Marcadores moleculares asociados a resistencia al virus de la hoja blanca en arroz, (*Oryza sativa* L)

Liliana María Dávalos Álvarez

Trabajo de Grado presentado como
requisito parcial para optar al título de
Biólogo

Director: César P. Martínez, Ph.D. (CIAT)

Codirector: Joseph Tohme, Ph.D. (CIAT)

Codirector: Enrique Bravo, M.Sc.

(Univalle)

Universidad del Valle

Facultad de Ciencias

Departamento de Biología

Julio de 1997

Santiago de Cali

© Liliana M. Dávalos 1997

Agradecimientos

Deseo sinceramente expresar mis agradecimientos a todas las personas e instituciones que han hecho posible el desarrollo de este trabajo, sin embargo, si su nombre no aparece aquí y considera que ud. también ha contribuído, inclúyase en alguno de los apartes genéricos:

A mis patrocinadores de toda la vida, mis padres Alberto Dávalos y Faridha Álvarez,

A mi patrocinador científico inmediato, el CIAT,

Particulares agradecimientos a mis directores de trabajo César Martínez y Joseph Tohme por su invaluable colaboración científica y personal,

Al profesor Enrique Bravo por haber aceptado esta responsabilidad,

A todos mis compañeros de todos los laboratorios,

En particular a Jershon López quien es responsable de la otra mitad de este proyecto,

A Nidia Reyes quien fue mi guía espiritual en el comienzo de esta ardua empresa,

A los habitantes de Bioquímica, por haberme recibido en su aquelarre,

A Martin Fregene por sus interpretaciones valiosas,

A todos los que trabajan en Patología de Arroz,

En particular a Fernando Correa, Gustavo y Dumar,

A los entrenadores de la colonia de insectos vectores Mauricio, Efrén y Mónica,

A mi ayudante logístico José Arboleda,

A los gurús de la estadística James y Myriam Cristina,

A mi alma mater, la Universidad del Valle, si no fuera por el paro del 95' no habría llegado aquí,

Y por último, pero no menos, a mi apoyo psicoterapéutico gratuito:

mi hermana Eleonora y mi amiga Juliana.

© Liliana M. Dávalos 1997

Dedicatoria

Cuando a Tarantino le dieron el oscar a mejor guión por "Pulp Fiction", salió a la tarima a decir todo lo que se le ocurrió porque pensaba que no se iba a ganar ningún otro premio y quería aprovechar a su público. Yo no creo que este vaya a ser el único de mis textos en enfrentar los ojos ávidos (o somnolientos) de los lectores, pero uno nunca sabe. Por eso aprovecho para poner sobre el papel mi muy particular opinión en esta, la única página completamente creativa del texto.

Como tantas otras empresas científicas, esta es una "pequeña historia tendiente a ilustrar lo precario de la estabilidad dentro de la cual creemos existir, o sea que las leyes podrían ceder terreno a las excepciones, azares o improbabilidades, y ahí te quiero ver".

Puede la biología ser surrealista?

Tiene sentido algo que no lo sea?

Si usted, desocupado lector se ha preguntado eso alguna vez, a usted se dedica este texto. Si no, no se preocupe, ya le dedicarán otros trabajos de grado.

En consonancia con leyes establecidas mucho antes de nuestra era, este trabajo se imprime por un solo lado del papel (!), a doble espacio (!!) y con demasiado margen (!!!): si no va usar esta copia que tiene en las manos, recíclela y recuerde:

The knowledge imposes a pattern, and falsifies,

For the pattern is new in every moment

And every moment is a new and shocking

Valuation of all we have been.

TSE

© Liliana M. Dávalos 1997

Indice

Resumen 1

Summary 2

1. Introducción 3

2. Objetivos 6

3. Revisión de la literatura 7
3.1. El virus de la Hoja Blanca 7
3.1.1. Características de la infección 8
3.1.1.1. Diagnóstico 10
3.1.1.2 Vectores y Reservorios 10
3.1.1.3 Características moleculares 12
3.1.2. Importancia económica 13
3.1.3. Resistencia al VHB 13
3.1.3.1 Evaluación de la resistencia 14
3.1.3.2 Modo de herencia 15
3.2. Marcadores Genéticos en Arroz 16
3.2.1. Marcadores morfológicos 17
3.2.2. Marcadores bioquímicos 17
3.2.3. Marcadores moleculares 18
3.2.3.1. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de enzima de restriccion (RFLP) 19
3.3. Estrategia de Búsqueda de Marcadores 21
3.3.1 Líneas autógamas recombinantes, (Recombinant Inbred Lines, RILs) 22
3.3.2 Loci de características cuantitativas (Quantitative Trait Loci, QTL) 22
3.4. Asignación de los marcadores a grupos de ligamiento 70

4. Materiales y Métodos 24
4.1. Localidad y Sitio de Trabajo 24
4.2. Material Vegetal 24
4.3. Evaluación de resistencia al VHB 26
4.4. Extracción de ADN 26
4.5. Digestión, Precipitación, Electroforesis y Transferencia 28
4.5.1. Digestión 28
4.5.2. Precipitación 28
4.5.3. Electroforesis 29
4.5.4. Transferencia 30
4.6.Sondas 32
4.7. Marcaje Radioactivo, Hibridización y Exposición 32
4.7.1. Marcaje 32
4.7.2. Hibridización 33
4.7.3. Exposición 33
4.8. Construcción del Mapa Ligamiento y Análisis de Loci para Características Cuantitativas 34
4.8.1. Mapa de ligamiento 34

© Liliana M. Dávalos 1997

4.8.2. Análisis de loci para características cuantitativas, (Quantitative Trait Loci).... 34

5. Resultados y Discusión 37
5.1. Evaluación de la Resistencia al Virus de la Hoja Blanca..... 37
5.1.1 Características de la infección..... 37
5.2. Resistencia al Virus de la Hoja Blanca..... 38
5.2.1. Primer ensayo 38
5.2.2. Segundo ensayo 43
5.2.3 Segregación de la resistencia 52
5.3. Polimorfismos de Longitud en los Fragmentos de Restricción (RFLPs) 54
5.3.1 Polimorfismo con las enzimas utilizadas..... 54
5.3.2 Segregación de los marcadores..... 61
5.3.3 Nuevo locus para CDO38..... 68
5.3.5. Problemas en la ubicación de algunos marcadores 72
5.3.5.1. Cromosoma 12 72
5.3.5.2. Los marcadores RZ144 y RG140..... 73
5.4. Mapeo de marcadores ligados a resistencia al VHB 78

6. Conclusiones..... 85
6.1. Marcadores Asociados a Resistencia en el Mapa Molecular del cruce Fanny x Oryzica Llanos 5 85
6.2. Origen de la Resistencia en el Cruce..... 85
6.3. Segregación de la Resistencia en la Progenie 85
6.4. RG190 como Marcador para Resistencia proveniente de Fanny..... 86

7. Referencias..... 87

Anexo 1. Soluciones utilizadas en los procedimientos de Laboratorio..... 94

Anexo 2. Resultados completos primer Ensayo Evaluación de Hoja Blanca..... 101

Anexo 3. Resultados completos 2do. ensayo de Evaluación de Resistencia. 104

Figura 1. Esquema de los procesos que causan a la presencia de un RFLP..... 19
Figura 2. Pedigree de Oryzica Llanos 5 y otras variedades mejoradas. 25
Figura 3. Foto (reducida) con luz ultravioleta de una digestión completa de ADN de arroz 31
Figura 4. Resumen del proceso de hibridización con sondas radioactivas..... 36
Figura 6. Prueba de rango múltiple de Duncan para la variable porcentaje de infección en los dos ensayos..... 48
Figura 7. Histograma de comparación entre las frecuencias de porcentajes de infección de los dos ensayos..... 51
Figura 8. Autoradiografía de la hibridización en parentales con la sonda RG190. .. 60
Figura 9. Representación gráfica de los cromosomas 1, 8 y 11..... 65
Figura 10. Autoradiografía de la hibridización en filtros de progenie de CDO385. .. 69
Figura 11. Representación gráfica de los cromosomas 2, 3, 6 y 12..... 74
Figura 12. Regresión lineal entre el estado alélico de los marcadores mapeados para cada cromosoma 79

© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 13. Análisis de contingencia para la característica "Resistencia a la Hoja Blanca" 81
Figura 14. Análisis de intervalo para QTL en los cromosomas 2 y 6. 83

Glosario de siglas y abreviaturas 106
Histograma de la distribución de frecuencias de los intervalos de infección con los datos del primer ensayo..... 40

Tabla 1. Análisis de Varianza para porcentaje* de hoja blanca transformado, Primer Ensayo. 42
Tabla 2. Resultados en porcentaje de infección de los dos ensayos. 45
Tabla 3. Polimorfismo con las sondas rastreadas en parentales (Fanny y OL5). 56
Tabla 4. Segregación de todos los marcadores analizados en progenie. 62
Tabla 5. Marcadores con segregación sesgada. 63
Tabla 6. Marcadores que más determinan la variación en la resistencia a la hoja blanca. 80

© Liliana M. Dávalos 1997

Marcadores Moleculares Asociados a Resistencia al Virus de la Hoja Blanca en Arroz (***Oryza sativa***, L)

Resumen

Una población de 134 líneas autógamas recombinantes derivadas del cruce Fanny x Oryzica Llanos 5 fue evaluada cuantitativamente para resistencia al virus de hoja blanca en invernadero. La segregación de 74 marcadores RFLP provenientes del mapa molecular de arroz (McCouch et al, 1988; McCouch, 1990; Causse et al., 1994 y Nagamura et al., 1993) en estas líneas, se utilizó para generar un mapa genético del cruce con el objetivo de ubicar en el mapa y rastrear la procedencia de los genes de resistencia a la hoja blanca presentes en la progenie.

La mayoría -67%- de las líneas evaluadas fue resistente al virus, incluyendo una fracción -20%- más resistente que el testigo, Colombia 1. La distribución de la variación en la resistencia de la progenie fue continua.

Se encontraron dos regiones, una en el cromosoma 2 proveniente de Fanny y otra en el cromosoma 6 proveniente de Oryzica Llanos 5, asociadas a resistencia en la progenie. Se estableció, entonces, que los genes de resistencia de los parentales son distintos, lo que significa que Fanny es una nueva fuente de resistencia. La asociación entre estas regiones cromosómicas y la resistencia fue, sin embargo, no significativa.

El marcador tentativo para resistencia, RG190, fue descartado al no encontrarse correlación entre el alelo heredado de Fanny y la resistencia en la progenie. Este marcador no se pudo mapear en el cromosoma reportado en la literatura (cr. 12) y se esperan los resultados de la segregación de RG396 para identificar con precisión su localización en el mapa. En el mapa molecular construido se identificó, además, un nuevo locus para el marcador CDO38 y regiones de segregación sesgada en los cromosomas 1, 8 y 11.

© Liliana M. Dávalos 1997

Molecular Markers linked to resistance to the Rice Hoja Blanca Virus in Rice (***Oryza sativa***, L)

Summary

A population of 134 recombinant inbred lines derived from the cross Fanny x Oryzica Llanos 5 was quantitatively tested under greenhouse conditions for resistance to the rice hoja blanca virus. The segregation data of 74 RFLP markers from the rice molecular map (MacCouch et al., 1988; McCouch, 1990; Causse et al., 1994 y Nagamura et al., 1993) in these lines were used to generate a molecular map of the cross with the objective of locating and tracking resistance to hoja blanca genes in the progeny.

Most -67%- of the lines examined were resistant to the virus, including a fraction -20%- more resistant than the control variety, Colombia 1. The distribution of variation in the resistance of the progeny was continuous.

Two regions, one in chromosome 2 coming from Fanny, and another in chromosome 6 coming from Oryzica Llanos 5; were identified as linked to resistance in the progeny. Thus, was established that the resistance genes from the parents are different, which means that Fanny is a new source of reistance. The linkage between chromosomal regions and resistance was, however, non-significant.

The tentative marker for resistance, RG190, was discarded as no correlation between the allele from Fanny and resistance to the virus could be detected. This marker was did not map in the chromosome recorded in literature (chromosome 12) and results from the segregation of RG396 are expected in order to precisely identify its location on the map. Additionally, a new locus for the marker CDO38 and a distorted segregation region were identified on the map.

© Liliana M. Dávalos 1997

1. Introducción

Importancia del cultivo de arroz

El arroz (***Oryza sativa*** L.) se cultiva mundialmente en más de 148 millones de hectáreas, es la fuente principal de alimento para el 50% de su población y puede fácilmente ser el cultivo más importante a nivel mundial (Shimamoto, 1995). Los principales consumidores de arroz viven en paises en vías de desarrollo, por lo tanto el aumento en la producción de arroz podría constituir una enorme contribución para aliviar la demanda de alimentos en la fracción de la población de mas rápido crecimiento a nivel global en Asia y las Américas.

En América Latina, como en casi todas las regiones productoras de arroz, la mayor parte de la cosecha se consume localmente y algunos paises sin tradición arrocera deben importar el grano, con las limitantes que impone un mercado mundial que solo comercia internacionalmente el 5% de la producción total (Khush y Toeniessen, 1991).

En los últimos años las preocupaciones ambientales y sanitarias alrededor del abuso de agroquímicos y la ineficiencia en técnicas de irrigación y aplicación de fertilizantes propias de grandes cultivos comerciales, han planteado serios cuestionamientos sobre la sostenibilidad a largo plazo de los sistemas de producción agrícola moderna. Cómo asegurar una producción sostenible de alimentos es un tópico de álgida discusión.

Las enfermedades y plagas son uno de las limitantes al aumento de la productividad de arroz en los trópicos, restringen la expansión de las áreas de cultivo y aumentan los costos por insumos en el sembrado. Aunque el arroz crece en amplio rango de condiciones -incluyendo planicies altas secas- los agroecosistemas de arroz más

© Liliana M. Dávalos 1997

productivos son las planicies bajas irrigadas: el resultado final es que las zonas más productivas son también las más vulnerables a las pérdidas causadas por roedores, insectos, hongos, bacterias y virus.

En Colombia, el uso de variedades mejoradas de arroz ha sido un importante factor de desarrollo de la producción agrícola en las planicies inundables de la Costa Atlántica y los Llanos Orientales en la segunda mitad de este siglo. Es también en Colombia donde se observó por primera vez la hoja blanca, en 1935 (Bernal, 1939). Después de dos epidemias en los 50's y 60's la enfermedad desapareció durante casi 15 años. En 1981, se presentaron graves epidemias en Colombia, Ecuador y Venezuela. En algunos valles interandinos (como el Valle del Cauca) se observaron fluctuaciones cíclicas cortas en la severidad del virus de la hoja blanca (VHB) dentro del marco general de la epidemia. Hoy en día, esta enfermedad se conoce en todos los paises productores de arroz de América, incluyendo a los Estados Unidos y se sabe que las pérdidas por hoja blanca, una vez que se desata una epidemia, van desde el 25 hasta el 100% de la cosecha (Zeigler et al., 1988).

Las estrategias de control de la hoja blanca anteriormente se concentraron en eliminar el vector del virus mediante el uso de insecticidas; en la actualidad se busca incorporar a las plantas la ventaja de la resistencia genética al virus ***per se***. Esta característica se encuentra ya presente, en mayor o menor grado en diferentes fuentes de resistencia. A partir del estudio de este rasgo, queda en claro que no existe una resistencia total y, en todo caso, los factores ambientales como la presión de vectores y edad de la planta juegan un papel importante a la hora de desarrollar o no la enfermedad.

Además de las implicaciones económicas a gran escala de la investigación en arroz, esta especie puede convertirse en organismo modelo en la investigación

© Liliana M. Dávalos 1997

biologica por su estructura genética. El arroz es diploide, n =12 cromosomas, su genoma es el menor de las monocotiledóneas conocidas (4.3Mbases) y existe una enorme colección de germoplasma (mas de 120 000 accesiones alrededor del mundo). Adicionalmente, el conocimiento de la estructura genética del arroz puede beneficiar otros cultivos como maíz, sorgo, trigo, centeno y avena porque el arroz pertenece a la misma familia -Graminea- (Causse et al., 1994).

En este proyecto se propone la aplicación de la técnica de marcadores moleculares RFLP para lograr la identificación y localización de algunas regiones cromosómicas que confieren resistencia al virus de la hoja blanca. La utilización de marcadores moleculares asociados a características agronómicas deseables, incluídas las de resistencia, es una herramienta relativamente reciente desde el punto de vista tecnológico, para aportar información valiosa a los diferentes programas de mejoramiento varietal. La identificación molecular de marcadores asociados a genes de resistencia economiza tiempo, dinero y esfuerzo en diferentes pasos del programa de mejoramiento pues aumenta la eficiencia en la transferencia de genes a nuevas variedades al tiempo que permite dilucidar la configuración genética del arroz.

© Liliana M. Dávalos 1997

2. Objetivos

2.1. Evaluar por medio de correlación a marcadores RFLP (Restriction Fragment Length Polymorphism) la resistencia a la hoja blanca de una población de 134 líneas autógamas recombinantes F5 producto del cruce Fanny por Oryzica Llanos 5.

2.2. Localizar en el mapa genético del arroz el o los marcadores que se encuentren asociados a posibles genes de resistencia al VHB en dicha población.

2.3. Confirmar o descartar el marcador preliminar RG 190 como indicador de resistencia a la hoja blanca proveniente de Fanny.

2.4. Establecer las diferencias o similitudes entre las regiones marcadoras (y por lo tanto los genes) de resistencia presentes en Fanny y en Oryzica Llanos 5.

© Liliana M. Dávalos 1997

3. Revisión de la literatura

3.1. El virus de la Hoja Blanca

La enfermedad hoja blanca del arroz fue reportada por primera vez en Colombia en 1935 (Garcés, 1940 y 1941) y desde entonces ha aumentado su distribución a todas las zonas arroceras tropicales del continente americano (Everett y Lamey, 1969). Las pérdidas en producción debido a la hoja blanca pueden ir desde 25% hasta la totalidad de la cosecha en el peor de los casos (Jennings, 1963).

Ante los efectos devastadores de esta enfermedad, los estudios tendientes a descubrir el patógeno y sus medios de transmisión no se hicieron esperar estableciendo al saltahojas ***Tagosodes orizicolus*** [1] (Muir) como vector principal (Gálvez y Jennings, sd; Malaguti et al., 1957; Gálvez et al., 1960 y Gálvez. 1961). Aunque ya se clasificaba como una enfermedad viral desde los 60's, fue hasta 1983 cuando Morales y Niessen lograron la caracterización inequívoca del patógeno como una nucleoproteina filamentosa aislada a partir de tejidos infectados. Estudios posteriores agruparon al VHB junto con otros cuatro virus -el mosaico estriado del trigo europeo (European Wheat Striate Mosaic Virus), el virus del enanismo del arroz (Rice Growth Stunt Virus), el virus rayado del arroz (Rice Stripe Virus) y el virus rayado del maiz (Maize Stripe Virus)- en la familia de los tenuivirus (Gingery, 1988).

Las últimas investigaciones han logrado caracterizar el virus con una resolución molecular muy alta, permitiendo establecer su expresión genómica ***in vitro*** (Ramirez et al., 1992), el número y tamaño de las cadena de ARN de su genoma (De Miranda

© Liliana M. Dávalos 1997

et al**.**, 1994), la secuencia completa de tres de las cuatro cadenas de ARN (Ramirez et al**.**, 1993; De Miranda et al**.**, 1994 y De Miranda et al**.**, 1996a) y la estrategia de traducción de la cadena 3 (Ramírez et al**.**, 1995).

3.1.1. Características de la infección

Desde los primeros reportes (Bernal, 1939; Garcés Orejuela, 1940) las descripciones de síntomas de hoja blanca en el arroz coinciden en anotar la decoloración rayada de la hoja, con lesiones concomitantes correspondientes a sitios de alimentación o a posturas de huevos del vector; siendo más afectadas las hojas nuevas que pueden aparecer completamente blancas desde el nacimiento. El número de hojas así afectadas puede ocasionar la muerte de la planta antes de la floración y, aunque esto no ocurra, en todo caso se disminuye la producción de grano. Las plantas infectadas reducen su crecimiento y rendimiento en proporción a la severidad de la infestación con el vector -***Tagosodes orizicolus*** -, la cantidad de vectores reales en la población de insectos y la edad de exposición de las plantas (Gálvez 1967).

El VHB se ha reportado sólo en las Américas: Brasil, Belize, Colombia, Costa Rica, Cuba, República Dominicana, El Salvador, Ecuador, Guatemala, Guyana, Honduras, México, Nicaragua, Panamá, Perú, Puerto Rico, Surinam, Estados Unidos y Venezuela. La enfermedad está restringida a América tropical, principalmente debido a la baja supervivencia del vector en el invierno de las regiones templadas. La hoja blanca es la más importante de las dos enfermedades víricas del arroz en el continente americano y no hay evidencia de la existencia de cepas: las diferentes

---

[1] ***Tagosodes orizicolus*** Muir (1990, Asche and Wilson) =***Sogatodes orizicola*** Muir (Ishihara, 1969) =***Sogatodes oryzicola*** Muir (Ishihara y Nasu, 1966) =***Sogatodes orizicola*** Muir (Fennah, 1963) =***Sogata oryzicola*** Muir (Muir, 1926). Tomado de Pantoja y Hernández, 1993.

© Liliana M. Dávalos 1997

reacciones varietales en diferentes paises son consecuencia de la variación en la incidencia de vectores (Morales y Niessen, 1985).

Las epidemias de hoja blanca han sido cíclicas con intervalos de infección alternándose a períodos más largos sin la enfermedad (Everett y Lamey, 1969). Estos ciclos corresponderían a la proporción de vectores efectivos al interior de la población total de ***Tagosodes orizicolus***. La capacidad del insecto para infectarse, replicar y transmitir el virus -o sea para ser un vector- está bajo el control genético directo de un alelo recesivo (Zeigler y Morales, 1990), que es además seleccionado en contra en la naturaleza pues la infección tiene un efecto deletéreo para la fertilidad y longevidad del insecto (Webber et al***.***, 1971); por lo tanto, una epidemia de hoja blanca en el arroz ***debe*** estar precedida de una epidemia del virus en la población de insectos, y esto depende de la proporción de individuos de genotipo susceptible al virus. Para que haya suficientes vectores reales en una población natural es necesario que dicha población ***no haya estado expuesta al virus*** durante el tiempo suficiente para que la proporción de vectores potenciales (homocigotos recesivos) alcance un nivel significativo en la población.

Las primeras estrategias de control de las epidemias de hoja blanca buscaban eliminar las poblaciones de ***Tagosodes orizicolus*** -vectores y no vectores- mediante el uso de insecticidas (Zeigler et al***.***, 1988). La efectividad de este método es dudosa en la medida que incrementa los costos, selecciona poblaciones de insectos resistentes a insecticidas y contamina el medio ambiente, además de pertubar las relaciones predador presa en los cultivos de arroz (Kenmore et al***.***, 1984; citado por Zeigler et al., 1994). Es así como las prácticas de control cultural y biológico i.e. manejo de la época de siembra, rotación de cultivos y liberación de insectos

© Liliana M. Dávalos 1997

hiperparásitos se han vuelto recomendaciones frecuentes a los agricultores (Muñoz 1996).

Aunque este tipo de control tiene resultados exitosos, a largo plazo, la consecución de variedades resistentes es la mejor alternativa; siempre y cuando se logre integrar esta característica a otras igualmente deseables en cuanto a calidad de grano y rendimiento (Martínez, 1982).

