

Tesis de Posgrado

Mapeo y caracterización de marcadores moleculares asociados al brotado pre-cosecha en sorgo granífero

Lijavetzky, Diego C.

1996

Tesis presentada para obtener el grado de Doctor en Ciencias Biológicas de la Universidad de Buenos Aires

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en digital.bl.fcen.uba.ar. Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in digital.bl.fcen.uba.ar. It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Lijavetzky, Diego C.. (1996). Mapeo y caracterización de marcadores moleculares asociados al brotado pre-cosecha en sorgo granífero. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2893_Lijavetzky.pdf

Cita tipo Chicago:

Lijavetzky, Diego C.. "Mapeo y caracterización de marcadores moleculares asociados al brotado pre-cosecha en sorgo granífero". Tesis de Doctor. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 1996. http://digital.bl.fcen.uba.ar/Download/Tesis/Tesis_2893_Lijavetzky.pdf

EXACTAS UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



UBA

Universidad de Buenos Aires

Universidad de Buenos Aires
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Mapeo y caracterización
de marcadores moleculares asociados al
brotado pre-cosecha en sorgo granífero**

Trabajo de tesis para optar al grado de
Doctor en Ciencias Biológicas.

Ing. Agr. Diego C. Lijavetzky

Director: Dr. Horacio Esteban Hopp

1996

Lugar de trabajo: Instituto de Biotecnología, CICV, INTA Castelar.

#2893

1/2

AGRADECIMIENTOS

Después de más de cuatro años haciendo una tesis, compartiendo cosas con tanta gente, dentro y fuera del laboratorio, son muchas las personas a la que quiero agradecer y diversos los motivos...

...a Esteban Hopp mi director, por haberme posibilitado desarrollar este proyecto con toda libertad, apoyándome, resolviendo cuanto problema pudo y teniendo, como siempre, más confianza en uno que uno mismo.

...a Jorge Dubcovsky porque fue una fuente inagotable de respuestas, ideas y algunas preguntas. Desafortunadamente para él, yo fui una inagotable fuente de preguntas.

...a Susana, porque fue con quien empecé a "pipetiar" y desde ese momento pasamos casi todo juntos.

...a Dario Bernacchi, porque fue un verdadero salvavidas cuando yo naufragaba por los "QTL analysis".

...a Carolina, porque empezó ayudándome con unos "rapids" y le gustó tanto que hizo como mil.

...a Marce, porque me socorrió cuando me estaba quedando bizco de pelar semillitas y a Sergio, porque para bien y para mal, trajo el "Dig".

...a la Cátedra de Cerealicultura de Facultad de Agronomía (Roberto y Haydeé), por los materiales y la foto.

...al CONICET, por las becas de investigación.

...al INTA, que a través del Dr. Palma, me dio el apoyo institucional y espacio para desarrollar esta tesis, incluyendo al personal técnico y administrativo.

...a Fernanda, Paulita, Mariana, Magda y Daniel, que mucho hicieron por molecularizar a este ingeniero.

...a Osvaldo, Ale E., Lela y Angel, porque me resolvieron más de un problema.

...a Dani y Ceci V., porque algo sospechaban.

...a Osky, porque "es un grande"...

...a Ceci T., Pauli, Laura B., Silvito, y Fabi, porque me sufrieron pero no me llegaron a matar.

...a Ale y Analía, por el viaje tan lindo que vamos a compartir.

...a los que fueron llegando, Fernando, Eleonora, Laura M., Sebas, Juan Carlos, Ana Rosa, Mercedes...

...a Erika, Dino, Marisa, Alicia Al., Alicia Ar., Nilda y los que me olvido, que también compartieron estos años.

...a todos, porque me divertí muchísimo.

...a Adalberto Maniatis, porque como yo, todos lo consultamos a él, pero citamos a Sambrook.

...a Dalia, porque gracias a ella llegué al INTA y junto a Ernes, Guille y Fer, estuvieron siempre apoyándome.

...a papu, "porque me place".

...a mi mamá, mis hermanos, Marcela y mis sobrinos, porque son mi familia. A mi papá.

...a Magda, por todo lo hizo para que yo pudiera terminar esta tesis (hasta el último segundo) y porque es mi amiga, mi compañera y la fuerza que me mueve. Porque pase lo que pase, ella está a mi lado, y eso me permite seguir.

INDICE

RESUMEN	3
RESUMEN EN INGLES (ABSTRACT)	4
INTRODUCCION	5
HIPOTESIS Y OBJETIVOS	23
MATERIALES Y METODOS	24
1. CONSTRUCCION DE LAS POBLACIONES A ESTUDIAR	24
2. DETERMINACION DE LA REACCION AL BROTADO PRE- COSECHA.....	26
3. EXTRACCION DE ADN.....	28
4. ANALISIS DE RFLPs.....	29
4.1 Detección de sondas informativas.....	29
4.2 Mapeo de los marcadores RFLPs	32
5. ANALISIS DE RAPDs	33
5.1 Determinación de "primers" informativos.....	33
5.2 Mapeo de los marcadores RAPDs.....	35
6. ANALISIS DE AFLPs	35
6.1 Digestión - ligación.....	35
6.2 Amplificaciones.....	37
6.2.1 Pre-amplificación	37
6.2.2 Amplificación selectiva	38
6.3 Análisis en geles de poliacrilamida - Mapeo de los marcadores AFLPs	39
7. CONSTRUCCION DEL MAPA DEL MAPA BASICO DE SORGO	40

8. ANALISIS DE LIGAMIENTO ENTRE EL BPC Y LOS MARCADORES RFLPs, RAPDs Y AFLPs.....	42
9. TRANSFORMACION DE MARCADORES DOMINANTES A CODOMINANTES.	45
10. COMPARACIONES ENTRE EL BPC EN SORGO Y TRIGO	45
RESULTADOS	47
1. DETERMINACION DE LA REACCION AL BROTADO PRE-COSECHA.....	47
2. ANALISIS y MAPEO DE RFLPs.....	51
3. ANALISIS Y MAPEO DE RAPDs.....	57
4. ANALISIS Y MAPEO DE AFLPs	61
5. CONSTRUCCION DEL MAPA DEL MAPA BASICO DE SORGO	63
6. ANALISIS DE LIGAMIENTO ENTRE EL BPC Y LOS MARCADORES RFLPs, RAPDs y AFLPs. (DETECCION DE QTLs)	67
7. TRANSFORMACION DE MARCADORES DOMINANTES A CODOMINANTES.	76
8. COMPARACIONES ENTRE EL BPC EN SORGO Y TRIGO ..	80
DISCUSION	81
REFERENCIAS	106

RESUMEN

El brotado pre-cosecha (BPC) es uno de los principales problemas agronómicos del sorgo granífero (*Sorghum bicolor*) en Argentina. En este trabajo se construyó un mapa de ligamiento analizando la segregación de 112 marcadores moleculares (RFLPs, RAPDs y AFLPs) en una población F_2 de 93 individuos generada por cruzamiento entre una línea resistente y una susceptible al BPC. Los marcadores se distribuyeron en 14 grupos de ligamiento, cubriendo 950 cM. Por medio del mapeo por intervalos, se localizaron 2 regiones genómicas (QTLs) con importantes efectos sobre el BPC. Los QTLs detectados presentaron comportamientos atribuibles al de genes mayores ya que explicaron conjuntamente el 83% de la variación fenotípica (R^2), mientras que cada uno en forma individual, presentó valores de R^2 de 53%, con valores de LOD de 8,77 y 4,39 respectivamente. La diferencia entre la suma de los R^2 individuales y el R^2 conjunto se explicó por la presencia de efectos epistáticos. Estos resultados fueron corroborados por el análisis de la varianza de un factor, en el cual los 2 marcadores flanqueantes de la más probable posición de cada QTL, mostraron valores significativos para la prueba de F . Los marcadores localizados estrechamente ligados a los QTLs son potencialmente utilizables en mejoramiento vegetal.

Mapping and characterization of molecular markers associated with pre-harvest sprouting in grain sorghum

ABSTRACT

One of the most important problems of the sorghum (*Sorghum bicolor*) in Argentina is the pre-harvest sprouting (PHS). A molecular linkage map was developed after the cosegregation analysis of 112 markers (RFLPs, RAPDs and AFLPs). The F₂ mapping population of 93 individuals was derived from a cross between IS 9530 (resistance to PHS) and B2 Redland (susceptible to PHS). Fourteen linkage groups were obtained spanning 950 cM. By means of interval mapping analysis two significant QTLs were detected with LOD scores of 8.77 and 4.39 respectively, suggesting they act as major genes. These two QTLs explained individually about 53% of phenotypic variance (R^2) each, but together in a two-QTLs model they explained 83% of phenotypic variance. Differences between R^2 from the one-QTL model and two-QTL model were explained by epistatic effects. These results were corroborated by one-way ANOVA in which the 2 flanking markers of the most likely positions of each QTL displayed high significant values in the F-test. Molecular markers found to be closely linked to QTLs, may be used for plant breeding purposes.

Key words: QTL, *Sorghum*, pre-harvest sprouting, molecular markers, linkage map.

INTRODUCCION

El sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench.) ($2n = 20$) pertenece a la familia de las Gramíneas, subfamilia Panicoideas, tribu Andropogóneas. Dentro de la misma tribu se encuentra el maíz (*Zea mays*) y dentro la misma subfamilia la caña de azúcar (*Saccharum* sp.). Tanto el maíz como la caña de azúcar se encuentran estrechamente relacionados a nivel genético con el sorgo (Dogget, 1988; Spriger *et al.*, 1989; Grivet, *et al.*, 1994).

El sorgo ocupa el tercer lugar en el mundo como grano destinado al consumo humano y el quinto en superficie cultivada, produciéndose anualmente 5 millones de toneladas. El potencial de sorgo como alimento (tanto humano como para ganado) reside en que puede ser cultivado económicamente en zonas semiáridas, donde no pueden producirse trigo, maíz, arroz o cebada. Al igual que otros cereales, el sorgo es una excelente fuente de almidón y harina, los que son utilizados en un amplio rango de productos industrializados (papelería, textiles, alimentos). Asimismo, se utiliza en la elaboración de bebidas, principalmente cerveza. (Palmer, 1992). En el país se cultivan anualmente 600.000 ha de sorgo granífero con un rendimiento promedio de 3500 kg/ha, mientras que las exportaciones son de aproximadamente 400.000 tn. Aproximadamente el 50% de la producción nacional de sorgo se destina a la exportación y del 50% destinado al mercado interno alrededor del 45% se utiliza en

la alimentación de ganado (10% consumo directo y 35% balanceados) (CREA, 1987).

El sorgo es un cultivo estival que por su rusticidad y mecanismos de tolerancia al estrés hídrico se adapta a zonas donde la baja disponibilidad de agua no permite el establecimiento de otros cultivos. Sin embargo, la etapa de llenado y maduración del grano (fines de verano a principios de otoño) coincide en nuestro país con condiciones de alta humedad ambiental, lo que provoca el brotado del grano previo a la cosecha (CREA, 1987; Maiti *et al.* 1985)

El brotado pre-cosecha (BPC) es uno de los problemas más importantes que presenta el cultivo de sorgo granífero. Esta alteración, que se manifiesta como la ausencia de dormición de los genotipos susceptibles, conduce a la pérdida de viabilidad de las semillas producidas y promueve la hidrólisis del almidón en el endosperma, lo que resulta no solamente en una disminución del peso del grano (y por lo tanto del rendimiento), sino también en la creación de un ambiente favorable para el ataque de hongos saprófitos (Castor y Frederiksen, 1977). Al factor climático se agregan otros como las demoras en la cosecha (falta de maquinaria, insuficiente infraestructura de almacenaje) y el costo del secado, lo que hace que muchos productores opten por esperar el secado natural en la planta. Tradicionalmente este problema fue solucionado utilizando híbridos con altos contenidos

de tanino. Pese a la ventajas agronómicas de esta sustancia, el tanino reacciona con las proteínas del grano, reduciendo el valor nutritivo (hasta 30%) y la palatabilidad del mismo.

La bases fisiológicas de la resistencia al BPC en sorgo han sido extensamente estudiadas en los últimos años comparando entre genotipos susceptibles y resistentes al BPC. Entre los primeros aspectos de este problema que fueron considerados se encuentran las correlaciones observadas entre la germinabilidad, las concentraciones endógenas de ácido absísico (ABA) y la sensibilidad de los embriones al ABA en distintos estadios del desarrollo de la semilla (Benech-Arnold *et al.*, 1991). Posteriormente, se evaluó la distinta sensibilidad al ABA de los embriones de estos genotipos, encontrándose que los genotipos susceptibles al BPC, eran 10 veces menos sensibles a la acción inhibitoria del ABA que los genotipos resistentes (Steinbach *et al.*, 1995). Por otro lado, se analizaron los efectos de las fluctuaciones de la temperatura sobre la promoción de la germinación y el desarrollo de la semilla, observándose que las temperaturas alternantes disminuían la sensibilidad al ABA de los genotipos susceptibles (Benech-Arnold *et al.*, 1995a). Asimismo, el agregado de potasio a semillas en desarrollo, mostró tener influencias sobre la germinabilidad, la concentración de ABA y la sensibilidad de los embriones (Benech-Arnold *et al.*, 1995b). Más recientemente, Steinbach *et al.* (1996) estudiaron los efectos del contenido de

giberelinas (GAs) de embriones de genotipos con distinto comportamiento frente al BPC, encontrando que los contenidos y/o la sensibilidad de los embriones a esta fitohormona, también determinaban los bajos niveles de dormición de los genotipos susceptibles.

En otros cultivos también se estudiaron distintos determinantes fisiológicos de la dormición. En trigo, se propusieron distintos los mecanismos que incrementaban la resistencia al BPC, entre los que se citan: hipersensibilidad al ABA (Walker-Simmons, 1987), niveles reducidos de α -amilasa (Bhatt *et al.*, 1976) y compuestos inhibidores de la germinación en las brácteas (Derera y Bhatt, 1980). En maíz, se aislaron mutantes con reducida sensibilidad al ABA, de las cuales la más extensamente caracterizada es *vivipararous-1* (VP1). El gen VP1 fue clonado por marcado y pescado de genes por mutagénesis de inserción con transposones ("transposon tagging") y mostró codificar un potencial activador de la transcripción (McCarty *et al.*, 1991). En *Arabidopsis* (Koornneef *et al.*, 1984) identificaron 3 loci distintos con marcada insensibilidad al ABA (*ABI1*, *ABI2* y *ABI3*), reportando que las plantas que presentaban los 3 loci mutantes simultáneamente, eran 10 veces menos sensibles a la inhibición de la germinación por parte del ABA que las plantas normales. El gen *ABI3* fue aislado por clonado posicional (Giraudat *et al.*,

1992), mostrando similitudes a nivel proteico con el gen *VP1* de maíz.

A pesar de que es conocido que existen genotipos con mayor o menor susceptibilidad al brotado pre-cosecha y con distinta duración de la dormición en el grano después de que el mismo ha alcanzado la madurez final (algunos de los cuales presentan bajos niveles de tanino), las bases genéticas de la resistencia al brotado no han recibido atención hasta el momento.

Los marcadores moleculares constituyen uno de los principales aportes de la biología molecular a la genética vegetal. Estos comprenden un variado conjunto de técnicas que permiten detectar diferencias a nivel del ADN, que incluyen desde grandes deleciones e inserciones hasta mutaciones puntuales. Los ensayos a partir de los que se generan los marcadores moleculares se dividen en dos grandes categorías:

- 1) ensayos basados en digestión del ADN con endonucleasas y posterior hibridación, fundamentalmente **RFLP** (Polimorfismos para el Largo de los Fragmentos de Restricción) (Botstein *et al.*, 1980; Tanksley *et al.*, 1989).
- 2) ensayos basados en la amplificación del ADN, representados principalmente por dos técnicas: a) **RAPD** (Polimorfismos de ADN Amplificados al Azar -Williams *et al.*,

1990), b) **AP-PCR** (PCR de Iniciadores Arbitrarios -Welsh y McClelland, 1990-).

Recientemente se ha descrito una nueva técnica, llamada **AFLP**, que combina las propiedades de ambos tipos de ensayos. En los AFLPs se realiza una amplificación selectiva de fragmentos de restricción de ADN (Vos *et al.*, 1995).

La técnica de **RFLP** se basa en la digestión del ADN genómico con enzimas de restricción (endonucleasas) que reconocen sitios específicos del genoma para cortarlo. Si un genotipo presenta una mutación puntual que altere el sitio de reconocimiento de la enzima y/o inserciones o deleciones entre dos sitios, los fragmentos generados por las enzimas presentaran distinta longitud respecto al genotipo "salvaje". Esto puede ser visualizado corriendo los ADNs digeridos en un gel de agarosa, transfiriendo éste a una membrana por capilaridad ("Southern Blotting" - Sambrook *et al.*, 1989). Luego se hibrida con una sonda marcada y se expone a una película autorradiografica. De esta manera, se obtendrá un **polimorfismo** entre los genotipos generado por la diferencia de tamaño de los fragmentos observados (Botstein *et al.*, 1980; Tanksley *et al.*, 1989). (Figura 1)

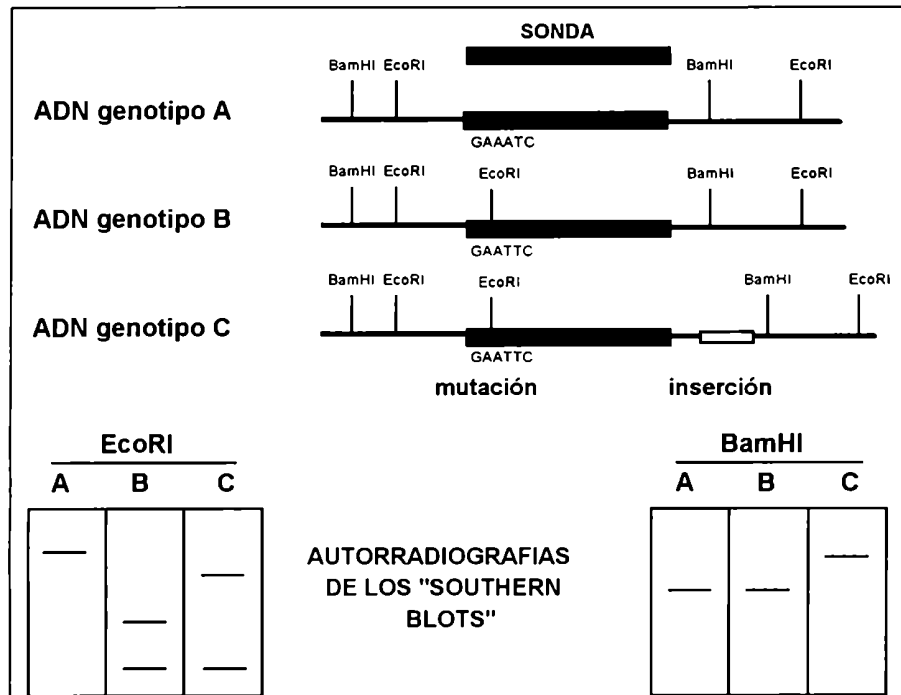


Figura 1: Detección de polimorfismos mediante la técnica de RFLP.

Las principales ventajas de los RFLP son: i)son marcadores codominantes (i.e. se pueden visualizar los tres alelos polimórficos de un locus -AA/Aa/aa); ii)pueden utilizarse para detectar loci homólogos a través de especies emparentadas; iii) son altamente reproducibles. Presentan como desventajas: i)requerir para realizar los ensayos grandes cantidades de ADN y ii)estos ensayos suelen consumir mucho tiempo e intensidad de trabajo.

En la técnica de **RAPD**, utilizando la reacción en cadena de la polimerasa (**PCR**), un oligonucleótido ("primer") actúa como iniciador para la ADN polimerasa a lo largo de todo el genoma a partir de los sitios donde se presenten secuencias

complementarias. Cuando dos primers hibriden en hebras complementarias y a una distancia de 200 a 3000 pares de bases entre ellos, el fragmento comprendido entre las secuencias complementarias a los primers será amplificado. El producto generado podrá visualizarse mediante una electroforesis en gel de agarosa. Si dos genotipos difieren en las secuencias complementarias a los primers, presentarán un **polimorfismo** entre ellos consistente en la presencia vs. ausencia de una o mas bandas (Figura 2) (Williams *et al.*, 1990; Welsh y McClelland, 1990).

