mediante Western o Elisa. Estos resultados sugieren que la resistencia conferida por el gen de la N-proteína es mediada por ARN.

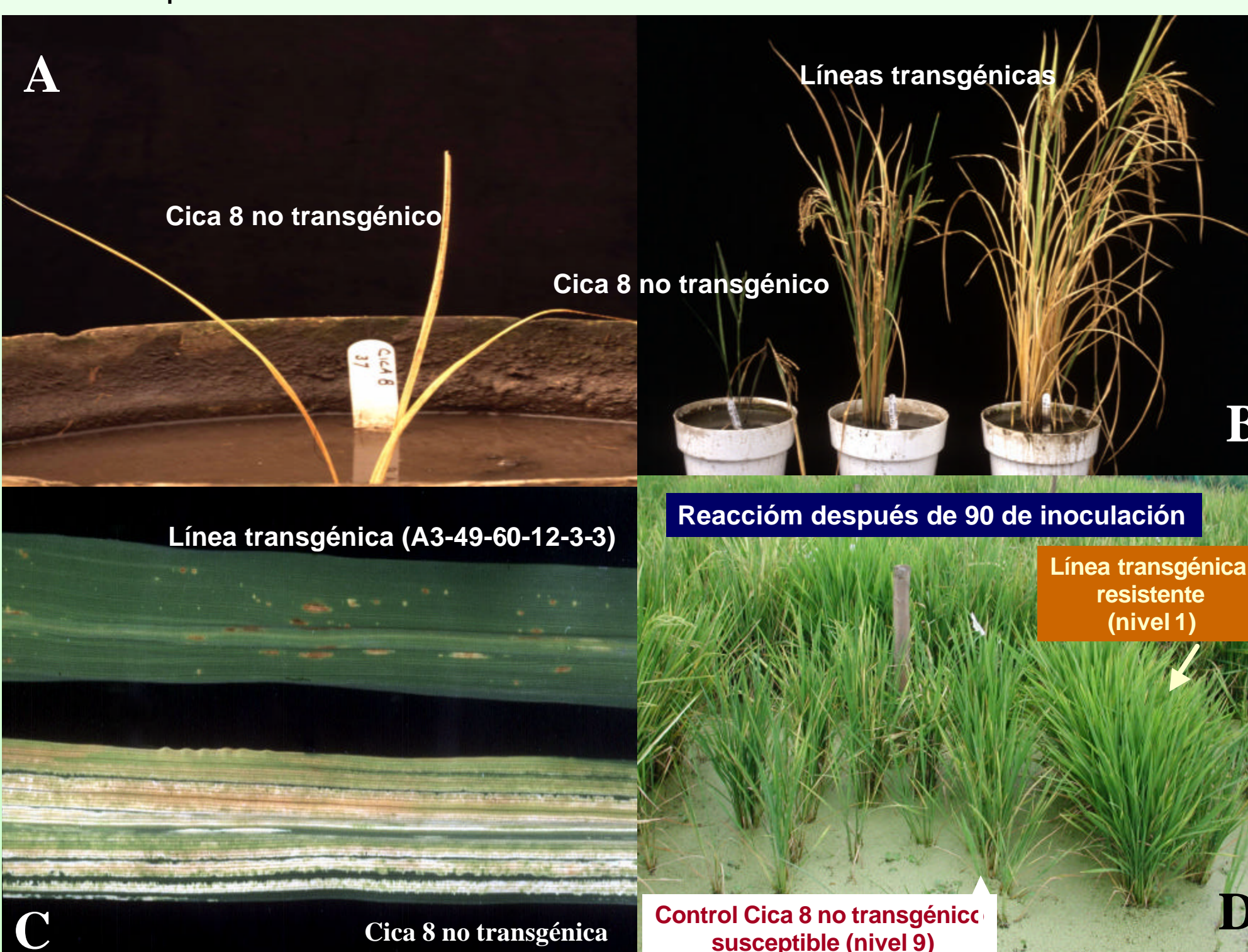


Figura 3. (A) Enfermedad causada por el RHBV al Control Cica 8 no transgénico. (B) A la izquierda planta Cica 8 no transgénica inoculada y enferma; centro y derecha plantas transgénicas inoculadas y saludables. (C) síntomas tipos de la enfermedad del RHBV en Cica 8; reacción de resistencia hipersensitiva en la línea transgénica A3-49-60-12-3-3 (D) Evaluación en campo del arroz transgénico resistente al RHBV