3.1.1.1. Diagnóstico

En el campo, el diagnóstico de la enfermedad depende de la expresión de los síntomas, lo cual a su vez está determinada por la edad de la planta al momento de inoculación, la proporción de vectores en la población de insectos y el tamaño mismo de esta población. Los primeros síntomas aparecen como puntos blanco amarillentos en las hojas inmaduras; después de 4 o más días de la inoculación, el virus se vuelve sistémico en la planta, causando líneas de clorosis o clorosis total en hojas tardías. Las panículas de plantas infectadas pueden ser completamente estériles, con semillas malformadas y descoloridas (Jennings, 1963; Vargas, 1985). El patrón de las lesiones de hoja blanca -decoloración de la nervadura hacia afuera- es el síntoma inequívoco característico de la enfermedad (Jennings et al., 1980). Zeigler y Morales desarrollaron en 1990 una prueba de ELISA (Enzyme Linked InmunoSorbent Assay) para detectar el virus de la hoja blanca en los insectos cuando apenas está en la fase de incubación. Como uno de los mecanismos de transmisión de la infección es a través del ovario en hembras vectoras, las ninfas producto del cruce de dos vectores probados -i.e. que han transmitido la infección a plantas sanas- se consideran también "vectores probados" (Gálvez, 1967), sin necesidad de recurrir a la prueba de ELISA.

3.1.1.2 Vectores y Reservorios

© Liliana M. Dávalos 1997

Gálvez y Jennings (sd) comprobaron que la hoja blanca no se transmite a través del suelo, semillas o agua, si no a través de ***Sogata oryzicola***); en otra publicación, presumiblemente posterior, Gálvez et al. (1960) registran la transmisión de la infección mediante el vector ***Sogata cubanus*** (= ***Tagosodes cubanus***). Finalmente, en 1961 Gálvez et al. establecen que ***T. orizicolus*** es vector del virus en arroz, mientras que ***T. orizicolus*** y ***T. cubanus*** pueden transmitir el virus del arroz a la maleza "liendrepuerco" (***Echinocloa colonum***) y que solamente ***T. cubanus*** puede transmitir la infección entre plantas de ***E. colonum*** .

Otras plantas susceptibles de ser infectadas con hoja blanca -lo cual las convierte en reservorios potenciales- son las especies cultivadas ***Avena sativa*** -avena-, ***Hordeum vulgare*** - cebada-, ***Secale cereale*** - centeno- y ***Triticum vulgare*** -trigo-, además de las malezas ***Lolium perenne*** -trébol- y la ya mencionada ***E. colonum*** -liendrepuerco- (Gálvez, 1968). Este mismo estudio comprobó la transmisión desde estas diferentes especies hacia el arroz con ***T. orizicolus*** como vector; sin embargo las preferencias alimentarias del insecto son muy importantes en la transmisión de la infección y no se podrían considerar especies diferentes al arroz y liendrepuerco como reservorios de infección en condiciones normales.

Estos resultados deben, sin embargo, considerarse con suma precaución pues los estudios más recientes de De Miranda et al***.*** (1996b y c) han confirmado la sugerencia de Morales y Niessen (1983): los agentes causales de hoja blanca en arroz y liendrepuerco son diferentes, aunque las secuencias codificantes de los dos virus sean 90% homólogas.

El cuadro general que emerge a partir de los estudios más precisos tiende a establecer al arroz como reservorio único del virus de la hoja blanca del arroz (RHBV, por sus siglas en inglés) y a ***Tagosodes orizicolus*** como su único vector.

© Liliana M. Dávalos 1997

3.1.1.3 Características moleculares

El virus de la hoja blanca del arroz -VHB- está clasificado como tenuivirus. Esta familia de virus de ARN incluye además al MStV (virus rayado del maiz), EWSMV (virus del mosaico estriado europeo del trigo), RGSV (virus del enanismo del arroz) y al RStV (virus rayado del arroz). Estos cinco virus comparten características sintomáticas como rayado clorótico en las hojas, disminución en el crecimiento de la planta y reducción en la cosecha. Las propiedades morfológicas, bioquímicas y ecológicas de la familia incluyen una estructura filamentosa, transmisión transovárica en el vector, un producto proteico predominante de 32- 34 Kdaltons, una razón de absorbancia 260/280 nm de 1:4 y el ser todos transmitidos por diferentes especies de saltahojas (Gingery, 1988; Morales y Niessen, 1983).

La estructura del VHB comprende 4 cadenas sencillas de ARN de 1.9, 2.3, 3.5 y 9.8 Kbases cada una (De Miranda et al., 1994). Las tres cadenas secuenciadas hasta ahora permiten afirmar que el VHB no es una cepa americana del RStV (De Miranda et al., 1994), y la estrategia de codificación de las cadenas estudiadas es similar: cada cadena codifica para dos proteinas con lecturas en sentido contrario (Ramirez et al., 1993; De Miranda et al., 1996a).

De Miranda et al. (1996c) describieron un método para purificar ribonucleoproteinas de tamaño significativamente diferente aisladas a partir de ***Echinocloa colonum*** y arroz, y luego lograron secuenciar la cadena de 3ARN de ambos virus, encontrando un 90% de homología en la región codificante y solo un 50% de homología en la región intergénica que separa los dos marcos de lectura abierta (De Miranda et al., 1996b) confirmando los datos para una comparación similar de la cadena 4ARN. Este hallazgo no solo confirma la diferente etiología de la infección por hoja blanca

© Liliana M. Dávalos 1997

en ambas especies de gramíneas, si no que también sugiere la evolución coordinada de las diferentes cadenas en estos dos virus.

3.1.2. Importancia económica

El impacto económico del virus de la hoja blanca en América Latina no puede subestimarse.

Tras dos epidemias distintas en los 50's y 60's (Gálvez, 1969; citado por Zeigler et al., 1988), la enfermedad no volvió a aparecer hasta las epidemias generalizadas de 1981 en Colombia, Ecuador y Venezuela, causando pérdidas hasta del 100% de las cosechas (Vargas, 1985) constituyéndose esta infección en una de las causas de la reducción del cultivo de arroz en el Valle del Cauca. Esta enfermedad es un desafío al desarrollo de los cultivos en América Tropical y se ha mantenido como una amenaza en regiones promisorias para la agricultura como los Llanos Orientales y la zona del Tolima y Huila en Colombia.

3.1.3. Resistencia al VHB

Desde hace treinta años ya se conocían fuentes de resistencia al VHB (Lamey, 1969). Estas fuentes de resistencia son de la subespecie ***japónica*** y la resistencia ha sido transferida exitosamente a tipos de la subespecie ***indica*** en programas de mejoramiento en América Latina.

La resistencia se expresa como una completa ausencia de síntomas después de ser inoculadas las plantas con vectores probados; típicamente, un porcentaje (10-30%) de plantas desarrolla síntomas de igual severidad que las plantas susceptibles. La hipótesis que se ha propuesto es que simplemente la resistencia es incompleta y podría romperse bajo condiciones de presión extrema -muy improbables en un cultivo comercial -(Zeigler et al., 1988)-.

© Liliana M. Dávalos 1997

El extenso trabajo de Vergel (1991) caracterizó variedades cuya resistencia o susceptibilidad dependen de la edad de inoculación o de la presión de insectos a las que son expuestas. Posteriormente, en 1994, Zeigler et al. aclararon que en las variedades susceptibles la inoculación con insectos de baja dosis de virus basta para causar niveles máximos de infección, pero en variedades resistentes el porcentaje de infección es directamente proporcional a la dosis de virus de los vectores. Por lo tanto y debido a los diferentes factores ambientales que afectan, tanto la expresión de los síntomas como la transmisión de la enfermedad, la evaluación de la resistencia se convierte en un procedimiento crucial.

3.1.3.1 Evaluación de la resistencia

La evaluación de la resistencia varietal al VHB debe superar obstáculos asociados a la relación entre el virus y su vector: manejo y multiplicación de una colonia de ***Tagosodes orizicolus*** con alta proporción de vectores, evaluación de la virulencia de la población misma y finalmente las diferencias entre los resultados de invernadero y de campo para evaluaciones de cultivares idénticos (Jennings et al., 1980). Adicionalmente, las preferencias alimentarias del vector y su tendencia a la vida sedentaria afectan su respuesta hacia un cultivar determinado de tal suerte que puede sobreestimarse su resistencia sin haber estado en realidad expuesto al virus simplemente porque no era del gusto del insecto. El cruce selectivo de insectos, los métodos seguros de diagnóstico del virus en el insecto, la inoculación de plantas entre 15 y 20 días de edad, y el uso de un número de insectos/planta muy alto (5 o más) son medidas apropiadas para hacer que las evaluaciones de resistencia sean más confiables.

© Liliana M. Dávalos 1997

Es importante señalar que se deben separar los efectos del daño mecánico ocasionado por las posturas y alimentaciones del insecto en la planta de los efectos del virus mismo: la resistencia al daño mecánico por el insecto y la resistencia al virus ***per se*** son rasgos diferentes y por lo tanto una misma variedad puede presentar respuestas distintas, i.e. ser resistente al virus pero no al daño mecánico o vice versa (Gavidia, 1970). Este problema se puede resolver parcialmente escogiendo la población de vectores seleccionandolos para una edad anterior a la madurez reproductiva, evitando así las posturas de huevos (Vergel, 1991).

Métodos para la evaluación en el campo y en invernadero están disponibles desde hace más de una década (Zeigler et al**.**, 1988; Jennings et al**.**, 1980) y son usados con regularidad en programas de mejoramiento clásico. Estos métodos usan una escala de dígitos impares para medir la infección en la población observada, siendo 1 el mínimo de infección y 9 el máximo, correspondiendo proporcionalmente a porcentajes de plantas infectadas, no se tiene en cuenta la severidad de la infección.

3.1.3.2 Modo de herencia

Desde 1961 (Beachell y Jennings) se sugirió que la herencia de la resistencia a la hoja blanca no está controlada por un solo gen dominante; posteriormente, Zeigler et al**.** (1988) concluyen que la resistencia es dominante y confirman la hipótesis anterior, anotando que puede haber factores "modificantes" de la resistencia.

Los resultados de la segregación en proporciones 1:2:1 y 9:4:5 en F3 de cruces entre variedades resistentes y Bluebonnet 50 (susceptible) en la revisión final de Vergel (1991) le llevaron a concluir que existe dominancia completa y un gen para la resistencia en la variedad Blue Rose; un gen de dominancia incompleta para la resistencia derivada de Takao Iku 18; y dos genes de segregación independiente

© Liliana M. Dávalos 1997

para la resistencia de Tainan Iku 487. Sus resultados en cruces entre las variedades resistentes sugieren, además, que las tres variedades comparten un mismo locus alélico para resistencia y Tainan Iku 487 tendría un locus adicional confiriéndole resistencia.

La hipótesis de unos pocos genes mayores controlando la resistencia es de nuevo apoyada por Zeigler et al. (1994), aclarando que lo que parece un rango continuo de resistencia se debe seguramente a genes menores, antibiosis parental o variaciones debidas al ambiente.

3.2. Marcadores Genéticos en Arroz

Un marcador genético es cualquier característica heredable que se encuentre asociada (estadísticamente correlacionada) con un rasgo de interés -en este estudio la resistencia al virus de la hoja blanca-. Los marcadores genéticos permiten visualizar la estructura del genoma al generar grupos de ligamiento a partir del análisis de la forma de herencia de diferentes características: el primero de estos análisis en arroz lo hizo Chao en 1927 con marcadores morfológicos de herencia mendeliana.

El producto de un análisis de ligamiento de una serie de marcadores genéticos es un mapa genético, cuyas distancias reflejan la probabilidad de ligamiento al segregar para los rasgos estudiados: a mayor distancia, menor es la probabilidad de ligamiento entre las características mapeadas. Este mapa genético es, a su vez, la representación (no necesariamente exacta) de una configuración física del genoma tal como está organizado en cromosomas al interior del núcleo celular (Gustafson y Dillé, 1992).

© Liliana M. Dávalos 1997

El objetivo último de un programa de mapeo es conseguir una resolución fina de la estructura del genoma, de tal manera que sea posible mediante marcadores asociados, seleccionar para características deseables en el mejoramiento del cultivo de arroz; llegando incluso hasta identificar los genes responsables de las diferentes características y así superar los resultados de programas de mejoramiento tradicionales en costos, tiempo y calidad de las variedades obtenidas. A continuación se citan los diferentes tipos de marcadores genéticos usados en programas de mejoramiento .

3.2.1. Marcadores morfológicos

Los primeros marcadores en ser mapeados corresponden a características fácilmente observables en el fenotipo, que segregan de manera mendeliana, controladas generalmente por un solo gen. Los marcadores genéticos utilizados para desarrollar estos mapas han sido los que afectan la morfología de la planta, incluyendo genes para enanismo, albinismo y morfología foliar.

Los mapas de ligamiento a partir de marcadores morfológicos permiten conocer las bases de la estructura citológica de algunos rasgos genéticos en arroz (Khush, 1990); sin embargo, este tipo de marcadores produce efectos mayores en el fenotipo de las plantas enmascarando los efectos de otros genes menores. Esto es indeseable en programas de mejoramiento pues hace imposible la identificación de ligamientos para selección (Tanksley et al**.**, 1989); además los marcadores morfológicos a menudo dependen del estado de desarrollo de la planta, dificultando aun más su incorporación en un programa de mejoramiento.

3.2.2. Marcadores bioquímicos

En los últimos veinte años se han caracterizado marcadores a partir de isoenzimas y proteinas de diferente peso molecular y/o punto isoeléctrico, distinguibles en el

© Liliana M. Dávalos 1997

patrón de corrida en electroforesis. De nuevo, la expresión de estos marcadores puede depender de un tejido o una edad determinada en la planta, pero la principal limitación de esta técnica está en el bajo número de loci detectables lo cual puede imposibilitar la saturación del mapa a construir (McCouch, 1990).

3.2.3. Marcadores moleculares

Con el descubrimiento de técnicas para extraer, manipular y caracterizar ADN, la búsqueda de marcadores genéticos supera varias de las desventajas citadas arriba: la capacidad de acceder directamente al genoma de un organismo permite independizar estos marcadores de la edad de la planta, el tejido y los factores medioambientales. Adicionalmente, el número de marcadores moleculares disponibles a partir del genoma de un eucariote es virtualmente ilimitado.

El uso de este tipo de marcadores en el mapeo de arroz no se ha hecho esperar y existen mapas saturados con marcadores moleculares incluyendo RFLP -restriction fragment length polymorphism- y RAPD -random amplified polymorphc DNA- (McCouch et al., 1988; McCouch, 1990; Nagamura et al., 1993 y Causse et al., 1994). Otros marcadores moleculares, de desarrollo mas reciente como microsatélites, STS (sequence tagged sites) y AFLP (amplified fragment length polymorphism), se están implementando con miras a integrar nuevos marcadores a los mapas existentes (Panaud et al., 1996,)

En el mapa del grupo de Causse et al. (1994) se incluye la ubicación cromosómica de 25 marcadores para genes de resistencia (estudiados por diferentes grupos de investigadores) a pyricularia, bacteriosis, saltahojas blanco, verde y castaño y virus esférico del tungro. Algunos de estos marcadores han sido localizados con mayor precisión en los estudios originales y posteriores como varios marcadores de resistencia a pyricularia (Yu et al., 1991; Wang et al., 1994; La Rota, 1996), a

© Liliana M. Dávalos 1997

bacteriosis (Yoshimura et al., 1992; citado por Causse et al., 1994) y al saltahojas blanco (McCouch, 1990). Ya en el mapa de Causse et al. (1994) aparece mapeado el marcador de resistencia a VHB en el cromosoma 12 (reportado por Tohme); estudios posteriores realizados por La Rota y Tohme localizaron una región de marcadores cuantitativos (QTL) asociados a resistencia en el cromosoma 12 - alrededor de RG190- procedente de la variedad Fanny y otras dos regiones en los cromosomas 11 y 10 procedentes de Colombia 1 (J. Tohme, com. pers.).

3.2.3.1. Polimorfismo en la longitud de fragmentos de enzima de restriccion (RFLP)

Esta técnica depende de la variación natural en la secuencia de ADN producto tanto de mutaciones puntules como de cambios a gran escala: inversiones, delecciones, inserciones o transposiciones. Si estas variaciones en la secuencia ocurren en regiones evolutivamente neutrales del genoma las diferencias entre individuos se acumulan al paso de las generaciones sin estar necesariamente asociadas a cambios fenotípicos evidentes. La Figura 1 resume los diferentes mecanismos que pueden causar cambios en el tamaño de los fragmentos de restricción y la forma como se visualizan al utilizar RFLPs (Liou et al., 1996).

Figura 1. Esquema de los procesos que causan a la presencia de un RFLP.

Como resultado de este proceso individuos cercanamente emparentados presentarán menos diferencias en la secuencia entre sí, que otros menos emparentados al ser las diferencias acumuladas proporcionales a las generaciones que los separan.

© Liliana M. Dávalos 1997

Una de las formas de detectar estas variaciones en la secuencia es digerir el ADN con enzimas de restricción sitio-específicas pues la distribución de los sitios de corte de la enzima se altera al cambiar la secuencia. El sitio de reconocimiento de la enzima desaparece si su secuencia es modificada; un nuevo sitio puede crearse donde antes no lo había o, al insertarse o borrarse una parte de la secuencia, entonces la distancia entre dos sitios de corte contiguos se altera (Kochert, s.d.). Una vez que el ADN está completamente digerido, la longitud de los fragmentos obtenidos reflejará la distribución de sitios de reconocimiento para la enzima de restricción. Por supuesto estos patrones de corte, al depender de la secuencia, son semejantes en organismos emparentados y disímiles entre individuos menos emparentados.

Para poner en evidencia las diferencias en la longitud de los fragmentos de restricción -polimorfismos- de una planta superior es preciso separar los fragmentos en un barrido electroforético, transferirlo a un soporte o filtro conservando el patrón de barrido y luego reconocer regiones particulares mediante sondas.

Las sondas son segmentos cortos de ADN que, debido a la alta especificidad de la hibridización ADN-ADN reconocen regiones homólogas que les son complementarias y específicas, entre los fragmentos de restriccion individuales presentes en el barrido.

Al hibridizar una sonda determinada con el filtro que contiene las digestiones fraccionadas por peso molecular de diferentes genomas, se pueden visualizar los polimorfismos pues la sonda -marcada de alguna manera- señala en el filtro el fragmento que contiene su secuencia complementaria (La Rota, 1996). La ubicación comparativa entre individuos del fragmento complementario a la sonda nos indica la presencia o ausencia de polimorfismo entre los genomas estudiados. Estos

© Liliana M. Dávalos 1997

polimorfismos son tratados como alelos, lo que permite hacerle un seguimiento a su segregación y eventualmente, analizar el ligamiento entre ellos para mapeo.

Los polimorfismos así detectados -RFLPs- tienen la ventaja de ser exclusivamente genotípicos, evolutivamente neutrales y heredarse de forma mendeliana codominante; evitando así los efectos del ambiente, el estado de desarrollo, la selección natural y las interacciones al interior del genoma. Estas ventajas hacen mucho más eficiente la construccion de un mapa genético por este medio (McCouch, 1990).

Sin embargo, los RFLP también presentan desventajas: requieren ADN en grandes cantidades y de calidad óptima (en contraste con algunas técnicas basadas en PCR) y, en especies autógamas como el arroz, se deben seleccionar cruces entre parentales suficientemente divergentes para disponer de los polimorfismos necesarios para el análisis.

En los últimos años, la aplicacion de RFLPs al estudio de la genética del arroz incluye -además del mapeo de genes- la caracterización de la diversidad genética (Zhang et al., 1992), la localización de regiones cromosómicas asociadas a distorsión en la segregacion (Xu et al., 1997) y el mapeo de loci para características cuantitativas -Quantitative Trait Loci- (Redoña y Mackill, 1996; McCouch y Doerge, 1995).

3.3. Estrategia de Búsqueda de Marcadores

La localización de marcadores moleculares para genes de resistencia al virus de la hoja blanca requiere un mapa saturado con marcadores moleculares, una población segregante evaluada para la resistencia al virus y el análisis de ligamiento que permita correlacionar la resistencia a algun (os) marcador (es).

© Liliana M. Dávalos 1997

Algunos mapas moleculares saturados publicados en la literatura se mencionan aquí. Este trabajo ha utilizado algunos de los marcadores mapeados por Causse et al., (1994), con énfasis en sondas asignadas a los cromosomas 6, 12, 11 y 3; siguiendo el reporte no publicado de Tohme (1994, ver Causse et al. op cit) que señala un marcador morfológico para resistencia al VHB en el cromosoma 12, más específicamente en la region alrededor del marcador RG 190.

3.3.1 Líneas autógamas recombinantes, (Recombinant Inbred Lines, RILs)

Este tipo de líneas (RILs) son poblaciones permanentes estables y genotípicamente homocigotas, al ser el resultado de 8 a 12 generaciones de autopolinización a partir de cada una de las semillas de la F2 (Single Seed Descent). Cada RIL de arroz puede producir centenares de semillas homocigotas en una sola generación de tal manera que el genotipo invariable puede evaluarse repetidamente en diferentes años y localidades, para caracteres distintos. Esta capacidad para replicar experimentos utilizando genotipos fijos ofrece una manera inteligente de discriminar el papel del ambiente y los factores genéticos en la expresión del fenotipo (McCouch y Doerge, 1995).

3.3.2 Loci de características cuantitativas (Quantitative Trait Loci, QTL)

Ya desde 1923, Sax propuso las bases teóricas de lo que sería la reducción a loci mendelianos de las características cuya variación es continua y dependiente de muchos genes o cuantitativas. El estudio de la variación cuantitativa ha estado, sin embargo, limitado por la disponibilidad de mapas genéticos completos que permitan correlacionar la variación en la característica con diferentes regiones del genoma simultáneamente. La utilidad de los mapas moleculares saturados de arroz se hace entonces evidente (Tanksley et al., 1989).

© Liliana M. Dávalos 1997

La base de la detección de QTL está en la identificación de asociaciones entre fenotipos condicionados genéticamente y regiones asociadas a marcadores genéticos específicos; el análisis de QTL utiliza la posición estimada de los marcadores en el mapa para calcular la localización, el efecto y la procedencia de cada QTL en la población experimental (McCouch y Doerge, 1995).

© Liliana M. Dávalos 1997

4. Materiales y Métodos

4.1. Localidad y Sitio de Trabajo

Todos los procedimientos descritos a continuación se llevaron a cabo en las instalaciones del Centro Internacional de Agricultura Tropical, (CIAT); específicamente en el laboratorio de ADN de la Unidad de Biotecnología y en los invernaderos del Programa de Arroz. Los experimentos, tanto de invernaderos como de laboratorio, se realizaron desde principios de mayo de 1996 hasta finales del mismo mes en 1997. Adicionalmente, contamos con el apoyo de los analistas de datos estadísticos de Arroz/Biodiversidad, en la fase final del proyecto.

4.2. Material Vegetal

Una población segregante de 134 líneas recombinantes autógamas se escogió para este estudio, a partir de la progenie total obtenida de 240 líneas autógamas recombinantes -Recombinant Inbred Lines o RILs- F5 obtenidas a partir de semillas de la F2 del cruce de Fanny (femenino) por Oryzica Llanos 5 (masculino). El criterio de selección fue el diagnóstico claro de resistencia o susceptibilidad a uno de los 6 linajes colombianos del hongo ***Pyricularia grisea***. Estas líneas fueron desarrolladas previamente por el Programa de Arroz del CIAT siguiendo el método conocido como avance generacional rápido.