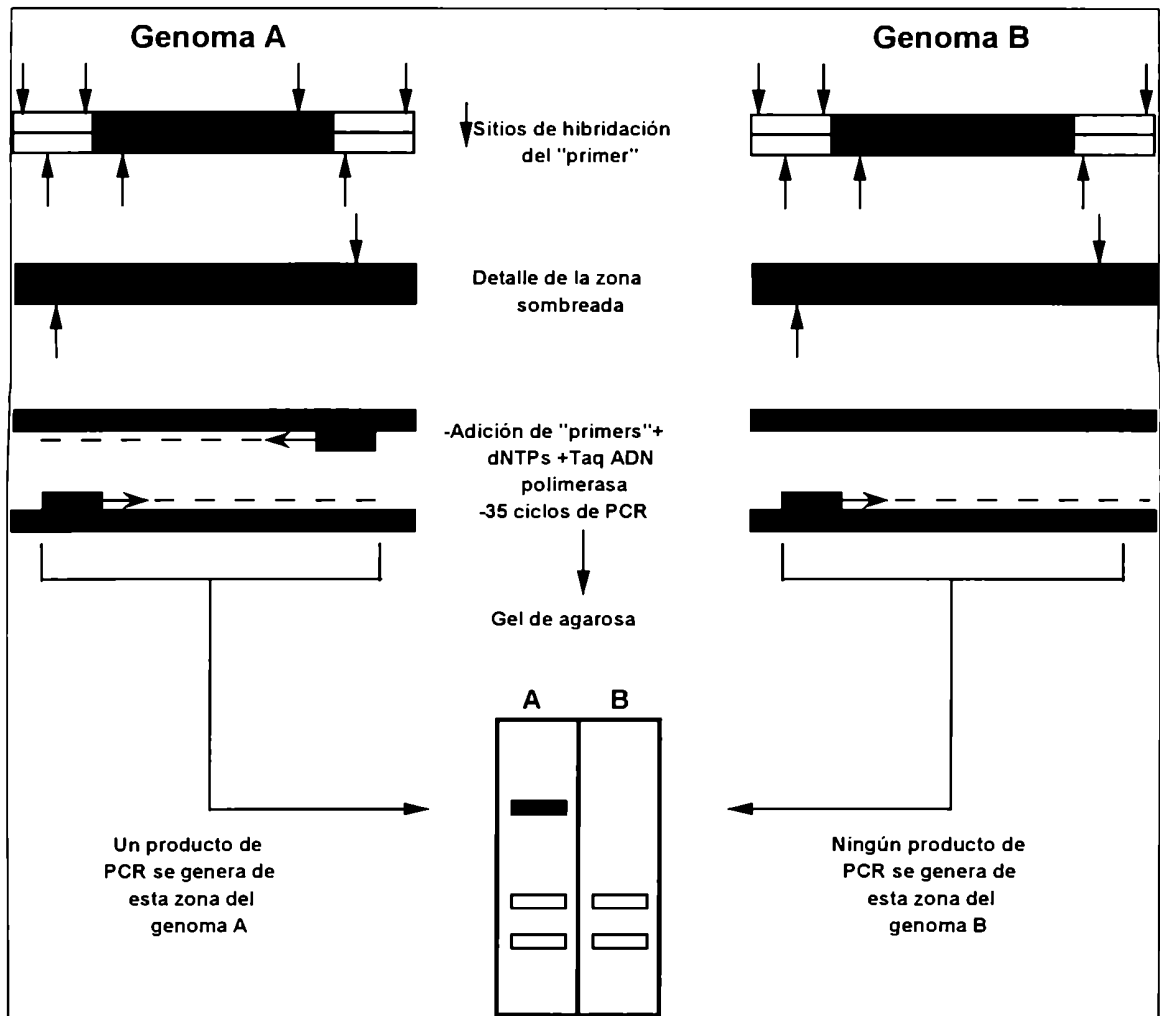


Figura 2: Detección de polimorfismos mediante la técnica de RAPD

Las ventajas de los RAPD son: i) los ensayos requieren una muy pequeña cantidad de ADN; ii) suelen ser más eficientes que los RFLP para detectar polimorfismos por su alta abundancia; iii) no requieren una tecnología sofisticada para su realización. Las desventajas son: i) ser marcadores dominantes (i.e. sólo se visualiza un alelo del locus, como presencia o ausencia de una

banda); ii) la información de un locus no puede ser extrapolada entre especies; iii) son menos reproducibles que los RFLP.

La técnica de **AFLP** se basa en la detección de fragmentos genómicos de restricción mediante la técnica de PCR. La generación de AFLPs consta de tres pasos: a) digestión del ADN genómico y ligación de oligonucleótidos adaptadores, b) amplificación selectiva de los fragmentos digeridos por PCR, y c) análisis de los fragmentos amplificados por medio de electroforesis en geles de poliacrilamida (PAGE). La PCR de los fragmentos de restricción es llevada a cabo usando los adaptadores y los sitios de restricción como blanco de hibridación de los primers. La amplificación selectiva se realiza usando primers que se extienden dentro del fragmento de restricción, amplificando sólo aquellos fragmentos en los cuales existe homología con los nucleótidos que flanquean a los sitios de restricción. Este método permite la co-amplificación de numerosos fragmentos de restricción. El número de fragmentos amplificados varía usualmente entre 50 y 100. Aún en poblaciones con un bajo nivel de polimorfismo, se espera encontrar al menos 3-5 marcadores claramente identificables (Figura 3).

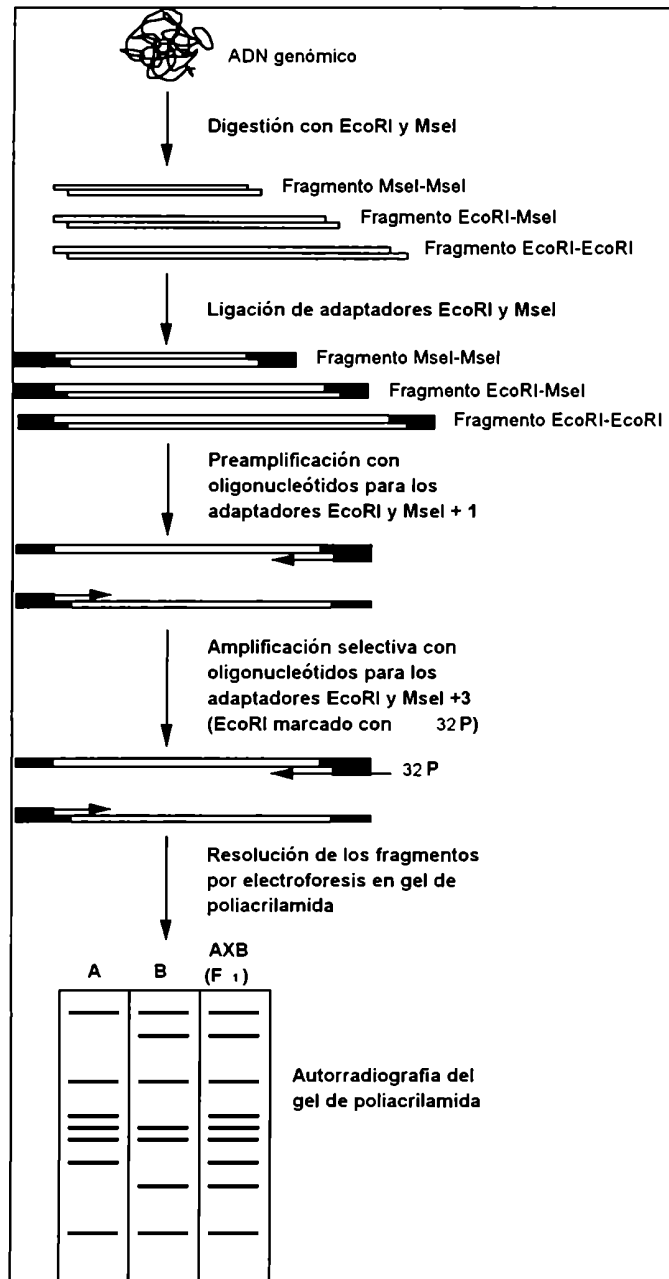


Figura 3: Representación esquemática de la obtención de polimorfismos mediante la técnica de AFLP

Las ventajas de los AFLP son: i) no es necesario recurrir, como en los RFLPs y RAPDs, a una selección inicial de primers polimórficos debido al gran número de loci ensayados

simultáneamente; ii)son muy reproducibles debido a la exigente temperatura de hibridación durante la PCR; iii) requieren menos trabajo que los RFLP ya que no se realizan "Southern Blotting" ni hibridaciones. Las desventajas son: i)son marcadores dominantes; ii)requieren mediana cantidad de ADN; iii)los niveles de polimorfismos son menores que los RFLP y RAPD.

Debido a que cada uno de los sistemas de marcadores citados cuenta distintas clases de ventajas y desventajas, la elección de uno u otro sistema dependerá de los objetivos particulares del proyecto de mapeo u mejoramiento encarado. La introgresión de caracteres, el mapeo de caracteres cualitativos, el mapeo de caracteres cuantitativos y el análisis de germoplasma tienen cada uno diferentes desafíos técnicos, y por lo tanto diferentes requerimientos de los marcadores (Mazur y Tingey, 1995).

Uno de los puntos más álgidos de diferencia entre los sistemas de marcadores es la codominancia vs. dominancia. Esto es especialmente importante cuando se intenta discriminar en un locus determinado, el comportamiento de todos los alelos (i.e. AA/Aa/aa). Si por motivos económicos, técnicos o de otra índole, se decide optar por alguno de los marcadores dominantes, puede salvarse parcialmente la pérdida de información genética transformando el marcador dominante del

locus de interés en un marcador codominante (ver Materiales y Métodos).

La utilización de marcadores moleculares en el mejoramiento genético vegetal está orientada a la identificación y localización de genes (o regiones genómicas) relacionados con caracteres de interés agronómico. Para lograr este objetivo es necesario desarrollar detallados mapas de ligamiento genético (Tanksley *et al.*, 1989). El interés final de la mayoría de los estudios mapeo de genes de interés es lograr clonar (aislar) y controlar dichos genes. Es imprescindible contar con mapas de ligamiento altamente saturados (i.e. con una alta densidad de marcadores por cromosoma) para poder iniciar estrategias de clonado posicional ("positional cloning"), también llamado clonado en base a mapeo ("map-based cloning"). Estas estrategias se basan en las técnicas de caminado cromosómico ("chromosome walking") (Wicking y Williamson, 1991; Giraudat *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1993) y más recientemente aterrizaje cromosómico ("chromosome landing") (Tanksley *et al.*, 1995)

Usando marcadores moleculares se construyeron mapas genéticos en numerosas especies vegetales: tomate (Tanksley *et al.*, 1992); maíz (Coe *et al.*, 1990; Burr *et al.*, 1988); papa (Gebhardt, *et al.*, 1991); soja (Muehlbauer *et al.*, 1991); arroz (McCouch *et al.*, 1988); caña de azúcar (Al-Janbi *et al.*, 1993) y

trigo (Hart, 1994). Si bien los primeros mapas de sorgo fueron realizados utilizando sólo sondas de maíz (Hulbert *et al.*, 1990; Binelli *et al.*, 1992; Whitkus *et al.*, 1992; Melake Berhan *et al.*, 1993), a partir de 1994 comenzaron a usarse también sondas de sorgo (Pereira *et al.*, 1994; Ragab *et al.*, 1994; Chittenden *et al.*, 1994).

Para caracteres monogénicos u oligogénicos, cuyo modo de herencia puede ser determinado por métodos mendelianos clásicos, el mapeo puede ser realizado por análisis de cosegregación de los marcadores y el carácter (Tanksley, *et al.*, 1989; Melchinger, 1990). Los marcadores moleculares ligados a esta clase de caracteres (principalmente resistencias a hongos, bacterias, virus e insectos) han sido identificados en diversas especies (Barone *et al.*, 1990; Bentolilla *et al.*, 1991; Martin *et al.*, 1991; Michelmore *et al.*, 1991; Paran *et al.*, 1991; Ritter *et al.*, 1991; Leonards-Schippers *et al.*, 1992; Martin *et al.*, 1992; Ronald *et al.*, 1992; Balintkurti *et al.*, 1994).

Para el caso de los caracteres de herencia cuantitativa, se han desarrollado métodos de análisis estadístico y programas de computación que permiten "diseccionar" los caracteres complejos, al menos en sus principales componentes mendelianos (Tanksley, 1993; Jansen, 1996) y de esta forma determinar asociaciones entre los marcadores moleculares y los

loci responsables de la variación cuantitativa (**QTLs** -**Quantitative Trait Loci**-).

El método inicialmente utilizado para la detección de QTLs es el análisis de la varianza de un factor ("one-way ANOVA"), el cual considera a los marcadores individualmente. Este método no requiere de la existencia previa de un mapa de ligamiento ya que analiza los marcadores de a uno a la vez (Edwards, *et al.*, 1987; Weller *et al.*, 1988). El fundamento del análisis es el siguiente: para cada genotipo (clases alélicas) de un marcador, se calcula la media genotípica como la media de los valores del carácter para las plantas que tienen dicho genotipo. Si el marcador está estrechamente ligado al QTL la medias genotípicas del marcador van a ser diferentes. Esto puede ser probado estadísticamente mediante un análisis de varianza de un factor con programas de computación convencionales. Utilizando esta metodología se han localizado QTLs asociados a diferentes caracteres (Edwards, *et al.*, 1987; Weller *et al.*, 1988; Anderson *et al.*, 1993; Leonards-Schippers *et al.*, 1994; Leon *et al.*, 1995). Las desventajas de este análisis son: i) cuanto más lejos esté el marcador del QTL, más difícil es detectar efectos significativos, debido a la mayor probabilidad de recombinación entre el marcador y el QTL; ii) la magnitud de los efectos detectados, son normalmente subestimados debido también a los eventos de recombinación (Tanksley, 1993).

La posibilidad de construir mapas de ligamiento molecular abarcando gran parte de los genomas, hace posible solucionar algunos de los problemas de análisis de un factor para la detección de QTLs. El método propuesto por Lander y Botstein (1989), denominado mapeo por intervalos, analiza simultáneamente grupos de marcadores ligados, considerando sus efectos sobre el carácter estudiado. Al considerar marcadores ligados para el análisis, es posible compensar los efectos de la recombinación entre los marcadores y el QTL, aumentando la probabilidad de detectar estadísticamente al QTL y teniendo una estimación insesgada del efecto del QTL sobre el carácter. El mapeo por intervalos fue inicialmente aplicado en tomate por Paterson *et al.* (1988) y luego empleado con éxito en numerosos estudios de detección de QTLs (Doebley y Stec, 1991; Paterson *et al.*, 1991; Stuber *et al.*, 1992; Pereira y Lee, 1995; Lin *et al.*, 1995; Grandillo y Tanksley, 1996; Dingerdissen *et al.*, 1996)

Tanto caracteres cualitativos como cuantitativos fueron mapeados en sorgo. Fueron utilizados dentro de la primer clase de caracteres, marcadores RADPs y RFLPs para detectar y ubicar genómicamente genes de resistencia a *Sporisorium reilianum* (Oh *et al.*, 1994) y *Peronosclerospora sorghi* (Bhavanishankara Gowda *et al.*, 1995). Con respecto a los caracteres de herencia cuantitativa, se detectaron QTLs

asociados a la altura de plantas (Pereira y Lee, 1995) y a la altura de las plantas y a la maduración (Lin *et al.*, 1995).

La utilidad de contar con marcadores moleculares estrechamente ligados al carácter brotado pre-cosecha se hace evidente en el momento de determinar la presencia de este carácter en un individuo (perteneciente a una línea o a una población segregante). Convencionalmente, se debe recurrir a ensayos biológicos relativamente complejos y que deben realizarse recién al finalizar el ciclo del cultivo, cuando se han formado los granos. Esto implica esperar y mantener a todos los individuos durante un período de 3 a 4 meses para determinar su fenotipo. Asimismo, llegado el momento de la ejecución del ensayo, las condiciones ambientales (principalmente humedad y temperatura), pueden influir severamente en los resultados del mismo (Anderson *et al.*, 1993).

Por otro lado, la existencia de marcadores asociados al carácter permite la determinación del genotipo (y su fenotipo para el carácter en cuestión) de numerosos individuos en un estado precoz del cultivo (inclusive al estado de plántula), por lo cual el marcador es una eficiente herramienta de selección temprana, siendo especialmente útil en los procesos de mejoramiento por retrocruza (Tanksley *et al.*, 1989). Además, dicha determinación, para la cual solo se requieren pocos

gramos de hoja, no es afectada por las condiciones ambientales.

**HIPOTESIS
Y
OBJETIVOS**

La hipótesis que sustenta este trabajo es que existen diferencias genéticas entre los genotipos resistentes y susceptibles al brotado pre-cosecha, y que dichas diferencias pueden ser detectadas por medio de mapeo con marcadores moleculares (RFLPs, RAPDs y AFLPs) en los materiales vegetales a utilizados.

Los objetivos de la presente investigación son:

1. Detectar marcadores moleculares (RFLPs, RAPDs y AFLPs) asociados con la resistencia al brotado pre-cosecha durante el desarrollo del grano de sorgo granífero
2. Caracterizar las bases genéticas de la resistencia al brotado pre-cosecha en poblaciones segregantes generadas por cruzamientos entre genotipos resistentes y susceptibles.

**MATERIALES
Y
METODOS**

1. CONSTRUCCIÓN DE LAS POBLACIONES A ESTUDIAR

Se utilizaron cuatro líneas de sorgo que presentan características contrastantes respecto de la resistencia al brotado pre-cosecha (B2 Redland y Kansas 57 - susceptibles - y IS 9530 y SC 650 - resistentes -). En la Foto 1 se muestran panojas de los genotipos IS 9530, B2 Redland y SC 650 incubadas durante 4 días en un ambiente de alta humedad relativa y con temperaturas contrastantes. Los cruzamientos entre las líneas parentales (F_1) y la obtención de los materiales segregantes (F_2) se realizaron con la colaboración del Ing. Agr. Martín Luders (FUNK'S - CIBA GEIGY Argentina-), quien aportó la línea B2 Redland (línea pública). Finalmente se seleccionaron para generar las poblaciones segregantes a IS 9530 (IS) como línea parental resistente y a B2 Redland (B2) como línea parental susceptible, debido a que fueron el par resistente/susceptible que presentó mayor nivel polimorfismos (ver punto 4).

Aproximadamente 200 semillas F_2 del cruzamiento IS x B2 fueron sembrados en diciembre de 1993 en el campo experimental del Instituto de Recursos Biológicos (INTA Castelar). Las semillas se dispusieron a 0,50 m x 0,50 m para disminuir el efecto de interacción entre plantas. Se sembraron también 10 individuos IS, 10 B2 y 10 F_1 . El terreno fue cubierto con redes hasta que las plántulas alcanzaron 10 cm de altura. Se realizaron



Foto 1: Panojas de los genotipos B2 Redland, SC 650, e IS 9530, incubadas durante 4 días en atmósfera con alta humedad relativa, a temperaturas de 20°C/30°C y 25°C.

periódicamente riegos y desmalezados manuales. Se aplicaron insecticidas para controlar orugas cortadoras y bactericidas para prevenir ataques de *Xanthomonas*. En la floración se construyó una jaula de alambre hexagonal para proteger al cultivo del ataque de pájaros.

Familias F_3 fueron generadas por autofecundación de todos los individuos F_2 a los que se les realizó el ensayo biológico. Para ello se embolsaron las panojas inmediatamente luego de determinar el comienzo de floración.

2. DETERMINACIÓN DE LA REACCIÓN AL BROTADO PRE-COSECHA.

Se realizó el ensayo biológico en la población F_2 según el siguiente procedimiento: se evaluaron 50 semillas de cada individuo, incubándose las mismas a 25°C con humedad del 100% en placas de Petri con papel de filtro 3MM Whatman y diariamente (durante 12 días) se determinó el número de semillas germinadas para cada placa. La fecha de inicio de evaluación de cada individuo se estableció sumando 30 días a la fecha de floración del mismo (estimada como la aparición de los estambres en la mitad superior del tercio medio de la panoja). En este momento se estima que la planta se encuentra en

madurez fisiológica, periodo en el que Benech-Arnold *et al.* (1995a) observaron las mayores diferencias en los valores de IG entre IS y B2. Se calculó un Índice de Germinación (IG) (Reddy *et al.*, 1985) de la siguiente manera:

$$IG = (12 \times n_1) + (11 \times n_2) + \dots + (1 \times n_{12})$$

donde n_1, n_2, \dots, n_{12} son el número de semillas germinadas el día 1, 2, ..., 12 y **12, 11, ..., 1** son las ponderaciones que se le dan a las semillas germinadas el día 1, 2, ..., 12. Los valores de IG fueron divididos por 5 para hacerlos comparables a los de trabajos fisiológicos sobre BPC (Steinbach *et al.*, 1995; Benech-Arnold *et al.*, 1995a)

Un ensayo similar se realizó a partir de diciembre de 1994 con familias F3 de los individuos extremos (resistentes y susceptibles) junto con los padres IS y B2. Se sembraron en el mismo campo experimental 20 semillas de cada familia F3 y se calculó un IG promedio de la familia.

