

**RECUPERACIÓN DEL GENOMA DEL PADRE RECURRENTE
EN UN PROGRAMA DE RETROCRUZAS ASISTIDO
POR MARCADORES EN ARROZ**

Erika Arnao, Orangel Borges, Catalina Ramis, Antonio Díaz e Iván Galindo

RESUMEN

La *piricularia* (*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.) es una de las enfermedades más destructivas del arroz a nivel mundial. El uso de cultivares resistentes es la vía más efectiva y económica de controlar la enfermedad. El método de la retrocruza es el más empleado para la incorporación de genes simples de resistencia. Sin embargo, el proceso se dificulta cuando existe ligamiento de estos genes con características indeseables, el cual puede ser difícil de romper, aún después de muchas generaciones de retrocruzas. La selección asistida por marcadores (SAM) contribuye a facilitar la recuperación del genoma del padre recurrente (PR) en un menor número de generaciones. El objetivo del presente estudio fue la recuperación del genoma del PR utilizando marcadores moleculares en generaciones tempranas de un programa

de retrocruzas para la incorporación de un gen de resistencia a *P. grisea*. En los parentales se evaluaron 36 microsátélites ubicados en los 12 cromosomas del arroz; aquellos que mostraron polimorfismo se evaluaron en plantas de las generaciones RC_2F_2 y RC_3F_1 . La SAM permitió identificar plantas 100% similares al PR para los loci evaluados en ambas generaciones de retrocruzas; sin embargo, la proporción fue mayor en la RC_3F_1 que en RC_2F_2 . Se identificaron regiones cromosómicas candidatas en los cromosomas 4 y 7 para la futura identificación del gen de resistencia incorporado. La aplicación de SAM en el programa de retrocruzas permitió la recuperación del genoma del PR en pocas generaciones, reduciendo el tiempo necesario en el proceso de mejoramiento para incorporar resistencia a *piricularia*.

Introducción

El arroz (*Oryza sativa* L.) constituye la base alimenticia para gran parte de la población mundial, siendo el cereal más cultivado después del trigo y el tercero en producción (FAO, 1993). Este

cultivo se ve amenazado por numerosas enfermedades y problemas causados por agentes bióticos y por factores abióticos (Castaño, 1985). Dentro de éstas, la enfermedad conocida como *piricularia*, causada por el hongo *Pyricularia grisea* (Cooke)

Sacc., es la principal limitante de la producción a nivel mundial (Ou, 1985).

El empleo de variedades resistentes y la aplicación de fungicidas son los principales métodos de control de la enfermedad usados actualmente. Sin embargo, el uso de fun-

gicidas no siempre es económico ni deseable para el medio ambiente y la resistencia de las variedades comerciales ha sido de poca duración, entre otras razones, por el surgimiento de nuevas razas del hongo compatibles con los genes de resistencia de los

PALABRAS CLAVE / Microsátélites / Piricularia / Resistencia / SAM /

Recibido: 10/11/2004. Modificado: 21/03/2006. Aceptado: 07/04/2006.

Erika A. Arnao T. Ingeniero Agrónomo y Magíster en Agronomía, Universidad Central de Venezuela (UCV). Investigador, Fundación para la Investigación Agrícola Danac, Venezuela. Dirección: Fundación Danac, Apartado Postal 182, San Javier-vía Guarataro, Edo. Yaracuy, Venezuela. e-mail: earnao@danac.org.ve

Orangel L. Borges F. Ingeniero Agrónomo, UCV, Venezuela. M.Sc. en Agronomía y Ph.D. en Genética, University of California, Davis, EEUU. Profesor, Facultad de Agronomía, UCV, Venezuela. e-mail: oborges@cantv.net
Catalina M. Ramis J. Ingeniera Agrónoma, UCV, Venezuela. Docteur, Université de Rouen,

Francia. Profesora, Facultad de Agronomía, UCV, Venezuela. e-mail: cmcramis@yahoo.es
Antonio J. Díaz P. Ingeniero Agrónomo y Magíster en Agronomía, UCV, Venezuela. Profesor, Facultad de Agronomía, UCV, Venezuela. e-mail: adiape@cantv.net

Iván F. Galindo C. Licenciado en Biología, UCV, Venezuela. Doctor en Biología Celular, Universidad Simón Bolívar, Venezuela. Investigador, Fundación Instituto de Estudios Avanzados (IDEA), Venezuela. e-mail: igalindo@idea.org.ve