Oryzica Llanos 5 cuenta entre sus ancestros a Colombia 1 (Martínez y Cuevas-Pérez, 1995), conocida fuente de resistencia al VHB(Zeigler et al., 1988) derivada de Blue Rose y Takao Iku, como se ve en el pedigree de la Figura 2 (González Tous et al., 1991). Fanny es una variedad no comercial francesa que pertenece a la

© Liliana M. Dávalos 1997

subespecie ***japónica*** y según el reporte no publicado de Tohme, 1994 también se considera una fuente de resistencia al VHB.

Aproximadamente diez gramos de semilla de cada una de las 134 líneas se sembraron en materos rectangulares en invernadero. Cinco semanas más tarde el tejido foliar de las plantas fue colectado y conservado en nitrógeno líquido antes de ser trasladado a los refrigeradores de -80˚C.

Figura 2. Pedigree de Oryzica Llanos 5 y otras variedades mejoradas.

© Liliana M. Dávalos 1997

4.3. Evaluación de resistencia al VHB

La evaluación de las líneas en el invernadero se realizó siguiendo la metodología descrita por Jennings et al (1980). En noviembre de 1996 se sembraron 7-20 semillas de cada línea en materas de 10 cm de altura por 10.5 cm de diámetro; se completaron tres conjuntos de tres materas por línea, cada uno de los cuales fue distribuido al interior de la jaula de inoculación de dimensiones 19 x 1.4 x 0.7 m en una casa de malla del programa de Arroz del CIAT. A los 15 días de edad se inocularon las plantas con una colonia de ***Tagosodes orizicolus*** (Muir) en estado ninfal (de 4 a 5 instar) con un 97% de vectores potenciales según prueba de ELISA. Las plantas al interior de la jaula se agitaron cuatro veces al día durante el período de inoculación que se prolongó por 10 días; después de los cuales se fumigó la jaula con 1 Kg de Furadan granulado y se sacaron las bandejas con las materas de la jaula de inoculación.

Las evaluaciones de síntomas se hicieron pasados 25 y 35 días tras el primer día de inoculación; se registraron como una fracción con numerador igual al número de plantas infectadas sobre un denominador igual al número de plantas totales, y se agruparon como tres unidades de muestreo con tres materas cada una.

Una fracción de la población debió sembrarse de nuevo por problemas de mala germinación, se repitieron todos los pasos anteriores, esta vez con una población de insectos de 92% de vectores.

Los resultados de la evaluación se interpretaron mediante análisis de varianza y prueba de Duncan para agrupamiento con el programa SAS, al igual que la normalización de las distribuciones de las dos evaluaciones.

4.4. Extracción de ADN

© Liliana M. Dávalos 1997

Para la extracción de ADN, se utilizó el método de extracción de ADN de arroz documentado en McCouch et al, 1988, con las modificaciones descritas por González et al., 1995. Colectamos entre 5 y 10g de hojas jóvenes. Luego, se maceró el tejido en nitrógeno líquido hasta obtener un polvo fino y seco, agregando luego 16 mL de solución de extracción Dellaporta modificada (ver Anexo 1) precalentada a 65ºC, por cada 3 g de polvo en el tubo de ensayo. Las muestras se mezclaron agitando vigorosamente cada tubo para luego incubarse a 65ºC durante 30 min, invirtiendo los tubos cada 10 min. A continuación, se añadieron 5 mL de acetato de potasio 5M, mezclando vigorosamente; acto seguido, las muestras se incubaron en baño de hielo durante 20 min con agitación, para luego centrifugarse a 3000 rpm durante 20 min.

Si el sobrenadante estaba oscuro se repetía el procedimiento a partir de la adición de acetato de potasio, máximo dos veces, hasta que el sobrenadante resultante fuera amarillo claro.

Este sobrenadante se filtró a través de gasa y luego se volvió a adicionar acetato de potasio, a incubar, centrifugar y filtrar las muestras. Entonces se añadió a cada muestra 2/3 de su volumen en isopropanol a -20ºC y se dejaron incubándose a -20ºC toda la noche. Al día siguiente, se centrifugaron las muestras a 3000 rpm durante 20 min a 4ºC. Después de lavar el precipitado de ADN con etanol al 70% a -20ºC, se resuspendió en 1000 μL de TE, se centrifugaron a 3000 rpm durante 15 min a 4ºC y se transfirió el sobrenadante a un tubo nuevo de 15 mL.

Posteriormente, se añadió ARNasa a una concentración final de 10 μg/mL, se incubó a 37ºC durante 15 min y se adicionó 1/10 de volumen de acetato de sodio 3M pH 5.2 y 2 volumenes de etanol absoluto a -20ºC. Las muestras se incubaron durante 30 min a -20ºC, se centrifugaron a 3000 rpm durante 10 min a 4ºC y se lavó

© Liliana M. Dávalos 1997

el botón de precipitado con 1 mL de etanol al 70% a -20ºC; para luego resuspender en 300 μL de TE. A continuación, las muestras se centrifugaron a 3 000 rpm durante 3 min a TA y se transfirió el sobrenadante a un tubo eppendorf nuevo. La calidad de las muestras de ADN obtenidas fue examinada en un gel de agarosa al 0.8%.

Con esta técnica obtuvimos un rendimiento promedio de 50 microgramos de ADN por cada 10 gramos de tejido fresco recolectado. Las muestras se cuantificaron con un fluorómetro DyNA Quant (Hoefer Pharmacia Biotech Inc., 1995), basado en una solución de colorante Hoescht H 33258.

4.5. Digestión, Precipitación, Electroforesis y Transferencia

4.5.1. Digestión

Los procedimientos de digestión, precipitación y electroforesis en geles de agarosa fueron similares a los descritos por Hoisington et al (1994): dieciseis microgramos de ADN total se digirieron en un tubo de 1.5 mL con 40u de una de las siguientes enzimas: Eco RI, Eco RV, Dra I y Hind III (GibCo BRL y Amersham); en 10 μL de la solución tampón recomendada por el fabricante, más 10 μL de espermidina 4mM; llevando a un volumen final de 550 μL con agua bidestilada estéril. Teniendo el cuenta el número de reacciones (134 líneas+2 parentales) con cada enzima; se preparó una solución coctel adecuada para cada volumen de ADN (dependiendo de la concentración de la muestra) que contuviera todos los reactivos, menos el ADN, añadiendo la enzima al final. Esta solución maestra se mantuvo en hielo hasta el momento de agregarla a cada muestra de ADN. Las digestiones se mezclaron cuidadosamente sin utilizar vórtex y se incubaron durante toda la noche a 37ºC.

4.5.2. Precipitación

© Liliana M. Dávalos 1997

La reacción de cada digestión se detuvo añadiendo 50 μL de NaCl 5M y se precipitó con 1 mL de etanol absoluto, para luego incubar por 30 minutos a -80°C. Después, se centrifugaron las muestras por 15 min. a 14 000 rpm, se descartó el sobrenadante, se secaron las muestras en una bomba de vacío y se resuspendieron en una solución de 64 microlitros de agua y 16 microlitros de blue juice (solución de carga) concentrado.

4.5.3. Electroforesis

Las electroforesis se corrieron en geles dobles de agarosa al 0.9% durante 14 horas a 22 voltios. De esta manera cada digestión se alicuotó en dos geles dobles que luego se separaron para transferir el ADN digerido a cuatro juegos de filtros de membrana de nylon Hybond N+ (Amersham Corp.) por cada digestión corrida con una enzima determinada.

El procedimiento para la elaboración de estos geles fue el siguiente: se agregaron 5.4 g de agarosa a 600 mL de TBE 1x y se llevó esta solución al horno microondas (hasta que la agarosa se derrite); mientras tanto, se envolvieron con cinta de enmascarar los extremos de una bandeja para gel, colocando tres peines de treinta pozos delgados por bandeja. Una vez que la agarosa se enfrió a 55ºC, servimos 250 mL de la agarosa. Se deja solidificar la agarosa al menos una hora y luego se sirve la agarosa restante sobre la misma bandeja. Una vez que el gel de dos capas estuvo totalmente polimerizado, retiramos las cintas y lo sumergimos en la cámara de electroforesis con suficiente TBE 1x (≈ 2 L). Las digestiones resuspendidas se sembraron a razón de 40 μL en cada pozo y luego se corrieron preliminarmente a 100 mA durante 5 minutos. Finalmente, todas las muestras, se corrieron en electroforesis a 22.5 mA durante toda la noche (14- 16 hr).

© Liliana M. Dávalos 1997

Al día siguiente retiramos el gel doble de la cámara y lo transferimos a una bandeja con agua deionizada para luego, separar cuidadosamente los geles con una pipeta delgada. La corrida de la digestión se examinó tiñendo el gel con una solución de bromuro de etidio y fotografiando con luz ultravioleta, tal como se ve en la Figura 3, que muestra una foto de las digestiones una vez corridas.

4.5.4. Transferencia

La transferencia alcalina Southern se hizo de acuerdo con la metodología descrita en González et al (1995): inicialmente, se invirtió el gel, para que el ADN quedara arriba, luego se sumergió el gel en HCl 0.25N con agitación constante hasta que la solución de carga (azul) se tornara amarilla. A continuación, se lavó dos veces el gel con agua deionizada, se colocó el gel en una solución de NaOH 0.5N/NaCl 0.5N con agitación constante durante 1 hr.

Luego, se colocó en una bandeja suficiente (1.5-2.0 L) solución de transferencia (NaOH 0.5N/NaCl 0.5N) y en la bandeja un vidrio apoyado sobre bordes opuestos. Posteriormente, se humedeció una tira (puente) de papel Whatman 3MM con solución de transferencia y se puso sobre el vidrio de tal forma que quedara en contacto, por ambos extremos, con la solución de transferencia; encima del puente colocamos una tira corta de papel Whatman 3MM, humedecida en solución de transferencia, del ancho del gel a transferir. Se eliminaron las burbujas pasando sobre el papel una pipeta, entonces se colocó el gel con el ADN hacia arriba, repitiendo la operación de eliminar las burbujas. Después se colocó sobre el gel una membrana de nylon (Hybond N+), del mismo tamaño del gel, previamente humedecida en solución de transferencia; sobre la membrana, colocamos dos tiras húmedas de papel Whatman 3MM y finalmente una torre de al menos 5 cm de hojas de papel periódico alineado sobre el montaje.

© Liliana M. Dávalos 1997

Luego, se añadió peso al montaje con un libro grueso sobre una lámina de plástico. Las transferencias se realizaban en el transcurso de la noche y al día siguiente se les desmontaba, conservando las membranas de nylon. Las membranas (también llamadas filtros) se lavaron en solución 2XSSC durante 5 min y luego se colocaron sobre papel absorbente hasta secarse. Una vez secas, colocamos los filtros dentro del Stratalinker (UV Stratalinker 2400 de Stratagene) y programamos la operación "Autocrosslink". Cuando terminó la fijación del ADN a la membrana, se guardaron los filtros de membrana en Vinilpel a 4ºC hasta el momento de la hibridización (las membranas se manipularon con pinzas y guantes, nunca con los dedos).

Figura 3. Foto (reducida) con luz ultravioleta de una digestión completa de ADN de arroz, teñida con bromuro de etidio. Los primeros dos carriles de la izquierda de cada peine corresponden a los parentales (Fanny y Oryzica Llanos 5). El último carril es el marcador de peso molecular λ digerido con la enzima Pst I. Los carriles del medio corresponden a diferentes individuos de la progenie en orden consecutivo.

© Liliana M. Dávalos 1997

4.6.Sondas

Las sondas utilizadas son de dos tipos: clones derivados al azar (random genomic clones) de librerías genómicas de arroz, denominados RG, Y, G y L y clones de ADN complementario de arroz, cebada y avena denominados RZ, BCD y CDO respectivamente . Estos clones estan disponibles en la librería genómica y de cADN del laboratorio de la unidad de biotecnología del CIAT, que a su vez proviene de la librería genómica PstI elaborada por McCouch et al (1988) y los clones de cADN de las librerías elaboradas por Causse et al (1994); ambos equipos en el departamento de Fitomejoramiento de la Facultad de Agricultura y Ciencias de la Universidad de Cornell.

Una evaluación preliminar de 176 sondas (copia única preferible, aunque no exclusivamente) se realizó en este laboratorio un año antes de comenzar el proyecto, en filtros de parentales -Fanny, Oryzica Llanos 5, ***Oryza rufipogon***, Bg90 y Colombia1- con las cuatro enzimas utilizadas en este estudio, para detectar polimorfismo y así escoger las sondas a ser hibridizadas en progenie (CIAT, 1996).

4.7. Marcaje Radioactivo, Hibridización y Exposición

4.7.1. Marcaje

El marcaje radioactivo de sondas de ADN, la purificación de las mismas y la posterior hibridización se hizo de acuerdo con González et al (1995), basado en Feinberg and Vogelstein, 1983. Las sondas se marcaron radioactivamente con α32P-dATP (Amersham), utilizando el kit RPN 1601Y para marcaje de la misma casa comercial. Cuando el peso molecular de las bandas hibridizadas en parentales era suficientemente divergente, las hibridizaciones sobre filtros de progenie se hicieron con dos clones simultáneamente para así volver más eficiente el uso de los

© Liliana M. Dávalos 1997

filtros. Aproximadamente 150ng de ADN de cada sonda seleccionada para hibridización se denaturaron por calentamiento a 96ºC durante 10 min en tubos cónicos y luego se llevaron a hielo hasta el momento del marcaje. A continuación, se preparó una mezcla para marcaje consistente en 4 µL de dCTP, 4 µL de dTTP, 4 µL de dGTP, 5 µL de tampón comercial, 5 µL de primer/BSA, 5 µL de _32P-dATP, 2 µL de polimerasa Klenow y 18-20 µL de agua bidestilada por cada sonda a marcar. Esta mezcla se añadió a cada sonda denaturada y los tubos se llevaron a un baño maría a 37ºC durante 1 hr. Una vez marcadas, se purificaron las sondas, pasándolas por columnas de Sephadex G- 50, centrifugando a 1500 rpm durante 3 min a TA.

4.7.2. Hibridización

Mientras tanto, se colocó cada juego de filtros a ser hibridizado en una bandeja con 50 mL de solución de prehibridización, incluyendo 1% de ADN de esperma de salmón denaturado (ver anexo 1) a 65ºC con agitación durante 4 o 5 hr si era la primera hibridización o al menos 1 hr, si ya se habían hibridizado antes los filtros. A continuación, se denaturó la sonda marcada y purificada a 96ºC durante 10 min llevándola luego a un baño de hielo por 5 min, entonces se agregó la sonda a la solución de prehibridización de cada bandeja, cuidando de no salpicar la sonda directamente al filtro. Los filtros así tratados se dejaron incubando durante toda la noche a 65ºC. Al día siguiente se hicieron tres lavados sucesivos a los filtros con las correspondientes soluciones 2, 1 y 0.5XSSC (ver anexo 1) al 1% de SDS a 65ºC. El tiempo de cada lavado dependió de la lectura de un contador Geiger en cuentas por minuto (lectura final entre 400 y 1500 cuentas por minuto) al final de cada lavado (en promedio, 45 min para el 1er lavado y 30 min para los otros dos lavados).

4.7.3. Exposición

© Liliana M. Dávalos 1997

Después de los lavados los filtros se dejaron secar sobre papel absorbente para luego ser expuestos a película sensible a radiación (Kodak, película para diagnóstico T-Mat™ sensible al verde). Para maximizar la intensidad de la señal los filtros y la película eran puestos entre pantallas intensificadoras Hyperscreen, en casetes sellados para ser llevados a -80˚C (de otro modo no funcionan las pantallas). El tiempo de exposición de las autoradiografías en los congeladores de -80°C osciló entre 2 y 5 días, dependiendo de la intensidad de la señal emitida por el filtro después del último lavado. La Figura 4 resume el procedimiento de hibridización con sondas marcadas radioactivamente.

4.8. Construcción del Mapa Ligamiento y Análisis de Loci para Características Cuantitativas

4.8.1. Mapa de ligamiento

El análisis de ligamiento se hizo utilizando el programa Mapmaker Macintosh versión 2.0 NDP (Lander et al. 1990). Los grupos de ligamiento se obtuvieron con el comando "group" con Lod siempre mayor o igual a 3.0. Aquellos marcadores que no pudieron ser agrupados de esta manera, se incluyeron en los grupos de ligamiento reportados en la literatura utilizando el comando "try". El orden de los marcadores en cada grupo de ligamiento se determinó con el comando "compare", y el orden así obtenido se evaluó con el comando "ripple".

4.8.2. Análisis de loci para características cuantitativas, (Quantitative Trait Loci)

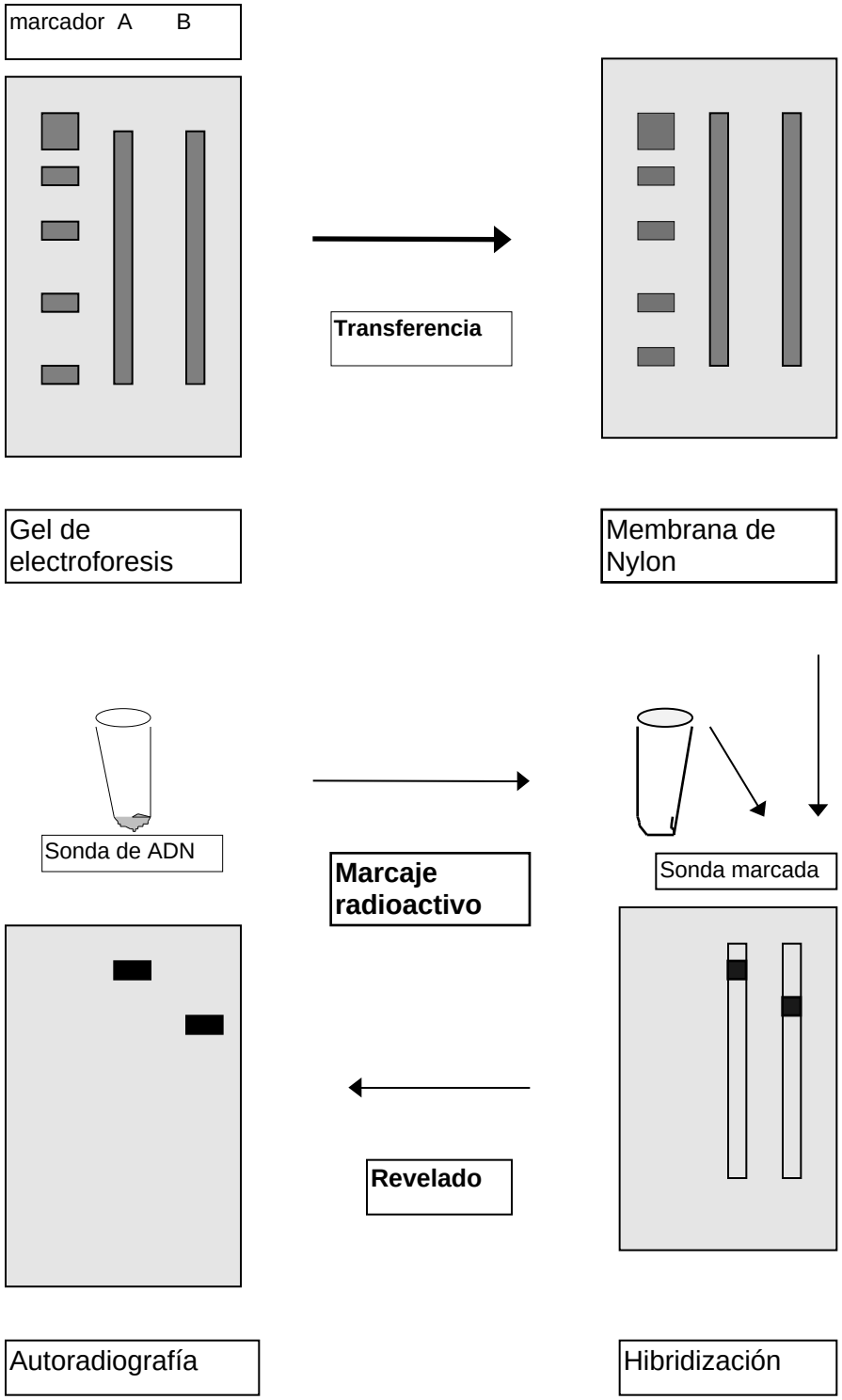
El mapa de ligamiento obtenido con Mapmaker se utilizó para el análisis de QTL (Quantitative Trait Loci) con qGene versión 2.30a para Macintosh (Nelson, 1996, 1997). En este análisis se utilizaron los datos porcentuales de resistencia a la

© Liliana M. Dávalos 1997

enfermedad, normalizados y standarizados para el primer ensayo de evaluación de resistencia.

© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 4. Resumen del proceso de hibridización con sondas radioactivas.



© Liliana M. Dávalos 1997

5. Resultados y Discusión

5.1. Evaluación de la Resistencia al Virus de la Hoja Blanca

5.1.1 Características de la infección

Los síntomas clásicos del VHB se hicieron evidentes en los controles susceptibles a los diez días de haber sacado las plantas de la jaula de inoculación; se realizaron dos lecturas de síntomas: una a los 25 y otra 35 días después de introducir los insectos a la jaula. Al encontrar diferencias significativas entre las lecturas de las dos evaluaciones, se escogió la segunda lectura tanto para los datos cualitativos como para los cuantitativos. La primera evaluación fue, sin embargo, indispensable porque algunas plantas murieron antes de alcanzar la segunda evaluación y esto podría distorsionar el porcentaje real de infección en cada unidad de muestreo.

Las plantas afectadas mostraron todos los síntomas descritos en la literatura: rayado clorótico en las hojas, marchitez de las hojas más enfermas y algunas hojas nuevas completamente blancas desde su nacimiento. El rendimiento en grano de las líneas no fue evaluado en estas pruebas.

Varias plantas -veinte y dos distribuidas al azar en algunas unidades de muestreo de diferentes líneas- presentaron además de síntomas de hoja blanca, deformidades en el crecimiento asociadas comúnmente con "entorchamiento" (Morales y Sanint, 1996).

A estas plantas se les hizo una prueba de ELISA para detectar el virus sospechoso de provocar entorchamiento con resultados negativos (Dumar Carrillo comunicación personal).

Las plantas así afectadas no se tuvieron en cuenta para estimar los porcentajes de infección y, en la parte de la prueba que se tuvo que repetir por mala germinación,

© Liliana M. Dávalos 1997

se esterilizó el suelo para evitar la contaminación. A pesar de esta medida, 4 plantas del segundo ensayo presentaron las deformidades asociadas al entorchamiento. Como los síntomas del entorchamiento (deformación y rayado clorótico) se pueden confundir con el rayado de hoja blanca sumada a malformaciones de otro origen, y las plantas afectadas no alcanzan el 0.5% del total de plantas este resultado no cobra suficiente relevancia como para discutirse aquí.

5.2. Resistencia al Virus de la Hoja Blanca

5.2.1. Primer ensayo

Ninguna de las 118 líneas sembradas en el primer ensayo presentó un porcentaje de infección igual a cero (totalmente resistente) o a cien (totalmente susceptible), al promediar los resultados de las unidades de muestreo. Los parentales de este cruce, Fanny y Oryzica Llanos 5 presentaron 22 y 15.6% de plantas infectadas respectivamente y se clasificarían como resistentes en una valoración cualitativa, siendo mayor la resistencia de Oryzica Llanos 5. El control resistente -Colombia 1- tuvo un porcentaje de infección de 10% y los controles susceptibles -Bluebonnet 50 y Cica 8- presentaron 100 y 96% de infección, respectivamente. Los resultados de este ensayo se resumen en el histograma de la Figura 5 y los resultados numéricos completos del primer ensayo se pueden ver en el Anexo 2.