La realización de estos ensayos se llevó a cabo con la colaboración de la Cátedra de Cerealicultura de la Facultad de Agronomía (UBA), la cual está involucrada en el estudio fisiológico de este carácter en los mismos materiales (Steinbach *et al.*, 1995; Benech-Arnold *et al.*, 1995a, 1995b).

3. EXTRACCIÓN DE ADN

Para determinar los genotipos de las líneas parentales, así como de la F_1 y de cada uno de los individuos F_2 , se cosecharon 2 hojas de plantas en el estado de 4-5 hojas para extraerles el ADN genómico. Las hojas cosechadas fueron liofilizadas durante 3 días y molidas. Para cada extracción se partió de aproximadamente 1000 mg de material molido y se realizó la extracción mediante el método de CTAB modificado por Saghai-Marooif *et al.*, (1984) con el siguiente buffer de extracción:

Componentes	[final]
Tris pH 7,5	100 mM
NaCl	700 mM
EDTA pH 8,0	50 mM
CTAB	1%
β -mercaptoetanol	140 mM

El tejido fue incubado en el buffer durante 60-90 min. a 65°C con agitación. Luego de tratar con cloroformo:octanol (24:1 v/v) se precipitó el ADN con (2:3 v/v) de isopropanol y se lo lavó con etanol/NaOAc 76 v/v y 0,2 M y etanol/NH₄OAc 76v/v y 10 mM.

La cuantificación del ADN se realizó por medio de espectrofotometría ultravioleta, asumiendo una equivalencia de

1 OD (260 nm) = 50µg. Paralelamente se realizó una verificación de la integridad de ADN extraído, sembrando 2 µl del mismo en un gel de 1% agarosa en TAE 1x teñido con EtBr (Sambrook *et al.* 1989). Una vez cuantificados todos los ADNs se los llevó a una concentración de 100 ng/µl.

4. ANALISIS DE RFLPs

4.1 Detección de sondas informativas

Inicialmente se debe determinar qué sondas son informativas (i.e. sondas que revelen polimorfismos entre las líneas parentales) y con cual/cuales enzimas de restricción. Para ello realizó la digestión de 10µg de ADN durante 3 hs de cada genotipo con cinco enzimas de restricción (*EcoRI*, *EcoRV*, *HindIII*, *BamHI* y *XbaI*) utilizando 2,5 U enzima/µg ADN. Los productos de digestión fueron sometidos a una electroforesis en un gel de agarosa (0,8% en buffer TAE 1x a 0,6 mA/cm) con el objetivo de separar por tamaño los fragmentos generados. Posteriormente se realizó un "Southern Blotting" (Sambrook *et al.* 1989), para lo cual se desnaturalizaron los geles con 0,25 N HCl y se los transfirió alcalinamente a una membrana de nylon (MSI, EUA) con 0,4 N NaOH. Luego, se lavaron las membranas con 2x SSC y se

inmovilizó el ADN, sometiendo la membrana primero a horneado a 80°C por 20 min y luego a luz UV (120.000 μ joules/cm²).

Las sondas fueron marcadas no-radiactivamente incorporándoles un nucleótido marcado con digoxigenina (Dig-dUTP) por medio de la técnica de PCR (Reacción en Cadena de la ADN Polimerasa) en un volumen de 100 μ l según el siguiente protocolo:

Componentes	[final]
10x <i>Taq</i> Buffer	1x
50 mM MgCl ₂	2 mM
Glicerol	15%
10 mM dNTP (^s /dTTP)	50 μ M
10 mM dTTP	47,5 μ M
1 mM Dig-dUTP	2,5 μ M
5U/ μ l <i>Taq</i> ADN Polimerasa	2 U
2 μ M "primer" CV72 ^a	0,2 μ M
2 μ M "primer" CV76 ^b	0,2 μ M
1 ng/ μ l clon	10 ng

^aCV72: 5' ACGACGTTGTAAAACGACGGCCAGT 3'

^bCV76: 5' AAACAGCTATGACCATGATTACGCC 3'

Las amplificaciones fueron verificadas en geles de agarosa (1% TAE 1x). Para determinar si el Dig-dUTP se había efectivamente incorporado a los clones, se transfirió el gel anterior a una membrana de nylon y se detectó la hibridación

con el procedimiento que se explica luego de detección por quimioluminiscencia.

Se ensayaron 157 clones genómicos de maíz (University of Missouri, Columbia (UMC) y Broockhaven National Laboratory (BNL) mapeados en maíz por los correspondientes laboratorios

Se utilizó un horno de hibridación a 65°C incubándose las membranas con las sondas durante 18 hs con el siguiente buffer de hibridación:

Componentes	[final]
25x SSC	5x
20% SDS	0,02%
10% Laurilsarcosin	0,01%
PAES ^a	0,2%

^a PAES: ácido polianetolsulfónico

Las membranas fueron luego lavadas con 0,15x SSC a 65°C para remover la sonda pegada inespecificamente e incubadas con un anticuerpo (i.e. anti-digoxigenina) conjugado con fosfatasa alcalina (AP) y luego con un sustrato quimioluminiscente (i.e. CSPD¹). El sustrato reacciona ante la presencia de la AP liberando fotones que imprimen una placa autorradiográfica (mejor llamada "luminografía"). Las

¹ 3 - (4 - metoxispiro{1,2 - dioxetano - 3,2' - (5' - cloro)tricyclo[3.3.1.1^{3,7}]decano} - 4 - il)fenil fosfato disódico.

exposiciones en placa radiográfica fueron de 1 a 2 días. Para la remoción de las sondas, se lavaron las membranas en 0,1% SDS a 80°C, procediéndose luego a la re-hibridación de las membranas.

Los protocolos para la realización de los distintos pasos de la detección de sondas no-radiactivas se realizaron según Hoisington *et al.* (1994).

4.2 Mapeo de los marcadores RFLPs

Se prepararon membranas para hibridación digiriendo los ADNs de 93 individuos F₂ utilizando separadamente las cinco enzimas de restricción para cada membrana. Las sondas que revelaron polimorfismos se usaron para hibridar las membranas generadas con las enzimas con las que se obtuvieron los polimorfismos, permitiendo de esta manera evaluar la segregación de los RFLPs. En este procedimiento las sondas fueron marcadas radiactivamente con ³²P mediante la técnica de iniciación al azar ("random priming", Sambrook *et al.* 1989). Luego de 18 h de hibridación en el mismo buffer que se utilizó en el punto 4.1, las membranas fueron lavadas con 2x SSC/0,5% SDS durante 30 min y 0,1x SSC/0,5% SDS durante 2 hs. Posteriormente, se expuso las membranas a placas autorradiográficas durante 7 días.

Debido a que los RFLPs son marcadores codominantes (i.e. puede diferenciarse al heterocigota de ambos padres) la codificación de cada individuo F_2 para cada marcador se realizó de la siguiente manera: **A** = genotipo IS; **B** = genotipo B2; **H** = heterocigota. Se utilizaron también los códigos **C** = no A (B o heterocigota) y **D** = no B (A o heterocigota) en los casos en los que la lectura no clara.

5. ANALISIS DE RAPDs

5.1 Determinación de "primers" informativos

El primer paso en el mapeo de marcadores RAPDs es identificar "primers" que revelen polimorfismos entre las líneas parentales. Para esto se amplificaron los ADNs genómicos de IS y B2 con 131 "primers" de 10 pb de longitud ("kits" A, B, C, D, F, G, H, X e Y; OPERON Technologies, EUA). Las reacciones se realizaron en un volumen de 25 μ l conteniendo:

Componentes	Volumen
10x Stoffel Buffer	2,50 μ l
25 mM MgCl ₂	4,00 μ l
10 Mm dNTP	0,25 μ l
16 ng/ μ l 10-mer Primer ⁽¹⁾	1,00 μ l
10 U/ μ l Stoffel ⁽²⁾	0,20 μ l
ddH ₂ O	12,05 μ l
5 ng/ μ l ADN	5,00 μ l

(1) Operon Technologies Inc., EUA

(2) ADN polimerasa Fragmento Stoffel (Perkin Elmer Cetus, EUA)

Las amplificaciones se llevaron a cabo en un termociclador TC480 (Perkin Elmer Cetus, EUA) con el siguiente programa:

1 ciclo	94°C	3 min
	94°C	1 min
40 ciclos	35°C	1 min
	72°C	2 min
1 ciclo	72°C	7 min

Los productos generados fueron analizados mediante una electroforesis en gel de agarosa (1,5%; TBE 1x; 8 V/cm; 4 hs) teñido con EtBr. Los geles fueron luego visualizados con luz UV y fotografiados.

5.2 Mapeo de los marcadores RAPDs

Una vez determinados los "primers" informativos (i.e. RAPDs propiamente dichos), se procedió a amplificar, con el protocolo arriba descrito, los ADNs genómicos de 90 individuos F₂ usando dichos "primers" seleccionados. De esta forma, es posible estudiar la segregación de los marcadores en la progenie. Luego, de fotografiar los geles correspondientes, se procedió a la codificación de los datos obtenidos. Por tratarse de marcadores dominantes (no es posible diferenciar un genotipo heterocigota del genotipo parental que presenta la banda) para la codificación se utilizaron las siguientes letras: **A** = genotipo IS; **B** = genotipo B2; **C** = no A (B o heterocigota) y **D** = no B (A o heterocigota). Cuando la banda estaba presente en IS se codificó **B** o **D** y si estaba en B2, **A** o **C**.

6. ANÁLISIS DE AFLPs

6.1 Digestión - ligación

Se digirió durante 3 hs 1 µg de ADN genómico de las dos líneas parentales (IS y B2), de la F₁ y de 90 individuos F₂, con dos enzimas de restricción (*EcoRI* y *MseI*). Las digestiones se realizaron

en placas de 96 hoyos del tipo de las usadas para ELISA en un volumen final de 50 μl con los siguientes reactivos:

Componentes	Volumen
5x Buffer RL ⁽¹⁾	10,00 μl
10 U/ μl <i>EcoRI</i>	0,50 μl
10 U/ μl <i>MseI</i>	1,25 μl
ddH ₂ O	28,25 μl
0,1 $\mu\text{g}/\mu\text{l}$ ADN	10 μl

(1) RL: Restricción - Ligación

Se verificó la digestión sembrando 5 μl del producto en un gel de agarosa 1% (TAE 1x) y se procedió luego a la ligación de los adaptadores para cada enzima a los fragmentos digeridos en 55 μl de volumen de reacción conteniendo:

Componentes	Volumen
5x Buffer RL	2,0 μl
5 μM Adaptador <i>EcoRI</i>	1,0 μl
5 μM Adaptador <i>MseI</i>	1,0 μl
10 mM ATP	1,2 μl
1 U/ μl T4 ADN Ligasa	1,0 μl
ddH ₂ O	3,8 μl
Producto de digestión	45,0 μl

Adaptador *EcoRI*= 5' CTCGTAGACTGCGTACC 3'
3' CTGACGCATGGTTAA 5'

Adaptador *MseI*= 5' GACGATGAGTCCTGAG 3'
3' TACTCAGGACTCAT 5'

6.2 Amplificaciones

Las amplificaciones se realizaron en dos pasos: (i) pre-amplificación usando primers con 1 nucleótido selectivo (+1), y (ii) amplificación selectiva usando primers con 3 nucleótidos selectivos (+3). En ambos casos se utilizó un ciclador térmico Perkin Elmer TC480 (Norwalk, CT, EUA).

6.2.1 Pre-amplificación

Las pre-amplificaciones se realizaron en 25 μ l de volumen final, conteniendo cada una:

Componentes	Volumen
10x PCR Buffer	2,500 μ l
50 mM Mg Cl ₂	1,500 μ l
5 mM dNTP	1,000 μ l
1 μ g/ μ l Primer <i>Eco</i> RI (+1)	0,075 μ l
1 μ g/ μ l Primer <i>Mse</i> I (+1)	0,075 μ l
5 U/ μ l <i>Taq</i> DNA polimerasa	0,200 μ l
ddH ₂ O	15,650 μ l
Producto de ligación	4,000 μ l

"primer" *Eco*RI (+1) = 5' GACTGCGTACCAATTCA 3'

"primer" *Mse*I (+1) = 5' GATGAGTCCTGAGTAAA 3'

La PCR se realizó con 30 ciclos del siguiente programa:

30 s 94 °C

30 s 60 °C

60 s 72 °C

Los productos fueron chequeados en gel de agarosa 1% (TAE 1x) y diluidos en TE (10:0,1) a un volumen de 75 μ l. Esta dilución fue utilizada como templado de la amplificación selectiva.

6.2.2 Amplificación selectiva

Para la amplificación selectiva se utilizaron 12 combinaciones de primers *EcoRI/MseI* con tres nucleótidos selectivos (+3). Para la lograr la visualización de los productos generados se utilizó la marcación en 5' del primer *EcoRI* con [γ^{32} P]ATP o [γ^{33} P]ATP con la enzima T4 polinucleótido kinasa. Las reacciones se realizaron en un volumen de 23 μ l, conteniendo:

Componentes	Volumen
10x Buffer de PCR	2,300 μ l
50 mM MgCl ₂	0,600 μ l
5 mM dNTP	0,800 μ l
1 μ g/ μ l "primer" <i>Eco</i> RI (+3)	0,025 μ l
1 μ g/ μ l "primer" <i>Mse</i> I (+3)	0,025 μ l
1 μ Ci/ μ l [γ ³² ó ³³ PATP "primer" <i>Eco</i> RI	1,000 μ l
5 U/ μ l <i>Taq</i> ADN polimerasa	0,600 μ l
ddH ₂ O	14,650 μ l
Producto de pre-amplificación	3,000 μ l

"Primers" *Eco*RI (+3):

E32: 5' GACTGCGTACCAATTCAAC 3'

E38: 5' GACTGCGTACCAATTCAC 3'

E39: 5' GACTGCGTACCAATTCAGA 3'

E46: 5' GACTGCGTACCAATTCATT 3'

"Primers" *Mse*I (+3):

M31: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAAA 3'

M32: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAAC 3'

M38: 5' GATGAGTCCTGAGTAAACT 3'

M39: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGA 3'

M40: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGC 3'

M41: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGG 3'

M42: 5' GATGAGTCCTGAGTAAAGT 3'

6.3 Análisis en geles de poliacrilamida - Mapeo de los marcadores AFLPs

Posteriormente a la amplificación selectiva los productos fueron mezclados con 10 μ l de buffer de carga (98% formamida y como colorantes azul de bromofenol y xilene cianol), desnaturalizados a 95°C por 5 min, y puestos inmediatamente en

hielo. Se sembraron 3 μ l de cada muestra en geles 6% desnaturalizantes de poliacrilamida. Los geles se corrieron en TBE 1x a 45 W durante 3 h y se los fijó en 10% etanol/10% acético durante 20 min. Posteriormente los geles fueron secados en papel cromatográfico 3 MM Whatman usando un secador de geles en vacío y expuestos durante 36 h en películas autorradiográficas. Al ser los AFLPs marcadores dominantes (como ocurre con los RAPDs) se los codifico igual que a éstos.

7. CONSTRUCCIÓN DEL MAPA DEL MAPA BÁSICO DE SORGO

Utilizando los datos de la segregación de los marcadores RFLPs, RAPDs y AFLPs se procedió a construir un mapa básico. Se usó el programa MAPMAKER/EXP 3,0 para PC (Lander *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1992a) para la confección propiamente del mapa. La versión 1,0 para Macintosh de MAPMAKER se utilizó para realizar los esquemas de los grupos de ligamiento.

El procedimiento de construcción del mapa constó de dos pasos:

- 1) Se estudió inicialmente la cosegregación de todos los marcadores para determinar mediante un análisis de "dos puntos" los posibles grupos de ligamiento. Este agrupamiento

se realizó teniendo en cuenta dos criterios: i) el valor umbral de **LOD = 3,0** y ii) la distancia máxima = 0,40. El valor de **LOD** expresa cuanto más probable es, que dos marcadores estén ligados, respecto de que segreguen independientemente. Un valor de **LOD** de 3,0 significa que la probabilidad de que dos marcadores estén ligados debe ser 1000:1 respecto de la probabilidad de segregación independiente, ya que:

$$LOD = \log_{10} \frac{\text{probabilidad_de_estar_ligados}}{\text{probabilidad_de_segregar_independientemente}}$$

Por otro lado, la distancia máxima expresa el valor máximo aceptado, en fracciones de recombinación, entre dos marcadores para conciderarlos ligados.

- 2) Posteriormente se estableció el ordenamiento de los marcadores dentro de los grupos de ligamiento mediante un análisis "multi-punto" y las distancias entre marcadores adyacentes (en centimorgans -cM-) utilizando la función de mapeo de Haldane.

La bondad de ajuste a las proporciones esperadas para los marcadores codominantes (1:2:1) y dominantes (3:1), se realizó por medio del programa STATISTICA. (versión 4,1, StatSoft, Inc, EUA)

8. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO ENTRE EL BPC Y LOS MARCADORES RFLPs, RAPDs Y AFLPs.

Para llevar adelante el mapeo de QTLs se utilizaron el análisis de varianza de factor simple (AVFS; Edwards *et al.*, 1987) y el método de mapeo por intervalos (Lander y Botstein, 1989). Para el AVFS se establecieron las posibles asociaciones entre los marcadores (RFLPs, RAPDs y AFLPs) y los valores fenotípicos de BPC de cada individuo. Se empleó para esto el programa STATISTICA determinándose mediante la prueba "F" las significancias de las asociaciones expresadas como valores de probabilidad "p". El AVFS permite distinguir si existe una variación significativa en la expresión del carácter asociada con las diferencias entre las clases genotípicas en cada locus (A/H/B, para marcadores codominantes; A/C ó B/D, para los dominantes).

Se empleó el análisis de la varianza de 2 factores (AVDF - Edwards *et al.*, 1987) para determinar posibles efectos epistáticos entre los QTLs. Este procedimiento se llevó a cabo mediante el programa Macintosh-qGENE (Nelson, 1994)

La detección de QTLs asociados al BPC usando el método de mapeo por intervalos se realizó con el programa MAPMAKER/QTL 1,1 (Paterson *et al.*, 1988; Lincoln *et al.*, 1992b). En éste último análisis se obtiene para cada intervalo dentro de

marcadores de un grupo de ligamiento, valores de LOD cada 2 cM. El LOD, en este análisis es

$$LOD = \log_{10} \frac{\text{probabilidad_de_exista_un_QTL_dentro_del_intervalo}}{\text{probabilidad_de_dicho_QTL_no_exista}}$$

El umbral utilizado para declarar la presencia de un QTL en una región del genoma fue de LOD = 2,6. Este valor es el que corresponde para la prueba de la presencia de un QTL con un nivel de significancia de $p = 0,05$ de acuerdo con Lander y Botstein (1989). Se utilizaron los comandos "sequence" y "scan" para rastrear el genoma y detectar QTL individuales. Se construyeron los gráficos de los valores de LOD a lo largo de los grupos de ligamiento en los que se detectaron QTLs significativos. Los valores de LOD se calcularon y graficaron cada 2 cM versus las distancias de mapeo para cada grupo de ligamiento. Para cada QTL detectado MAPMAKER/QTL determina la máxima probable ubicación dentro de los límites de un intervalo de confianza de 10:1 alrededor del pico.

Los efectos genéticos (a = efecto aditivo; d = efecto de dominancia) y el porcentaje de la variación fenotípica atribuible a cada QTL fueron estimados en los picos (máxima probable ubicación de los QTLs). Se calculó el nivel medio de dominancia como el cociente d/a y se determinaron los valores de acción génica de cada QTL según Stuber *et al.* (1987):

Acción génica	Cociente d/a
aditiva (A)	0-0,20
dominancia parcial (DP)	0,21-0,80
dominancia (D)	0,81-1,20
sobredominancia (SD)	>1,20

Como convención el signo del efecto de aditividad del alelo **B** (proveniente del genotipo B2) define la contribución de cada parental en cada QTL. Un signo positivo indica que el alelo que aumentaba el **IG** vino de B2 y el negativo que el alelo vino de IS. Vale recordar que a menor valor de IG, mayor es la resistencia al BPC.