SUMMARY

Rice blast (*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.) is one of the most destructive diseases of rice world-wide. The deployment of resistant cultivars is the most effective and economic way for controlling the disease. The backcross breeding is the method most commonly used for incorporating single resistance genes. It is limited by the presence of linkage between the resistance gene and undesirable traits, which may persist even after many generations of backcrossing. Marker assisted selection (MAS) contributes to overcome the main limitation of the backcross breeding, accelerating the recovery of the recurrent parent (RP) genome. The purpose of this study was the recovery of the RP genome in early generations of backcrossing by

using molecular markers. Thirty six microsatellites located in the 12 rice chromosomes were evaluated in the parents and the polymorphic ones were evaluated in plants of the BC_2F_2 and BC_3F_1 generations. MAS allowed identification of plants which were 100% similar to the RP for the loci evaluated in both generations of backcrossing. However, the probability of finding those genotypes was greater in BC_3F_1 than in BC_2F_2 . Some chromosomal regions were identified as candidates for mapping the resistance gene in chromosomes 4 and 7. The application of MAS on this backcrossing breeding program accelerated the recovery of the RP genome, reducing the number of generations and the time for incorporating resistance to rice blast.

RESUMO

A piricularia (*Pyricularia grisea* (Cooke) Sacc.) é uma das enfermidades mais destrutivas do arroz a nível mundial. O uso de cultivares resistentes é a via mais efetiva e econômica de controlar a enfermidade. O método da retrocruzada é o mais empregado para a incorporação de genes simples de resistência. No entanto, o processo se dificulta quando existe ligamento destes genes com características indesejáveis, o qual pode ser difícil de romper, mesmo depois de muitas gerações de retrocruzadas. A seleção assistida por marcadores (SAM) contribui a facilitar a recuperação do genoma do padre recorrente (PR) em um menor número de gerações. O objetivo do presente estudo foi a recuperação do genoma do PR utilizando marcadores moleculares em gerações precoces de um programa de retrocruzadas

para a incorporação de um gene de resistência a *P. grisea*. Nos parentais se avaliaram 36 micro satélites localizados nos 12 cromossomos do arroz; aqueles que mostraram polimorfismo se avaliaram em plantas das gerações RC_2F_2 e RC_3F_1 . A SAM permitiu identificar plantas 100% similares ao PR para os loci avaliados em ambas gerações de retrocruzadas; no entanto, a proporção foi maior na RC_3F_1 que em RC_2F_2 . Se identificaram regiões cromossômicas candidatas nos cromossomos 4 e 7 para a futura identificação do gen de resistência incorporado. A aplicação de SAM no programa de retrocruzadas permitiu a recuperação do genoma de PR em poucas gerações, reduzindo o tempo necessário no processo de melhoramento para incorporar resistência a piricularia.

cultivares liberados (Correa y Zeigler, 1993; Guimarães *et al.*, 1996).

El método de mejoramiento por retrocruzadas es el más utilizado para la incorporación de genes simples de resistencia a *P. grisea*, minimizando la probabilidad de transferir características indeseables del padre donante (PD) con el gen resistencia. Una de las principales limitantes del método es que para obtener una progenie genéticamente idéntica al padre recorrente (PR), excepto para el gen a ser incorporado, son necesarias de 6 a 7 generaciones de retrocruzadas (Stam y Zeven, 1981; Tanksley *et al.*, 1989). La selección asistida por marcadores moleculares (SAM) abre muchas posibilidades a la incorporación de genes por retrocruzadas, al reducir el número de generaciones necesarias para la recuperación del genoma del PR mientras se fija el gen incorporado (Paterson, 1996).

En arroz existe un número considerable de investigadores que están comenzando a usar marcadores moleculares para

la transferencia simultánea de dos o más genes de resistencia a enfermedades importantes como lo son el añublo bacteriano causado por *Xanthomonas oryzae* pv. *oryzae* y la piricularia causada por *P. grisea*. Por ejemplo, Huang *et al.* (1997) piramidaron mediante marcadores moleculares cuatro genes (*Xa4*, *Xa5*, *Xa13* y *X21*) que confieren amplio espectro de resistencia al añublo bacteriano. Sánchez *et al.* (2000) transfirieron tres genes de resistencia a la misma enfermedad a tres líneas susceptibles que poseían características agronómicas deseables. Hittalmani *et al.* (2000) usaron la SAM para combinar los genes *Pi1*, *Piz-5* y *Pita* que confieren resistencia a piricularia en un solo genotipo.

El impacto de la SAM ha sido mayor en los programas de mejoramiento para transferir genes de resistencia mediante retrocruzadas, donde además de los marcadores ligados a genes específicos, los marcadores distribuidos en el genoma permiten la selección de plantas genética-

mente similares al PR (Young y Tanksley, 1989). Chen *et al.* (2000) usaron SAM para transferir el gen *Xa21* al cultivar "Minguini 63", un padre ampliamente usado para la producción de híbridos en China. Los marcadores permitieron seguir la presencia del gen y acelerar la recuperación del genoma de "Minguini 63". Estos estudios han demostrado la factibilidad de usar SAM para piramidar genes y acelerar los programas de mejoramiento hasta en tres generaciones de retrocruzadas, lo que se traduce en ahorro de tiempo y dinero.