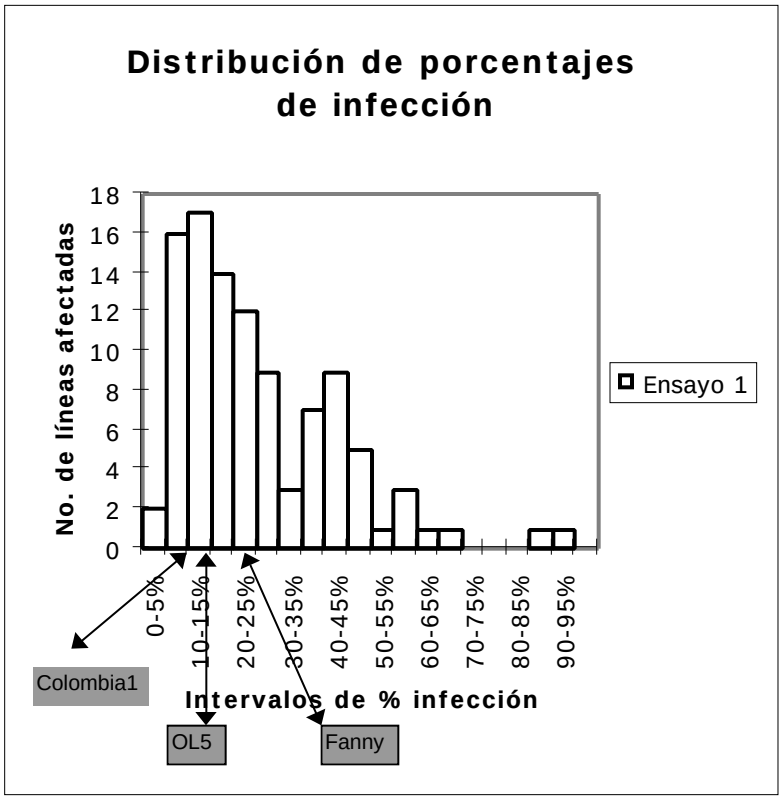
La resistencia de Fanny en esta evaluación contrasta con otras pruebas de invernadero realizadas con anterioridad en el Programa de Arroz (J. Tohme, com. pers.), en las que Fanny presentó un porcentaje de infección alrededor del 5%. La colonia de insectos utilizada entonces fue completamente diferente a la actual pues la primera llevaba casi diez años multiplicandose en condiciones de invernadero y fue reemplazada en 1991 por otra colonia más agresiva colectada del campo en una

© Liliana M. Dávalos 1997

localidad del Tolima. Esta nueva colonia fue examinada con prueba de ELISA para porcentaje de vectores y se encontró mayor porcentaje de vectores que en la colonia de invernadero. Esto explicaría el nivel diferencial de resistencia para esta variedad con respecto a mediciones anteriores.

© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 5. Histograma de la distribución de frecuencias de los intervalos de infección con los datos del primer ensayo, incluyendo las posiciones de Colombia1 y los parentales en la distribución.



n= 101 líneas incluidas.

Tradicionalmente, la clasificación con relación al VHB divide las variedades estudiadas en resistentes, susceptibles e intermedias, basándose en una escala de equivalencia aproximada a porcentajes de infección: 1 y 3 son resistentes; 7 y 9 son susceptibles y 5 es intermedio (Jennings et al., 1980). Otros investigadores (Fernando Correa com. pers.) separan estrictamente variedades resistentes y susceptibles con un criterio de 30% de infección, cuando son probadas en

© Liliana M. Dávalos 1997

invernadero: 1 y 3 son resistentes, los demás son susceptibles. La separación en grupos discretos se facilita al registrar los datos con esta escala.

El caracter resistente de ambos parentales, la homocigosidad genotípica de las líneas estudiadas y los controles impuestos en la evaluación de la resistencia, especialmente en lo relacionado con la edad de la planta y el porcentaje de vectores en la población de insectos, exigían hacer una medida más exacta que la de la escala de la resistencia en la población para detectar no sólo marcadores para genes mayores, si no también para muchos otros genes de acción menor que podrían estar involucrados en un tipo de herencia cuantitativa para este rasgo.

Por eso los promedios de infección por unidad de muestreo en cada línea se obtuvieron sumando las fracciones obtenidas de las tres materas que la conformaban -lo que equivale a ponderar los porcentajes por matera-; los porcentajes de infección hallados no se convirtieron a la escala y se seleccionaron inicialmente solo aquellas líneas con un número final de plantas mayor o igual a 30 para el subsecuente análisis de varianza y prueba de agrupamiento.

Este tipo de análisis se realizó con el propósito de establecer grupos significativamente distintos -resistentes y susceptibles o resistentes, intermedios y susceptibles- en la progenie y entonces incluir esta característica en el mapa generado con marcadores moleculares. Estos grupos también deberían separar a uno de los parentales del otro para así establecer segregación de la característica para mapeo. Para normalizar los datos obtenidos se transformaron los porcentajes con la función arcoseno y así continuar los análisis estadísticos con procedimientos paramétricos. Los resultados del análisis de varianza para el ensayo 1 se presentan en la Tabla 1.

© Liliana M. Dávalos 1997

Tabla 1. Análisis de Varianza para porcentaje* de hoja blanca transformado, Primer Ensayo.

Fuente Var.	G.L.	Suma cuadrados	Cuadrado medio	valor F	Pr. > F
Líneas	107	19.6733257	0.18386286	9.97	0.0001**
Error	210	3.87335852	0.01844456		
Total Corregido	317	23.54668422			
	r2	coef. de var.	√CME		promedio
	0.835503	25.69916	0.13581077		0.52846391
F. Var	G.L.	S.C. tipo III	C.M.		
Rep. (muestra)	2	0.00266499	0.00133249	0.07	0.9303 n.s.
Línea	105	19.67066071	0.18733963	10.16	0.0001**

* Sólo se utilizaron las líneas con más de 30 plantas evaluadas.

Está claro que más del 83% de las diferencias en el porcentaje de infección se deben a las líneas mismas -según análisis de regresión lineal-y no existen diferencias significativas entre unidades de muestreo de una misma línea. Por otra parte, salvo por tres líneas que se agrupan con los controles susceptibles en el extremo de la distribución, no fue posible discriminar entre los parentales ni separar claramente 98 de las 101 líneas que cumplían con la condición inicial de tener 30 o más plantas al momento de evaluar. A partir de la distribución generada con los promedios normalizados se observa que hay 20 líneas (19.8% del total) más resistentes que Colombia 1, 37 líneas (36.6% del total) más resistentes que Oryzica Llanos 5 y 50 líneas (49.5% del total) más resistentes que Fanny.

No obstante, es posible clasificar como susceptible o resistente a cada una de las líneas con el criterio del 30% de infección, para un resultado final de 72 resistentes vs. 46 susceptibles con los datos crudos o sea una razón de 1.6:1. La misma

© Liliana M. Dávalos 1997

clasificación para los datos utilizados en el análisis estadístico (más de 30 plantas evaluadas por líneas) resulta en 68 resistentes vs. 34 susceptibles o sea una razón resistente:susceptible de 2:1.

5.2.2. Segundo ensayo

Treinta y seis de las 37 líneas que faltaban por evaluar se sembraron, con el mismo diseño utilizado la primera vez, junto con otras diez líneas que tenían más de 30 plantas evaluadas, pero menos que 50 en el primer ensayo. Los resultados numéricos completos de esta prueba pueden verse en el Anexo 3. Al observar diferencias (Tabla 2) entre los porcentajes de infección observados en esta prueba y los del primer ensayo se hizo necesaria una comparación estadística entre los ensayos mismos, para asegurar que los resultados eran equivalentes y podían compilarse como un solo conjunto de datos en los análisis numéricos de correlación marcador/resistencia.

El análisis de varianza entre las variedades de control (Colombia 1, Bluebonnet 50 y Cica 8) para los dos ensayos no detectó diferencias significativas entre las dos pruebas. Sin embargo, al incluir en este análisis las líneas que se habían evaluado en el ensayo 1 y que también estaban en el ensayo 2, se encontró que el comportamiento de algunas líneas fue distinto en cada ensayo. Este resultado se puede explicar (al menos en parte) teniendo en cuenta que las poblaciones de insectos vectores, aunque obtenidas de la misma colonia, fueron diferentes para cada ensayo y que la resistencia a la hoja blanca está fuertemente determinada por la dosis de virus que reciba la planta (lo cual depende del porcentaje de vectores reales en la población, la dosis de virus al interior del vector y el tiempo de exposición a los insectos). De acuerdo con Zeigler et al. (1994) las líneas susceptibles se comportarían identicamente en ambas pruebas, pero las líneas

© Liliana M. Dávalos 1997

resistentes se infectarían menos en la prueba en la que hubieran recibido menos dosis de virus.

© Liliana M. Dávalos 1997

Tabla 2. Resultados en porcentaje de infección de los dos ensayos.

Línea		Promedio total	número de plantas	Línea		Promedio total	Número de plantas
993	1	27.3	160	1144	90	13.0	22
994	2	23.3	144	1144	90*	16.5	69
997	3	8.9	85	1148	91	38.2	70
998	4	8.9	132	1150	92	9.5	92
999	5	8.6	117	1151	93	8.0	51
1005	6	55.2	60	1151	93*	5.7	40
1006	7	32.1	56	1155	94	75.0	6
1007	8	93.6	61	1155	94*	0.0	6
1008	9	6.7	33	1157	95	18.0	121
1008	9*	12.1	76	1158	96	38.4	69
1012	10	12.7	70	1159	97	12.3	89
1013	11	44.4	85	1162	98	5.0	49
1014	12	22.4	121	1162	98*	5.4	56
1015	13	46.3	15	1163	99	48.2	100
1051	13*	14.1	51	1165	100	12.5	95
1016	14	13.2	179	1169	101	20.4	45
1017	15	21.0	96	1169	101*	7.0	70
1018	16	39.1	111	1170	102*	93.8	33
1020	17	23.9	87	1171	103	46.3	32
1021	18	9.0	119	1171	103*	13.4	127
1023	19	58.3	73	1174	104	33.3	19
1027	20*	2.8	149	1174	104*	12.3	63
1028	21	6.0	49	1176	105*	21.8	58
1029	22	87.9	78	1177	106	25.8	42
1032	23	38.9	105	1177	106*	26.2	11
1034	24	11.1	103	1180	107	23.5	104
1035	25	58.3	67	1183	108	17.6	80
1036	26	23.1	39	1188	110	25.8	88
1036	26*	21.8	34	1189	111	35.1	74
1039	27	12.9	116	1190	112*	32.0	91
1041	28	40.2	89	1191	113	43.0	75
1042	29	27.0	120	1193	114	16.8	90
1043	30	13.0	131	1194	115	43.4	67
1044	31	36.7	166	1199	116	11.7	18
1046	32	16.7	134	1199	116*	12.0	100
1047	33	62.5	91	1203	117	100.0	8
1048	34	44.0	48	1203	117*	9.4	47
1048	34*	19.5	67	1204	118	66.7	12
1049	35	6.3	119	1204	118*	2.0	193
1050	36*	80.0	34	1206	119	66.7	9
1052	37	42.3	91	1206	119*	55.9	72
1053	38	26.0	100	1209	120	25.8	27
1054	39	23.1	77	1209	120*	2.5	75
1055	40	16.0	145	1211	121*	4.4	56
1058	41	26.8	46	1214	122	87.5	7
1059	42	5.2	98	1214	122*	4.5	98
1060	43	3.5	103	1215	123	40.7	56

© Liliana M. Dávalos 1997

1062	44	18.0	114
1063	45	11.8	109
1066	46	9.2	150
1067	47	22.8	75
1068	48*	7.7	29
1071	49	7.9	112
1073	50	14.5	142
1074	51	10.0	128
1077	52	45.2	103
1082	53	26.7	68
1083	54	97.2	106
1084	55*	4.2	116
1086	56	10.8	106
1087	57	5.8	124
1088	58	52.3	99
1089	59	8.8	74
1092	60	18.0	109
1094	61	28.0	61
1096	62	17.0	135
1097	63	27.0	40
1097	63*	16.0	48
1099	64	100.0	3
1099	64*	12.6	122
1100	65	10.2	100
1103	66	33.3	71
1105	67*	12.6	121
1107	68	67.3	77
1108	69	45.4	128
1109	70*	8.6	113
1110	71	23.2	94
1112	72	33.6	63
1113	73*	13.3	10
1116	74	14.8	148
1117	75	17.5	80
1120	76*	11.2	95
1122	77	13.3	49
1123	78	28.2	103
1125	79	47.3	104
1125	79*	20.3	45
1128	80	14.7	50
1130	81	7.4	101
1131	82	8.3	176
1134	83	15.0	82
1135	84*	8.4	107
1137	85	33.3	11
1137	85*	7.3	133
1139	86	14.3	50
1139	86*	18.0	44
1140	87*	14.4	112
1141	88	30.7	125
1143	89	2.8	119
1217	124	63.4	27
1217	124*	20.4	68
1218	125	25.2	21
1218	125*	6.3	151
1224	126*	24.5	100
1226	127	44.4	43
1226	127*	14.4	143
1227	128	7.4	30
1227	128*	3.8	139
1228	129	12.5	52
1229	130	66.3	22
1229	130*	7.1	146
1231	131	38.0	43
1231	131*	4.6	152
1237	132	35.5	32
1237	132*	24.8	110
1238	133	15.9	15
1238	133*	21.0	86
1245	134	77.8	11
1245	134*	46.6	114
Fanny		21.9	150
Fanny*		22.2	33
OL 5		15.6	222
Col 1		9.63	305
Col 1*		4.9	236
BB50		100.0	228
BB50*		98.9	100
Cica8		96.3	168
Cica8*		99.4	173

© Liliana M. Dávalos 1997

*= obtenido en el segundo ensayo

La hipótesis para este caso sería que en la segunda prueba, las plantas recibieron menos dosis de virus que en la primera pues los porcentajes de infección observados fueron menores y el porcentaje de portadores del virus -según prueba de ELISA- al interior de la población de insectos fue 97% para el primer ensayo y 92% para el segundo ensayo, siendo el tiempo de exposición igual. Es importante considerar además, que la prueba de ELISA indica cuantos insectos de una muestra de la población portan una cantidad de virus más allá de cierto umbral de absorbancia óptica, pero no hay forma de saber cuántos pueden en realidad transmitir el virus que portan, porque esta característica depende de un gen recesivo en el insecto cuya proporción en la colonia se desconoce (Zeigler y Morales, 1990). Si esta fuera la explicación para las diferencias entre las pruebas se debería encontrar que algunas líneas (las susceptibles) no presentan diferencias significativas de uno a otro ensayo y que otras líneas (las resistentes) las pueden presentar, pero siempre con un nivel de infección menor en la segunda prueba. La Figura 6 muestra los resultados de la prueba de rango múltiple de Duncan para el análisis de varíanza combinado de líneas presentes en ambas pruebas (con más de 30 plantas evaluadas por línea en ambos casos). De acuerdo con esta prueba, 12 de las 17 líneas analizadas permanecieron estables en ambos ensayos, mientras que 5 líneas-131, 128, 103, 79 y 127- muestran diferencias significativas entre ensayos, con menor porcentaje en el segundo ensayo siempre. Estos resultados son consistentes con la hipótesis propuesta y permiten explicar las diferencias entre los resultados de los ensayos.

© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 6. Prueba de rango múltiple de Duncan para la variable porcentaje de infección en los dos ensayos.

Alpha= 0.05 g.l.= 72 CME= 0.017226

Los valores con la misma letra no son significativamente diferentes

Agrupamiento de Duncan								Media	Ensayo*Línea
				A				1.4363	2 * CICA 8
				A					
				A				1.3941	2 * BB50
				A					
				A				1.3854	1 * CICA 8
				A					
				A				1.3453	1 * BB50
				B				0.7575	1 * 79
				B					
				B				0.7480	1 * 103
				B					
		C		B				0.7290	1 * 127
		C		B					
		C		B				0.7252	1 * 34
		C		B					
		C		B		D		0.7116	2 * 106
		C		B		D			
		C	E	B		D		0.6593	1 * 131
		C	E	B		D			
	F	C	E	B		D		0.6123	1 * 132
	F	C	E	B		D			
	F	C	E	B		D	G	0.5345	2 * 26
	F	C	E	B		D	G		
	F	C	E	B	H	D	G	0.5292	1 * 63
	F	C	E	B	H	D	G		
	F	C	E	B	H	D	G	0.5262	1 * 106
	F	C	E	B	H	D	G		
	F	C	E	I B	H	D	G	0.5140	2 * 132
	F	C	E	I	H	D	G		
	F	C	E	I	H	D	G	0.4876	1 * 26
	F	C	E	I	H	D	G		
	F	C	E	I	H	D	G	0.4860	2 * FANNY
	F	C	E	I	H	D	G		
	F	C	E	I J	H	D	G	0.4852	1 * FANNY
	F	C	E	I J	H	D	G		
	F	K	E	I J	H	D	G	0.4671	2 * 79
	F	K	E	I J	H	D	G		
	F	K	E	I J	H	D	G	0.4665	1 * 101
	F	K	E	I J	H	D	G		
	F	K L	E	I J	H	D	G	0.4568	2 * 34
	F	K L	E	I J	H		G		
	F	K L	E	I J	H		G	0.4167	2 * 86
	F	K L		I J	H		G		
	F	K L		I J	H		G	0.3920	2 * 63

figura 6. continuación.

	F	K L		I J	H		G	0.3865	1 * 86
	F	K L		I J	H		G		

© Liliana M. Dávalos 1997

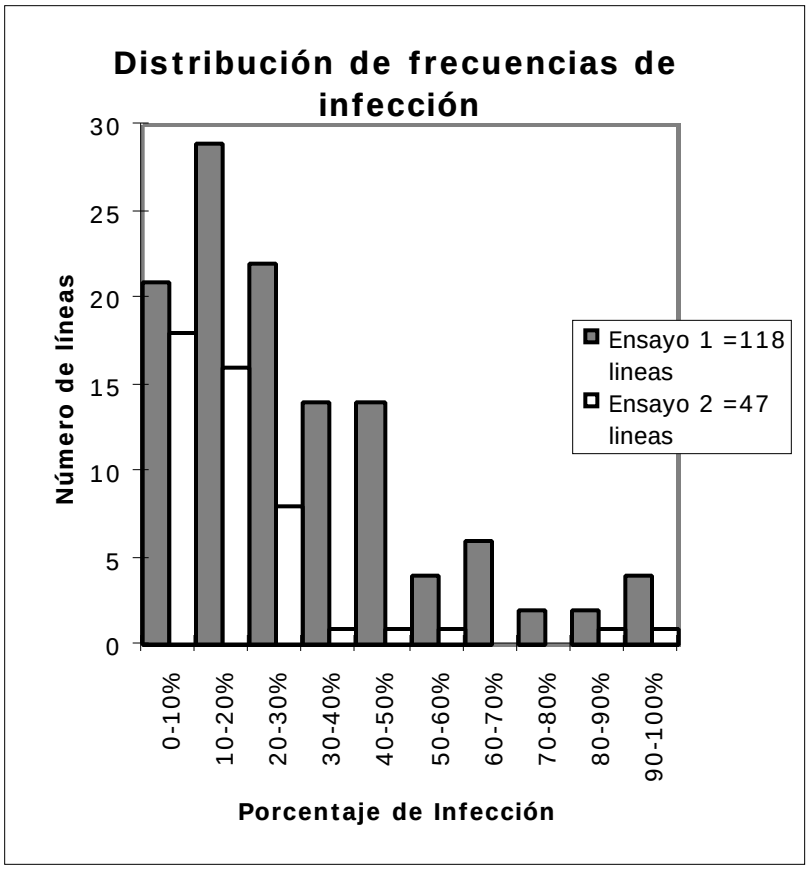
F	K L	I J H	G			
F	K L	I J H	G	0.3689		2 * 103
	K L	I J H	G			
	K L	I J H	G	0.3338		2 * 9
	K L	I J H	G			
	K L	I J H	G	0.3155		1 * COL 1
	K L	I J H	G			
	K L	I J H	G	0.3016		1 * 128
	K L	I J H	G			
	K L	I J H	G	0.2869		1 * 9
	K L	I J H	G			
	K L	I J H	G	0.2843		1 * 93
	K L	I J H	G			
	K L	I J H	G	0.2817		2 * 93
	K L	I J H	G			
	K L	I J H	G	0.2763		2 * 101
	K L	I J H				
	K L	I J H		0.2666		2 * 98
	K L	I J				
	K L	I J	0.2599		1 * 98	
	K L	J				
	K L	J	0.2232		2 * 131	
	K L					
	K L			0.2206		2 * COL 1
	L					
	L			0.1999		2 * 128

© Liliana M. Dávalos 1997

No fue posible, sin embargo, establecer una función para integrar los conjuntos de datos de los dos ensayos porque la variación no fue uniforme a lo largo del rango de porcentaje de infección, i.e. como no se puede saber ***a priori*** cuales líneas son resistentes y cuales susceptibles, y los resultados no se pudieron agrupar claramente con respecto a esta característica (mediante análisis de varíanza y prueba de Duncan para el ensayo 2 exclusivamente), no se puede predecir el desempeño que una línea en particular hubiera tenido en el primer ensayo con el resultado del segundo ensayo porque la variación depende, entre otras cosas, de la resistencia o susceptibilidad de la línea.

© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 7. Histograma de comparación entre las frecuencias de porcentajes de infección de los dos ensayos. Se utilizaron los datos completos de ambas pruebas.



Para este segundo ensayo, el análisis de varianza indicó un índice de correlación de 94% y una vez más no se pudieron generar grupos estadísticamente diferentes, salvo por un conjunto de dos líneas que agrupan con los controles susceptibles. Las restantes 43 líneas -4 se descartaron por tener menos de 30 plantas al evaluar- no se separaron estadísticamente entre sí.

La Figura 7 muestra la comparación entre las distribuciones de frecuencia de rangos de infección para los ensayos; a este nivel, el comportamiento del segundo ensayo se ve como lo que es -una fracción resistente de la población del primer ensayo-.

© Liliana M. Dávalos 1997

Teniendo en cuenta las dificultades a la hora de interpretar los datos obtenidos en este segundo ensayo con respecto a los del primero (que fue más extenso en cuanto a número de líneas evaluadas), la población fue reducida a 101 líneas en el análisis cuantitativo y las medidas de porcentaje de infección utilizadas en el programa de mapeo para correlación con datos numéricos fueron las del primer ensayo, para líneas con un número de plantas mayor que 30 individuos.

5.2.3 Segregación de la resistencia

La diferencia entre los promedios de una línea con respecto a otra es tan baja y/o la dispersión de los datos para cada línea es tan alta que, aunque las líneas son significativamente diferentes, la distribución de la resistencia a la hoja blanca en esta población sigue un comportamiento continuo y no se ajusta a una curva normal. La explicación a la distribución continua ha sido discutida por Zeigler et al. (1988 y 1994), quienes atribuyeron este esquema de distribución a una serie de factores que alteran la interpretación de la genética de la resistencia a la hoja blanca como genes menores, antibiosis parental o variabilidad inducida por el ambiente.

Algunas características propias de esta población imponen restricciones a la hora de interpretar los resultados en cuanto a segregación del fenotipo:

1. Los parentales del cruce son resistentes, con medias de porcentaje de infección que no son significativamente diferentes.
2. La progenie al momento de evaluar se encuentra en F5 descendiente de semilla única en la F2, sin selección para la característica resistencia a la hoja blanca.
3. El método de evaluación impuso controles estrictos sobre el efecto ambiental en cuanto a edad y tiempo de exposición de las plantas al virus; suelo, riego y fertilización.