Los comandos "sequence" y "map" se emplearon para determinar la variación fenotípica total en el BPC, atribuida al modelo de múltiples QTLs el cual contempla todos QTLs significativos. Cuando se detectó más de un pico dentro de un grupo de ligamiento, se analizó la posibilidad de que existieran dos QTLs ligados. En este caso se fijó el pico con mayor valor de LOD y se volvió a rastrear el genoma para computar el valor de LOD para el modelo de dos QTLs. Si el valor de LOD aumenta significativamente en el posible lugar del segundo QTL, implica que es más probable que sean 2 los QTLs en lugar de uno.

9. TRANSFORMACION DE MARCADORES DOMINANTES A CODOMINANTES.

Para posibilitar el estudio de los tres estados alélicos presentes en los marcadores codominantes se transformaron los marcadores RAPDs ligados al BPC. Para esto se corrieron dichos RAPDs en geles de agarosa de bajo punto de fusión y se extrajeron y purificaron las bandas ADN de interés con fenol:cloroformo (Sambrook et al., 1989). Este ADN fue marcado radiactivamente y utilizado como sonda de tipo RFLP. Primeramente, se hibridaron membranas conteniendo ADN de ambos parentales digerido con cinco enzimas de restricción y posteriormente se hibridaron membranas conteniendo ADNs de todos los individuos F₂ digeridos con aquellas enzimas que revelaron polimorfismos con esta sonda.

10. COMPARACIONES ENTRE EL BPC EN SORGO Y TRIGO

Para verificar si existía algún tipo de relación entre las regiones asociadas al BPC detectados en trigo (Anderson *et al.*, 1993) y las del presente trabajo, se utilizaron como sondas de RFLP seis de los diez marcadores que en el mencionado trabajo se presentaron ligadas al carácter. Al igual que en el punto

anterior, se determinó inicialmente si las sondas revelaban polimorfismos entre IS y B2 y luego se las mapeó en la F₂.

RESULTADOS

1. DETERMINACIÓN DE LA REACCIÓN AL BROTADO PRE-COSECHA

El ensayo biológico para la determinación del grado de resistencia o susceptibilidad al brotado se realizó sometiendo las semillas a condiciones controladas de humedad y temperatura favorables para la germinación (ver Materiales y Métodos). Se evaluaron las semillas de 194 individuos de población segregante F_2 (IS 9530 x B2 Redland) determinándose para cada uno el Índice de Germinación (IG).

Se seleccionaron inicialmente 93 individuos que constituyeron la población de mapeo (i.e. los individuos que se utilizaron luego para los análisis de cosegregación de los marcadores moleculares entre sí y con el carácter). El número de individuos (93) se estableció en función de la capacidad de las máquinas de PCR y la capacidad de siembra en los geles de agarosa y poliacrilamida. Estos implementos permiten trabajar con 96 muestras, lo que posibilitaba evaluar los ADNs genómicos de los 2 padres, la F_1 y los 93 individuos F_2 . La selección de la población de mapeo no produjo variaciones significativas respecto de los parámetros poblacionales que presentaban los originales 194 individuos.

La media de los valores de IG en la población de mapeo fue de 18,11, mientras que el desvío fue de 15,19. En la Figura 4 se muestra el histograma de distribución de frecuencias del IG,

en donde se indica además la media de los valores obtenidos y la curva de ajuste a la distribución normal de los valores. Debido a que, como se esperaba, los datos no se distribuyen en forma discreta no resulta posible emplear la técnicas de mapeo comúnmente utilizadas con caracteres cualitativos, por lo que deben ser analizados como un carácter de variación continua.

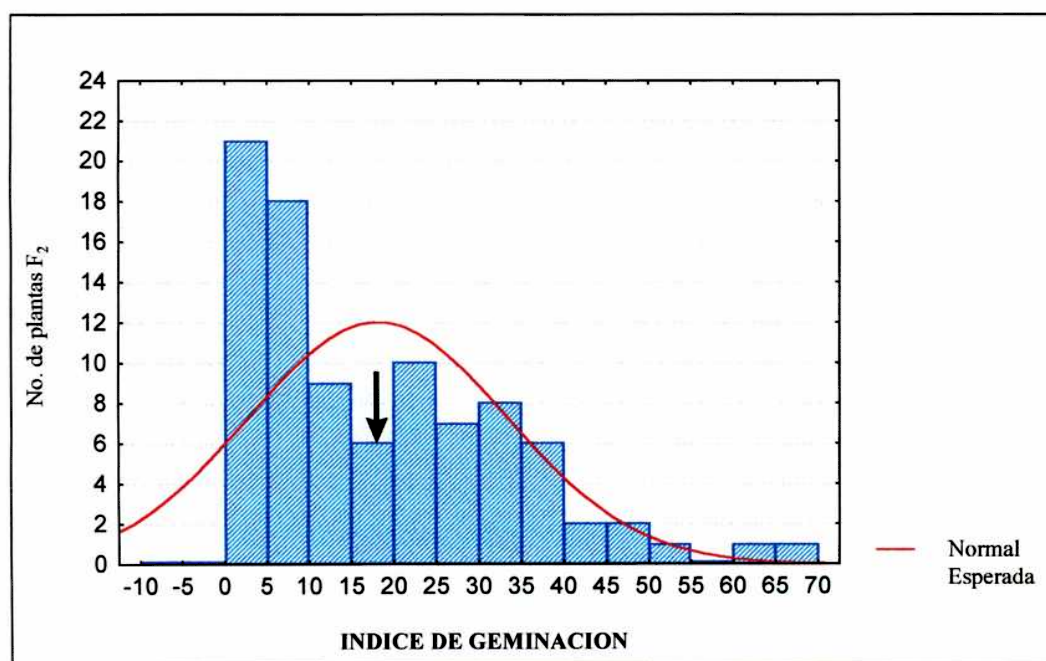


Figura 4 Distribución de frecuencias del Índice de Germinación (IG) en la población segregante F₂ (IS9530 x B2 Redland). Ajuste de los valores a la distribución normal y media de los valores de IG (↓).

Siendo el IG un valor que surge de incubar las semillas en condiciones óptimas para la germinación, es obvio que a mayor valor de IG, mayor es la susceptibilidad al brotado y a menor valor, mayor la resistencia.

La prueba de χ^2 de bondad de ajuste a la distribución normal resulta significativa ($p > 0,0001$) y por lo tanto se acepta que los datos no están normalmente distribuidos. Este fenómeno es frecuente en estudios similares al presente (León *et al.*, 1995; Lin *et al.*, 1995). Se observa en la Figura 4 que los valores de IG se encuentran desplazados hacia los valores inferiores (i.e. mayor número de individuos F_2 resistentes), lo cual se refleja como una asimetría de la distribución de los valores. Para descartar que la falta de normalidad fuera debida a la forma de medición de los datos, se intentó realizar transformaciones de los datos originales de IG para verificar si resultaban en un mejor ajuste a la distribución normal. Debido a que las transformaciones (\log_{10} , raíz cuadrada y arcoseno) no normalizaron completamente los datos y/o resultaron inaplicables en esta situación, se concluyó que la falta de normalidad era atribuible a la magnitud de los efectos genéticos de los loci que segregaban en la población. Se decidió por este motivo, utilizar los datos sin transformar para el mapeo de QTLs.

Para estudiar los extremos de la población y así descartar que existiera segregación transgresiva, se analizaron 7 familias F_3 derivadas de 7 individuos F_2 , 3 susceptibles (S42, S85 y S47) y 4 resistentes (S55, S56, S108 y S159), junto con las líneas parentales (Figura 5). Estas familias derivan de aquellas segregantes F_2 que presentaron los valores de extrema susceptibilidad y resistencia

respectivamente. Los análisis se centraron en la comparación de los parentales y segregantes a nivel de F_3 y no de F_2 , porque en este último caso hubo un importante grado de daño de los parentales durante el ensayo, lo cual imposibilitó el cálculo de los valores medios de IG tanto de IS como de B2.

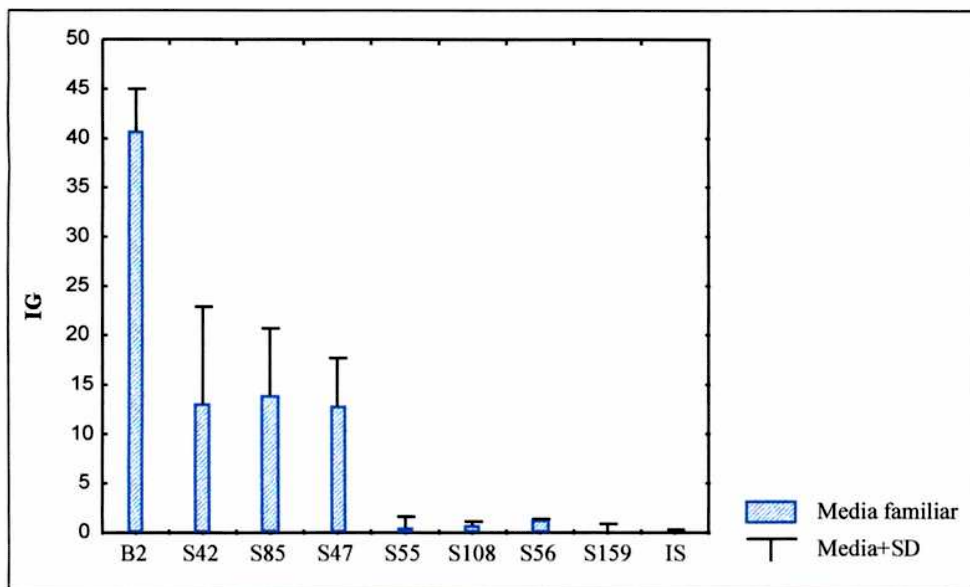


Figura 5: Índice de Germinación de 7 familias F_3 (S42, S85, S47, S55, S108, S56, S159) y de las líneas parentales (IS y B2). Las barras representan las medias de por lo menos 10 individuos.

Como se observa en la Figura 5, si bien los valores de las familias resistentes presentaron valores significativamente inferiores (medidos en IG) que las susceptibles (confirmando las observaciones de la F_2); en ningún caso fueron más extremos que los parentales, es decir individuos con menores valores de IG que los IS y/o con mayores valores de IG que los B2. Las líneas parentales fueron las que presentaron los valores extremos de

resistencia y susceptibilidad, lo cual es una evidencia de que no hay herencia transgresiva.

2. ANALISIS y MAPEO DE RFLPs

La selección inicial de las sondas informativas (i.e. aquellas que revelaban polimorfismos) que se utilizaron luego en el mapeo, se realizó por medio de técnicas de hibridación y detección no radiactivas (ver Materiales y Métodos).

Se ensayaron 157 sondas de las genotecas UMC y BNL de las cuales 140 hibridaron correctamente. De estas 140, 54 (39%) resultaron polimórficas con al menos 1 de las 5 enzimas de restricción probadas. Si bien *EcoRI* y *EcoRV* revelaron mayor número de polimorfismos (aproximadamente 20%) que *HindIII*, *XbaI* y *BamHI*, por lo general cuando una sonda reveló un polimorfismo, éste fue visualizable para 2 o más enzimas. Este fenómeno es atribuible a que las mutaciones detectadas, no son probablemente puntuales (i.e. cambio de un nucleótido en el sitio de restricción) sino estructurales (pequeñas inserciones o deleciones no detectables citológicamente (Tanksley *et al.*, 1989). En la Tabla 1 se muestran los clones UMC y BNL ensayadas.

Tabla 1: Resultados de las hibridaciones con las clones de maíz UMC y BNL. Se detalla la localización de cada clon en los cromosomas del maíz.

Clon	Cromosoma	Resultado	Clon	Cromosoma	Resultado
UMC 1	5	Monomórfica	UMC 90	5	Monomórfica
UMC 2A	3	Polimórfica	UMC 91	7	Monomórfica
UMC 3A	8	Polimórfica	UMC 92	3	Monomórfica
UMC 3B	3	Polimórfica	UMC 93	8	Monomórfica
UMC 4	2	Polimórfica	UMC 94	9	Monomórfica
UMC 5	2	Polimórfica	UMC 95	9	Monomórfica
UMC 6	2	Monomórfica	UMC 96	3	Polimórfica
UMC 7	8	Monomórfica	UMC 97	3	Polimórfica
UMC 8A	1	Polimórfica	UMC 98	2	Polimórfica
UMC 8B	2	Polimórfica	UMC 102	3	Monomórfica
UMC 10	3	Monomórfica	UMC 103	8	Monomórfica
UMC 11	1	Monomórfica	UMC 104	5	Monomórfica
UMC 12	8	Monomórfica	UMC 105	9	Monomórfica
UMC 13	1	Monomórfica	UMC 106	1	Monomórfica
UMC 14	1	Polimórfica	UMC 107	1	Polimórfica
UMC 15	4	Polimórfica	UMC 108	5	Monomórfica
UMC 16	3	Monomórfica	UMC 109	9	Polimórfica
UMC 17	3	Monomórfica	UMC 110	7	Sin resultado
UMC 19	4	Sin resultado	UMC 111	4	Sin resultado
UMC 20	9	Monomórfica	UMC 113	9	Monomórfica
UMC 21	6	Monomórfica	UMC 114	9	Polimórfica
UMC 22	2	Polimórfica	UMC 115	1	Polimórfica
UMC 23	1	Monomórfica	UMC 116	7	Polimórfica
UMC 26	3	Monomórfica	UMC 119	1	Monomórfica
UMC 27	5	Polimórfica	UMC 120	8	Polimórfica
UMC 28	6	Monomórfica	UMC 121	3	Monomórfica
UMC 29	1	Polimórfica	UMC 122	2	Monomórfica
UMC 30	8	Sin resultado	UMC 124	8	Sin resultado
UMC 31	4	Polimórfica	UMC 125A/B	2	Monomórfica
UMC 32	3	Polimórfica	UMC 126	5	Sin resultado
UMC 33	1	Monomórfica	UMC 127	9	Monomórfica
UMC 34	2	Polimórfica	UMC 128	1	Monomórfica
UMC 35	5	Polimórfica	UMC 129	1	Polimórfica
UMC 36	2	Monomórfica	UMC 130	10	Monomórfica
UMC 37	1	Polimórfica	UMC 131	2	Sin resultado
UMC 38	6	Monomórfica	UMC 132	6	Monomórfica
UMC 39	3	Polimórfica	UMC 133	4	Monomórfica
UMC 40	5	Sin resultado	UMC 134	6	Polimórfica
UMC 42	4	Polimórfica	UMC 135	2	Monomórfica
UMC 43	5	Polimórfica	UMC 136	7	Monomórfica
UMC 44	10	Monomórfica	UMC 137	2	Monomórfica
UMC 45	7	Monomórfica	UMC 138	6	Polimórfica
UMC 46	6	Sin resultado	UMC 139	2	Monomórfica

UMC 47	4	Monomórfica	UMC 140	1	Polimórfica
UMC 48	8	Polimórfica	UMC 141	5	Sin resultado
UMC 49	2	Monomórfica	UMC 146	10	Polimórfica
UMC 50	3	Polimórfica	UMC 147	5	Monomórfica
UMC 51	5	Polimórfica	UMC 148	9	Polimórfica
UMC 52	4	Polimórfica	UMC 149	7	Monomórfica
UMC 53	2	Sin resultado	UMC 150	2	Monomórfica
UMC 54	5	Monomórfica	UMC 151	7	Sin resultado
UMC 55	2	Monomórfica	UMC 152	6	Polimórfica
UMC 56	7	Polimórfica	UMC 153	9	Monomórfica
UMC 57	10	Monomórfica	UMC 154	3	Polimórfica
UMC 58	1	Monomórfica	UMC 155	10	Monomórfica
UMC 59	6	Monomórfica	UMC 156	4	Monomórfica
UMC 60	3	Monomórfica	UMC 157	1	Sin resultado
UMC 61	2	Sin resultado	UMC 158	4	Monomórfica
UMC 62	6	Polimórfica	UMC 161	1	Monomórfica
UMC 63	3	Polimórfica	UMC 163	10	Sin resultado
UMC 64	10	Monomórfica	UMC 164	1	Sin resultado
UMC 65	6	Monomórfica	UMC 165A	3	Monomórfica
UMC 66	4	Sin resultado	UMC 166	5	Monomórfica
UMC 67	5	Sin resultado	UMC 167	1	Polimórfica
UMC 68	5	Monomórfica	UMC 168	7	Monomórfica
UMC 70A		Polimórfica	UMC 172	6	Sin resultado
UMC 70C		Polimórfica	UMC 174	8	Polimórfica
UMC 71	6	Polimórfica	UMC 177	6	Polimórfica
UMC 72	5	Monomórfica	UMC 181		Polimórfica
UMC 76	1	Monomórfica	UMC 182		Polimórfica
UMC 80	7	Polimórfica	UMC 185.3		Polimórfica
UMC 81	9	Monomórfica	UMC 188		Monomórfica
UMC 83	1	Polimórfica	UMC 193		Monomórfica
UMC 84	1	Monomórfica	UMC 196		Monomórfica
UMC 85	6	Monomórfica	UMC 197		Monomórfica
UMC 86	1	Monomórfica	UMC 198		Monomórfica
UMC 87	4	Monomórfica	UMC ij		Monomórfica
UMC 88	2	Polimórfica	BNL 1.380	5	Polimórfica
UMC 89	8	Monomórfica			

Las clones sin resultados son las que no hibridaron correctamente.

En la Figura 6 se muestra una luminografía resultante del ensayo con 4 sondas probadas en 4 membranas. Se observa que la sonda UMC 42 reveló polimorfismos para las 5 enzimas de restricción ensayadas, presentando el padre resistente (IS) y el susceptible (B2) fragmentos de distinto tamaño. Por otro lado, las sondas UMC 50, UMC 59 y UMC 63 no presentaron polimorfismos.

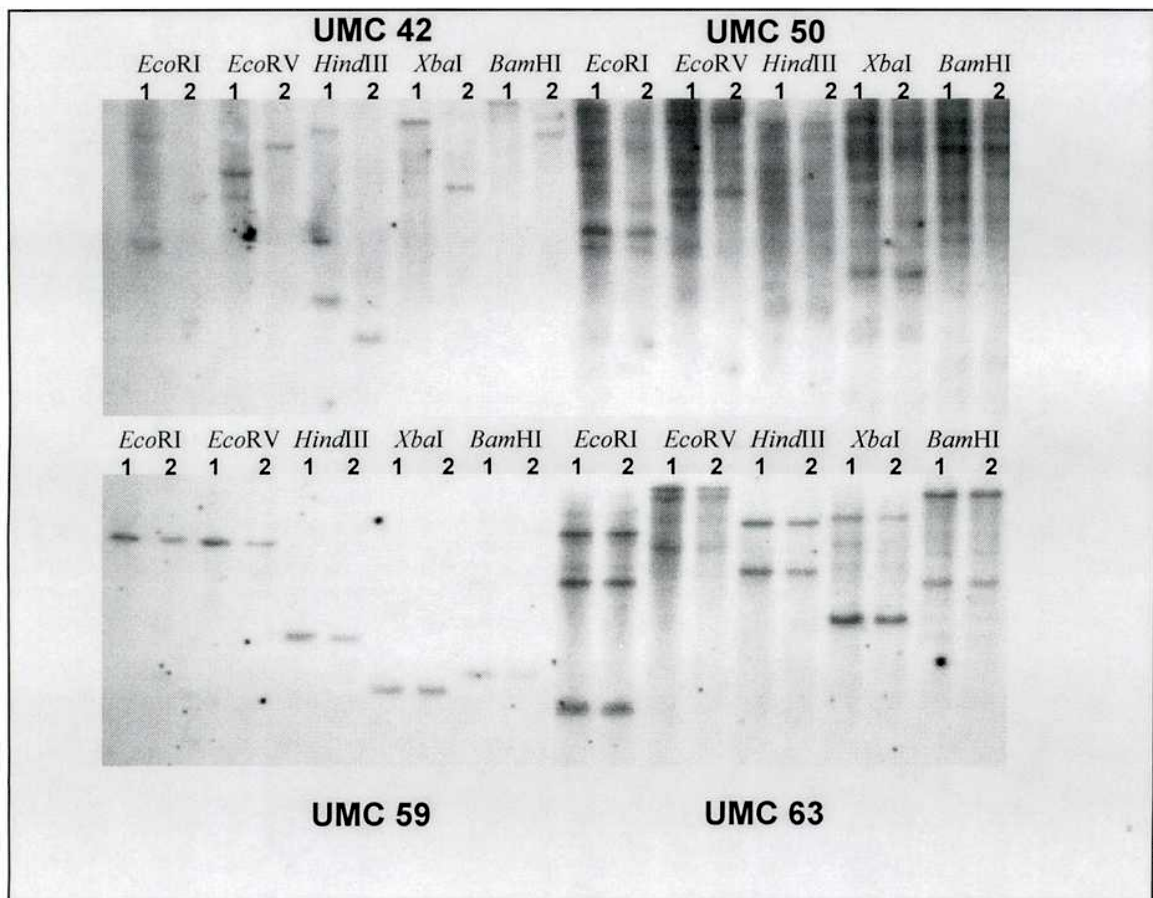


Figura 6: Luminografía de las sondas UMC 42, UMC 50, UMC 59 y UMC 63, marcadas con digoxigenina. Las membranas contienen ADN genómico de IS (1) y B2 (2) digeridos con 5 enzimas de restricción. La detección de las hibridaciones se realizó por quimioluminiscencia.