El objetivo de este estudio fue acelerar la recuperación del genoma del padre recorrente, mediante la detección de plantas idénticas al PR para un conjunto de marcadores moleculares utilizados en generaciones tempranas en un programa de retrocruzadas para la incorporación de un gen de resistencia a *P. grisea*. Se caracterizó la relación entre la proporción del genoma del PR y el porcentaje de similitud fenotípica

con este padre, de tal forma de conocer cuales marcadores están asociados con genes responsables de la morfología.

Materiales y Métodos

Material Vegetal

En 1988 se inició el programa de retrocruzadas para incorporar el gen de resistencia a *P. grisea*. Como PR se usó la variedad comercial "Cimarrón", que presenta excelente calidad industrial y características agronómicas deseables; sin embargo, tiene la desventaja de ser susceptible a piricularia. Como PD se utilizó la variedad "Fonaiap 1", conocida por mostrar un amplio espectro de resistencia a *P. grisea*. El esquema de retrocruzada forma parte de un programa de mejoramiento que contempla la producción de líneas isogénicas con diferentes genes de resistencia, las cuales pueden ser utilizadas para construir pirámides de genes que ofrezcan una protección más durable a la piricularia.

Evaluación de la resistencia

Las plantas de las generaciones RC₁F₁, RC₁F₂, RC₂F₁, RC₂F₂ y RC₃F₁ fueron evaluadas por su resistencia al hongo *P. grisea*. En cada caso se seleccionaron los individuos resistentes para la obtención de la siguiente generación. Las muestras de semilla se sembraron en el invernadero en bandejas de 50x20cm y se inocularon a los 21 días después de la siembra (dds). El inóculo consistió de una suspensión de conidias (5x10⁵ conidias/cc) del aislamiento monospórico 39003 de *P. grisea*. Dicho aislamiento pertenece al linaje venezolano 1, es el de mayor frecuencia en la población del patógeno en Venezuela y ha mostrado un amplio espectro de virulencia en un grupo de cultivares diferenciadores. Ocho días después de la inoculación, se realizó la evaluación para seleccionar las plantas resistentes, utilizando la escala del IRRRI para *P. grisea*, modificada en el CIAT (Fernando J. Correa-Victoria, comunicación personal).

Evaluación molecular

Extracción y cuantificación del ADN. El número de plantas resistentes seleccionadas para las evaluaciones morfológicas y moleculares en la RC₂F₂ y RC₃F₁ fue de 123 y 185, respectivamente. En éstas se realizó la extracción del ADN utilizando el método descrito por Dellaporta *et al.* (1983) con modificaciones menores. La calidad y cantidad del ADN se verificó en geles de agarosa al 0,8%, utilizando como referencia un marcador de peso molecular conocido (ADN del bacteriófago Lambda).

Selección de iniciadores microsatélites polimórficos. Para seleccionar los microsatélites polimórficos a ser evaluados en la progenie se probaron en los parentales “Cimarrón” y “Fonaiap 1” 36 SSR ubicados en los 12 cromosomas del arroz. Cada reacción de PCR se desarrolló en un volumen

final de 20µl, el cual contenía tampón para PCR (10mM Tris-HCl, pH 8,3; 50mM KCl); 1,5mM MgCl₂; 0,325mM dNTPs; 0,2µM de cada iniciador directo y reverso; 0,5U de taq polimerasa y 20ng de ADN. La amplificación del ADN se realizó en un termociclador MJ Research® modelo PT-100, bajo los siguientes perfiles de temperatura: un ciclo de desnaturalización inicial por 5min a 94°C, seguido por 34 ciclos de desnaturalización a 94°C por 45seg; 2min de alineamiento de los iniciadores a 56°C y 15seg de extensión a 72°C. Por último, se agregó un ciclo de extensión final a 72°C por 5min.

Electroforesis. Los productos amplificados fueron sometidos a electroforesis en geles de agarosa al 3% o poliacrilamida al 6%, dependiendo del tamaño del segmento de ADN amplificado. Se usaron marcadores de talla molecular para establecer el tamaño (pb) de los diferentes alelos. Una vez realizada la electroforesis se procedió a la tinción con bromuro de etidio (geles de agarosa) o nitrato de plata (geles de poliacrilamida) usando el kit Promega (SILVER SEQUENCE™). Estos últimos se dejaron secar por 24h para proceder a examinarlos y registrar la información.