© Liliana M. Dávalos 1997

Los resultados cuantitativos permiten, entonces, establecer lo siguiente:

1. Como ya ha establecido la literatura para otros cruces (Zeigler et al, 1988), los genes responsables de la resistencia a la hoja blanca en los parentales de este cruce no confieren resistencia completa al virus.

2. No se puede definir a partir del estudio cuantitativo si los genes de cada parental son iguales o diferentes, con efecto similar o no, aditivos o no, y ligados o no; sin embargo, se asume que por lo menos dos genes de procedencia distinta estarían actuando sobre la resistencia en la progenie porque uno de los parentales - Oryzica Llanos 5- portaría el gen de resistencia de Colombia 1 (ver figura 2) y el otro - Fanny- obtendría su resistencia de otra fuente, al pertenecer a una subespecie distinta.

3. Aunque al estar en F5-F6 algunas de las líneas podrían estar segregando para resistencia a hoja blanca, la mayor parte de la variación en la respuesta a hoja blanca se debe al genotipo de las líneas.

Por otra parte, los resultados sin publicar del estudio del cruce Fanny x IRAT13 obtenidos en este laboratorio identificaron preliminarmente un marcador molecular para resistencia proveniente de Fanny, que podria usarse a la hora de separar los efectos de los parentales resistentes.

Teniendo en cuenta todas estas consideraciones, y la experiencia en un análisis de QTL para resistencia a hoja blanca en Fanny x Colombia 1 (sin publicar, Tohme y LaRota), el análisis para mapeo molecular se hizo asumiendo un modo de herencia cuantitativo (poligénico) aunque no necesariamente fuera este el caso. Para tal efecto, se debió normalizar la distribución de la resistencia en la población mediante transformación utilizando la función arcoseno.

© Liliana M. Dávalos 1997

5.3. Polimorfismos de Longitud en los Fragmentos de Restricción (RFLPs)

5.3.1 Polimorfismo con las enzimas utilizadas

El rastreo de polimorfismo entre los parentales de este cruce ya se había hecho en este laboratorio, basándose en el trabajo de McCouch, (1990) que registra a Dra I, Eco RI, Eco RV y Hind III como las enzimas de restricción que permiten evidenciar más RFLPs en arroz. La Tabla 3 comprende los datos completos en cuanto a los niveles de polimorfismo encontrados para esas enzimas con las 176 sondas hibridizadas en parentales hasta ahora; y un ejemplo de marcador polimórfico para las cuatro enzimas utilizadas en el rastreo se ilustra en la Figura 8.

El 58% de las sondas hibridizadas resultaron polimórficas para al menos una de las cuatro enzimas utilizadas. Este nivel de polimorfismo corresponde al origen genético divergente de los parentales: Oryzica Llanos 5 es una variedad de la subespecie ***indica*** y Fanny es ***japonica***, por lo tanto este es un cruce intersubespecífico.

Las consecuencias prácticas de este nivel de polimorfismo -que es alto comparado con uno intrasubespecífico, pero menor que el encontrado en un cruce interespecífico como el que mapearon Causse et al., (1994)- afectan el nivel de resolución posible del mapa porque para poder inferir distancias entre marcadores y genes partiendo de la segregación en la progenie, es indispensable determinar de cual de los parentales se ha heredado ADN en cada individuo de la población, a lo largo de cada segmento de cromosoma analizado con marcadores.

Por eso, es necesario que la región alrededor del locus para el gen buscado sea polimórfica pues la probabilidad de que una de las sondas hibridizadas coincida exactamente con el gen de resistencia buscado es muy baja. Cuando un intervalo grande del cromosoma resulta monomórfico para el cruce estudiado, los RFLPs no

© Liliana M. Dávalos 1997

pueden resolver la procedencia de los fragmentos especificos, haciendo imposible el mapeo.

© Liliana M. Dávalos 1997

Tabla 3. Polimorfismo con las sondas rastreadas en parentales (Fanny y OL5). Se han señalado las sondas ya rastreadas en progenie y la enzima con la que se hibridizaron.

Sonda/enzima	Dra I	Eco RI	Eco RV	Hind III	cromosoma	progenie	enzima
RG2	M	M	P	M	11	+	EcoRV
RG9	P	P	P	P	12	+	
RG13	M	P	P	P	5	+	EcoRI
RG20		P	M	M	8	*	
RG25	M	M	M	M	2		
RG28	M	M	M	M	8		
RG30	M	P	M	M	7	+	EcoRI
RG29		M	M		8		
RG64	P	P	P	P	6	+	DraI
RG81	P	P	M	P	12	+	DraI
RG83	M	M	M	M	2		
RG100	P	P	P	P	3	+	DraI
RG101	M	M	M	M	7		
RG104	P	M	M	P	3	+	DraI
RG119	P	M	M	M	5	*	
RG123	M	M	P	P	6	+	HindIII
RG125	M	M	M	M	9		
RG134	M	M	M	P	10	+	
RG138	P	M	M	M	6	+	DraI
RG139	M	P	M	M	2		
RG140	P	M	M		1	+	DraI
RG143	M	M	M	M	4		
RG144	P	P	P		2	*	
RG146	M	M	M	M	7		
RG163	M	P	M	M	4	*	
RG165		M	M	M	7	+	EcoRV
RG169	M	M	M	M	4		
RG171			P		1	+	EcoRV
RG172	M	M	M	P	6	*	
RG176	M	M	M	M	12		
RG177	M	M	M	M	4		
RG181	P	M	M	M	12	+	DraI
RG190	P	P	P	P	12	+	DraI
RG191	M	M	P	P	3	*	
RG214		P	P	M	4	+	EcoRV
RG220	M	M	M	M	1		
RG222	M	M	M		1		
RG246	M	M	M	M	1		
RG247	M	P	M	P	11	+	HindIII
RG303	M	P	P	P	11	+	EcoRI

© Liliana M. Dávalos 1997

RG324	M	M	M	M	2		
RG341	M	M	M	P	12	+	HindIII
RG350	M	M	M	M	1		
RG353	M	P	P	M	11	*	
RG364	M	M	M	M	1		
RG445			P	P	6	+	HindIII
RG457	M	M	M	M	12		
RG463	P	M	M	M	12		
RG476	M	P	P		4	*	
RG543	M	M	M	M	12		
RG574	M	M	M	P	12	+	HindIII
RG588	M	M	P	M		*	
RG648	M	M	M	M	6		
RG869	P	M	P	P	12	+	DraI
RG901	M	P	P	M	12		
RG913	M	P	P	P	2	+	
RG958	M	M	M	M	12		
RG1034	P	P	P	P	8	+	EcoRV
BCD98	M	M	M	M			
BCD454	M	M	P	M	5	*	
BCD808	M	M	P	M	11		
BCD828	P	M	M	M		*	
BNL8.29	M	M	M	M	3		
C82	M	M	P	M	11	*	
C496	M	M	M	P	11	*	
C794	M	M	M	M	11		
CDO17	P	M	M	M	6	*	
CDO38	P	M	M	M	7	+	DraI
CDO87	M	M	M	M	3		
CDO89	M	M	M	M	5		
CDO127	M	M	M	P	12	*	
CDO192	M	M	M	M	8		
CDO344	M	M	M	M	12		
CDO385	M	M		M	7		
CDO395	M	M	M	P		*	
CDO407	M	P	P		7	*	
CDO459	M	M	P	P	12	*	
CDO533	P	P	P	P		*	
CDO534	M	M	P	M	2	*	
CDO595	M	M	M	M	8		
CDO1160	M	M	P	P	5	+	HindIII
CDO1508	M	P	M	M		*	
G181	P	P	M		12	+	DraI
G1160		M	M		12		
G1112	M	M	P	M	12	+	EcoRV
G1391	M	P	M	M	12		
G1465	M	M	M	M	11		

© Liliana M. Dávalos 1997

Y12817R	P	M	P		12	*	
RZ2	M	M	M	M	6		
RZ14	M	M	M	M	1	+	DraI
RZ19	M	M	M	M	1		
RZ23	M		M	M	4		
RZ28	M	M	M	M	8		
RZ53	M	P	P	P	4	+	HindIII
RZ67	M	M	M	M	5		
RZ69	M	M	M	M	4		
RZ70	M	M	M	M	5		
RZ76	M	M	P	M	12	*	
RZ79	M	M	M				
RZ86	M	M	M		4		
RZ87	M	M	M	P	2	+	HindIII
RZ92	M	M	M	M	1		
RZ141	M	M	M	M	11		
RZ143	P	M	P	M	8	+	DraI
RZ144	M	M	M	M	6	+	HindIII
RZ166	M	M	M	M	2		
RZ192	M	P	M	M	6	+	EcoRI
RZ206	P	M	M	P	9	+	DraI
RZ217				P	2	+	HindIII
RZ225	P	M	M	P	5	+	HindIII
RZ242	M	M	P	M	6	*	
RZ244	M	M	M	M	5		
RZ257	P	M	M		12	+	DraI
RZ261	M	P	M	P	12	+	HindIII
RZ273	M	M	M	M	2		
RZ276	M	M	M	M	1		
RZ296	M	M	M	M	5		
RZ323	M	M	P	P	8	+	EcoRV
RZ329	P	M	M	M	3	+	DraI
RZ343	P	M	M	P		+	DraI
RZ382	P	M	P	M	1	*	
RZ387	P	M	M	M	7	+	DraI
RZ390	M	P	P	M	5	+	
RZ393	M	M	M		3		
RZ395	M	M	P	P	7	+	EcoRV
RZ397	M	M	M	M	12		
RZ398	M	M	M		6		
RZ400	P	M	M	M	10	+	DraI
RZ404	P	P	M	P	9	+	HindIII
RZ413	M	M	M	M	1		
RZ421	M	M	M	M	10		
RZ444	M	P	P	P	1	+	HindIII
RZ446	M	M	M	M	2		
RZ455	M	M	M	P	5	*	

© Liliana M. Dávalos 1997

RZ474	P	M	M	P	3	+	DraI
RZ476	P	M	M	M	2	+	DraI
RZ508					6	+	
RZ509	P	M	M	M		*	
RZ516	P	M	P	M	6	+	DraI
RZ525	M	P	M	M	11	+	EcoRI
RZ527	M	M	M	M	1		
RZ536	P	P	M	M	11	+	DraI
RZ538	P	M	P	M	1	+	EcoRI
RZ543	M	M	M	M	1		
RZ567	M	M	M	M	2		
RZ576	P	M	P	M	3	+	DraI
RZ583	M	P	M	M	10	+	EcoRI
RZ588			P		6	+	EcoRV
RZ590	M	M	P	P	4	+	EcoRV
RZ596	M	M	M	M	9		
RZ599	M	M	M		2	+	EcoRI
RZ614	M	M	M	M	3		
RZ617	P	M	M	M	8	+	DraI
RZ626	M		M	M	7		
RZ630	M	M	P	M	3	+	EcoRV
RZ643	M	M	M	M	2		
RZ656	M	M	M		4		
RZ667		M	M	M			
RZ682	P	P	P	M	6	+	EcoRI
RZ698	M	M	P	M	9	+	EcoRV
RZ717	M	M	M	M	4		
RZ716	P	M	P	M		+	DraI
RZ730	P	P	P		1	+	EcoRI
RZ744	P	M	M	M	1	*	
RZ783	P	M	P	M	1	+	EcoRV
RZ797	M	M	M	M	11		
RZ816	P				12	+	DraI
RZ892		M	P	M	10	+	EcoRV
RZ900	P	M	M	M	11	+	DraI
RZ912	M	M	P	M	3	+	EcoRV
RZ952	M	M	M	M	8		
RZ953	M	M	M	M	6		
RZ995	M	M	M		1		
RZ997	P	M	M	M	8	+	DraI
RZ953	M	M	M	M	6		
RZ1002	P				6	+	DraI
totales	47	35	52	39		74	
	117	132	119	114			
porcentaje	29%	21%	30%	25%		72%	

M =monomórfico
P =polimórfico

© Liliana M. Dávalos 1997

+ =hibridizado en progenie
* =por hibridizar

Figura 8. Autoradiografía de la hibridización en parentales con la sonda RG190. Los primeros dos carriles de cada enzima son Fanny y Oryzica Llanos 5, que muestran polimorfismo con todas las enzimas.

© Liliana M. Dávalos 1997

Se encontraron en la progenie Fanny x Oryzica Llanos 5, 102 sondas polimórficas, de 176 rastreadas en parentales. Hasta el momento se ha analizado la segregación en la progenie de 74 RFLP pertenecientes a los 12 cromosomas de arroz, con énfasis en los cromosomas 3, 6, 11 y 12. Estos cromosomas recibieron atención particular en el rastreo de sondas porque se esperaba que este trabajo sirviera para confirmar los reportes iniciales sin publicar que mapean marcadores para resistencia a hoja blanca en los cromosomas 11 y 12, y además porque este cruce está siendo analizado para marcadores ligados a resistencia a cada uno de los seis linajes del hongo ***Pyricularia grisea***, presumiblemente ubicados en los cromosomas 6, 11 y 12.

5.3.2 Segregación de los marcadores

Aunque las líneas de esta progenie se han tratado como líneas autógamas recombinantes (Recombinant Inbred Lines, RILs) -las cuales son por definición homocigotas- al estar en F5, todavía no se les puede considerar completamente homocigotas. Por lo tanto, se espera una segregación 15:2:15 (alelos Fanny:heterocigotos:alelos Oryzica) equivalente a un gen codominante con los parentales en estado homocigoto en los RFLPs. La Tabla 4 resume la segregación de los 74 marcadores rastreados en la progenie. Como los RFLP son codominantes, los heterocigotos se reconocen por presentar las dos bandas parentales en la autoradiografía.

© Liliana M. Dávalos 1997

Tabla 4. Segregación de todos los marcadores analizados en progenie.

alelos F	esp	chi2	alelos OL5	esperado	chi2	heterocigto	esp	chi2
4753	4512	0.05	4559	4512	0.01	313	601	0.48

Aunque la distribución total de alelos no se desvía significativamente de las proporciones mendelianas esperadas, algunas sondas evidencian segregación sesgada si se analizan una por una en toda la progenie. Treinta (40%) de las 74 sondas hibridizadas presentan segregación sesgada en diferentes proporciones como se ilustra en la Tabla 5. Un estudio reciente de Xu et al., (1997) caracteriza regiones cromosómicas precisas donde se ha evidenciado segregación sesgada en RILs, además de otro tipo de poblaciones como F2, retrocruzas y dobles haploides.

© Liliana M. Dávalos 1997

Tabla 5. Marcadores con segregación sesgada.

Marcador	cromosoma	alelos Fanny	alelos Oryzica	esperado	Chi 2 lim. 3.8
*RZ14	1	73	49	61	4.721307287
*RZ538	1	77	41	59	10.98265319
*RZ730	1	51	75	63	4.571419219
*RZ783	1	48	81	64.5	8.441728621
*RZ444	1	78	44	61	9.475151729
RG140	1	74	45	59.5	7.06722858
RZ343	1	48	68	58	4.249993449
RG913	2	69	46	57.5	4.599984819
RZ599	2	76	46	61	7.376985266
RZ630	3	113	16	64.5	#NUM!
RZ912	3	51	78	64.5	5.651176684
RG100	3	72	44	58	6.7586076
CDO38b	3	80	49	64.5	7.449587461
RZ225	5	51	30	40.5	5.444466029
RG64	6	74	47	60.5	6.024767068
RG138	6	35	87	61	22.11332321
CDO38a	7	76	53	64.5	4.100767594
RZ323	8	41	85	63	15.36096679
RZ617	8	52	75	63.5	4.165355836
*RZ143	8	47	70	58.5	4.521355949
RZ404	9	76	40	58	11.17227773
RZ698	9	84	42	63	13.99778776
RG2	11	52	78	65	5.199991716
*RZ525	11	107	19	63	#NUM!
RZ816	12	38	87	62.5	19.18971539
RG574	12	27	92	59.5	#NUM!
RG81	12	51	77	64	5.281230224
RG341	12	47	70	58.5	4.521355949
G1112	12	23	96	59.5	#NUM!
RG9	12	120	5	62.5	#NUM!
totales		1911	1735		

Las sondas que presentan segregación sesgada según nuestros resultados, están mapeadas para las regiones reportadas en Xu et al***.*** (1997) como sitios de segregación sesgada en RILs producto de un cruce ***indica*** x ***japonica***, excepto por las que están señaladas con asterisco en la Tabla 5. Aunque la estructura de la población es similar, en nuestro cruce el segmento comprendido entre los marcadores RZ14 y RZ730 sería otra región de segregación sesgada tal como se ve

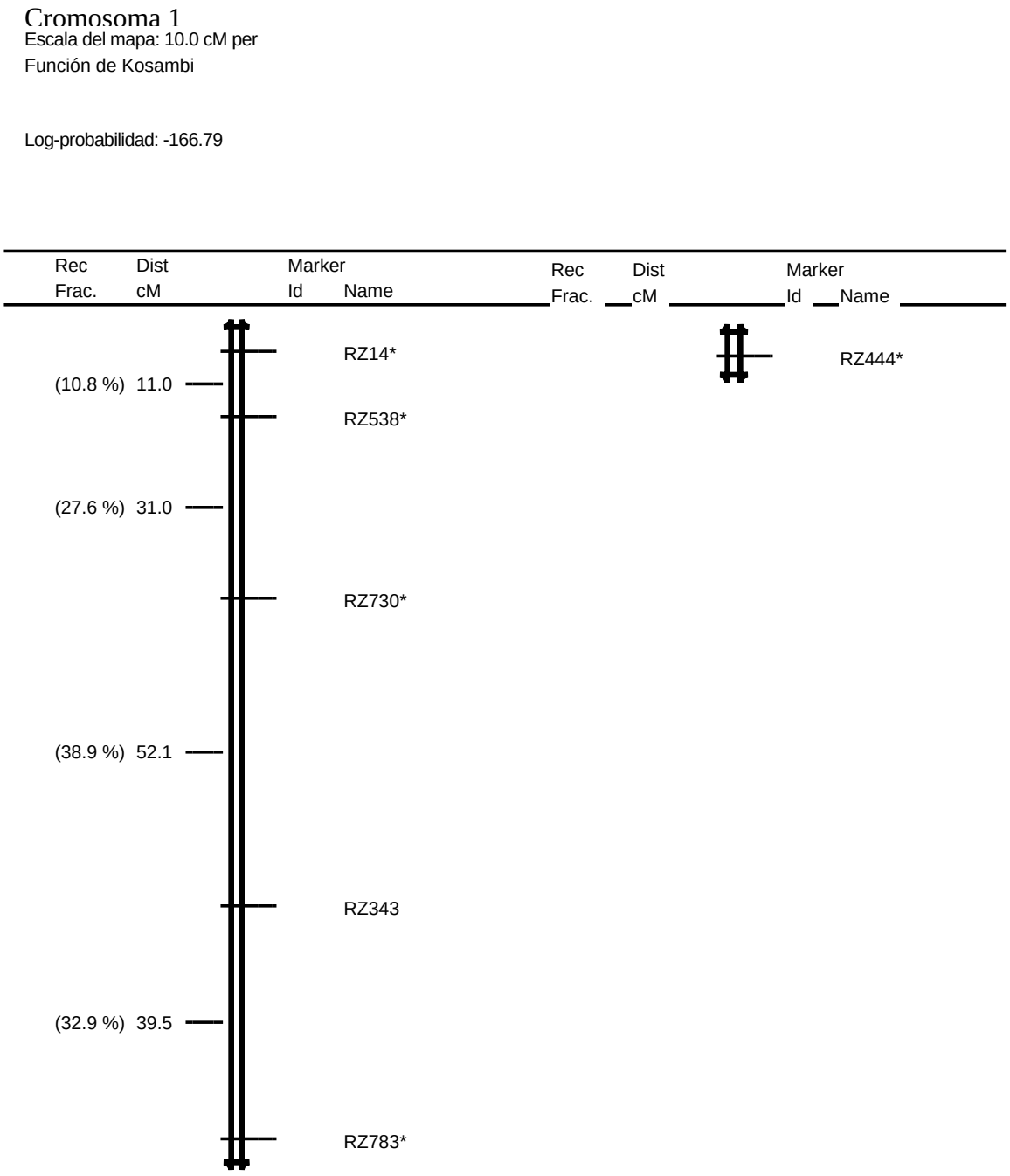
© Liliana M. Dávalos 1997

en la Figura 9. Otros sitios de segregación sesgada estarían alrededor de los marcadores RZ143 (crom. 8) y RZ525 (crom. 11). Se requiere mayor saturación de marcadores en los cromosomas señalados para poder delimitar más claramente las regiones que presentan distorsión al segregar; para tal efecto, se hace necesario un rastreo con otras enzimas, ya que con las cuatro utilizadas en este trabajo, no se pudieron detectar polimorfismos en las regiones entre RZ730 y RZ343 del cromosoma 1, RZ997 y RG143 del cromosoma 8 y RG2 y RZ 525 del cromosoma 11.

Este resultado es particularmente interesante porque la distorsión en la segregación está cercanamente asociada a la probabilidad de obtener recombinantes específicos de interés en poblaciones segregantes. Las estrategias modernas de mejoramiento se enfrentan a un límite al hacer cruces intersubespecificos, porque a menudo se falla al intentar recuperar los mejores recombinantes en parte por la supervivencia diferencial de la progenie. Los resultados de estos estudios contribuyen a aclarar la localización de factores genéticos asociados a segregación sesgada y cómo podrían manejarse en el marco de un programa de mejoramiento (Xu et al., 1997).

© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 9. Representación gráfica de los cromosomas 1, 8 y 11 de arroz con nuevas regiones de segregación sesgada. Los marcadores que presentaron distorsión en la segregación están señalados con asterisco (*).