Utilizando métodos de hibridación y detección radiactivos (^{32}P) se mapearon posteriormente 7 de las sondas que resultaron polimórficas. Se escogieron sondas cuyos loci de detección ya hubieran sido localizados en anteriores publicaciones, en mapas genéticos de sorgo y/o maíz. De esta manera se podría contar con un paralelismo entre estos mapas y el construido en el presente trabajo, así como un ancla para localizar marcadores ligados para los que no se cuenta con información de mapa.

En la Figura 7 se presenta una autorradiografía con los ADNs genómicos de 24 individuos (IS, B2, F₁ y 21 F₂) digeridos con *Eco*RI e hibridados con la sonda UMC 3 marcada con ^{32}P . En esta Figura se puede visualizar el carácter codominante de los marcadores RFLP, ya que es posible diferenciar 3 clases genotípicas distintas. Los individuos homocigotas como el parental IS (A), presentaron sólo el alelo IS (indicado con una flecha). Los homocigotas como el parental B2 (B) presentaron sólo el alelo B2 (indicado con una flecha). Los individuos F₁ (heterocigotas IS x B2) presentaron los 2 alelos simultáneamente. Se muestra esta hibridación, además, porque UMC 3 (como se verá más adelante) pertenece al grupo de ligamiento que presentó asociación con un QTL para BPC.

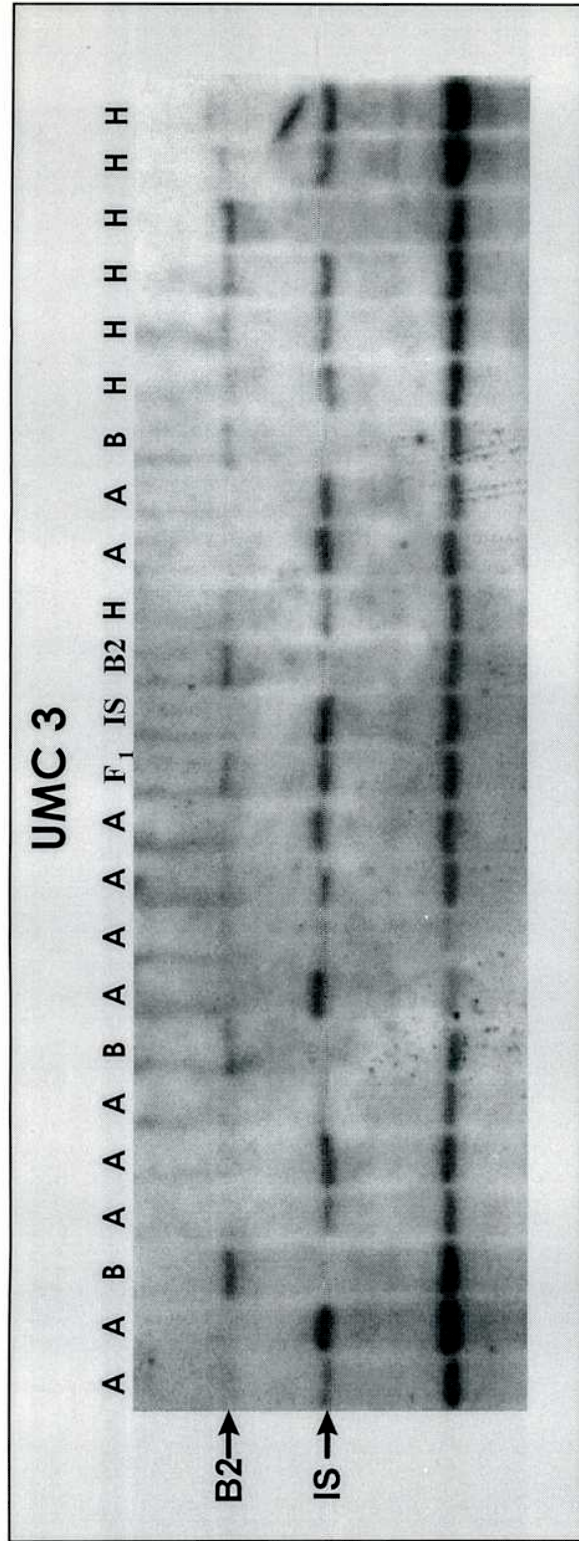


FIGURA 7: Autorradiografía mostrando la segregación del RFLP UMC 3, en 21 individuos F₂ junto con IS, B₂ y F₁. Los ADN_s fueron digeridos con la enzima EcoRI. Se indican con sendas flechas los alelos correspondientes a cada parental. La sonda esta marcada con ³²P. A = homocigota IS; B = homocigota B₂; H = heterocigota.

3. ANALISIS Y MAPEO DE RAPDs

Las determinación de "primers" útiles para el mapeo (i.e. aquellos que revelaron diferencias entre IS y B2) produjo los siguientes resultados: de los 131 "primers" analizados, 103 mostraron amplificación detectable y de éstos, 31 (30%) evidenciaron polimorfismos entre las líneas parentales. Estos 31 "primers" generaron 55 marcadores (1,8 marcador/"primer") Siendo por lo tanto el grado de polimorfismo = 53% (55 marcadores/103 "primers" ensayados). En la Tabla 2 se indican los "primers" utilizados con el respectivo resultado.

Tabla 2: Resultados de las amplificaciones de los "primers" ensayados.

Primer	Resultado	Primer	Resultado	Primer	Resultado
OP A01	Monomórfico	OP C16	Polimórfico	OP H16	Monomórfico
OP A02	Monomórfico	OP D02	Polimórfico	OP H17	Monomórfico
OP A04	Monomórfico	OP D05	Polimórfico	OP H18	Polimórfico
OP A05	Monomórfico	OP D13	Monomórfico	OP H19	Polimórfico
OP A06	Monomórfico	OP D19	Monomórfico	OP H20	Polimórfico
OP A07	Polimórfico	OP D20	Monomórfico	OP X01	Polimórfico
OP A08	Monomórfico	OP F13	Polimórfico	OP X02	Polimórfico
OP A09	Monomórfico	OP F14	Polimórfico	OP X03	Monomórfico
OP A10	Polimórfico	OP F15	No amplificó	OP X04	Monomórfico
OP A11	Polimórfico	OP F16	Polimórfico	OP X05	Polimórfico
OP A12	No amplificó	OP F17	Polimórfico	OP X06	Monomórfico
OP A13	Monomórfico	OP F18	No amplificó	OP X07	Polimórfico
OP A14	No amplificó	OP F19	No amplificó	OP X08	Monomórfico
OP A15	Monomórfico	OP F20	Polimórfico	OP X09	No amplificó
OP A16	Monomórfico	OP G01	Monomórfico	OP X10	No amplificó
OP A17	Monomórfico	OP G02	Polimórfico	OP X11	No amplificó
OP A18	Polimórfico	OP G03	Monomórfico	OP X12	Polimórfico
OP A19	Monomórfico	OP G04	Monomórfico	OP X13	Polimórfico
OP A20	Monomórfico	OP G05	Polimórfico	OP X14	Monomórfico
OP B01	Polimórfico	OP G06	Polimórfico	OP X15	No amplificó

OP B02	No amplificó	OP G07	No amplificó	OP X16	No amplificó
OP B03	Monomórfico	OP G08	No amplificó	OP X17	Polimórfico
OP B04	Polimórfico	OP G09	Monomórfico	OP X18	Monomórfico
OP B05	Monomórfico	OP G10	Polimórfico	OP X19	No amplificó
OP B06	No amplificó	OP G11	Polimórfico	OP X20	No amplificó
OP B07	Polimórfico	OP G12	Polimórfico	OP Y01	Polimórfico
OP B08	Monomórfico	OP G13	Polimórfico	OP Y02	Monomórfico
OP B09	No amplificó	OP G14	Polimórfico	OP Y03	Monomórfico
OP B10	Polimórfico	OP G15	Polimórfico	OP Y04	Polimórfico
OP B11	Polimórfico	OP G16	Monomórfico	OP Y05	Monomórfico
OP B12	No amplificó	OP H01	No amplificó	OP Y06	Monomórfico
OP B13	Monomórfico	OP H02	Polimórfico	OP Y07	No amplificó
OP B14	No amplificó	OP H03	Polimórfico	OP Y08	No amplificó
OP B15	No amplificó	OP H04	Polimórfico	OP Y09	Monomórfico
OP B16	No amplificó	OP H05	Monomórfico	OP Y10	Monomórfico
OP B17	Polimórfico	OP H06	Monomórfico	OP Y11	Polimórfico
OP B18	Monomórfico	OP H07	Polimórfico	OP Y12	No amplificó
OP B19	No amplificó	OP H08	Monomórfico	OP Y13	Monomórfico
OP B20	No amplificó	OP H09	Polimórfico	OP Y14	Polimórfico
OP C03	No amplificó	OP H10	No amplificó	OP Y15	Monomórfico
OP C04	No amplificó	OP H11	No amplificó	OP Y16	Polimórfico
OP C05	Monomórfico	OP H12	Polimórfico	OP Y17	Monomórfico
OP C09	No amplificó	OP H13	Polimórfico	OP Y18	Polimórfico
OP C11	Polimórfico	OP H14	Polimórfico	OP Y19	Monomórfico
OP C13	Polimórfico	OP H15	Polimórfico	OP Y20	Polimórfico

Los nombres de los "primers" son los sugeridos por el proveedor (OPERON Technologies, EUA): OP = OPERON; A, B, C, etc. = "kit" A, B, C, etc. y el número deriva del homónimo de cada "kit".

Se muestra en la Figura 8 el análisis de 16 de estos "primers" de los cuales algunos presentan polimorfismos entre IS y B2 (indicados con una flecha en la figura) y otros no mostraron diferencias resultando por lo tanto no informativos.

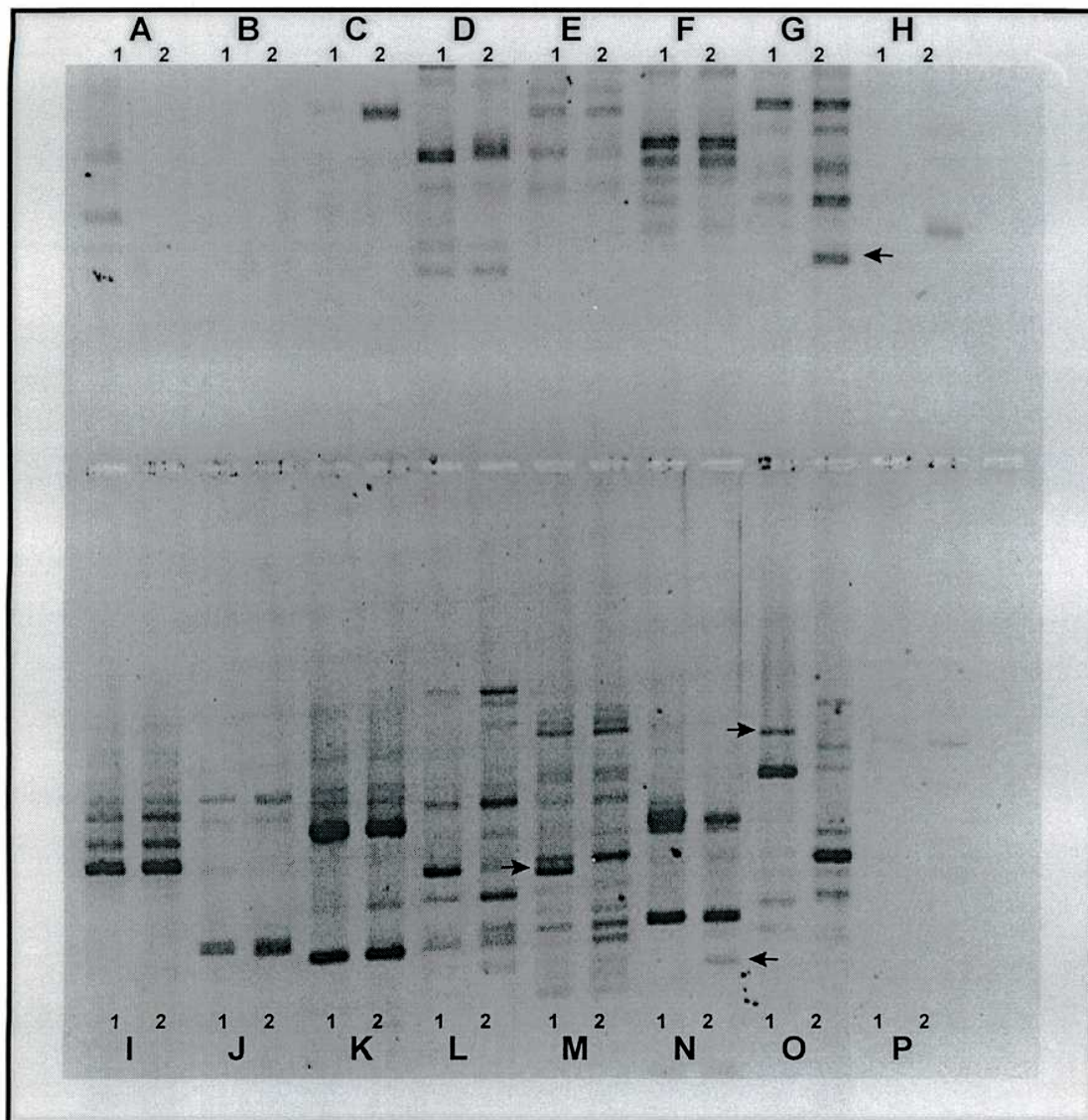


Figura 8: Detección de RAPDs. Amplificación de ADN de IS (1) y B2 (2) con 16 "primers" (A-P). Se indican con una flecha alguna de las bandas polimórficas que fueron luego mapeadas. Productos de PCR corridos en un gel de agarosa (1,5%, TBE 1x) teñido con EtBr.

Se mapearon 50 de los marcadores RAPDs obtenidos (i.e. bandas amplificadas polimórficas). En la Figura 9 se muestran los patrones de 20 individuos F_2 junto con las líneas parentales y la F_1 generados por la amplificación con el "primer" OP H02. Se observa la segregación de 1 banda (marcador) visualizándose claramente el carácter dominante de los marcadores RAPD. El parental IS presenta una banda y el B2 no la tiene. El híbrido F_1 presenta la misma banda que IS y en la progenie F_2 no es posible diferenciar si los individuos de genotipo IS de los F_1 . Sólo se puede diferenciar a los B2.

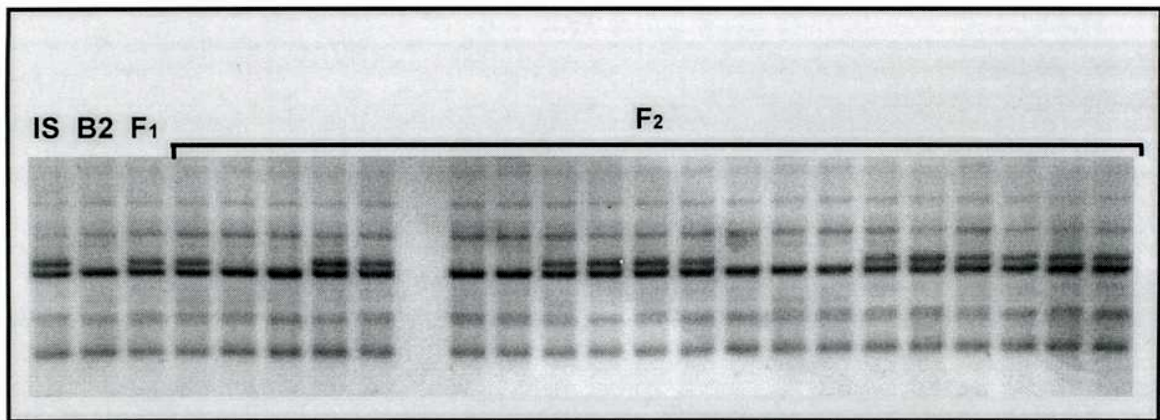


Figura 9: Segregación de un marcador RAPD. ADNs de IS, B2, F_1 y 20 individuos F_2 amplificados con el "primer" OP H02. Productos de PCR corridos en un gel de agarosa (1,5%, TBE 1x) teñido con EtBr.

4. ANALISIS Y MAPEO DE AFLPs

Como se explica en Materiales y Métodos, la técnica de AFLP no requiere de una selección inicial a fin de escoger las combinaciones de "primers" que permitan visualizar polimorfismos. Esto se debe a la gran cantidad de fragmentos que se generan por cada amplificación. Las 12 combinaciones de "primers" *EcoRI/MseI* con tres nucleótidos selectivos (+3) produjeron 55 marcadores AFLPs (4,6 marcadores/combinación). Se utilizaron las siguientes 12 combinaciones de primers *EcoRI* (E) y *MseI* (M): E32/M32; E38/M31; E38/M38; E38/M39 ;E38/M40; E38/M41; E38/M42; E39/M31; E39/M39; E46/M39; E46/M40; E46/M41. Todas las combinaciones produjeron marcadores polimórficos (entre 1 y 7). El número promedio de productos que se observó en los geles fue 60 con lo que estimó que aproximadamente 6,5% de las bandas totales son polimórficas en sorgo.

En la Figura 10 se muestra la segregación de 5 marcadores AFLPs generados con la combinación E38/M31.

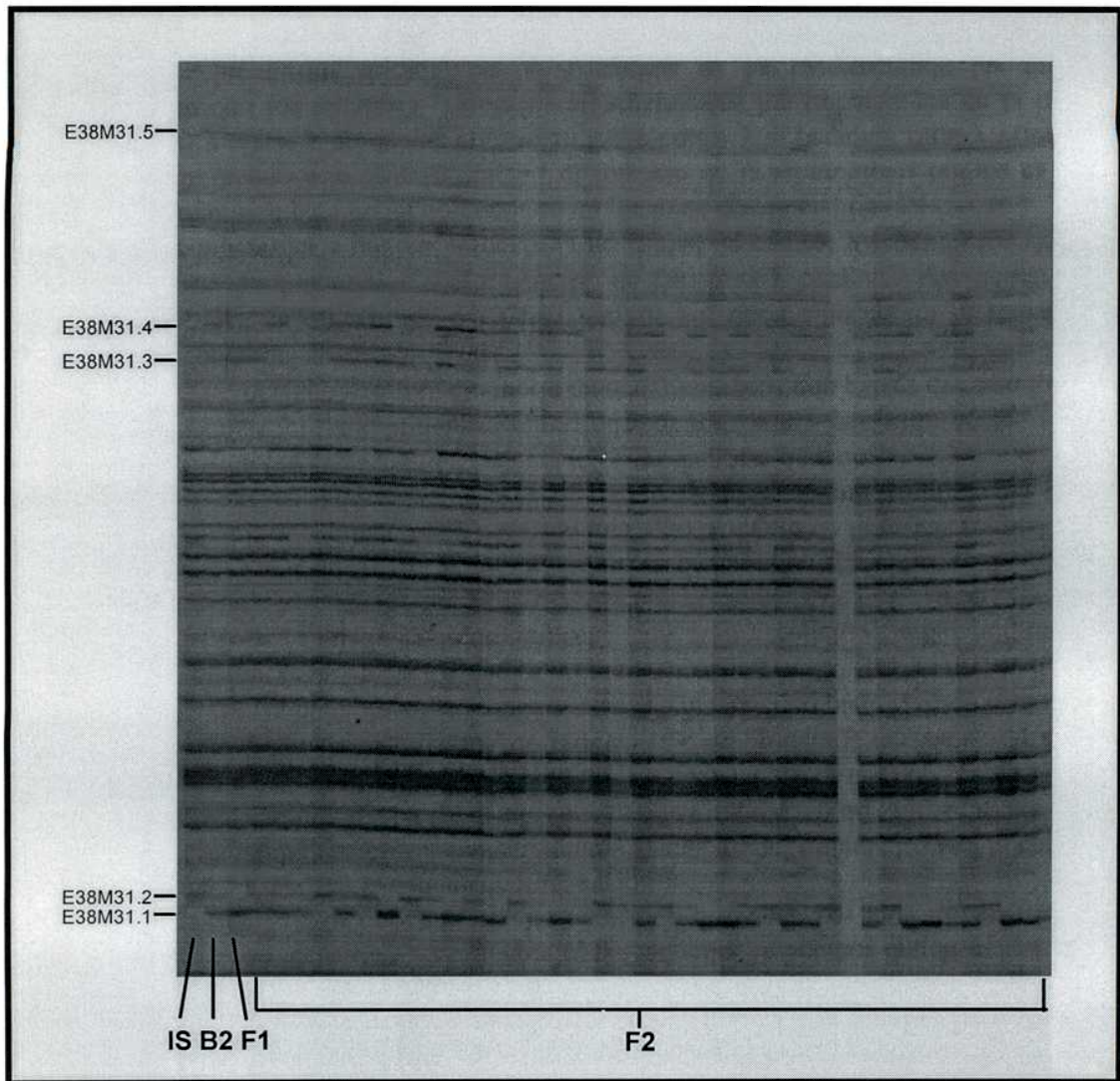


FIGURA 10: Autorradiografía con la segregación de los marcadores AFLP E38/M31.1 a E38/M31.5. Los ADNs amplificados corresponden a IS, B2, F1 y 40 individuos F₂. El primer E38 se encuentra marcado con ³²P.