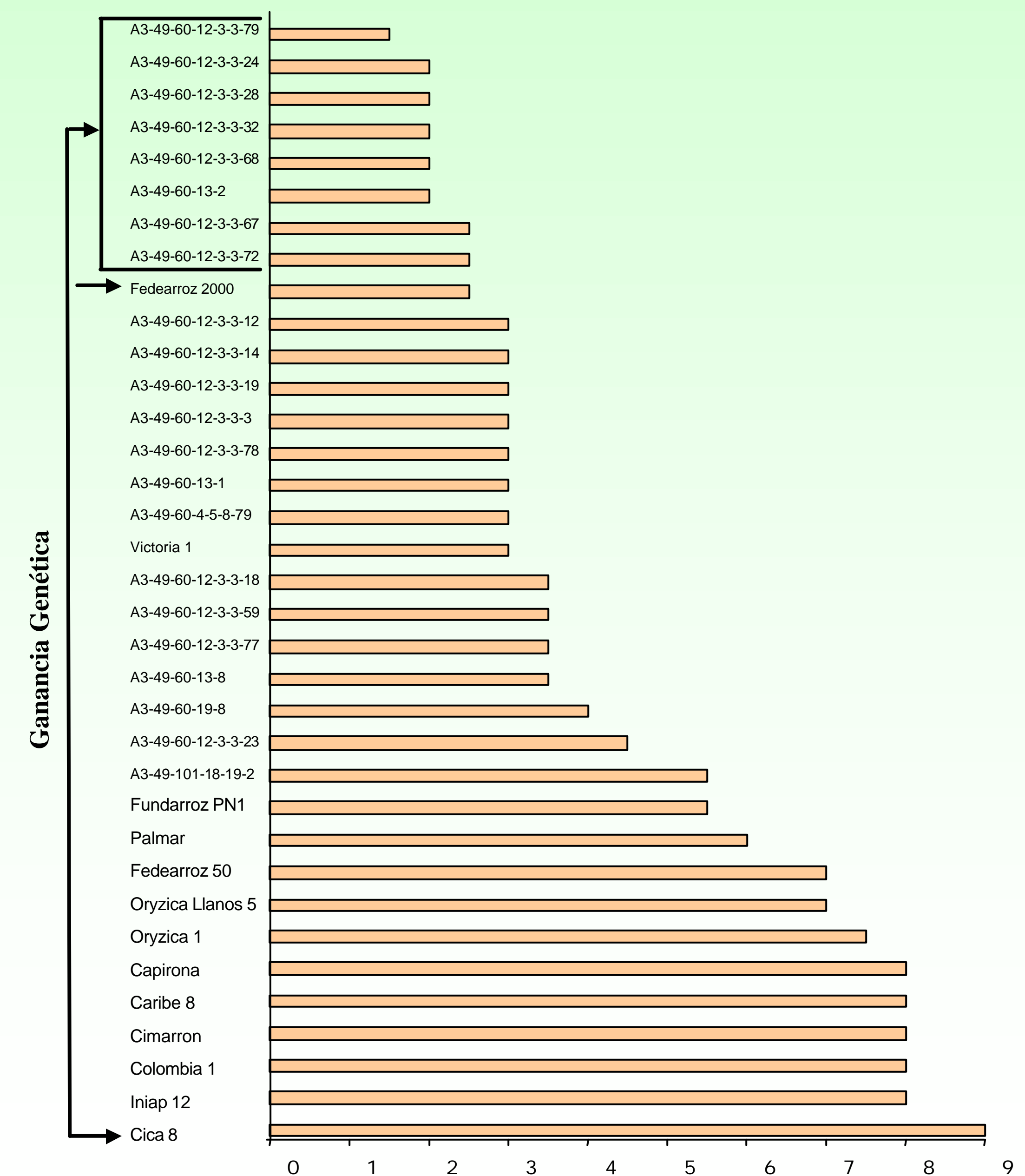


Figura 4. Reacción a la enfermedad del RHBV-N de plantas transgénicas y variedades comerciales en condiciones de campo. Valores promedio de dos evaluaciones en Noviembre de 2000 y Julio de 2001.