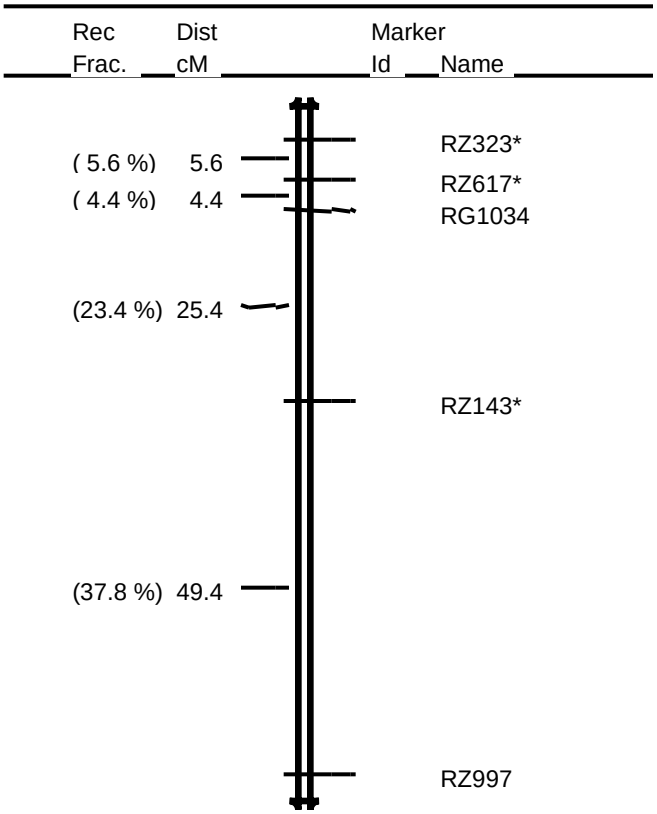


© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 9. continuación. Cromosoma 8

Cromosoma 8
Escala del mapa10.0 cM per
Función de Kosambi

Log probabilidad: -99.54

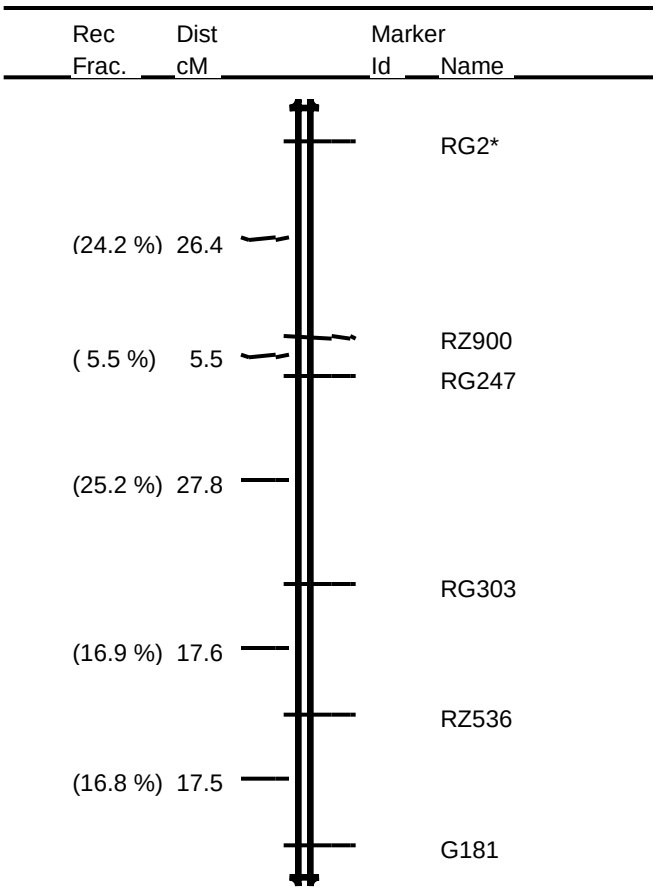


© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 9. continuación. Cromosoma 11.

Cromosoma 11
Escala mapa 10.0 cM per cm
Función de Kosambi

Log-prob: -146.38



© Liliana M. Dávalos 1997

La base genética de la distorsión en la segregación puede ser el aborto de los gametos -masculinos o femeninos- o la fertilización selectiva de genotipos gaméticos particulares. Sano (1990) propuso que la distorsión en el locus del marcador sería causada por el ligamiento entre el marcador y un gen del gametofito que confiere menor capacidad de polinización, también llamado "gen eliminador de gameto" o "asesino de polen".

Aun así, las causas de la distorsión en la segregación no son exclusivamente genéticas; pueden ser ambientales, fisiológicas y/o genéticas y la contribución relativa de estos factores difiere según la estructura de la población. En una población de RILs derivadas de semilla única (Single Seed Descent), la segregación sesgada representa los efectos acumulados de factores genéticos y ambientales en múltiples generaciones y la interacción genotipo-ambiente se pronuncia más al progresar la autopolinización. Por eso, es díficil diferenciar las causas ambientales de las genéticas en este tipo de población y no se puede establecer un ligamiento con posibles genes de esterilidad gametofítica.

5.3.3 Nuevo locus para CDO38

Al hibridizar la sonda CDO38 con los filtros de Dra I, sonda mapeada para el cromosoma 7 en Causse et al. (1994), se encontró homología en al menos tres fragmentos distintos del genoma de cada parental (copia múltiple). La segregación diferencial de bandas en la progenie puso en evidencia que las 3 bandas de hibridización en cada parental eran alelos de tres loci, dos de ellos polimórficos. CDO38a y CDO38b segregan cada uno de manera individual en la progenie como se ve en la Figura 10.

© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 10. Autoradiografía de la hibridización en filtros de progenie de CDO385.

© Liliana M. Dávalos 1997

3.4. Asignación de los marcadores a grupos de ligamiento

La información obtenida a partir de RFLPs para esta progenie se utilizó para generar un mapa molecular de este cruce. Se esperaba que los grupos de ligamiento correspondieran a los reportados en la literatura para estos mismos marcadores en arroz (McCouch, 1990; McCouch et al**.**, 1994; Causse et al**.**, 1994); el mapa reportado por Cusse et al., 1994 este último fue el que se utilizó para confrontar los resultados. El mapeo de marcadores ***de novo*** no es totalmente aplicable porque los marcadores que exhiben segregación sesgada, dificultan la interpretación de los grupos de ligamiento obtenidos: los algoritmos para ligamiento en el analisis de Mapmaker asumen una proporción 1:1 de los alelos en la población y la hipótesis nula -no ligamiento o aleatoriedad- se acepta cuando el número de recombinantes observados es compatible con la fracción esperada de recombinación -0.5-. Si se presenta distorsión severa en la segregación, la frecuencia de recombinación esperada para marcadores no ligados desciende y el programa, asumiendo distribución 1:1, asigna ligamientos a loci que no están ligados en realidad (Wang et al., 1994).

Inicialmente se utilizaron los resultados de los 44 marcadores no sesgados para generar un marco de referencia para el mapa molecular. Cuando se observó que los grupos de ligamiento asi obtenidos no diferían significativamente de aquellos obtenidos con todos los marcadores, se utilizaron todos los marcadores en un solo análisis. Los grupos de ligamiento se obtuvieron con un Lod =3.0, θ =0.4 (porcentaje de recombinación máximo), y se separaron grupos menores muy ligados con Lod =7, θ =0.18. Aquellos marcadores que no aparecían agrupados en ningún caso (ni con el Lod mínimo de 3), se integraron a grupos mayores utilizando el comando "try", evaluando adicionalmente su ligamiento mediante la probabilidad de ligamiento

© Liliana M. Dávalos 1997

"linked?" con respecto a los grupos en los que están asignados en la literatura y su ubicación relativa se examinó con el comando "ripple".

El valor Lod máximo para un par de loci es la medida tradicional para análisis de ligamiento. Esta medida se deriva de dos probabilidades, la primera es la probabilidad de obtener los datos observados si los marcadores estuvieran ligados a la distancia sugerida por el número de individuos recombinantes, y la segunda, es la probabilidad de obtener los datos observados si los marcadores no estuvieran ligados. Entonces el valor Lod es el logaritmo del cociente de esas dos probabilidades. Un valor Lod = 3.0 o mayor significa que es 1000 (o más) veces más factible que los datos observados experimentalmente hayan sido obtenidos por un ligamiento que por eventos aleatorios. Un Lod mínimo de 3.0 es lo que normalmente se acepta para validar un ligamiento

Los marcadores CDO38a y CDO38b se mapearon como loci individuales: CDO38a se integró (con Lod =3) al grupo de ligamiento del cromosoma 7 -donde esta mapeado CDO38 en la literatura-; mientras que CDO38b se agrupó con marcadores del cromosoma 3 como se ve en la Figura 11, lo que constituye un nuevo locus para este marcador.

Siete marcadores -RZ 444 del cr. 1, RZ630 del cr. 3, RG138 del cr. 6, RZ525 del cr. 11, RZ261, RG9 y RZ 257 del cr. 12- que presentaban segregación sesgada no pudieron ser asignados a grupos de ligamiento con el procedimiento descrito y se utilizó su ubicación en el mapa publicado en la literatura para señalarlos en el mapa final.

© Liliana M. Dávalos 1997

5.3.5. Problemas en la ubicación de algunos marcadores

5.3.5.1. Cromosoma 12

Dos marcadores del cromosoma 12 -RG181 y RG190- aparecen agrupados con marcadores correspondientes a los cromosomas 2 y 3 respectivamente, incluso con un Lod =7.0 y sin posibilidad de ser incluidos en el grupo de ligamiento del cromosoma 12.

Ya se han reportado problemas con respecto a la ubicación de RG190 en la literatura (LaRota, 1996; Wang et al**.**, 1994) pues a pesar de ser una sonda de copia única aparece mapeada en al menos dos sitios: uno en el cromosoma 12 (Causse et al., 1994) y otro en el cromosoma 4 (Wang et al., 1994). McCouch, 1990, estudió la segregacion de RG190 y mapeo este marcador en una fraccion separada del cromosoma 12 con RG396. Song y Gustafson (1995) reportan a RG190 en el cr. 12 mediante una técnica de mapeo físico, lo cual constituiría una ubicación inequívoca para este marcador.

En este trabajo, sin embargo, no es sólo RG190 el marcador del cr. 12 el que aparece asignado a otro cromosoma; también RG181 -que esta mapeado a 20 cM de RG190 según Causse et al. (1994)- aparece en el cromosoma 3. Chung y Wu (1990) sugirieron, a partir de un estudio de trisómicos de la variedad IR36, que el cromosoma extra en el trisómico del cromosoma 12 presentaba una traslocación de una sección del cromosoma 4.

Este rearreglo estructural no explicaría la posición de RG190 y RG181 en nuestro mapa, pero si tenemos en cuenta que estos marcadores están en el extremo distal del cromosoma 12 -lo cual hace menos confiable la estimación de ligamiento con respecto a los demás marcadores- y que ya fue reportada la ocurrencia de este tipo de rearreglos, se sugiere continuar saturando esta región cromosómica, además de

© Liliana M. Dávalos 1997

utilizar otras técnicas -p.e. microsatélites-, para resolver la ubicación exacta de estos marcadores en el mapa molecular de este cruce. A corto plazo, el estudio de la segregación de RG396 en esta progenie podría poner en evidencia un comportamiento tipo transposon de este fragmento en particular del cromosoma 12. La necesidad de refinar el mapa del cromosoma 12 (y resolver la aparición de estos dos marcadores en otros cromosomas) se hace particularmente importante al estar allí reportado el marcador morfológico para resistencia a la hoja blanca (ver Causse et al**.**, 1994), y ser más específicamente RG190 un supuesto marcador para resistencia proveniente de Fanny en un cruce de Fanny x IRAT 13 (susceptible) estudiado por J. Tohme (com. pers.). Los resultados del presente trabajo, sin embargo, sugieren que posiblemente RG190 no es un marcador para resistencia en este caso porque el 28% de las líneas que han heredado el alelo de Fanny son susceptibles a la hoja blanca.

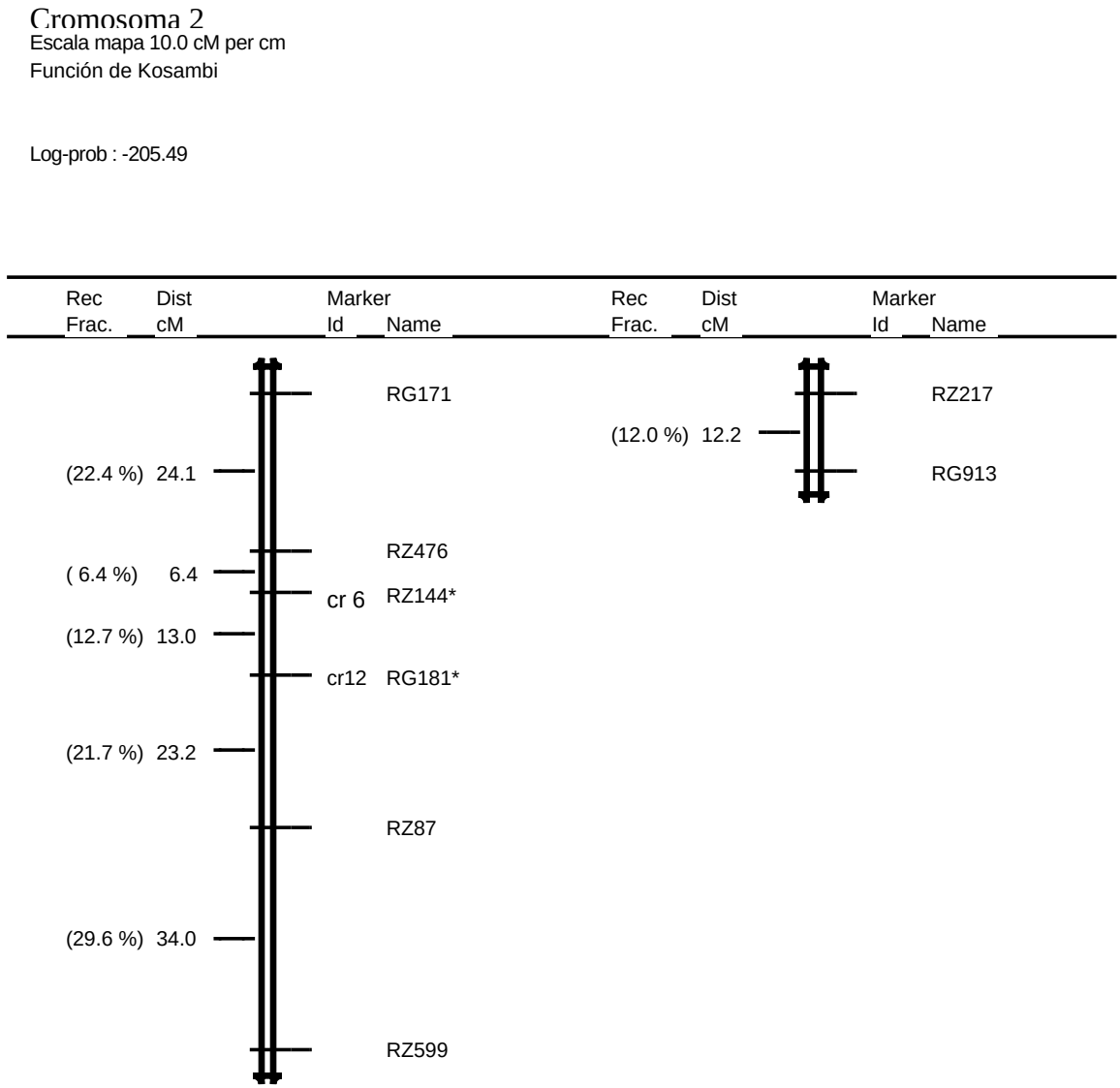
5.3.5.2. Los marcadores RZ144 y RG140

Otros marcadores que se asignaron a grupos de ligamiento diferentes a aquellos reportados en la literatura fueron RZ144 (cr. 6) y RG140 (cr.1) que aparecen -con un lod de 7.0- asociados a los grupos de ligamiento de los cromosomas 2 y 6 respectivamente.

El marcador RZ144 aparece asociado al mismo grupo donde se ubica RG181. Es importante anotar que RG140 no pudo ser agrupado con Lod>2.0 en el cromosoma 1 en el mapa de Causse et al. (1994) y, por lo tanto, su ubicación en el cromosoma 1 se considera de alguna manera lábil. En la Figura 11 se ilustra la representación gráfica de los cromosomas 2, 3, 6 y 12 obtenidos exclusivamente a partir de nuestros resultados, con las nuevas ubicaciones de estos dos marcadores.

© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 11. Representación gráfica de los cromosomas 2, 3, 6 y 12; obtenida exclusivamente a partir del análisis de ligamiento para la segregación en progenie. Se resaltan los marcadores cuya posición no concuerda con la reportada en Causse et al., 1994.

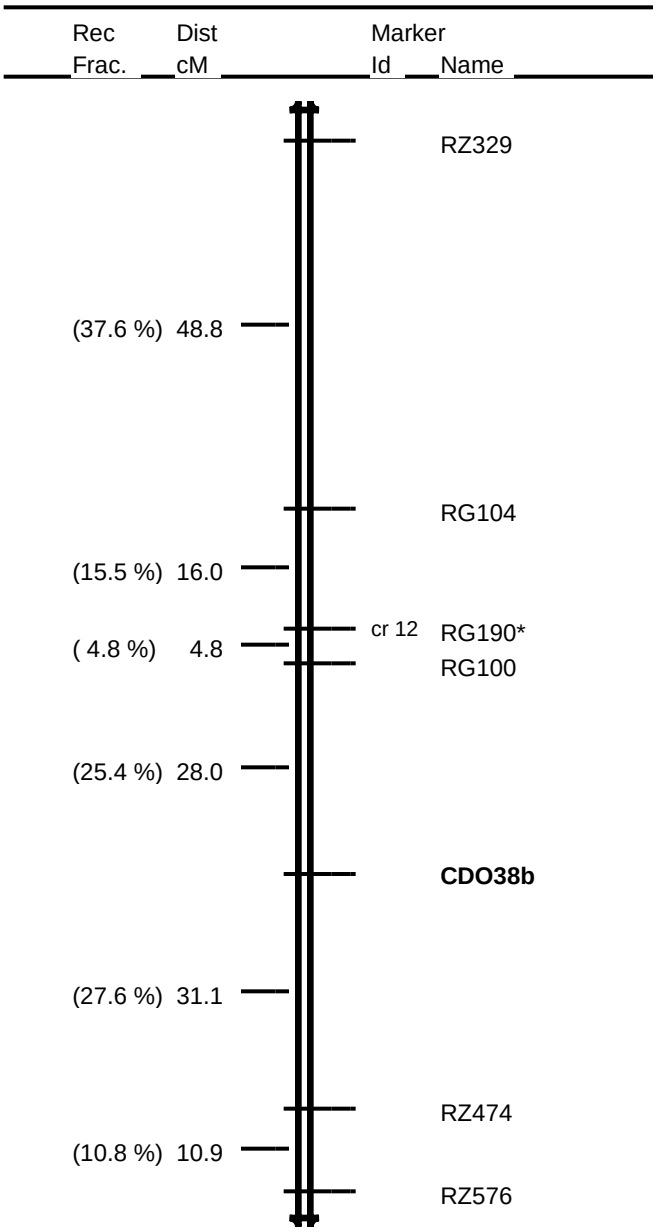


© Liliana M. Dávalos 1997

figura 11. continuación. Cromosoma 3, donde se ubica el nuevo locus para CDO38.

Cromosoma 3
Escala mapa 10.0 cM per cm
Función de Kosambi

Log-prob: -168.27

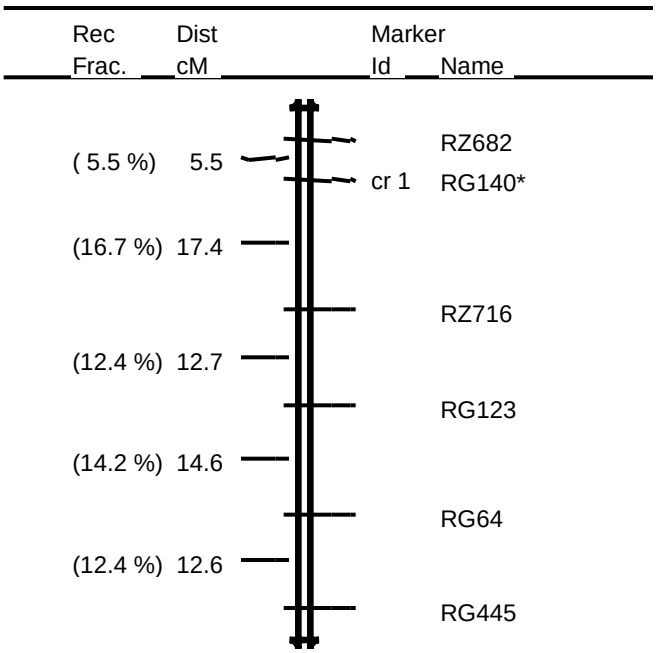


© Liliana M. Dávalos 1997

figura 11. continuación. Cromosoma 6.

Cromosoma 6
Escala mapa10.0 cM per cm
Función de Kosambi

Log-prob: -121.09

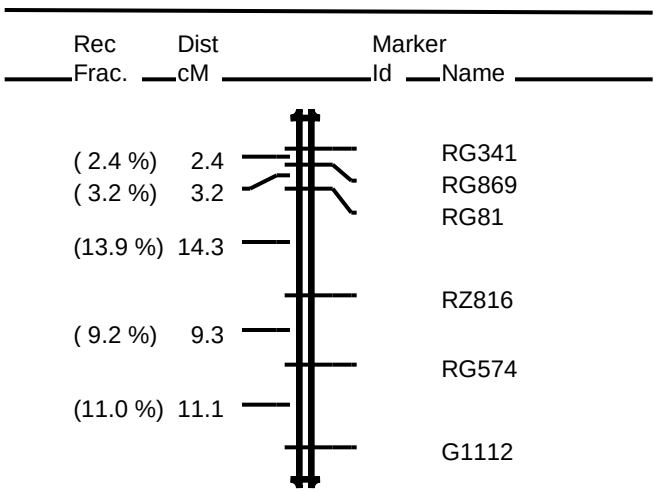


© Liliana M. Dávalos 1997

figura 11. continuación. Cromosoma 12

Cromosoma 12
Escala mapa 10.0 cM per cm
Función de Kosambi

Log-prob: -96.99



© Liliana M. Dávalos 1997

De nuevo, la saturación con nuevos marcadores -RFLP y otros- es lo más indicado para aclarar con precisión la posición de estos marcadores en este cruce; porque siempre cabe la posibilidad -no importa que tan improbable sea- de que esta progenie presente rearreglos particulares en su estructura genómica en comparación con el cruce interespecifico de Causse et al., 1994 y los otros cruces estudiados por Wang et al., 1994 y McCouch et al., 1988.

5.4. Mapeo de marcadores ligados a resistencia al VHB

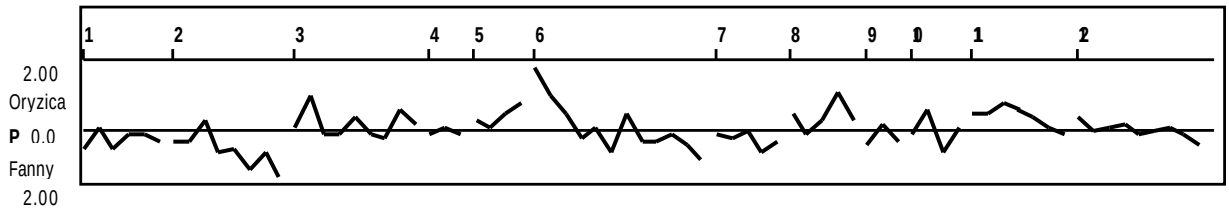
El primer obstáculo enfrentado al intentar mapear la característica "resistencia a la hoja blanca" fue la ausencia de diferencias significativas entre el desempeño de los parentales, lo que hace imposible una valoración cualitativa de la segregación porque la característica "resistencia a la hoja blanca" no puede incluirse como un marcador más en los datos de Mapmaker: aunque la población segrega para la característica, a las líneas susceptibles no se les puede asignar un "F" u "O" porque no se parecen a ninguno de los dos parentales, que son resistentes; y a las líneas resistentes tampoco, porque no se sabe si su resistencia proviene de Fanny u Oryzica, o de ambos.

No obstante, los datos cuantitativos de porcentaje de infección se pueden utilizar para el mapeo de QTL, sin que esto implique que la herencia de la resistencia sea poligénica. De hecho, el perfil de la distribución de la resistencia es continuo, pero no sigue una distribución normal y las caracteristicas poligénicas -como p.e. rendimiento- por lo general muestran además de continuidad, un perfil de distribución normal. Al hacer este análisis, suponemos que los QTL que se encuentren tendrán un efecto comparativamente grande sobre la resistencia,

© Liliana M. Dávalos 1997

correspondiente a uno (si el gen de resistencia fuera uno y el mismo en ambos parentales) o más genes mayores provenientes de Fanny y Oryzica Llanos 5.

Figura 12. Regresión lineal entre el estado alélico de los marcadores mapeados para cada cromosoma y la característica fenotípica cuantitativa continua "Resistencia a la Hoja Blanca" en 101 líneas evaluadas. Los picos señalan los marcadores y/o regiones cromosómicas que determinan con mayor peso la variación en la resistencia. La dirección de los picos en la regresión indica el origen de los alelos. La escala vertical muestra el valor de -Log10 (P). Donde P es la probabilidad de que el marcador cosegregue con la resistencia.