5. CONSTRUCCIÓN DEL MAPA DEL MAPA BÁSICO DE SORGO

Se estudió la cosegregación de 112 marcadores de los cuales 7 fueron RFLPs, 50 RAPDs y 55 AFLPs. Para esto se analizó la segregación de las bandas que presentaron los individuos de la población de mapeo F₂ para cada RFLP, RAPD y AFLP considerado. En la Tabla 3 se muestran los marcadores moleculares analizados con los correspondientes valores de χ^2 .

Tabla 3: Marcadores moleculares analizados, ubicación y prueba de χ^2 .

Marcador	N	Grupo de ligamiento	χ^2	Marcador	N	Grupo de ligamiento	χ^2
OP A11.1	77	A	ns	OP G12.1	87	no ligado	ns
OP Y14.1	87	J	ns	E32/M32.1	81	A	ns
OP Y14.2	86	no ligado	ns	E32/M32.2	80	L	ns
OP Y14.3	86	N	ns	E32/M32.3	84	B	ns
OP Y14.4	79	J	ns	E32/M32.4	85	B	0,02
OP Y14.5	79	A	ns	E32/M32.5	86	B	ns
OP X5.1	85	A	ns	E38/M31.1	84	A	ns
OP X5.2	89	no ligado	ns	E38/M31.2	85	L	ns
OP Y4.1	85	C	0,04	E38/M31.3	84	H	ns
OP Y16.1	81	A	ns	E38/M31.4	84	C	ns
OP A10.1	88	E	ns	E38/M31.5	85	no ligado	ns
OP A10.2	88	C	ns	E38/M31.6	87	F	ns
OP A10.3	88	A	ns	E38/M38.1	73	no ligado	ns
OP A10.4	87	A	ns	E38/M39.1	69	no ligado	ns
OP Y11.1	86	E	0,01	E38/M39.2	67	G	0,01
OP Y11.2	72	F	ns	E38/M39.3	70	C	ns
OP A18.1	86	F	0,03	E38/M39.4	69	no ligado	ns
OP A7.1	82	B	ns	E38/M39.5	73	E	ns
OP Y18.1	88	I	ns	E38/M39.6	73	J	ns
OP Y18.2	85	K	ns	E38/M39.7	77	B	ns
OP Y18.3	73	H	ns	E38/M40.1	74	no ligado	ns
OP X13.1	89	N	ns	E38/M40.2	75	I	ns

OP Y01.1	87	C	ns	E38/M40.3	63	no ligado	ns
OP Y01.2	86	L	ns	E38/M41.1	81	A	ns
OP Y01.3	84	A	0,01	E38/M41.2	81	A	ns
OP X01.1	89	M	0,0005	E38/M41.3	68	B	ns
OP X12.1	89	no ligado	ns	E38/M42.1	84	C	ns
OP B07.1	80	A	ns	E38/M42.2	82	B	ns
OP B07.2	79	C	ns	E38/M42.3	79	B	0,05
OP B07.3	81	B	ns	E39/M31.1	81	F	ns
OP B10.1	87	A	ns	E39/M31.2	83	F	ns
UMC 71	83	D	ns	E39/M31.3	83	D	ns
OP X02.1	82	E	ns	E39/M31.4	83	F	ns
CDO 64	85	D	ns	E39/M31.5	81	A	ns
OP B11.1	82	A	ns	E39/M39.1	87	F	ns
OP B11.2	81	B	ns	E39/M39.2	83	A	ns
RflpX02.1	72	E	ns	E39/M39.3	82	A	ns
UMC 48	81	no ligado	ns	E39/M39.4	79	no ligado	ns
UMC 70	83	no ligado	ns	E46/M39.1	83	J	ns
OP D02.1	90	M	0,001	E46/M39.2	84	B	ns
OP D05.1	88	D	ns	E46/M39.3	83	C	ns
OP D05.2	88	no ligado	ns	E46/M39.4	82	B	ns
OP C11.1	89	no ligado	ns	E46/M39.5	77	K	ns
OP C13.1	89	F	ns	E46/M39.6	78	no ligado	ns
OP C16.1	87	B	ns	E46/M40.1	79	A	ns
UMC 3	89	E	ns	E46/M40.2	76	A	ns
UMC 182	80	no ligado	ns	E46/M40.3	74	B	ns
OP F13.1	75	A	ns	E46/M40.4	74	B	ns
OP F14.1	89	F	ns	E46/M40.5	74	B	ns
OP H02.1	82	G	ns	E46/M40.6	75	A	ns
OP H09.1	85	I	ns	E46/M40.7	50	B	0,04
OP H09.2	86	G	ns	E46/M41.1	54	no ligado	ns
OP H09.3	85	A	ns	E46/M41.2	60	A	ns
OP G05.1	90	A	ns	E46/M41.3	58	no ligado	ns
OP H12.1	89	H	ns	E46/M41.4	54	A	ns
OP H13.1	87	G	ns	E46/M41.5	44	B	ns

ns = no significativo

Se pudieron ubicar 93 de los marcadores (4 RFLPs, 44 RAPDs y 45 AFLPs) en 14 grupos de ligamiento, cubriendo en total 950 cM con intervalos promedio de 10,2 cM (Figura 11). El grupo de mayor tamaño ("A") abarcó 292,7 cM y contuvo a 25 marcadores y el de menor tamaño ("N") cubrió 2,6 cM y presentó 2 marcadores. Por otro lado, 19 marcadores no se ligaron a ninguno de los 14 grupos.

Las proporciones observadas para las clases genotípicas de 102 marcadores se ajustaron a lo esperado en la prueba de bondad de ajuste (χ^2). Sin embargo 10 loci no lo hicieron así, 5 presentaron deficiencia de la clase IS y 5 de la clase B2. Estos 10 loci estuvieron distribuidos en 9 de los 14 grupos de ligamiento, presentándose los dos marcadores del grupo de ligamiento M con deficiencia de la clase genotípica B2. Estos 2 marcadores fueron los que presentaron mayor distorsión de los 10 antes mencionados.

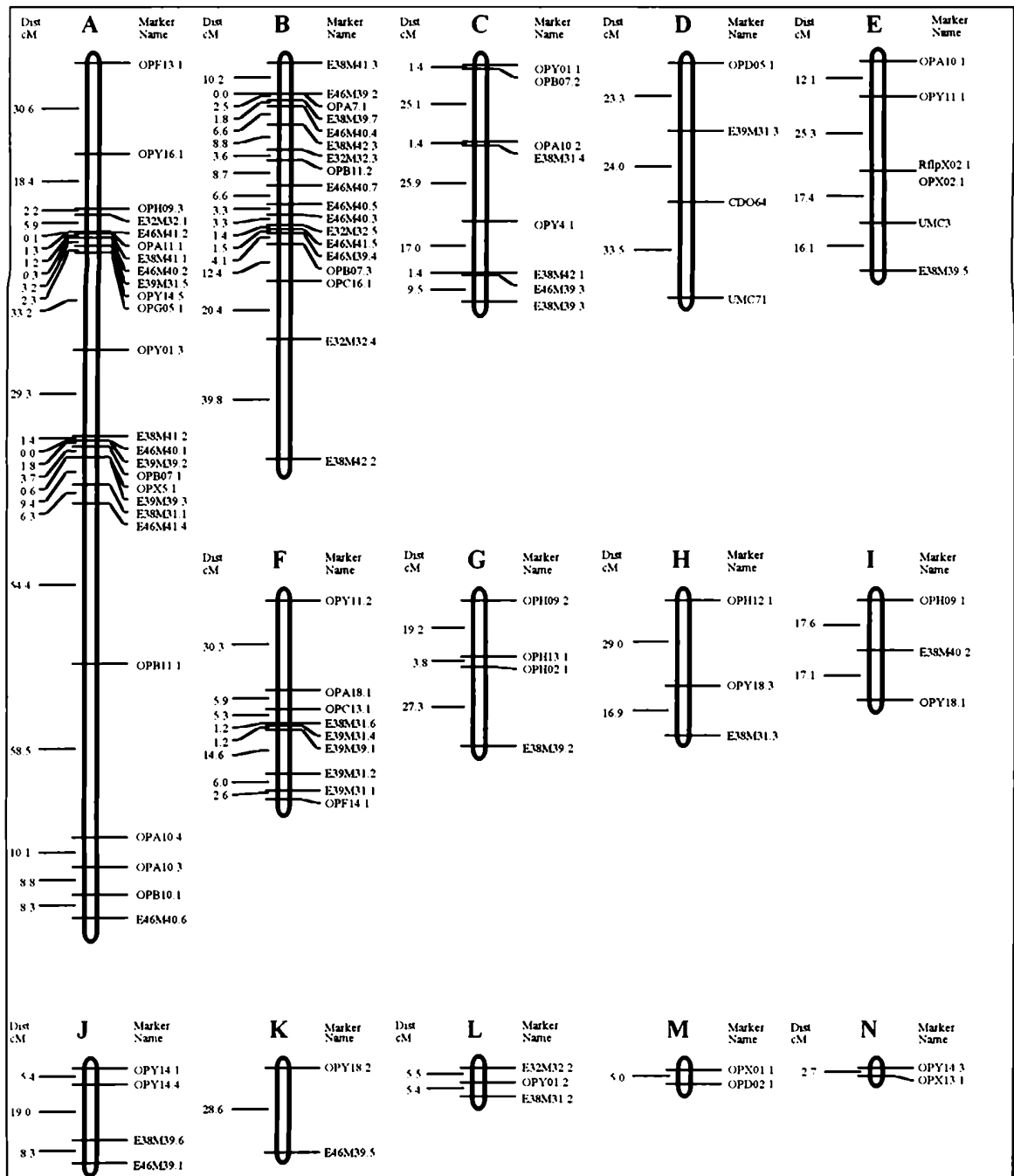


Figura 11: 14 grupos de ligamiento generados por la segregación de 93 marcadores. Se indica en la parte superior de cada grupo el tamaño en cM. Los grupos fueron denominados por orden de tamaño decreciente.

6. ANÁLISIS DE LIGAMIENTO ENTRE EL BPC Y LOS MARCADORES RFLPs, RAPDs y AFLPs. (DETECCION DE QTLs)

Para determinar posibles asociaciones entre los marcadores moleculares mapeados y el BPC se utilizaron el mapeo por intervalos y al Análisis de la Varianza de Factor Simple (ver Materiales y Métodos).

El método de mapeo por intervalos permitió detectar dos regiones genómicas (**QTLs**) no ligadas entre sí con efectos significativos sobre el BPC. Se muestra en la Tabla 3 el resultado generado por el programa MAPMAKER/QTL en el que se detallan los valores de aditividad, dominancia, porcentaje de la varianza fenotípica explicada y valor de LOD cada 2 cM a lo largo de los grupos de ligamiento en los que encontró efectos significativos sobre el BPC. Estos QTLs se localizaron en los grupos de ligamiento E y F (Figura 11).

Tabla 3: Resultados del mapeo por intervalos generados por el programa MAPMAKER/QTL para los grupos de ligamiento E y F.

```
*****
* Output from:                               Thu Nov 14 09:50:26 1996 *
*
*                                           MAPMAKER/QTL
*                                           (version 1.1b)
*
*****
```

Linkage group E...

POS ^a	WEIGHT ^b	DOM ^c	%VAR ^d	LODscore ^e	
-----					OP A10.1
0.0	9.683	-4.948	27.4%	4.765	
2.0	10.34	-3.103	29.1%	5.086	
4.0	11.04	-1.545	32.0%	5.500	
6.0	11.37	-0.748	33.5%	5.871	
8.0	11.49	-0.218	34.2%	6.169	
10.0	11.51	0.209	34.3%	6.405	
12.0	11.46	0.573	34.0%	6.591	
-----					OP Y11.1
0.0	11.38	0.871	33.5%	6.733	
2.0	11.89	-0.449	36.5%	7.070	
4.0	12.53	-2.254	41.5%	7.474	
6.0	13.13	-4.011	47.2%	7.943	
8.0	13.45	-4.852	50.3%	8.343	
10.0	13.64	-5.275	51.8%	8.618	
12.0	13.77	-5.550	52.6%	8.757	
14.0	13.85	-5.696	52.8%	8.749	
16.0	13.89	-5.742	52.3%	8.569	
18.0	13.84	-5.538	50.5%	8.153	
20.0	13.24	-4.429	42.8%	7.389	
-----					RflpX02.1
0.0	11.48	-4.270	31.5%	6.699	
2.0	12.25	-6.737	41.1%	7.634	
4.0	12.18	-7.112	41.8%	7.582	
6.0	11.99	-7.383	41.7%	7.303	
8.0	11.71	-7.592	40.9%	6.872	
10.0	11.34	-7.760	39.6%	6.313	
12.0	10.84	-7.747	37.2%	5.629	
14.0	10.17	-7.429	33.5%	4.821	
16.0	9.163	-6.605	27.4%	3.918	
18.0	7.403	-5.584	18.5%	3.090	
20.0	5.906	-5.292	13.0%	2.565	
-----					UMC 3
0.0	5.566	-5.206	11.9%	2.436	
2.0	5.817	-5.177	12.5%	2.404	
4.0	6.123	-5.115	13.3%	2.381	
6.0	6.483	-5.018	14.3%	2.366	
8.0	6.877	-4.897	15.4%	2.362	
10.0	7.289	-4.964	16.8%	2.368	
12.0	7.698	-5.244	18.6%	2.384	
14.0	8.170	-5.862	21.3%	2.413	
16.0	8.910	-7.015	26.2%	2.470	
-----					E38/M39.5

Linkage group F...

POS	WEIGHT	DOM	%VAR	LOD score	

					OP Y11.1
0.0	14.52	-8.589	52.9%	4.413	
2.0	14.53	-8.418	52.7%	4.332	
4.0	14.55	-8.282	52.6%	4.229	
6.0	14.54	-8.141	52.2%	4.102	
8.0	14.51	-7.988	51.7%	3.948	
10.0	14.44	-7.839	51.0%	3.765	
12.0	14.32	-7.624	49.7%	3.550	
14.0	14.14	-7.372	48.1%	3.302	
16.0	13.76	-6.850	45.1%	3.020	
18.0	10.93	-2.012	26.1%	2.681	
20.0	9.107	1.555	17.8%	2.550	
22.0	8.442	2.717	15.8%	2.474	
24.0	7.986	3.376	14.5%	2.412	
26.0	7.588	3.850	13.4%	2.358	
28.0	7.292	4.041	12.5%	2.310	
30.0	6.981	4.207	11.6%	2.264	

					OP A18.1
0.0	6.809	4.239	11.0%	2.237	
2.0	6.622	4.717	11.3%	2.143	
4.0	6.412	4.943	11.2%	1.996	
6.0	6.120	4.883	10.5%	1.781	

					OP C13.1
0.0	6.070	4.849	10.4%	1.747	
2.0	5.688	4.062	8.8%	1.454	
4.0	4.924	2.414	6.1%	1.109	

					E38/M31.6
0.0	4.505	1.475	4.9%	0.968	

					E39/M31.4
0.0	4.409	0.996	4.5%	0.871	

					E39/M39.1
0.0	4.578	1.667	5.2%	1.017	
2.0	4.454	1.178	4.8%	0.889	
4.0	4.259	0.637	4.3%	0.767	
6.0	4.007	0.015	3.8%	0.656	
8.0	3.700	-0.660	3.4%	0.561	
10.0	3.348	-1.345	3.0%	0.485	
12.0	2.967	-1.984	2.7%	0.432	
14.0	2.575	-2.530	2.5%	0.399	

					E39/M31.2
0.0	2.437	-2.694	2.4%	0.391	
2.0	2.251	-2.576	2.2%	0.369	
4.0	2.064	-2.501	1.9%	0.347	
6.0	1.877	-2.400	1.7%	0.327	

					E39/M31.1
0.0	1.830	-2.392	1.6%	0.322	
2.0	1.808	-2.747	1.8%	0.354	

					OP F14.1

- ªPOS = Posición a lo largo de los grupos de ligamiento
- ºWEIGHT = aditividad
- ºDOM = dominancia
- ª%VAR = porcentaje de la varianza fenotípica explicada
- ºLOD score = valor de LOD

En la Tabla 4 se resumen los resultados del mapeo por intervalos y en Figuras 12 y 13 se muestran los gráficos de LOD,

que son una representación gráfica de lo que ocurre con los valores de LOD a lo largo de los grupos de ligamiento E y F.

El QTL del grupo de ligamiento E explicó el 52,9% de la variación fenotípica observada con un Valor de LOD de 8,77, mientras el QTL del grupo F explicó el 53,2% con un valor de LOD de 4,39. El modelo de múltiples QTLs mostró que ambos QTLs explicaban en conjunto el 83,0% de la variación para el BPC. Cuando se volvió a rastrear el genoma luego de fijar la posición los QTLs localizados, no se detectaron regiones genómicas adicionales con valores significativos. Esto sugiere que los dos picos que se observan en el grupo de ligamiento E (Figura 12) están asociados a un único QTL y la depresión entre ambos posiblemente se deba a errores en la medición de unos pocos individuos como ya fuera destacado por Lincoln *et al.* (1992b).

Tabla 4: Localización y efectos genéticos de los QTLs asociados al BPC. Valores surgidos del mapeo por intervalos (MAPMAKER/QTL)

Grupo de ligamiento	Intervalo ^a	LOD ^b	R ² (%) ^c	Efectos genéticos ^d		d/a	Acción génica
				Aditividad	Dominancia		
E	OP Y11.1 RflpX02.1	8,77	53	13,8	-5,6	-0.40	DP
F	OP Y11.2 OP A18.1	4,39	53	14,6	-8,6	-0,59	DP
Múltiple QTL ^e		12,37	83				

^a Marcadores flanqueantes de la posición más probable de los QTLs

^b Umbral de valores de LOD = 2,6

^c Porcentaje de la varianza fenotípica explicada por los QTL

^d Las unidades son valores de **IG**. Los valores positivos de aditividad están asociados a los alelos de B2

^e Modelo contemplando los 2 QTLs simultáneamente.