Evaluación de los microsatélites en la progenie. Los iniciadores que generaron polimorfismo en los padres fueron evaluados en la progenie. La amplificación del ADN y la electroforesis se realizaron bajo las condiciones previamente estandarizadas. La información de los microsatélites en la progenie incluyó la caracterización genética. Cada locus microsatelital se registró en una matriz con una fila para cada individuo y una columna para cada locus. Se consideraron homocigotos aquellos individuos que presentaron una sola banda idéntica a la de uno de los padres y heterocigotos los que presentaron las dos bandas, re-

gistrándose tres genotipos: AA= homocigotos para el padre recurrente “Cimarrón”, AB= heterocigotos, y BB= homocigotos para el padre donante “Fonaiap1”.

Evaluación morfológica

Para detectar alguna relación entre los individuos seleccionados por presentar una mayor proporción del genoma del GPR y el fenotipo característico de la variedad, las plantas resistentes seleccionadas se transplantaron al campo para realizar la evaluación fenotípica planta a planta, en hileras de 3m de largo, con una distancia de siembra de 30cm entre hileras y 25cm entre plantas. Se sembraron cuatro hileras del PR “Cimarrón” cada 10 hileras para fines de comparación. Las mediciones se realizaron en cada planta utilizando descriptores varietales que incluyeron número de macollos, días a floración, altura de la planta y longitud de la hoja bandera. También se evaluó el aspecto general de la planta en comparación con “Cimarrón” mediante una escala de 1 a 3, donde 1, 2 y 3 corresponden a muy parecido, moderada-

mente parecido y ningún parecido a cimarrón, respectivamente.

Análisis de resultados

Se utilizó el programa GGT (Van Beerlo, 1999) para cuantificar en los individuos de la RC₂F₂ y RC₃F₁ la proporción del GPR. Se obtuvo una representación gráfica de las regiones cromosómicas evaluadas, tanto por grupo de ligamiento como por individuos, así como las estadísticas acerca de la proporción del genoma que provino de cada padre. Los individuos con mayor proporción del PR fueron seleccionados y usados como padres de la siguiente generación.

De acuerdo al esquema de cruzamiento, se esperó para cada marcador independiente del gen de resistencia las proporciones genotípicas 13/16AA : 2/16AB : 1/16BB en RC₂F₂ y 7/8AA : 1/8AB en la RC₃F₁ (Figura 1). Para verificar si cada marcador SSR se ajustaba a la segregación esperada, se estimó la frecuencia genotípica observada y su intervalo de confianza (IC), asumiendo una distribución binomial. Se probó si la pro-

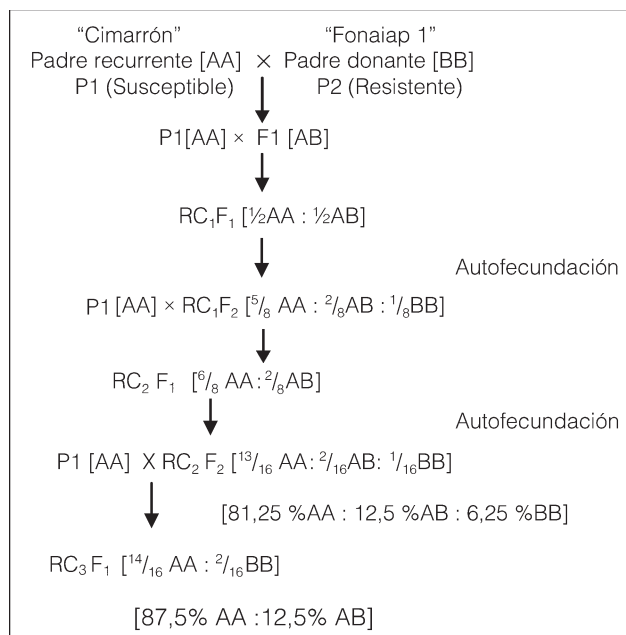


Figura 1. Esquema de segregación de un marcador molecular independiente del gen para resistencia a *P. grisea*, en un programa de retrocruzamiento con el PR “Cimarrón” asistido por marcadores moleculares.

TABLA I
 PORCENTAJES DE INDIVIDUOS HOMOCIGOTOS Y HETEROCIGOTOS SEGÚN
 LA SEGREGACIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN LAS GENERACIONES
 RC₂F₂ Y RC₃F₁ DEL CRUCE ENTRE LOS CULTIVARES “CIMARRÓN” Y “FONAIAP 1”