La Figura 12 muestra los resultados de la regresión entre los marcadores mapeados y datos cuantitativos continuos de resistencia para 101 líneas. Se observan dos picos mayores en la regresión, uno proveniente de Fanny en el cromosoma 2 y otro proveniente de Oryzica Llanos 5 en el cromosoma 6. De acuerdo con la regresión múltiple del programa, los dos mejores marcadores de estos cromosomas explican el 11.9% de la variación total. La Tabla 6 resume la información respecto a los mejores marcadores de la regresión. La diferencia entre los índices de correlación crudos sucesivos nos muestra que, después de los picos mayores en RZ1002 (cr. 6) y RZ217 (cr.2), son RG171 (cr. 2), RZ508 (cr. 6) y RZ912 (cr 3) los marcadores que más efecto relativo tienen.

© Liliana M. Dávalos 1997

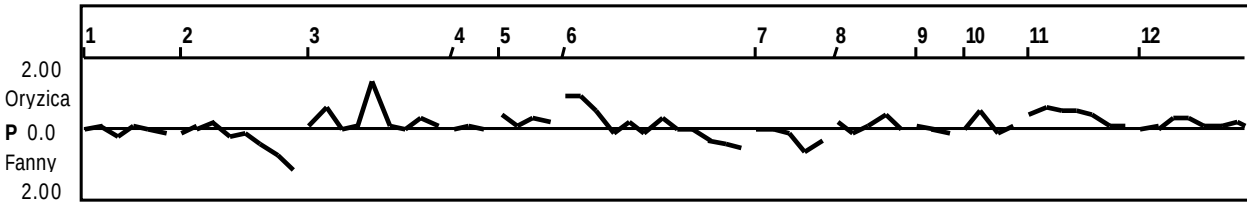
Tabla 6. Marcadores que más determinan la variación en la resistencia a la hoja blanca.

Marcador	cr.	alelos	r2 R. múltiple	r2RM ajustado	diferencia r2	r2 R. lineal
RZ1002	6	OL5				6.8
RZ217	2	Fanny	11.9	11.0		4.6
RZ617	8	OL5	13.7	11.9	1.8	4.1
RG171	2	Fanny	17.9	15.4	4.2	3.9
RZ516	6	OL5	18.3	14.9	0.4	3.4
RZ912	3	OL5	20.9	16.7	2.7	3.3
RZ390	6	OL5	21.5	16.5	0.6	2.8
RZ900	11	OL5	22.6	16.7	1.1	2.7
RZ508	6	Fanny	25.8	19.3	3.2	2.2
RG247	11	OL5	27.9	20.8	2.1	2.2

El programa QGene (Nelson, 1997) también permite estudiar la característica como una variable discontinua, distribuida a lo largo de rangos, lo que sería equivalente a estudiar la segregación de los alelos en correlación al histograma de la Figura 5. El resultado de este procedimiento es una regresión lineal con respecto a los marcadores mapeados, en la cual los valores de "resistencia a hoja blanca" están fijos dentro de un rango limitado tal como se ilustra en la Figura 13.

© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 13. Análisis de contingencia para la característica "Resistencia a la Hoja Blanca" estudiada de manera cuantitativa pero discontinua. La escala vertical corresponde al log10 (P). donde P es la probabilidad de cosegregación entre el marcador mapeado y la resistencia.



En este análisis se mantienen los picos en RZ217 y RZ1002 (RZ217 > RZ1002); aumentando la importancia relativa de RZ329 en el cromosoma 3 que tiene, según este análisis, el mayor efecto sobre la resistencia. Agrupar así los rangos de infección no es incorrecto porque ya la literatura (ver sección 3.1.3.2) indica que la continuidad en la distribución de infección no es de origen exclusivamente genético. Los mejores marcadores comunes -RZ1002 y RZ217- en ambos análisis estarían indicando regiones del genoma más relevantes para la variación. Si suponemos que la distribución continua en los niveles de infección se debe a genes menores y efectos del ambiente (Zeigler et al., 1994), entonces RZ329 (cr. 3) es marcador para un gen mayor asociado a resistencia de origen Oryzica Llanos 5 porque es el mejor marcador de acuerdo con el análisis que asume discontinuidad en los rangos de infección (o análisis por rangos).

Sin embargo, la evidencia a favor de los marcadores de los cromosomas 6 y 2 es mayor porque de los mejores 10 marcadores en el análisis continuo los del cr. 6 para alelos OL5 y los del cr. 2 para alelos Fanny explican un mayor porcentaje total -7.2 y 9.1% respectivamente- de la variación en regresión múltiple. Adicionalmente

© Liliana M. Dávalos 1997

RZ217 y RZ912 (cr.2); y RZ1002 y RZ516 (cr.6) aparecen también entre los 10 mejores marcadores (i.e. con P más alto) en el análisis de QTL por rangos lo que estaría reforzando los indicios de ubicación de los marcadores alrededor de estas regiones en los cr. 2 y 6.

Desafortunadamente, el análisis de frecuencias de infección por rangos no nos permite profundizar para aclarar la significancia (i.e. el Lod mediante análisis de intervalo) o el peso relativo (i.e. el r2 de la regresión lineal y múltiple) de cada región señalada.

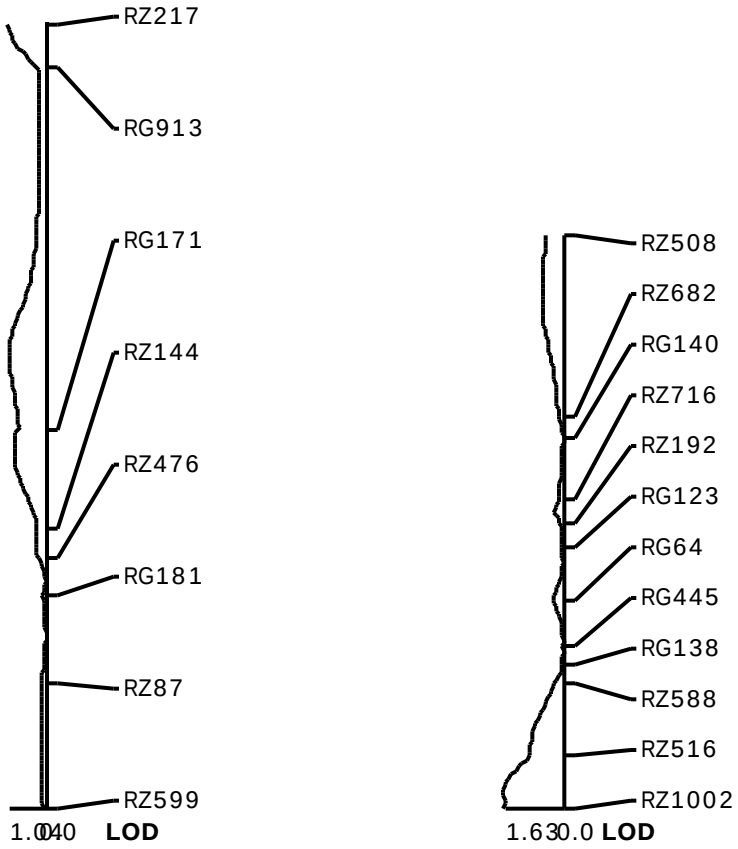
Para evaluar el nivel de significancia de los QTL encontrados con el análisis continuo se realizó un análisis de intervalo para los cromosomas 2 y 6. El análsis de intervalo para el cromosoma 3 no muestra ningún Lod diferente a 0 y es, por lo tanto, inservible.

La Figura 14 ilustra el análisis de intervalo para los cromosomas 2 y 6. Este análisis permite visualizar los resultados de una regresión para cada intervalo de 1cM en los cromosomas mapeados y su respectivo Lod; así, se puede inferir la posición más plausible de un QTL entre loci marcadores.

Está claro que aunque estos son los mejores marcadores para resistencia a hoja blanca, no alcanzan un nivel significativo pues en ambos casos el Lod<3.0.

© Liliana M. Dávalos 1997

Figura 14. Análisis de intervalo para QTL en los cromosomas 2 y 6. El Lod mínimo para declarar un QTL significativo es 3.0.



Análisis de intervalo Cr. 2 Análisis de intervalo Cr. 6

Adicionalmente, en la regresión lineal entre marcadores y resistencia, el efecto de cada marcador sobre la resistencia en el pico de correlación no sobrepasa el 7% (Tabla 6). Dos genes mayores -uno proveniente de Fanny en el cromosoma 2 y el otro de Oryzica Llanos 5 en el cromosoma 6 (aunque es remotamente posible que haya otro en el cr. 3)- estarían causando la mayor parte de las variación en la resistencia de la progenie. Algunas regiones de los cromosomas 3, 8 y 11 tendrían

© Liliana M. Dávalos 1997

un efecto correspondiente a genes menores. El poder de resolución -al no tener un resultado significativo- es, sin embargo, pobre en este sentido.

© Liliana M. Dávalos 1997

6. Conclusiones

6.1. Marcadores Asociados a Resistencia en el Mapa Molecular del cruce Fanny x Oryzica Llanos 5

Los resultados indican que los mejores marcadores para resistencia al VHB en este cruce estan ubicados alrededor de RZ217, en el cromosoma 2 y RZ1002, en el cromosoma 6. El nivel de resolución del experimento, sin embargo, no permite descartar el efecto menor que otras regiones cromosómicas pueden estar ejerciendo.

Si se lograran separar los efectos de los genes provenientes de cada parental (p.e. al ubicar inequívocamente marcadores en cruces entre cada parental y una variedad susceptible), los datos obtenidos en este trabajo podrían esclarecer con precisión el aporte de otras regiones cromosómicas asociadas a genes menores, al genotipo resistente.

6.2. Origen de la Resistencia en el Cruce

Claramente, Fanny y Oryzica Llanos 5 poseen genes de resistencia distintos, en regiones cromosómicas diferentes. Fanny constituye, entonces, una fuente de resistencia alternativa; lo cual es una ventaja potencial, si se tiene en cuenta que la mayoría de programas de mejoramiento de arroz en América Latina han venido utilizando alelos de un mismo gen proveniente de Colombia 1, que a su vez ha heredado sus alelos de resistencia de Blue Rose y Takao Iku para un sólo locus.

6.3. Segregación de la Resistencia en la Progenie

© Liliana M. Dávalos 1997

Una fracción apreciable (20%) de la progenie estudiada presenta niveles de resistencia superiores al testigo resistente (ver figura 5). Estas líneas, al estar en F5, están cerca de alcanzar el estado homocigoto y serían útiles en programas de mejoramiento al haber heredado al menos dos genes mayores de resistencia de fuentes distintas.

6.4. RG190 como Marcador para Resistencia proveniente de Fanny

La segregación del alelo proveniente de Fanny para el marcador RG190, indica que este no es un buen marcador para resistencia en este cruce. Adicionalmente, los problemas al mapear este marcador en particular y el extremo del cromosoma 12 en general, sugieren que esta es una región que, si se encuentra asociada con resistencia, debe saturarse exhaustivamente con varios tipos de marcadores para asegurar un ligamiento confiable.

© Liliana M. Dávalos 1997

7. Referencias

Beachell, H. M. and P. R. Jennings. 1961. Mode of inheritance of hoja blanca resistance in rice. Proceedings of the rice technical working group. 1960, pp 11-12 (Abstr.).

Bernal, A. 1939. La situación patológica del arroz en el Valle del Cauca. Rev. Fac. Nac. Agronomía de Medellin, 1: 234-238.

Causse, M. A. T. M. Fulton, Y.G. Cho, S.A. Ahn, J. Chunwongse, K. Wu, J. Xiao, Z. Yu, P.C. Ronald, S.E. Harrington, G. Second, S. R. McCouch and S. D Tanksley. 1994. Saturated molecular map of the rice genome based on an interspecific backcross population. Genetics 138: 1251-1274.

Chao, L. F. 1928. Linkage studies in rice. Genetics, 13: 133-169.

Chung, M. C., and H. K. Wu. 1990. Scrutiny of trisomics from an ***indica*** rice, ***Oryza sativa***. Proc. Natl. Science Council, Part B (Taiwan), 14:166-174. citado por Causse et al., 1994.

Churchill, G. A. and R. W. Doerge. 1994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. Genetics 138:963-971.

CIAT. 1996. Informe anual Unidad de Biotecnología. CIAT, Cali, Colombia

De Miranda, J. R., M. Muñoz, R. Wu, R. Hull and A. M. Espinoza. 1996a. Sequence of rice hoja blanca tenuivirus RNA2. Virus Genes 12(3): 231-237.

_____, M. Muñoz, J. Madriz, R. Wu and A. M. Espinoza. 1996b. Sequence of ***Echinocloa*** hoja blanca tenuivirus RNA3. Virus Genes 13(1): 65-68.

_____, A. M. Espinoza and R. Hull. 1996c. Rapid, small scale purification of rice hoja blanca and ***Echinocloa*** hoja blanca tenuivirus ribonucleoprotein. Journal of Virological Methods, 56 (1): 109-113.

_____, R. Hull and A. M. Espinoza. 1995. Sequence of the PV2 gene of rice hoja blanca tenuivirus RNA2. Virus Genes 10 (3): 205-209.

_____, Hernandez, R. Hull and A. M. Espinoza. 1994. Sequence analysis of rice hoja blanca virus RNA3. J Gen Virol, vol. 75: 2127-2132.

Doebley, J., A. Stec, J. Wendel and M. Edwards. 1990. Genetic and morphological analysis of a maize-teosinte F2 population: implications for the origin of maize. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Evolution). 87: 9888-9892.

© Liliana M. Dávalos 1997

Espinoza, A. M., M. Hernandez, R. Pereia, B. Falk and V. Medina. 1992. In situ immunogold labeling analysis of the rice hoja blanca virus nucleoprotein and major non capsid protein. Virology, vol. 191 (2): 619-627.
Everett, T.R. and Lamey, H. 1969. Hoja blanca. pp 361-377 ***in*** Viruses, Vectors and Vegetation. K. Maramorosch, ed. John Wiley & sons, New York.

Feinberg, A.P., and B. Vogelstein. 1983. A technique for radiolabelling DNA restriction endonuclease fragments to high specific activity. Anal. Biochem. 132:6-13.

Gálvez, G.. 1968. Transmission studies of the hoja blanca virus with highly active, virus free colonies of ***Sogatodes oryzicola***.. Phytopathology 58: 818-821.

_____. 1967. Frecuencia de ***Sogata oryzicola*** Muir y ***Sogata cubana*** Crawf en campos de arroz y liendrepuerco ***Echinocloa*** en Colombia. Agricultura tropical 23(6): 385-390.

_____ 1961. Hosts and insect vectors of the hoja blanca disease in rice. Plant Dis. Rep. 45:949-953.

_____, H. D. Thurston and P. R. Jennings. 1960. Transmission of hoja blanca in rice by planthopper ***Sogata cubanus***. Plant Dis. Rep. 44: 394.

_____ y P. R. Jennings. s.d. Transmisión de hoja blanca del arroz en Colombia. p. 507-515.

Garces Orejuela, E . 1941. Enfermedades del arroz. Reporte sin número. Palmira.

_____. 1940. Informe de una comisión para estudiar y presentar un plan de organización de proyectos en patología de plantas en la estación agrícola experimental de Palmira. Reporte sin número al Ministerio de Economía. Bogotá.

Gavidia, O. A. 1970. Resistencia de 15 variedades de arroz ***Oryza sativa*** L. al virus de la hoja blanca y al vector ***Sogatodes oryzicola*** Muir. Tesis M.Sc. Universidad Nacional de Colombia. Bogota, Colombia. 41 pp.

Gingery, R. E. 1988. The rice stripe virus group pp. 297-329 ***in*** The Plant Viruses vol. 4: the filamentous viruses, R. G. Milne (ed.). Plenum Press. New York and London.

Gonzalez, D. O., N. Palacios, G. Gallego y J. Tohme (compiladores y editores). 1995. Protocolos para marcadores moleculares. CIAT. Cali, Colombia. 82 pp.

Gonzáles Tous, D.I., L.E. Manosalva de Nivia y F. Cuevas-Pérez. 1991. Origen de las variedades de Arroz en Colombia 1971-1989. Arroz (Colombia), 4 (372):8-16.

Gustafson, J. P. and J. E. Dillé. 1992. Chromosome location of ***Oryza sativa*** recombination linkage groups. Proc. Natl. Acad. Sci. USA (Genetics), 89: 8646-8650.

© Liliana M. Dávalos 1997

Hoefer Pharmacia Biotech. 1995. DyNA Quant 200 Fluorometer Instructions. San Francisco.

Hoisington, D., M. Khairallah y D. González de León. 1994. Protocolos de laboratorio: laboratorio de Genética molecular aplicada CIMMYT. Segunda edición. CIMMYT. Mexico D. F. 51 pp.
Jansen, R. S. and P. Stam. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. 1994. Genetics 136:1447-1455

Jena, K. K., G. S. Khush and G. Kochert. 1992. RFLP analysis of rice (***Oryza sativa*** L.) introgression lines. Teor. Appl.Genet. 84: 608-616.

Jennings, P.R., O. Arregocés y A. Pineda. 1980. Evaluación de la resistencia varietal del arroz a la sogata (***Sogatodes oryzicola*** Muir) y al virus de la hoja blanca. Guía de estudio. CIAT Cali, Colombia. 30 pp

_____ and A. Pineda. 1971. The effects of the Hoja Blanca virus on its insect vector. Phytopathology 61: 142-143.

_____. 1963. Estimating yield loss in rice caused by Hoja Blanca. Phytopathology 53:492.

Khush, G. S. 1990. Report of meetings to discuss chromosome numbering system in rice. Rice Genet. Newsl. 7:12-15.

_____ and G, Toniessen. 1991. Rice biotechnology. Biotechnology in Agriculture no. 6, IRRI (International Rice Research Institute). Wallingford, Oxon, UK: CAB International.

Kochert, G.. Introduction to RFLP mapping and plant breeding applications. s.d. The Rockefeller Foundation International Program on Rice Biotechnology. 15 pp.

Lamey, H. A. 1969. Varietal resistance to hoja blanca. ***in*** The virus diseases of the rice plant. pp. 293-311. Johns Hopkins Press, Baltimore, MD.

Lander, E. S. and Botstein. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121:185-199.

_____, M. J. Daly and S. E. Lincoln. 1990. Constraucting genetic linkage maps with MAPMAKER: a tutorial and reference manual. Technical Report, Whitehead Institute for Biomedical Research, second edition.

La Rota, M.. 1996. Marcaje de genes que confieren resistencia en el arroz a linajes colombianos del patogeno ***Pyricularia grisea***. Facultad de Ciencias, Universidad de los Andes. Bogota, Colombia. 91pp

_____ y J. Tohme. 1997 Informe final del proyecto "marcaje de genes que confieren resistencia en el arroz a linajes colombianos del patógeno ***Pyricularia***

© Liliana M. Dávalos 1997

grisea" presentado ante el programa de jóvenes investigadores, COLCIENCIAS/BID/CIAT.

Liou, P.C., F. G. Gmitter and G.A. Moore.. 1996 Characterization of the ***Citrus*** genome through analysis of restriction fragment length polymorphisms. Theor Appl Genet. 92:425-435.
Malaguti, G., H. Díaz y N. Angeles. 1957. La virosis "hoja blanca" del arroz. Agron. Trop. 6:157-163.

Martínez, C. P. y F. Cuevas-Perez.1995. Registro de cruzamientos de arroz (Colombia). CIAT. Cali, Colombia.

Martínez, G.. 1982. Virología agrícola con énfasis en el problema de la hoja blanca del arroz en Colombia. p 139-152, Memorias del congreso de la Sociedad Colombiana de Entomología, SOCOLEN. 125pp

McCouch, S.R. and R. W. Doerge. QTL mapping in rice. 1995. TIG, Vol. 11, no. 12, pp 482-487.

_____, G. L. Wang, D. J. Mackill, J. M. Bonman, M. C. Champoux and R. J. Nelson. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics, 136: 1421-1434.

_____ 1990. Construction and Applications of a molecular linkage map of rice based on restriction fragment length polymorphism (RFLP). Ph. D. thesis for the Faculty of the Graduate School of Cornell University.

_____, G. Kochert, Z. H Yu, Z. Y. Wang, G. S. Khush, W. R. Coffman and S. D. Tanksley. 1988. Molecular mapping of rice chromosomes. Theor Appl Genet (1988) 76: 815-829.

Morales, F. J y L. Sanint. 1996. El entorchamiento: nueva enfermedad vírica del arroz. plegable de información, CIAT, Cali, Colombia.

_____ and A. Niessen. 1983. Association of spiral filamentous viruslike particles with rice hoja blanca. Phytopathology 73: 971-974.

_____. 1985. Rice Hoja Blanca Virus. ***in*** Plant Viruses 0-173. American Society of Phytopathologists.

Muñoz, D.. 1996. Un viaje al futuro. Arroz (Bogota, Colombia) Febrero, 1996. Fedearroz.

Nagamura, Y., T. Inoue, B. A. Antonio, T. Shimano, H. Kajiya, A. Shomura, S. Y. Lin, Y. Kuboki, N. Kurata, Y. Minobe. M. Yano and T. Sasaki. Conservation of duplicated segments between rice chromosomes 11 and 12. Breeding Science 45:373-376.

_____, K. Yamamoto, Y. Harushima, J. Z. Wu, B. A. Antonio, N. Sue, A. Shomura, S. Y. Lin, Y. Miyamoto, T. Toyama, T. Kirihara, T. Shimizu, Z. X. Wang, Y.

© Liliana M. Dávalos 1997

Tamura, I. Ashikawa, M. Yano and N. Kurata. 1993. A high density STS ans EST linkage map of rice. Rice Genome 2:11-13.

Nelson, C. 1996. qGene: Software for Genetics.URL: gopher://greengenes.cit.cornell.edu:70/.

Nelson, C. 1997. Software for marker based genome analysis and breeding. Molecular Breeding 3: 229-235.
Panaud, O., X. Chen, and S. R. McCouch. 1996. Development of microsatellite markers and characterization of simple sequence length polymorphism (SSLP) in rice (Oryza sativa L.). Mol Gen Genet (1996) 252:597-607.

Pantoja, A y M. P. Hernández. 1993. ***Sogatodes*** o ***Tagosodes***: sinonimia y evaluación a daño mecánico. Arroz (Colombia) Octubre de 1993:30-31.

Paterson, A. H., J. W. de Verna, B. Lanini and S. D. Tanksley. 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. Genetics 124:735-742.

Ramírez, B. C., D. Garcín, L. A. Calvert, D. Kolakofsky and A. L. Haenni. 1995. Capped nonviral sequences at the 5'' end of the mRNAs of rice hoja blanca tenuivirus RNA4. Journal of Virology. 69(3):1951-1954.

_____, I. Lozano, L. M. Constantino, A. L. Haenni and L. A. Calvert. 1993. Complete nucleotide sequence and coding strategy of rice hoja blanca virus RNA4. J gen virol, vol. 74:2463-2468.

_____, G. Macaya, L. A. Calvert and A. L. Haenni. 1992. Rice hoja blanca virus genome characterization and expression ***in vitro***. J Gen Virol, vol. 73 (pt. 6): 1457-1464.

Redoña, E.D. and D. J. Mackill. 1996. Molecular mapping of quantitative trait loci in ***japonica*** rice. Genome, 39:395- 403.

Sano, Y. 1990 The genic nature of gamete eliminator in rice. Genetics, 125:183-191.