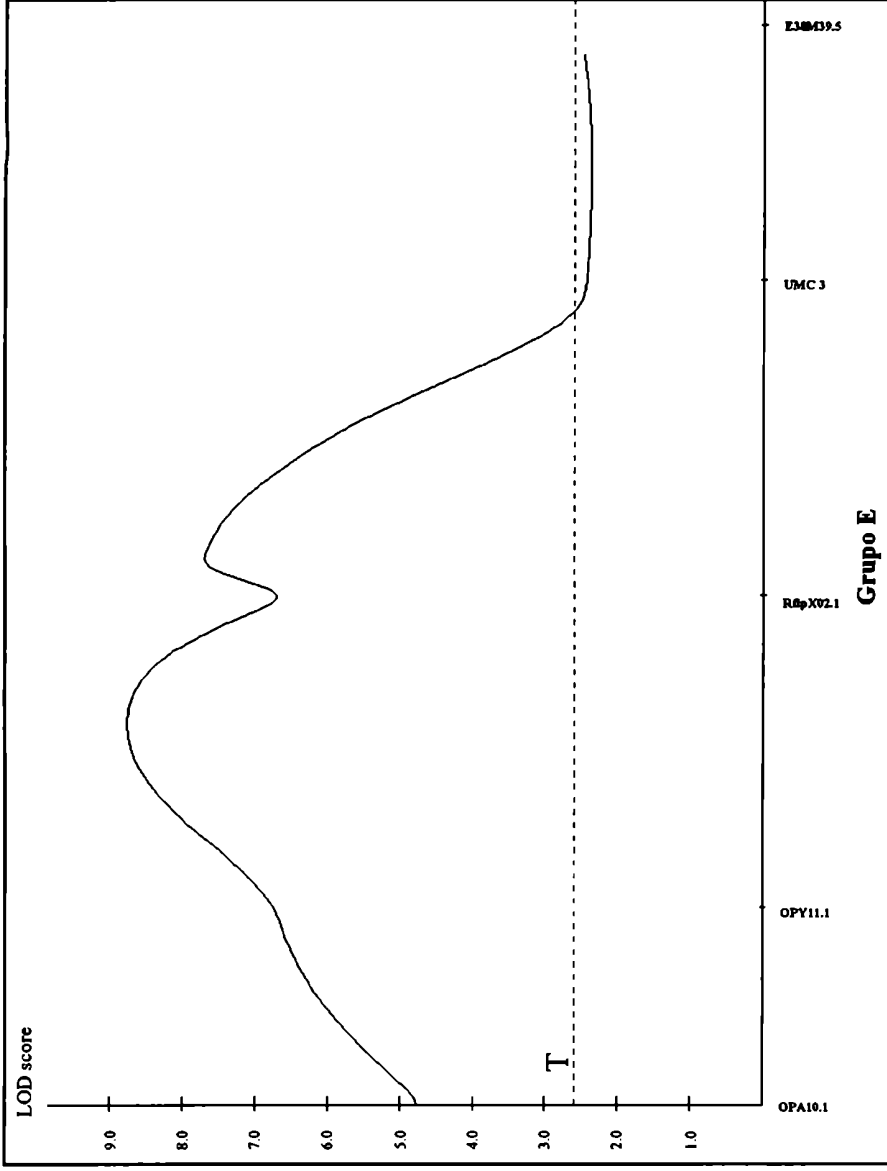


Figura 12: Gráfico de los valores de LOD (a intervalos de 2 cM) para los marcadores del grupo de ligamiento E. Se indica el umbral de significación de los valores (T).

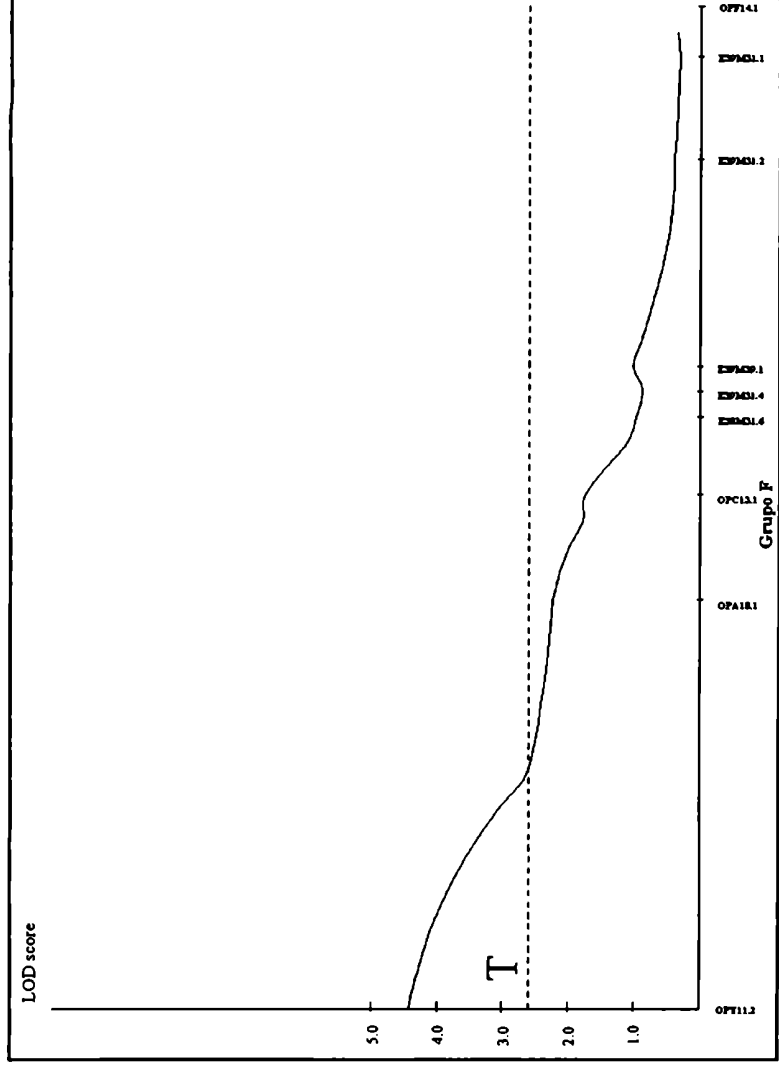


Figura 13: Gráfico de los valores de LOD (a intervalos de 2 cM) para los marcadores del grupo de ligamiento F. Se indica el umbral de significación de los valores (T).

Los dos QTLs mostraron efectos genéticos levemente diferentes (Tabla 4). Si bien los valores de aditividad fueron similares, el QTL del grupo de ligamiento F mostró valores de dominancia de mayor magnitud.

Las medias de las clases genóticas estimadas en la más probable ubicación de los QTLs (Lincoln *et al.*, 1992b) ilustraron la magnitud y el sentido de los efectos genéticos observados (Figura 14). Las diferencias entre ambas clases homocigotas (IS/IS versus B2/B2) fue similar, alrededor de 28,2 unidades de IG. Los heterocigotas (IS/B2) se encontraron más próximos a los IS/IS en ambos QTLs, siendo esto más marcado para el QTL del grupo de ligamiento F. Esta desviación de la linealidad fue producto de la dominancia observada. De acuerdo al cociente d/a , ambos QTLs exhibieron acción génica de tipo parcialmente dominante (PD) (Tabla 4).

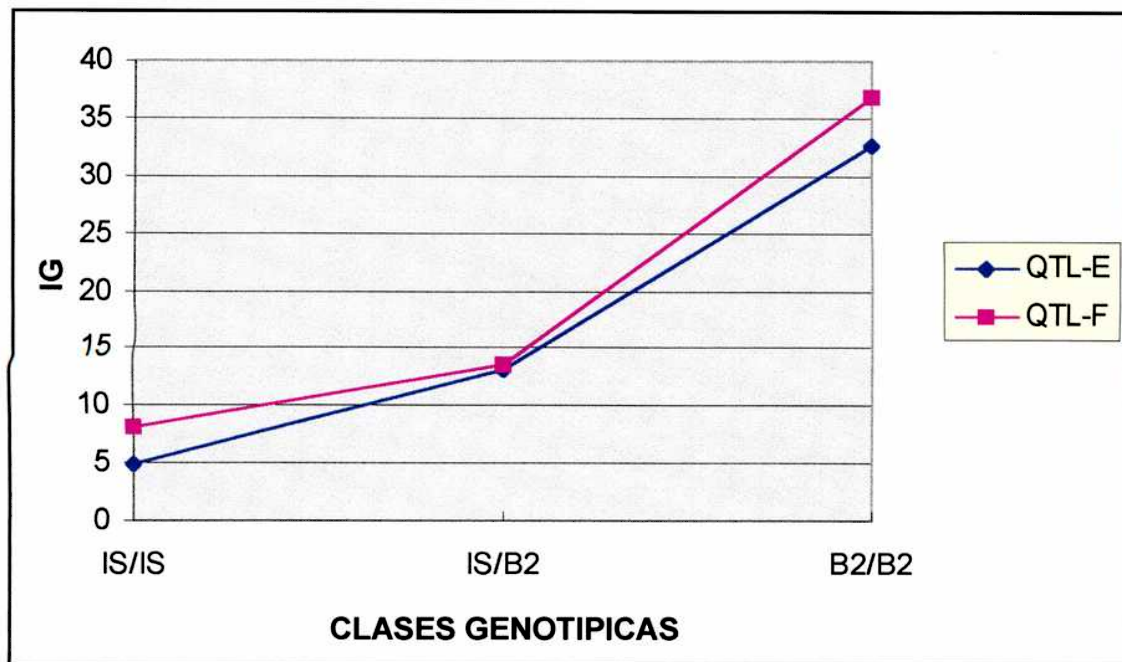


FIGURA 14: Medias de los valores de IG de las clases genotípicas estimadas en la más probable localización de los QTLs asociados al BPC según MAPMAKER/QTL

QTL-E= QTL del grupo de ligamiento E

QTL-F= QTL del grupo de ligamiento F

IS/IS (μ_{AA})= Media de los homocigotas IS

IS/B2(μ_{AB})= Media de los heterocigotas ($\mu_{AA} + a$ (efecto de aditividad) + d (efecto de dominancia)).

B2/B2 (μ_{BB})= Media de los homocigotas B2 ($\mu_{AA} + 2a$)

El Análisis de Varianza de Factor Simple (AVFS) empleado para detectar marcadores ligados al BPC presentó resultados que concordaron con los observados en mapeo por intervalos. Por medio del programa qGENE se realizó el AVFS detectándose 8 marcadores con efectos significativos sobre el BPC ($p < 0,05$ para la prueba F). Esto implica que la prueba F permitió detectar variación significativa en la expresión del carácter asociada con las clases genotípicas de los 8 marcadores. Seis de los 8 marcadores se encuentran ligados entre sí en el Grupo E y 2 en

el Grupo F (Figura 11). Estos 8 marcadores presentaron los valores para AVFS que se muestran en la Tabla 5:

Tabla 5: Resultados del AVFS para 8 marcadores ligados al BPC (qGENE)

MARCADOR	Grupo de ligamiento	F ^a	p ^b	R ² (%) ^c
OP A10.1	E	10,79	0,001461	11,0
OP Y11.1	E	23,43	0,000006	21,6
OP X02.1	E	29,02	<0,000001	27,2
RflpX02.1	E	26,45	<0,000001	27,4
UMC 3	E	7,43	0,007770	7,7
E38/M39.5	E	4,71	0,033233	6,1
OP Y11.2	F	10,93	0,001490	13,3
OP A18.1	F	13,08	0,000400	13,8

^a Valores de la prueba F. Si la significancia de F supera el umbral de $p=0,05$ se considera que existe asociación entre el marcador y el carácter

^b Significancia de los valores de la prueba F

^c Porcentaje de la variación fenotípica explicada por cada marcador

El Análisis de la Varianza de Dos Factores (AVDF) fue utilizado para detectar posibles efectos epistáticos digénicos. Se evaluaron marcadores con valores significativos para el AVFS de los 2 grupos de ligamiento en donde se detectaron los QTLs, considerando todas las posibles combinaciones entre cada marcador del grupo de ligamiento F con cada uno del grupo E (Tabla 6). Debido a que lo que se intentó evaluar era la interacción entre las 2 regiones, no se tomaron en cuenta las combinaciones entre marcadores ligados.

Tabla 6: Resultados del AVDF considerando los marcadores del grupo E (horizontales) y F (verticales) (qGENE)

	OP A10.1	OP Y11.1	OP X02.1	RflpX02.1	UMC 3	E38/M39.5
OPY11.2	8,12 <i>0,00546</i>	4,85 <i>0,03035</i>	5,79 <i>0,01837</i>	ns	ns	ns
OPA18.1	13,60 <i>0,00039</i>	ns	ns	ns	ns	ns

En **negrita**: valores de la prueba F

En *itálicas*: valor p (significancia de la prueba F)

ns = no significativo

Como se observa en la Tabla 6, 4 de las 12 posibles interacciones (33,3%) resultaron significativas. La significación de dichas interacciones (p) estuvo entre 0,03 y 0,0003, por lo que se asume que no son producto del azar.

7. TRANSFORMACION DE MARCADORES DOMINANTES A CODOMINANTES.

El marcador RAPD que se había inicialmente detectado como el más ligado al BPC fue OP X02.1 (Tabla 5). Por tratarse de un marcador RAPD no se podía distinguir entre las clases A y H, comprendidas en los individuos codificados como D (Figura 15 a). Luego de extraer del gel de agarosa la banda correspondiente a dicho marcador de aproximadamente 1400 pb, se la reamplificó para verificar su tamaño y que no se había

arrastrado ADN de otras bandas. Luego de purificarla se la utilizó como sonda de RFLP y se encontró que con la enzima de restricción HindIII se pudo visualizar un polimorfismo entre IS y B2 (Figura 16). Este marcador, denominado RflpX02.1, fue posteriormente mapeado y se lo pudo localizar cosegregando con OP X02.1 en el grupo de ligamiento E (Figura 11).

La transformación del marcador OP X02.1 permitió discernir entre las clases genotípicas enmascaradas como D. En la Figura 15 b, se puede observar como los heterocigotas presentaban valores intermedios entre ambas clases homocigotas.

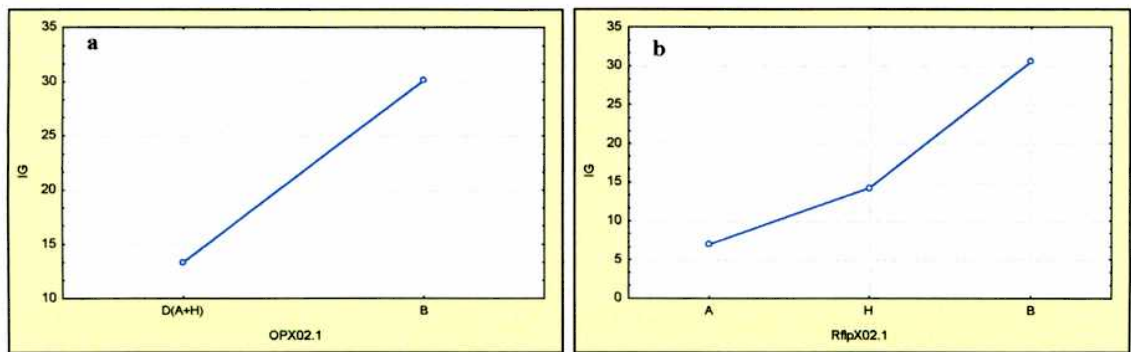


Figura 15: Medias para el IG de las clases genotípicas de los marcadores: a) OPX02.1 y b) RflpX02.1.



Figura 16: Autorradiografía de los ADNs de IS y B2 digeridos con *Hind*III e hibridados con la sonda RflpX02.1 marcada con ^{32}P . Se muestran con flechas los alelos correspondientes a cada genotipo.

Si bien en el AVFS se presentan los valores para ambos marcadores, para el mapeo por intervalos se muestran los resultados del análisis considerando sólo a RflpX02.1. Debido a que ambos marcadores cosegregaban, no era relevante utilizar a ambos marcadores (i.e. no existía un intervalo a mapear). Por otro lado, análisis realizados utilizando a uno u otro independientemente, mostraron que el valor de LOD era superior, como era de esperar, utilizando al marcador codominante.

Una transformación similar a la realizada con el RAPD OP X02.1 se había intentado previamente con el RAPD OP Y11.1. Este marcador fue el segundo de los encontrados asociados al BPC (el primero fue OP A10.1) pero todos los intentos por encontrar una enzima de restricción que revelara un

polimorfismo entre IS y B2 usando a OP Y11.1 como sonda (RflpY11.1) fracasaron. Se ensayaron 15 enzimas de restricción, las 5 utilizadas en el resto de trabajo más *DraI*, *StyI*, *XhoI*, *PvuII*, *PstI*, *BglI*, *KpnI*, *SmaI*, *NruI*, *SalI*,- pero con ninguna se observaron polimorfismos (Figura 17). El primer marcador asociado al BPC encontrado, OP A10.1, resultó técnicamente complejo de transformar. La banda correspondiente a este marcador, si bien era claramente codificable, se encontraba muy próxima a otras. Esto imposibilitaba extraerla del gel sin riesgos de "arrastrar" con ella ADNs de las otras bandas.

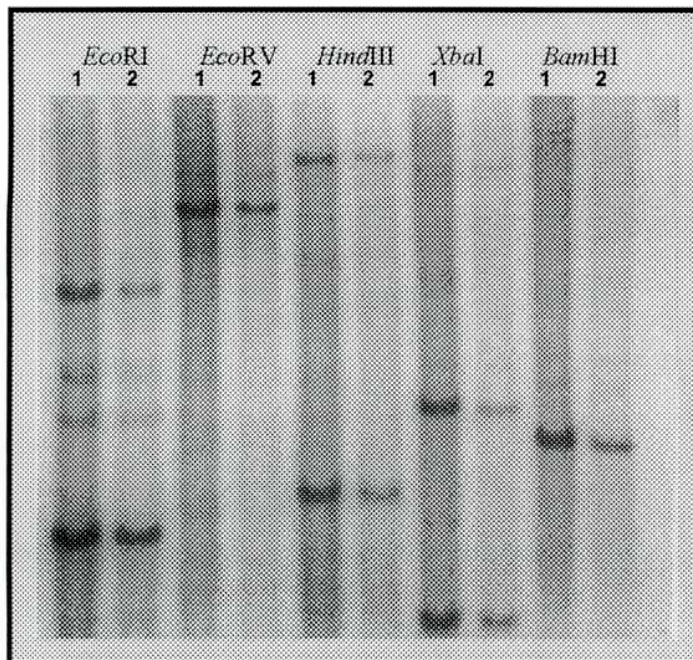


Figura 17: Autorradiografía de los ADNs de IS (1) y B2 (2) digeridos con 5 enzimas de restricción e hibridados con la sonda RflpY11.1 marcada con ^{32}P .

8. COMPARACIONES ENTRE EL BPC EN SORGO Y TRIGO

Las seis sondas seleccionadas del trabajo de Anderson *et al.* (1993) por estar ligadas al BPC en trigo, hibridaron correctamente con el ADN genómico de sorgo. Solamente una de ellas, CDO 64, reveló un polimorfismo entre IS y B2 (Figura 18). Se procedió luego a mapear dicho marcador localizándose en el grupo de ligamiento D (Figura 11).

No se detectó asociación significativa entre este marcador y el BPC por medio del AVFS ($p > 0,25$). Coincidentemente, el mapeo por intervalos del grupo de ligamiento D, arrojó valores de LOD inferiores a 0,2 en toda su extensión.

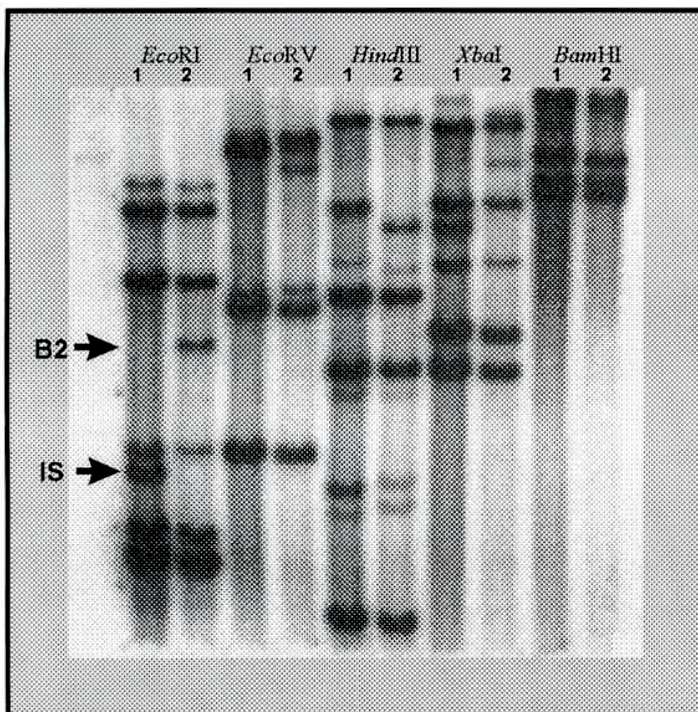


FIGURA 18: Autorradiografía de los ADNs de genómicas de IS (1) y B2 (2) digeridos con 5 enzimas de restricción e hibridados con la sonda CDO 64. Se indican los alelos producidos por *EcoRI* que fue la enzima utilizada posteriormente para mapear el marcador.