Marcador	Ubicación Crom	Tamaño Min	Tamaño Máx	RC ₂ F ₂ 123 individuos			RC ₃ F ₁ 185 individuos		
				AA	AB	BB	AA	AB	BB
RM221	2	187	193	100	0	0	100	0	0
RM207	2	71	139	100	0	0	100	0	0
RM263	2	158	198	100	0	0	100	0	0
RM185	4	195	200	26,02	24,39	48,78	59,46	40,54	0
RM334	5	125	150	60,16	32,52	6,504	85,95	14,05	0
RM111	6	90	110	100	0	0	100	0	0
RM400	6	175	200	100	0	0	100	0	0
RM70	7	125	200	51,22	27,64	12,2	81,62	18,38	0
RM248	7	90	95	68,29	13,01	11,38	87,57	12,43	0
RM11	7	120	145	52,85	34,96	11,38	60	40	0
RM346	7	140	175	32,52	55,28	11,38	76,76	23,24	0
RM72	8	130	140	90,24	4,87	1,62	96,76	1,08	2,16
RM310	8	60	90	98,37	1,62	0	96,76	3,24	0
RM242	9	190	195	100	0	0	100	0	0
RM296	9	120	125	84,55	5,69	8,94	82,16	17,84	0
RM228	10	100	105	99,19	0,81	0	98,38	1,62	0
RM216	10	210	260	98,37	1,63	0	99,46	0,54	0
RM144	11	214	255	100	0	0	100	0	0
RM224	11	175	190	100	0	0	100	0	0
RM332	11	155	160	100	0	0	100	0	0
RM17	12	162	184	100	0	0	100	0	0

AA: porcentaje de individuos homocigotos para el PR, AB: heterocigotos, y BB: porcentaje de individuos homocigotos para el PD.

porción teórica quedaba incluida dentro del intervalo de confianza, donde su aceptación sugeriría una segregación no sujeta a selección alguna.

Para estimar la relación de los individuos seleccionados por presentar mayor porcentaje de similitud genotípica (PSG) con cimarrón y las variables morfológicas, las variables cuantitativas número de macollos, días a floración, altura de la plantas y longitud de la hoja bandera fueron analizadas por métodos paramétricos. Para ello se calculó el IC para cada variable con una confianza de 95%. Considerando los IC de cada variable se formaron dos clases, una para los individuos cuyo valor de la variable esta incluida dentro del IC y otra para los individuos donde el valor de la variable estaba excluido. Se realizó el análisis de las varianzas aplicando una prueba de t normal cuando las variables cumplían con el supuesto de normalidad y una prueba de t aproximada cuando las variables violaron dicho supuesto. Se utilizó el

programa estadístico SAS para estos análisis.

Para medir el grado de asociación de las variables morfológicas con los marcadores moleculares se estimó la correlación de una medida de distancia fenotípica entre cada individuo y el PR *versus* el PSG. La distancia fenotípica se basó en la distancia euclídeana obtenida a partir de las variables estandarizadas, según el programa NTSYS (versión 2.0)

Resultados y Discusión

De los 36 iniciadores evaluados en los parentales solo 21 (58,33%) resultaron polimórficos; dichos iniciadores se encuentran distribuidos en casi todos los cromosomas del arroz excepto de los cromosomas 1 y 3 (Tabla I).

En promedio, el porcentaje de individuos homocigotos para el PR aumentó de la RC₂F₂ (83,84%) a la RC₃F₁ (91,66%) como era de esperarse por la continua introducción en la población de alelos del PR. En la RC₂F₂, el

cando que la mayoría de los alelos del PR ya habían sido fijados en la RC₂F₂. Por otro lado, los iniciadores que segregaron presentaron un comportamiento un poco diferente al esperado en cada generación de retrocruza. En las generaciones RC₂F₂ y RC₃F₁ las proporciones esperadas de los loci de individuos homocigotos para el PR deberían ser 0,81 y 0,875, respectivamente (Figura 1). Quizás la desviación en la segregación observada, con respecto al esperado, se debió al bajo número de individuos escogidos para realizar los cruces, el cual fue de 30 y 20 para la obtención de la RC₂F₁ y RC₃F₁, respectivamente.

Los intervalos de confianza calculados para cada marcador en ambas retrocruzas no mostraron solapamiento entre ellos (Tabla II), lo cual indica un aumento significativo en el porcentaje de individuos similares al PR de la RC₂F₂ a la RC₃F₁, exceptuando los marcadores RM72, RM310, RM296, RM228 y RM216 donde el aumento no fue significativo. En la RC₂F₂ la mayoría de los individuos ya tenían esos alelos fijados para el PR, manteniéndose esta tendencia en la RC₃F₁. El marcador RM11 localizado en el cromosoma 7 tampoco mostró un aumento significativo en la recuperación del PR de una generación de retrocruza a otra y al observar el porcentaje de homocigotos para el PR se evidencia una ten-

1,62% de las plantas evaluadas presentaron 100% de similitud con el PR para los marcadores evaluados, mientras que en RC₃F₁ el porcentaje fue 11,35%. La mayoría de los individuos mostraron entre 80,95 a 85,71 y 85,7 a 90,48% de similitud en la RC₂F₂ y RC₃F₁, respectivamente (Figura 2).