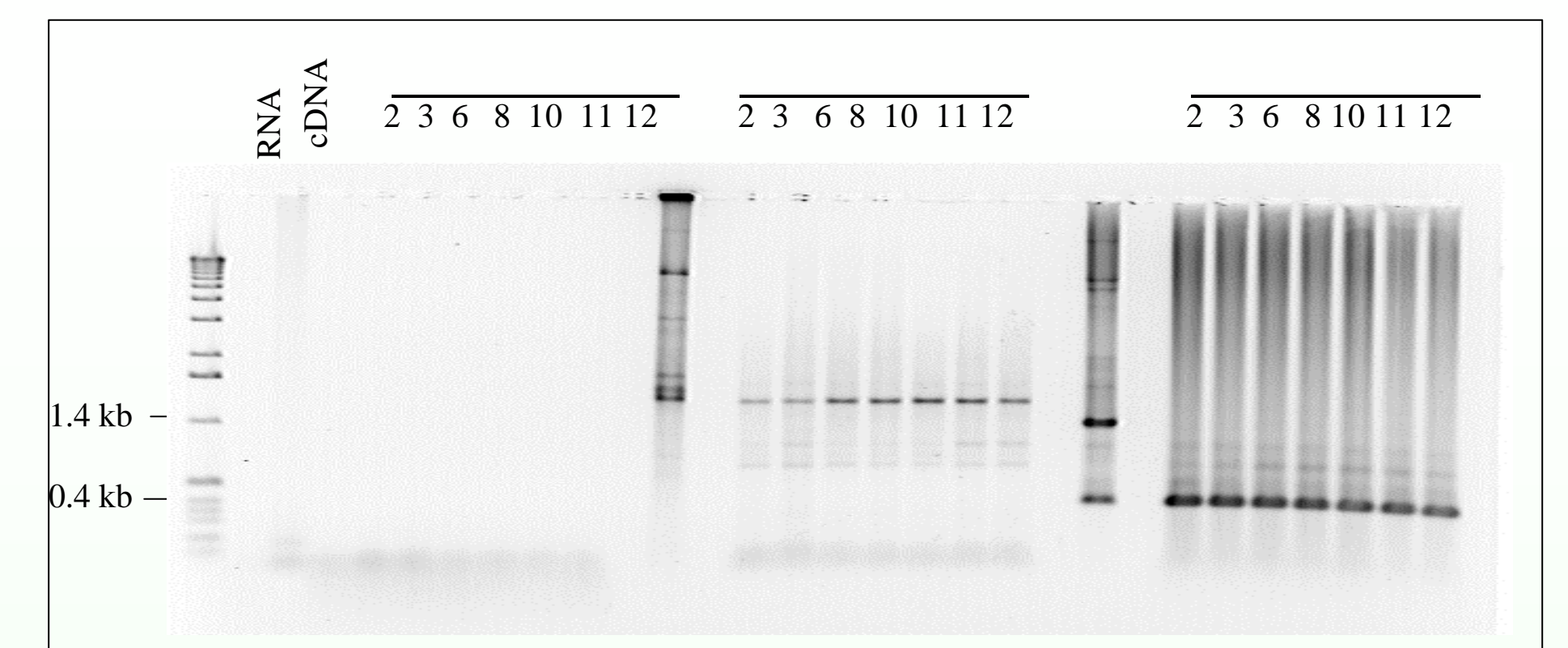


Figura 5. RT-PCR de ARN total de plantas de la línea resistente al RHBV A3-49-60-12-3-3.

Conclusiones

La protección conferida por el gen de la N-proteína fue detectada como una reducción significativa en el progreso y severidad de la enfermedad con respecto a los controles inoculados Cica 8. Se observaron muchas reacciones de resistencia incluyendo la producción de lesiones localizadas conocidas como una reacción de resistencia hipersensitiva. Los resultados a nivel de campo indican que la resistencia transgénica al RHBV puede ser utilizada para complementar las fuentes naturales de resistencia al virus. La tercera generación de líneas en cruzamiento fue más resistente que los cruzamientos no transgénicos. Estos resultados sugieren que la protección conferida por el transgen RHBV se expresa independientemente de la edad de la planta y su composición genética. Por tanto el transgen puede ser utilizado para complementar las fuentes naturales de resistencia. Actualmente se adelantan estudios que incluyen ensayos de rendimiento de las mejores líneas transgénicas

Referencias

- Beachy, R. N., Rogers, S. G. & Fraley, R.T. (1987). Genetic transformation to confer to plant virus disease. *Genetic Engineering*. 9:229-247.
- Hayakawa, T., Zhu, Y., Itoh, K., Kimura, Y., Izawa, T., Shimamoto, K. & Toriyama, S. (1992). Genetically engineered rice resistant to rice stripe virus, an insect-transmitted virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA*. 89: 9865-9869.
- Li, L., Rongda, Q., Kocho, A., Fauquet, C. & Beachy, R. N. (1993). An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Reports*. 12: 250-255.
- Morales, F. J & Niessen, A. I. (1983). Association of spiral filamentous viruslike particles with rice hoja blanca. *Phytopathology* 73: 971-974.
- Ramírez, B.C., Macaya, G., Calvert, L. A. & Haenni, A. L. (1992). Rice hoja blanca virus genome characterization and expression *in vitro*. *Journal of General Virology* 73: 1457-1464.
- Ramírez, B.C., Lozano, I., Constantino, L. M., Haenni, A. L. & Calvert, L. (1993). Complete nucleotide sequence and coding strategy of rice hoja blanca virus RNA4. *Journal of General Virology* 74: 2463-2468.