Sax, K. 1923. The association of size differences with seed coat pattern and pigmentation in ***Phaseolus vulgaris***. Genetics 8:552-560.

Shimamoto, K. The molecular biology of rice. 1995. Science, Vol. 270: 1772-1773.

Song, Y. C. a nd J. P. Gustafson. 1995. The physical location of fourteen RFLP markers in rice (***Oryza sativa*** L.). Theor Appl Genet. 76:125-128.

Tanksley, S. D. and M. C. de Vicente. 1993. QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross. Genetics 134: 585-596.

© Liliana M. Dávalos 1997

_____, Z. H. Yu, D. J. Mackill and J.M Bonman. 1991. Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. Theor. Appl. Genet. 81: 471-476.

_____, A. H. Paterson, J. W. DeVerna and B. Lanini. 1990. Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. Genetics, 124: 735-742

_____ , N. D. Young, , A. H. Paterson and M.W. Bonierbale. 1989. RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. Biotechnology 7: 257-264.

Vargas, H. P. 1985. La hoja blanca descalabro del Cica 8. Arroz (Bogotá, Colombia) 34:18-19.

Vergel Colón, D. M.. 1991. Caracterización de la resistencia genética al virus de la hoja blanca en arroz. Facultad de Ciencias Agrícolas, Universidad de Cordoba. Monteria, Colombia. 134 pp.

Vicente de, M. C. and S. D. Tanksley. 1993QTL analysis of transgressive segregation in an interspecific tomato cross.. Genetics 134: 585-596.

Wang, G-L, D. J. Mackill, M. Bonman, S. R. McCouch, M.C. Champoux and R.J. Nelson. 1994. RFLP mapping of genes conferring complete and partial resistance to blast in a durably resistant rice cultivar. Genetics 136: 1421-1434.

Webber, A. J., V. D. Damsteegt, and C. L. Graham. 1971. Studies on the relationship of the hoja blanca virus to the planthopper vector ***Sogatodes oryzicola***. Phytopathology 61: 916.

Xu, Y., L. Zhu, J. Xiao, N. Huang and S.R. McCouch. 1997. Chromosomal regions associated with segregation distortion of molecular markers in F2 backcross, double haploid, and recombinant inbred populations in rice (***Oryza sativa*** L.). Mol Gen Genet (1997) 253:535-545.

Young, N. D., C. A. Fatokun, D. I. Menancio-Hautea and D. Danesh. 1992. Evidence for orthologous seed weight genes in cowpea and mung bean based on RFLP mapping. Genetics, 132: 841-846.

Yu, Z. H., D. J. Mackill, J. M. Bonman and S. D. Tanksley. 1991, Tagging genes for blast resistance in rice via linkage to RFLP markers. Theor Appl Genet (1991) 81:471-476.

Zeigler, R. S., A. Pantoja, M. C. Duque and G. Weber. 1994. Characteristics of resistance in rice to rice hoja blanca virus (RHBV) and its vector ***Tagosodes orizicolus*** (Muir). Ann Appl Biol, vol 124: 429-440.

_____ and F. J. Morales. 1990. Genetic determination of rice hoja blanca virus with its planthopper vector, ***Sogatodes oryzicola***. Phytopathology 80: 559-566.

© Liliana M. Dávalos 1997

_____, M. Rubiano and A. Pineda. 1988. A field screening method to evaluate rice breeding lines for resistance to the hoja blanca virus. Ann. Appl. Biol. 112: 151-158.

Zhang, Q., M. A. Saghai Maroof, T. Y. Lu and B. Z. Shen. 1992. Genetic Diversity and diffrentiation of ***indica*** and ***japonica*** rice detected by RFLP analysis. Theor Appl Genet (1992) 83:495-499.

© Liliana M. Dávalos 1997

Anexo 1. Soluciones utilizadas en los procedimientos de Laboratorio

1.1. Soluciones Utilizadas en la Extracción de ADN de Arroz

Buffer de extracción Dellaporta modificado

100 mM Tris-HCl, pH 8.0
50 mM Na-EDTA, pH 8.0
500 mM NaCl
1.25% SDS (P/V)
Autoclavar.
Agregar 0.30 g de bisulfito de sodio por cada 100 mL de buffer, justo antes de usarlo.

Acetato de potasio 5M

En 900 mL de agua destilada disolver 490.75 g de acetato de potasio. Ajustar el volumen a 1000 mL. Autoclavar.

T10E1

Para 500 mL, mezclar:
Tris-HCl 1M pH 8.0 5 mL
EDTA 0.5M 1 mL
Completar el volumen con agua destilada.
Autoclavar y guardar a 4°C.

SDS 20%

Para preparar 2 litros de SDS al 20% disuelva:
400 g de SDS en 1600 mL de agua destilada.
Cuando esté completamente disuelto lleve a volumen de 2 litros.

© Liliana M. Dávalos 1997

Tris-HCl 1 M

PRECAUCIÓN!
El HCl es un ácido fuerte. Debe trabajarse en cámara de extracción, con guantes; evite respirar los vapores.
En 800 mL de agua destilada estéril disolver 121.1 g de Tris-base.
Ajustar al pH deseado adicionando HCl concentrado:

pH	HCl
7.4	70 mL
7.6	60 mL
8.0	42 mL

Ajustar volumen a 1000 mL. Autoclavar.

ARNasa 10mg/mL

Disolver ARNasa pancreática (ARNasa A) a una concentración de 10 mg/mL en agua bidestilada estéril.
Dispensar en alícuotas en cámara estéril y almacenar a -20°C.

Acetato de sodio 3M

En 900 mL de agua destilada disolver 408.1 g de acetato de sodio.
Ajustar el pH a 5.2 con ácido acético glacial. Completar el volumen a 1000 mL. Autoclavar.

Bromuro de etidio 10 mg/mL

PRECAUCIÓN!
El bromuro de etidio es altamente mutagénico y moderadamente tóxico. Use guantes cuando trabaje con soluciones que contienen este colorante y use máscara cuando trabaje con el reactivo puro.

© Liliana M. Dávalos 1997

En 100 mL de agua disolver 1 g de bromuro de etidio. Almacene en botella oscura y a 4°C.

1.2. Soluciones para Cuantificación

Buffer TNE 10x

En 800 mL de agua destilada, disolver:

Tris Base 12.1 g

EDTA-Na_2 3.7 g

NaCl 58.4 g

Ajustar el pH a 7.4 con Hcl. Completar con agua destilada hasta 1000 mL. Filtrar y almacenar a 4°C.

Buffer para fluorometría

Para 100mL de buffer, medir muestras de ADN que estén entre 100 y 200 ng/µl

Solución stock Hoechst 10 µl

10X TNE 10 mL

Agua destilada estéril 90 mL

1.3. Soluciones Para Digestión, Precipitación, Electroforesis Y Transferencia

Espermidina 40mM

Pesar 58.2 mg y llevar a 10 mL con agua destilada.

NaCl 5M

Para 1000 mL disolver 292.2 g de NaCl (PM 58.44)

Autoclavar.

Buffer TBE 10x

© Liliana M. Dávalos 1997

Para 1000 mL:

Tris Base 108 g

Acido bórico 55 g

EDTA 0.5M 40 mL

Ajustar volumen con agua destilada.

EDTA 0.5M pH 8.0

Para preparar 1 litro de EDTA (0.5M)

EDTA 186.1 g

NaOH 18 g

Ajustar pH a 8.2 antes de conpletar el volumen. Autoclavar.

Solución de carga o Blue Juice concentrado

Preparar una solución con azul de bromofenol al 0.25% y Glicerol en agua al 30%. Almacenar a 4°C.

HCl 2.5N

PRECAUCIÓN!

El HCl es un ácido fuerte. Debe trabajarse en cámara de extracción, con guantes; evite respirar los vapores.

Para 500 mL, tomar 104.2 mL de HCl al 37%.

NaOH 10N

Para preparar 1 litro, pesar 400 g de NaOH y disolverlos en 800 mL de agua. Cuando estén completamente disueltos, completar el volumen

SSC 20x

Para 1 litro, mezclar:

© Liliana M. Dávalos 1997

NaCl 175.3 g
Acido cítrico trisódico 88.2 g
Llevar a pH 7.0 con HCl 1M. Autoclavar.

1.5 Soluciones para amplificacion de sondas

Buffer para PCR 10x

KCl 500 mM
Tris-HCl pH 8.8 100 mM
Tritón X-100 1%

Medio LB líquido

A 950 mL de agua desionizada agregar:
Bacto triptona 10 g
Extracto de levadura 5 g
NaCl 10 g
Disolver. Ajustar pH a 7.0 con NaOH. Completar volumen a 1000 mL. Autoclavar.

Ampicilina 100 mg/mL

Para preparar 10 mL, pesar 1 g de ampicilina y disolver en agua destilada estéril. Filtrar por 0.22µm. Alicuotar y almacenar a -20˚C.

Lisozima 50 mg/mL

En 1 mL de agua destilada, disolver 50 mg de lisozima. Almacenar a -20°C. Descartar cada alícuota que use.

1.5 Soluciones para Marcaje e hibridización radioactiva

Buffer de pre & hibridizacion marcaje radioactivo

© Liliana M. Dávalos 1997

Na_2HPO_4 pH: 7.2 0.5 M
NaH2PO4 0.25M
SDS 7 %
BSA 1 %
ADN esperma de salmón 100 µg/mL
(Previamente denaturado durante 10 min a 100˚C y colocado luego en baño de hielo)

Na_2HPO_4 1M pH 7.2

Na_2HPO_4 anhidro 142 g
Agua 700 mL
Ajustar a pH 7.2 con 200 mL de NaH_2PO_4 1M.

NaH_2PO_4 1M

NaH_2PO_4 120 g
Agua Completar a 1 litro

ADN esperma de salmón 5 mg/mL

Pesar 1 g de ADN esperma de salmón y disolverlo en 200 mL de agua. Agitar hasta que el ADN se humedezca y luego autoclavar durante 30 min. Almacenar a -20°C. Antes de usar ésta solución se debe calentar a 100˚C durante 10 min y luego pasarla a un baño de hielo.

Sephadex G-50

Pesar 10 g de Sephadex G-50.
Adicionarle 300 mL de agua.
Dejar sedimentar. Sacar el agua. Repetir este procedimiento 3 veces. Lavar con TE 2 veces y dejar toda la noche a 4°C en TE. Autoclavar 20 min y almacenar a 4°C.

© Liliana M. Dávalos 1997

© Liliana M. Dávalos 1997

Anexo 2. Resultados completos primer Ensayo Evaluación de Hoja Blanca

		Porcentajes de Infección					
Línea		muestra 1	muestra 2	muestra 3	Promedio	desv. std.	no. plantas
993	1	32.3	13.5	36.1	27.3	12.1	160
994	2	24.4	18.7	26.9	23.3	4.2	144
997	3	0.0	12.2	14.4	8.9	7.8	85
998	4	2.6	14.1	9.9	8.9	5.8	132
999	5	0.0	6.8	18.9	8.6	9.6	117
1005	6	71.9	35.7	57.9	55.2	18.3	60
1006	7	26.2	33.8	36.2	32.1	5.2	56
1007	8	91.1	100.0	89.6	93.6	5.6	61
1008	9	0.0	6.7	13.3	6.7	6.7	33
1012	10	18.2	20.0	0.0	12.7	11.1	70
1013	11	50.4	42.1	40.7	44.4	5.2	85
1014	12	15.0	10.1	42.0	22.4	17.2	121
1015	13	50.0	50.0	38.9	46.3	6.4	15
1016	14	9.4	13.8	16.4	13.2	3.5	179
1017	15	28.3	8.1	26.5	21.0	11.2	96
1018	16	34.8	35.3	47.2	39.1	7.0	111
1020	17	25.9	8.3	37.6	23.9	14.7	87
1021	18	11.1	10.7	5.1	9.0	3.4	119
1023	19	59.8	43.3	71.8	58.3	14.3	73
1028	21	5.6	5.6	6.7	6.0	0.6	49
1029	22	87.2	81.4	95.2	87.9	6.9	78
1032	23	33.2	47.6	35.9	38.9	7.7	105
1034	24	3.0	12.7	17.6	11.1	7.4	103
1035	25	37.5	79.0	58.4	58.3	20.8	67
1036	26	27.8	8.3	33.3	23.1	13.1	39
1039	27	10.0	11.9	16.8	12.9	3.5	116
1041	28	38.8	47.4	34.5	40.2	6.6	89
1042	29	9.6	22.8	48.5	27.0	19.8	120
1043	30	8.9	12.9	17.2	13.0	4.2	131
1044	31	25.9	27.3	57.0	36.7	17.6	166
1046	32	17.4	18.8	13.8	16.7	2.6	134
1047	33	76.5	58.2	52.8	62.5	12.4	91
1048	34	44.4	50.8	36.9	44.0	7.0	48
1049	35	4.9	4.9	9.1	6.3	2.4	119
1052	37	43.6	39.7	43.7	42.3	2.3	91
1053	38	7.7	15.6	54.7	26.0	25.2	100
1054	39	20.4	37.5	11.4	23.1	13.3	77
1055	40	21.7	8.9	17.3	16.0	6.5	145
1058	41	25.6	31.1	23.8	26.8	3.8	46
1059	42	8.3	4.8	2.6	5.2	2.9	98
1060	43	2.8	5.2	2.4	3.5	1.5	103
1062	44	15.9	14.4	23.8	18.0	5.1	114
1063	45	2.2	14.5	18.7	11.8	8.6	109
1066	46	2.1	11.4	14.0	9.2	6.3	150
1067	47	16.2	38.8	13.3	22.8	14.0	75
1071	49	10.3	3.7	9.7	7.9	3.6	112

© Liliana M. Dávalos 1997

1073	50	15.3	15.6	12.5	14.5	1.7	142
1074	51	11.6	6.7	11.7	10.0	2.9	128
1077	52	49.8	48.8	36.9	45.2	7.2	103
1082	53	25.8	33.0	21.3	26.7	5.9	68
1083	54	100.0	91.6	100.0	97.2	4.8	106
1086	56	4.6	14.8	13.1	10.8	5.5	106
1087	57	3.0	9.1	5.3	5.8	3.1	124
1088	58	23.0	70.9	63.1	52.3	25.7	99
1089	59	11.1	11.1	4.2	8.8	4.0	74
1092	60	9.5	37.7	6.7	18.0	17.1	109
1094	61	36.7	31.9	15.3	28.0	11.2	61
1096	62	21.3	7.9	21.7	17.0	7.9	135
1097	63	36.1	8.3	36.7	27.0	16.2	40
1099	64	nd	100.0	100.0	100.0	0.0	3
1100	65	2.6	21.7	6.3	10.2	10.1	100
1103	66	19.4	26.2	54.4	33.3	18.6	71
1107	68	74.0	58.9	69.0	67.3	7.7	77
1108	69	42.5	38.1	55.7	45.4	9.2	128
1110	71	11.4	37.2	21.1	23.2	13.0	94
1112	72	24.0	45.1	31.7	33.6	10.7	63
1116	74	2.6	18.8	23.0	14.8	10.8	148
1117	75	23.5	19.2	9.8	17.5	7.0	80
1122	77	25.0	6.7	8.3	13.3	10.1	49
1123	78	42.1	30.4	12.2	28.2	15.1	103
1125	79	36.8	51.3	53.7	47.3	9.1	104
1128	80	16.7	0.0	27.4	14.7	13.8	50
1130	81	0.0	5.6	16.5	7.4	8.4	101
1131	82	11.0	8.9	5.0	8.3	3.0	176
1134	83	22.6	19.6	2.8	15.0	10.7	82
1137	85	66.7	33.3	0.0	33.3	33.4	11
1139	86	0.0	32.4	10.4	14.3	16.5	50
1141	88	31.5	41.1	19.5	30.7	10.8	125
1143	89	2.6	0.0	5.9	2.8	3.0	119
1144	90	22.2	16.7	0.0	13.0	11.6	22
1148	91	57.4	26.5	30.8	38.2	16.7	70
1150	92	11.9	6.7	9.8	9.5	2.6	92
1151	93	8.3	5.6	10.0	8.0	2.2	51
1155	94	75.0	50.0	100.0	75.0	25.0	6
1157	95	11.1	15.9	27.0	18.0	8.2	121
1158	96	53.3	35.6	26.4	38.4	13.7	69
1159	97	16.7	9.1	11.1	12.3	3.9	89
1162	98	0.0	8.3	6.7	5.0	4.4	49
1163	99	66.8	45.7	32.0	48.2	17.5	100
1165	100	11.7	0.0	25.8	12.5	12.9	95
1169	101	26.7	16.7	17.8	20.4	5.5	45
1171	103	41.7	61.1	36.1	46.3	13.1	32
1174	104	0.0	66.7	33.3	33.3	33.4	19
1177	106	36.1	13.9	27.5	25.8	11.2	42
1180	107	21.9	14.5	34.2	23.5	10.0	104
2283	108	30.5	11.1	11.1	17.6	11.2	80
1188	110	26.9	33.1	17.5	25.8	7.9	88

© Liliana M. Dávalos 1997

1189	111	61.9	31.0	12.3	35.1	25.0	74
1191	113	61.7	36.9	30.5	43.0	16.5	75
1193	114	12.3	14.6	23.5	16.8	5.9	90
1194	115	61.9	35.6	32.8	43.4	16.1	67
1199	116	18.5	16.7	0.0	11.7	10.2	18
1203	117	100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	8
1204	118	0.0	100.0	100.0	66.7	57.7	12
1206	119	0.0	100.0	100.0	66.7	57.7	9
1209	120	21.7	16.7	38.9	25.8	11.6	27
1214	122	nd	75.0	100.0	87.5	17.7	7
1215	123	28.1	46.8	47.2	40.7	10.9	56
1217	124	62.5	52.8	75.0	63.4	11.1	27
1218	125	47.8	0.0	27.8	25.2	24.0	21
1226	127	41.7	56.0	35.6	44.4	10.5	43
1227	128	11.1	11.1	0.0	7.4	6.4	30
1228	129	0.0	12.5	25.1	12.5	12.6	52
1229	130	100.0	38.9	60.0	66.3	31.0	22
1231	131	41.7	50.0	22.2	38.0	14.3	43
1237	132	83.3	14.8	8.3	35.5	41.6	32
1238	133	14.3	0.0	33.3	15.9	16.7	15
1245	134	100.0	83.3	50.0	77.8	25.5	11
Fanny		19.8	27.3	18.5	21.9	4.8	150
OL 5		19.8	21.8	5.1	15.6	9.1	222
Col 1		9.2	9.3	10.4	9.63	0.7	305
BB50		100.0	100.0	100.0	100.0	0.0	228
Cica8		97.9	97.8	93.3	96.3	2.6	168

nd =no hay dato.

© Liliana M. Dávalos 1997

Anexo 3. Resultados completos 2do. ensayo de Evaluación de Resistencia.

		Porcentajes de Infección					
Línea		muestra1	muestra2	muestra3	Promedio	desv.std.	no. plantas
1008	9	3.57	8.70	24.0	12.1	10.6	76
1051	13	20.00	16.00	6.3	14.1	7.1	51
1027	20	6.67	0.00	1.8	2.8	3.5	149
1036	26	30.00	0.00	35.3	21.8	19.0	34
1048	34	17.39	20.00	21.1	19.5	1.9	67
1050	36	73.33	100.00	66.7	80.0	17.6	34
1068	48	15.38	7.69	0.0	7.7	7.7	29
1084	55	6.82	2.27	3.6	4.2	2.3	116
1097	63	30.77	5.56	11.8	16.0	13.1	48
1099	64	13.16	19.15	5.4	12.6	6.9	122
1105	67	18.92	7.32	11.6	12.6	5.9	121
1109	70	12.00	5.00	8.7	8.6	3.5	113
1113	73	40.00	0.00	0.0	13.3	23.1	10
1120	76	4.35	25.00	4.2	11.2	12.0	95
1125	79	22.22	17.14	21.6	20.3	2.8	45
1135	84	5.88	5.41	13.9	8.4	4.8	107
1137	85	12.50	5.26	4.3	7.3	4.5	133
1139	86	5.26	15.38	33.3	18.0	14.2	44
1140	87	5.41	26.67	11.1	14.4	11.0	112
1144	90	25.00	15.79	8.8	16.5	8.1	69
1151	93	0.00	10.00	7.1	5.7	5.2	40
1155	94	0.00	0.00	0.0	0.0	0.0	6
1162	98	5.56	10.53	0.0	5.4	5.3	56
1169	101	3.23	0.00	17.6	7.0	9.4	70
1170	102	100.00	81.25	100.0	93.8	10.8	33
1171	103	21.21	9.09	10.0	13.4	6.8	127
1174	104	3.23	23.08	10.5	12.3	10.0	63
1176	105	25.00	8.70	31.6	21.8	11.8	58
1177	106	0.00	28.57	50.0	26.2	25.1	11
1190	112	54.17	27.27	14.7	32.0	20.2	91
1199	116	14.29	17.50	4.3	12.0	6.9	100
1203	117	0.00	10.53	17.6	9.4	8.9	47
1204	118	3.33	2.67	0.0	2.0	1.8	193
1206	119	60.87	36.00	70.8	55.9	17.9	72
1209	120	7.41	0.00	0.0	2.5	4.3	75
1211	121	6.67	6.67	0.0	4.4	3.8	56
1214	122	2.78	10.81	0.0	4.5	5.6	98
1217	124	9.09	26.32	25.9	20.4	9.8	68
1218	125	5.97	3.03	9.8	6.3	3.4	151
1224	126	29.41	34.29	9.7	24.5	13.0	100
1226	127	20.00	14.29	8.8	14.4	5.6	143
1227	128	0.00	9.09	2.4	3.8	4.7	139
1229	130	5.17	8.57	7.5	7.1	1.7	146
1231	131	10.00	0.00	3.9	4.6	5.0	152
1237	132	13.89	23.08	37.5	24.8	11.9	110
1238	133	11.76	20.00	31.3	21.0	9.8	86

© Liliana M. Dávalos 1997

1245 134	26.83	31.43	81.6	46.6	30.4	114
Fanny	30.00	14.29	22.2	22.2	7.9	33
Col 1	6.67	5.06	3.0	4.9	1.8	236
BB50	100.00	100.00	96.6	98.9	2.0	100
Cica8	100.00	100.00	98.2	99.4	1.0	173

© Liliana M. Dávalos 1997

Glosario de siglas y abreviaturas

α32dATP: deoxiadenosine triphosphate, marcado en el fosfato α con fósforo 32.
ADN: ácido desoxiribonucleico
AFLP: amplified fragment length polymorphism
ARN: ácido ribonucleico
BSA: bovine serum albumin
cADN: ADN complementario o ADN copia
dTTP: deoxythymidine triphosphate
EDTA: ethyenediamintetraacetic acid
ELISA: enzyme linked inmunosorbent assay
EWSMV: european wheat striate mosaic virus
F(número): generación filial
i.e.: in extensio
Lod: logaritmo del cociente de la probabilidad que la correlación entre dos marcadores ocurra por ligamiento sobre la probabilidad que ocurra por eventos aleatorios.
MStV o MSV: maize stripe tenuivirus
mARN: ARN mensajero
p.e.: por ejemplo
QTL: quantitative trait loci
RAPD: random amplified polymorphic DNA
RFLP: restriction fragment length polymorphism
RGSV: rice growth stunt virus
RHBV: rice hoja blanca virus
RIL: recombinant inbred line
RStV o RSV: rice stripe tenuivirus
SDS: sodium dodecyl sulphate
SSC: sodium chloride sodium citrate
TBE: tris boric acid EDTA
UV: ultravioleta
VHB: virus hoja blanca

© Liliana M. Dávalos 1997