De los 21 iniciadores polimórficos evaluados en las progenies (RC₂F₂ y RC₃F₁), 11 resultaron ser homocigotos para el PR en todos los individuos analizados, indi-

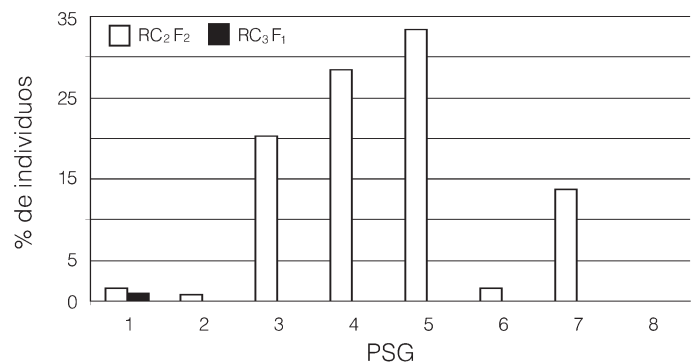


Figura 2. Frecuencia de individuos relacionados al porcentaje de similitud genotípica (PSG) con el padre recurrente “Cimarrón”.

TABLA II
INTERVALOS DE CONFIANZA PARA EL PORCENTAJE
DE INDIVIDUOS HOMOCIGOTOS PARA EL PR EN LAS
GENERACIONES DE RETROCRUZA RC₂F₂ Y RC₃F₁

Marcador	RC ₂ F ₂ (123 Individuos)		RC ₃ F ₁ (185 Individuos)		5% ^c
	AA ^a	IC ^b	AA ^a	IC ^b	
	RM 185	26,02	18,2-33,37	59,40	
RM 334	60,16	51,5-68,8	85,95	80,9-90,9	*
RM 70	51,22	42,3-60,0	81,62	76,0-87,2	*
RM 248	68,29	60,0-76,5	87,57	82,8-92,3	*
RM 11	52,85	44,0-61,6	60,00	52,9-67,0	n.s
RM 346	32,52	24,2-40,7	76,76	70,6-82,8	*
RM 72	90,24	85,0-95,4	96,76	94,2-99,3	n.s
RM 310	98,37	96,1-100	96,76	94,2-99,3	n.s
RM 296	84,55	78,1-90,9	82,16	76,6-87,6	n.s
RM 228	99,19	97,5-100	98,38	96,5-100	n.s
RM 216	98,37	96,1-100	99,34	94,8-100	n.s

a: % de individuos homocigotos para el PR detectados por el marcador; b: intervalo de confianza; c: significación al 5%; *: significativo; n.s.: no significativo.

dencia del marcador hacia el PD.

En este tipo de estudio es conveniente utilizar un mayor número de marcadores para realizar una cobertura más completa del genoma. Cuando el número de marcadores es limitado, la selección es más eficiente en etapas tempranas (RC₁ y RC₂), donde los marcadores están ligados a grandes bloques de genes, permitiendo cubrir una mayor proporción del genoma. Lo contrario ocurre en generaciones avanzadas donde el entrecruzamiento rompe el ligamiento, disminuyendo cada vez más la proporción monitoreada por el marcador.

Possible asociación de los marcadores con el gen de resistencia incorporado

La alta proporción de heterocigotos encontrada en RC₂F₂ y RC₃F₁ para algunos marcadores revela una posible asociación con el gen de resistencia transferido. Los marcadores RM70, RM11 y RM346, ubicados en el cromosoma 7, presentaron estadísticamente una mayor proporción de heterocigotos que la esperada (12,5%) en la RC₃F₁ (Tabla I). Es posible que el gen de resistencia se encuentre en el cromosoma 7 y que esa tendencia hacia el PD sea debido al ligamiento

de estos marcadores con genes de resistencia del PD, efecto conocido como "arrastre genético" o *linkage drag*. El marcador RM11 fue el que mostró una mayor proporción de heterocigotos en la RC₃F₁, por lo que posiblemente este marcador se encuentre más próximo al gen de resistencia. Además, se observa que a medida que los marcadores están más cercanos del centrómero hay una tendencia a aumentar la proporción de heterocigotos y a disminuir la de homocigotos para el PR, por lo que pudiera sugerirse la ubicación del gen de resistencia cercana a la región centromérica del cromosoma siete (Figura 3). El comportamiento de tres de los cuatro marcadores evaluados en el cromosoma 7 (Figura 3) segregando en las retrocruzas RC₂F₂ y RC₃F₁ apoyan ésta hipótesis, ya que la tasa de retorno hacia el genotipo del PR es menor en el cromosoma portador del gen, que en los cromosomas no portadores (Hospital, 2002).

La información generada en el presente trabajo es un primer paso para conocer la ubicación del gen y su manipulación en los programas de mejoramiento. Los marcadores ligados al gen facilitarían el desarrollo de líneas isogénicas, paso necesario para la formación de pirámides de

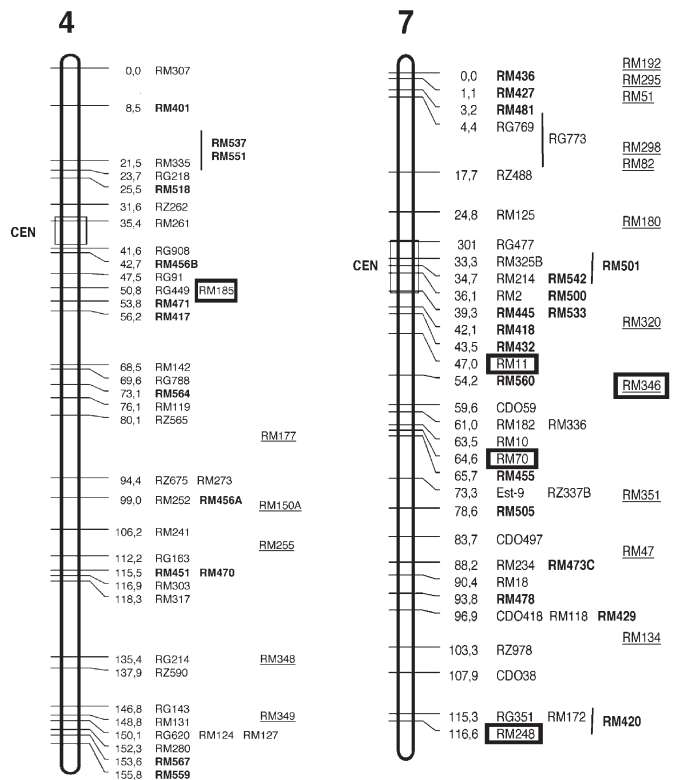


Figura 3. Cromosomas 4 y 7 con la ubicación de los marcadores microsatélites (recuadros) evaluados en plantas de la RC₂F₂ y RC₃F₁. Fuente: <http://ars-genome.cornell.edu/rice/>.

genes como una estrategia efectiva en la búsqueda de resistencia durable a *P. grisea*. Sin embargo; en este caso, los estudios de ubicación del gen serían complejos por la existencia de una región en otro cromosoma con las mismas características. El marcador RM185, ubicado en el cromosoma 4, presentó un comportamiento similar al RM11, RM70 y RM346, indicando la posibilidad de otro gen de resistencia, no evidenciado en las generaciones segregantes de estudios previos.

De ser posible la identificación de marcadores asociados a un gen de resistencia en "Fonaiap 1", sería factible utilizar la estrategia propuesta por Chen *et al.* (2000) para maximizar la eficiencia de la SAM, en la cual se debe realizar la selección en dos generaciones de retrocruzas. En la RC₁F₁ se debería seleccionar recombinantes para uno de los marcadores flanqueantes al gen y en la RC₂F₁ seleccionar recombinantes para el otro marcador

flanqueante, con el fin de minimizar el arrastre genético. Luego, seleccionar los individuos doble recombinantes por "background", es decir con marcadores ubicados en los cromosomas no portadores del gen para recuperar el genoma del PR. Si se asume una distancia de 1cM entre ambos marcadores flanqueantes y el gen en la primera generación de retrocruza se esperaría que la frecuencia de que ocurra una recombinación en alguno de los lados sea de 2%. De modo que se necesitarían solo 50 individuos en la RC₁F₁ para seleccionar un individuo recombinante entre el gen y uno de los marcadores y 100 individuos para obtener un individuo recombinante en el otro marcador en la RC₂F₁.

Asociación de los marcadores moleculares con los caracteres morfológicos

De las cuatro variables morfológicas cuantitativas evaluadas, solo el macolla-

TABLA III
VALORES DE LAS PROBABILIDADES DEL ANÁLISIS DE INTERVALOS DE CONFIANZA PARA LAS VARIABLES MORFOLÓGICAS Y LA VARIABLE PSG CON “CIMARRÓN”

Variable	RC ₂ F ₂			RC ₃ F ₁		
	PSG			PSG		
	Clase Sí ¹	Clase No ²	P	Clase Sí ¹	Clase No ²	P
Macollamiento	84,1821	83,928	0,8978	89,7243	92,3611	0,0186
Floración	85,7142	84,0862	0,6155	91,6219	92,0634	0,5739
Altura de planta	88,8888	84,0476	0,0849	92,3541	91,3611	0,2011
Longitud de HB	84,9420	83,8316	0,2614	91,1564	91,9576	0,3589

¹ Clase Sí: Medias de los individuos incluidos en intervalo de confianza, estadísticamente iguales a “cimarrón” en morfología. ² Clase No: medias de los individuos excluidos del intervalo de confianza, estadísticamente distintos a “cimarrón” en morfología. $\alpha=0,05$.

miento en la RC₃F₁ presentó cierta asociación con el % de similitud genotípica con el PR (Tabla III). Ello indica que con estos marcadores un mayor % de similitud con el PR está asociado con un mayor número de macollos. El macollamiento (número de macollos) es considerado una de las características morfológicas más importantes del cultivar “Cimarrón”, por lo que este hecho es ventajoso para acelerar la recuperación del PR.

Los coeficientes de correlación de Pearson de 0,05120 y 0,0098 para la RC₂F₂ y RC₃F₁, respectivamente, no mostraron asociación alguna entre el PSG con el PR y la distancia euclidiana calculada a partir de las variables morfológicas. Esto indica que las plantas con mayor PSG con el PR no necesariamente presentan una mayor similitud fenotípica. El número de marcadores utilizados en este es-

tudio pudo afectar la significación de las correlaciones con el fenotipo. Un bajo número de marcadores disminuye la probabilidad de que puedan estar ligados a los genes que condicionan los caracteres morfológicos evaluados; por lo tanto, no reflejan las variaciones que éstos presentan. Además, el efecto ambiental en las evaluaciones fenotípicas posiblemente disminuyó la capacidad de la prueba de detectar estas correlaciones, ya que las evaluaciones fueron realizadas en parcelas sin repeticiones, especialmente por tratarse de características seguramente bajo un control poligénico.

REFERENCIAS

Castaño A (1985) Principales enfermedades del arroz y su control en América Latina. En *Arroz: Investigación y Producción*. CIAT. Cali, Colombia. pp. 567-597.

Chen S, Lin X, Xu C, Zhang Q (2000) Improvement of bacterial blight resistance of “Minghui 63”, an elite restorer line of hybrid rice, by molecular marker assisted selection. *Crop Sci.* 40: 239-244.

Correa-Victoria FJ, Zeigler RS (1993) Pathogenic variability in *Pyricularia grisea* at a rice blast “hot spot” breeding site in Eastern Colombia. *Plant Dis.* 67: 1029-1035.

Dellaporta S, Wood T, Hicks T (1983) A plant DNA mini preparation: Version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21

FAO (1993) *Anuario Estadístico N° 42*. pp. 118-119.

Guimarães E, Ospina Y, Correa-Victoria F (1996) Empleo del concepto de linajes de *Pyricularia grisea* para escoger germoplasma de arroz resistente. *Rev. Fitopatol. Venez.* 9: 2-6.

Hittalmani S, Parco A, Mew TV, Zeigler RS, Huang N (2000) Fine mapping and DNA marker-assisted pyramiding of the three major genes for blast resistance in rice. *Theor. Appl. Genet.* 100: 1121-1128

Hospital F (2002) Marker-assisted Backcross Breeding: A Case-

Study in Genotype Building Theory. En Kang S (Ed.) *Quantitative Genetics, Genomics, and Plant Breeding*. CAB. Wallingford, RU. pp. 135-141

Huang N, Angeles ER, Domingo J, Magpantay G, Singh S, Zhang G, Kumaravadivel N, Bennett J, Krush GS (1997) Pyramiding of bacterial blight resistance genes in rice: Marker-assisted selection using RFLP and PCR. *Theor. Appl. Genet.* 95: 313-320

Ou S (1985) *Rice Diseases*. 2ª ed. Commonwealth Agricultural Bureaux. Wallingford, RU. 660 pp.

Paterson A (1996) DNA marker-assisted crop improvement. En Paterson A (Ed.) *Genome Mapping in Plants*. Landes Bioscience. Austin, TX, EEUU. pp. 72-83.

Sánchez AC, Brar DS, Huang N, Li Z, Khush GS (2000) Sequence tagged site marker-assisted selection for three bacterial blight resistance genes in rice. *Crop Sci.* 40: 792-797.

Stam P, Zeven C (1981) The theoretical proportion of the donor genome in near-isogenic lines of self-fertilizers bred by backcrossing. *Euphytica* 30: 227-238.

Tanksley S, Young N, Paterson A, Bonierbale M (1989) RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology* 7: 257-263.

Young N, Tanksley S (1989) RFLP analysis of the size of chromosomal segments retained around the tm² locus of tomato during backcross breeding. *Theor. Appl. Genet.* 77: 353-359.

Van Berloo R (1999) GGT: software for the display of graphical genotypes. *J. Heredity* 90: 328-329.