DISCUSSION

El ensayo biológico

En el presente estudio se realizó la estimación del grado de susceptibilidad al brotado pre-cosecha (BPC) de individuos de una población segregante F_2 mediante el cálculo de un Índice de Germinación (IG). La observación de los datos del ensayo biológico realizado mostró que los valores de IG calculados se distribuyeron en forma continua, es decir que no fue posible clasificar a los individuos de la población de mapeo F_2 en grupos de individuos claramente resistentes o susceptibles al BPC. Esta observación condujo a tratar al carácter como de distribución continua, y por lo tanto emplear métodos de mapeo específicos para este tipo de caracteres (Michelmore y Shaw, 1988; Tanksley, 1993; Jansen, 1996).

Los valores de IG no concordaron estrictamente con los esperados para una distribución normal (Figura 4). Varios autores concuerdan que es un concepto erróneo suponer que la distribución de un carácter cuantitativo necesariamente deba ser normal (Doerge y Churchill, 1994; Churchill y Doerge, 1994), de hecho ésta debiera seguir una mezcla de distribuciones. Dicha mezcla sólo podría aproximarse a una normal si numerosos loci contribuyeran simultáneamente a la expresión del carácter (Doerge, 1993) como postula la hipótesis de los poligenes Mather y Jinks, 1971). Los efectos genéticos determinantes de la expresión genotípica influyen en forma

definida sobre parámetros poblacionales tales como medidas de posición (i.e. media), dispersión (i.e. varianza) y simetría de la distribución (Mariotti, 1986). Es de esperar por lo tanto que los efectos genéticos detectados, particularmente si hay loci de efectos mayores, afecten críticamente la distribución de los valores de IG. Efectos similares observaron varios autores, entre los que cabe destacar un ejemplo en sorgo (Lin *et al.*, 1995) donde las distribuciones de los 2 caracteres cuantitativos que estudiaron en un cruzamiento interespecífico (altura de las plantas y tiempo a floración) presentaron distribuciones marcadamente bimodales, sugiriendo que un gen con gran efecto para ambos caracteres estaría segregando en la población. Por otro lado, Pereira y Lee (1995) observaron desviaciones en la distribución de los valores altura de las planta de sorgo, parecidas a la encontradas en este estudio. Los autores afirman que la asimetría era esperada debido a que las plantas altas eran parcial o completamente dominantes sobre las bajas.

El grado de desajuste de la distribución normal de los valores del presente ensayo, no causa ningún tipo de sesgo en la identificación de QTLs (Knott y Haley, 1992; Pereira y Lee, 1995). Las transformaciones de datos ensayadas no solo fallaron en mejorar el ajuste, sino que al utilizar los datos transformados se

obtuvieron resultados que no difirieron significativamente de los sin transformar.

La realización de un ensayo biológico con 2 grupos de familias F_3 derivadas de plantas F_2 que habían mostrado una marcada resistencia o susceptibilidad al BPC respectivamente, permitió contar con una apreciación de la inexistencia de segregación transgresiva en la población de mapeo F_2 . El hecho de que las familias F_3 "resistentes" tuvieran valores de IG superiores a los del padre IS y análogamente las susceptibles valores inferiores al padre B2 (Figura 5), se vio de alguna manera ratificado por no haberse detectado efectos genéticos de sobredominancia (León *et al.*, 1995; Pereira y Lee, 1995). Adicionalmente, el segundo ensayo biológico proporcionó evidencias de la estabilidad del comportamiento de los genotipos extremos resistentes y susceptibles.

Los marcadores moleculares

Los 112 marcadores utilizados en este estudio fueron generados por 3 sistemas distintos, RFLPs, RAPDs y AFLPs. Cada uno de estos sistemas permitió visualizar distinto número y clase de polimorfismos entre las líneas parentales, siendo también distinta la eficiencia relativa adjudicable a cada sistema.

La forma en que fueron presentados los grados de polimorfismos de cada uno de los tipos de marcadores responde a la intención de poder comparar dicho grado de polimorfismo con los obtenidos en trabajos de mapeo en sorgo.

Los 54 marcadores RFLP obtenidos fueron el resultado de probar 140 clones (sondas) genómicas de maíz y digiriendo el ADN genómico de IS y B2 con 5 enzimas de restricción. Esto representa alrededor de 39% de polimorfismo entre las líneas parentales, siendo ambas líneas de *S. bicolor*. Estos resultados son comparables con los obtenidos en la mayoría de los trabajos de mapeo realizados en cruzamientos intraespecíficos de *S. bicolor* utilizando sondas genómicas de maíz. En orden creciente de nivel de polimorfismo los mencionados trabajos presentaron: 36% (Binelli *et al.*, 1992); 39% (Ragab *et al.*, 1994); 50% (Hulbert *et al.*, 1990); 54% (Melake Berhan *et al.*, 1993). Los 2 primeros trabajos emplearon 2 y 3 enzimas de restricción mientras que los 2 últimos utilizaron 7 enzimas de restricción.

Cuando se usaron otros tipos de cruzamientos interespecíficos en lugar de cruzamientos intraespecíficos, los niveles de polimorfismo fueron mayores aún utilizando pocas enzimas de restricción, como es de esperar debido a la mayor divergencia genética de los parentales. Pereira *et al.* (1994) en un cruzamiento entre *S. bicolor ssp bicolor* x *S. bicolor ssp drummondii* detectaron con 2 enzimas de restricción un nivel de

polimorfismo de 58%, en tanto que Chittiden *et al.* (1994) usando 3 enzimas de restricción en un cruzamiento de *S. bicolor* x *S. propinquum* obtuvieron 80% de polimorfismos.

Respecto de los marcadores RAPDs, se ensayaron 131 "primers", de los cuales 28 (21%) fallaron en detectar algún locus. De los 103 "primers" restantes, 31 (30%) detectaron al menos 1 banda polimórfica. Estos 31 generaron 55 marcadores RAPD a razón de 1,8 por "primer". La utilización de RAPD para la construcción de mapas en sorgo no presenta antecedentes. Si bien se utilizaron estos marcadores para localizar genómicamente caracteres de interés agronómico (Oh *et al.*, 1994; Bhavanishankara Gowda *et al.*, 1995), en dichos trabajos se emplearon técnicas de mapeo para las que no se requiere una selección previa de "primers" informativos (Michelmore *et al.*, 1991). Esto hubiera permitido realizar una confrontación dentro de sorgo. En la construcción de un mapa de *Arabidopsis thaliana*, Reiter *et al.* (1992) reportó en un cruzamiento intraespecífico niveles de polimorfismo de 20% y obteniendo aproximadamente 1,6 marcadores por "primer". Al-Janabi *et al.* (1993) realizaron un completo mapa de caña de azúcar obteniendo porcentajes de "primers" que no detectaron ningún locus y de "primers" que detectaron al menos 1 banda polimórfica de 9% y 58% respectivamente. El número de marcadores/primer obtenidos fue de 2,3. Esta mayor eficiencia

respecto a los valores anteriormente citados puede deberse a que, para la resolución de los productos de PCR (ver Materiales y métodos) Al-Janabi *et al.* (1993) utilizaron electroforesis en geles de poliacrilamida en lugar de agarosa, lo cual permite una mejor resolución de los productos obtenidos.

La utilización en sorgo de marcadores AFLP, no registra precedentes hasta el momento. No obstante ello, los resultados obtenidos respecto al número de productos de amplificación obtenidos (aproximadamente 70) y el porcentaje de bandas polimórficas (4,6), por cada combinación de "primers" *EcoRI/MseI*, fue comparable a lo reportado en cebada por Becker *et al.* (1995). Estos autores, detectaron en promedio 65 productos de amplificación y 7,4 bandas polimórficas por cada combinación de "primers" ensayada.

La utilización de los distintos tipos de marcadores moleculares persiguió diferentes objetivos en este trabajo. Los RFLPs fueron principalmente empleados por su carácter codominante y por la posibilidad de comparar su localización con mapas anteriormente realizados por otros autores, tanto en sorgo como en maíz y otros cereales, ya que las sondas aquí utilizadas fueron seleccionadas con este propósito. Si bien los RFLPs son los marcadores más informativos, la obtención y mapeo de ellos requiere de ensayos complejos, ya sea que la detección se realice por métodos radiactivos o no radiactivos.

Esto motivó a recurrir a la utilización de otros sistemas que basándose en la técnica de PCR, permitieron con mayor facilidad y rapidez, obtener un gran número de marcadores. En este sentido, se emplearon inicialmente los RAPDs y luego los AFLPs. Ambos tipos de marcadores son dominantes pero permitieron obtener en un plazo que no hubiera sido posible con RFLPs, una adecuada cobertura del genoma de sorgo. Los RAPDs fueron utilizados inicialmente, pero luego del advenimiento de los AFLPs (técnica comenzada a utilizar para mapeo en 1995), se optó por ellos. Si bien su utilización es más compleja que los RAPDs (pero menos que los RFLPs), generaron más rápidamente marcadores informativos y son más reproducibles que los RAPDs.

De acuerdo a lo descrito en el párrafo anterior, la estrategia de mapeo utilizada, consistió en generar de la forma más eficiente el mayor número de marcadores posible (RAPDs y AFLPs). Luego, donde se detectaron efectos significativos sobre el BPC, se intentó transformar los marcadores dominantes en codominantes (RFLPs) a fin de visualizar la mayor información genotípica disponible. Los RFLPs con localización conocida (a través de su utilización en mapas publicados - ver adelante) se emplearon también para establecer la posición relativa a dichos mapas de posibles QTLs asociados al BPC.

El mapa de ligamiento

No obstante que el objetivo principal de este estudio no es construir un mapa de ligamiento, la utilización del método de mapeo por intervalos para la detección de QTLs, requiere contar con los marcadores en grupos de ligamiento. Por otro lado, para una correcta determinación del número de QTLs que afectaban al BPC, por cualquiera de los métodos aplicados, era preciso tener una certera idea del grado de cobertura del genoma contemplado.

Se logró construir un mapa a partir del análisis de la cosegregación de 93 marcadores (RFLPs, RAPDs y AFLPs) distribuidos en 14 grupos de ligamiento. Se cubrieron 950 cM con intervalos promedios de 10,2 cM. Otros 19 marcadores no se ligaron a ningún grupo de ligamiento. Asumiendo que los 112 (93 + 19) marcadores se encontraron arbitrariamente distribuidos, la distancia potencialmente cubierta fue de 1144 cM (112 x 10,2 cM).

En los últimos 6 años se realizaron numerosos mapas de sorgo. La distancia analizada por el presente trabajo representa el 75% respecto del más completo de ellos (Pereira *et al.*, 1994). En la Tabla 7 se comparan los distintos mapas de sorgo publicados hasta el este momento.

Tabla 7: Comparación de los distintos mapas de sorgo publicados.

Referencia	Número de Loci	Grupos de ligamiento	Tamaño (cM)
Hulbert <i>et al.</i> (1990)	55	8	283
Binelli <i>et al.</i> (1992)	35	5	440
Whitkus <i>et al.</i> (1992)	98	13	949
M. Berhan <i>et al.</i> (1993)	96	15	709
Pereira <i>et al.</i> (1994)	201	10	1530
Ragab <i>et al.</i> (1994)	71	15	633
Chittiden <i>et al.</i> (1994)	255	10	1445
Pereira <i>et al.</i> (1995)	111	10	1299
Lin <i>et al.</i> (1995)	78	11	935
Este trabajo	93	14	950

Se observaron 10 marcadores (9%) que no presentaron las proporciones esperadas para sus clases genotípicas (1:2:1 para codominantes y 3:1 para dominantes) según la prueba de bondad de ajuste (χ^2 , $p=5\%$). Teniendo en cuenta la probabilidad utilizada (5%) y el número de marcadores analizados (112) se hubieran esperado 6 marcadores que por azar presentaran sus proporciones desajustadas. De los 10 marcadores mencionados, 8 presentaron desajustes con una probabilidad entre 5% y 1%, encontrándose todos ellos en grupos de ligamiento distintos. Se puede asumir de esto, que estos 8 marcadores se encuentran dentro de lo esperado. Los otros 2 marcadores presentaron desajustes con probabilidad

menor a 1%, estando ambos marcadores ligados en el grupo de ligamiento M. El porcentaje de marcadores con proporciones desviadas descrito en los mapas de sorgo estuvo entre el 5% y el 20%. Los loci con proporciones desajustadas no afectan la identificación de QTLs, pero podrían tener efectos menores en la estimación de los valores de aditividad y/o dominancia (Edwards *et al.*, 1987). Esto puede visualizarse en la vecindad del marcador OP Y11.1 (Tabla 3) donde los valores de dominancia varían levemente respecto al resto del grupo de ligamiento.

Identificación de QTLs

Magnitud de los efectos

Se presentó en este trabajo la localización en el genoma de *Sorghum bicolor* de 2 QTLs (regiones genómicas) controlando al brotado pre-cosecha. Estos QTLs fueron mapeados en los grupos de ligamiento E y F (Figura 11), siendo la más probable localización de los mismos (según el mapeo por intervalos) dentro de los segmentos determinados por los marcadores OPY11.1-RflpX02.1 y OPY11.2-OPA18.1 respectivamente.

Los resultados del mapeo por intervalos indicaron que las 2 regiones genómicas que se detectaron controlando al BPC estuvieron asociadas con efectos significativos y de gran

magnitud. Individualmente cada QTLs explicó alrededor del 53% de la varianza fenotípica (R^2). Los valores de LOD presentados por los QTLs de los grupos de ligamiento E y F fueron de 8,77 y 4,39 respectivamente (Tabla 4, Figuras 12 y 13). El significado de estos valores es que la probabilidad de que exista un QTL (con $R^2= 53\%$) en el intervalo indicado para el grupo de ligamiento E es $10^{8.77}$ (aproximadamente 600.000.000) veces mayor de que no exista. Asimismo, la probabilidad de existencia del QTL del grupo de ligamiento F es aproximadamente 25.000:1 ($10^{4.39}$).

Por otro lado, el modelo de múltiples QTLs, que evalúa los efectos de los 2 QTLs en forma conjunta, explicó el 83% de la varianza fenotípica presente del carácter con un valor de LOD de 12,37 (Tabla 4). El valor de LOD del modelo conjunto excedió significativamente los valores individuales de los QTLs de los grupos de ligamiento E y F, siendo las diferencias a favor del modelo múltiple de $10^{3.6}$ ($12.37-8.77$) y $10^{7.98}$ respectivamente. Esto implica que la acción de los 2 QTL en forma conjunta es la más probable explicación de la variación observada en el BPC. Se observa sin embargo, que el valor del modelo múltiple fue inferior a la suma de los valores individuales (12,37, contra $8,77 + 4,39 = 13,16$). Esto puede deberse a datos anormalmente distribuidos y/o efectos de epístasis de ambos QTLs sobre el carácter (Lander y Botstein, 1989). Como se discutió anteriormente, existió un desajuste en los valores de IG. Por otro

lado, en concordancia con la existencia de efectos epistáticos, los porcentajes de la varianza fenotípica del modelo múltiple fue inferior a la suma de los porcentajes individuales (83%, contra $53\% + 53\% = 106\%$), lo cual claramente muestra que las porciones de la varianza que cada QTL explica están superpuestas entre sí. Dicho de otra manera, parte de la variación que explica el QTL del grupo de ligamiento E es la misma que explica el QTL de grupo de ligamiento F.

Los resultados de análisis de la varianza de factor simple (AVFS) fueron congruentes con los del mapeo por intervalos en la identificación de regiones genómicas ligadas al BPC (Tabla 5). Para cada QTL identificado por el mapeo por intervalos, el AVFS indicó que los marcadores flanqueantes de la más probable ubicación de los QTLs estuvieron muy significativamente asociados con el BPC. La concordancia de los resultados de ambos métodos de detección de QTLs se reflejó también en la magnitud y significancia de los efectos identificados (i.e. los marcadores que rodearon al QTL de mayor valor de LOD, presentaron valores mayores para el AVFS). Los marcadores que flanqueaban al QTL del grupo de ligamiento E (OP Y11.1 y RflpX02.1) presentaron valores de porcentaje de la varianza fenotípica explicada (R^2) de 21,6% y 27,4% respectivamente; los valores de probabilidad (p) que sustentaron dichas estimaciones fueron de $p < 0,00001$ y $p < 0,000001$ respectivamente. Por otro

lado, para el QTL de grupo de ligamiento F, los marcadores flanqueantes (OP Y11.2 y OP A18.1) presentaron valores de R^2 y p de 13,3%/13,8% y $p < 0,00149/p < 0,00040$ respectivamente. Este tipo de correspondencia entre los 2 métodos fueron mencionados en estudios simulados (Darvasi *et al.*, 1993) y en observaciones empíricas (Stuber *et al.*, 1992; Pereira y Lee, 1995; Grandillo y Tanksley, 1996). De los trabajos citados en el último párrafo, solamente el de Grandillo y Tanksley (1996) mencionó la relación entre la magnitud del porcentaje de la varianza fenotípica explicada (R^2) obtenidos en el AVFS y el mapeo por intervalos. Los autores reportaron el mismo fenómeno que se observó en el presente estudio en el sentido de que siempre la magnitud del R^2 del mapeo por intervalos fue mayor que el del AVFS. Esto es coherente con la proposición de los autores de método de mapeo por intervalos (Lander y Botstein, 1989). Los autores afirman que el AVFS explica la variación fenotípica asociada a un marcador que puede estar a una distancia variable (en cM) del QTL, mientras que el mapeo por intervalos explica la variación fenotípica asociada a la más probable localización de un QTL dentro del intervalo entre 2 marcadores.

La acción génica

Los 2 QTLs detectados mostraron acción génica de tipo parcialmente dominante (Tabla 4). En ambos casos los alelos de B2 contribuyeron al aumento de los valores de IG principalmente a través de los efectos aditivos. Los efectos de dominancia derivaron de los alelos de IS y para ambos QTLs contribuyeron a disminuir los valores de IG. Estos efectos fueron claramente visibles en el gráfico de las medias de las distintas clases genotípicas atribuidas a cada QTL (Figura 14). Gráficamente se distingue que para los 2 QTLs las clases homocigotas se encuentran bien diferenciadas debido a los efectos aditivos, mientras que los heterocigotas tienden a los valores de la clase homocigota IS, evidenciando efectos de dominancia que disminuyen los valores de IG.

Los efectos epistáticos

El análisis de varianza de dos factores (AVDF) es una extensión del AVFS utilizado para detectar posibles interacciones epistáticas entre marcadores (no ligados entre sí) que hayan presentado efectos significativos en el modelo de un factor. Analizando de a uno los marcadores del grupo de ligamiento E con los del grupo de ligamiento F, se obtuvieron 4 interacciones

significativas (Tabla 6). Este resultado sugiere la existencia de efectos epistáticos entre los 2 QTLs, ya que una interacción significativa implica que la acción conjunta de ambos QTLs no es simplemente la suma de sus efectos independientes (Tanksley, 1993). En este sentido, resulta muy elocuente el hecho que las interacciones significativas se produzcan entre marcadores que flanquean la más probable localización de ambos QTLs (OPY11.1 y OPX02.1 en el grupo E; OPY11.2 y OPA18.1 en el grupo F). Esto se vio sustentado por el resultado del modelo de múltiples QTLs del mapeo por intervalos, el cual sugería que la acción conjunta (pero no la suma) de los efectos de ambos QTLs era la mejor explicación de la variación observada en el BPC.

Estudios tendientes a la localización de QTLs afectando caracteres de interés agronómico se han reportado en diversas especies con resultados comparables con los obtenidos en la presente investigación. En sorgo, Pereira y Lee (1995) detectaron 4 QTLs afectando la altura de las plantas con valores de LOD de 8,4, 5,6, 3,8 y 2,7 respectivamente. Los valores de R^2 de estos QTLs fueron 29%, 20%, 12%, y 9%. En maíz (Dingerdissen *et al.*, 1996) encontraron 2 QTLs asociados con la resistencia a *Setosphaera turcica* con valores de LOD y R^2 de 7,4/ 2,5 y 38,0%/9,9%. En tomate, Grandillo y Tanksley (1996) localizaron 1 QTL controlando la forma del fruto con valores de LOD de 15 y R^2 de alrededor 33%. Los tipos de acción génica encontrados en estudios donde

se detectaron principalmente QTLs con efectos de gran magnitud fueron, al igual que en este trabajo, parcialmente dominantes o dominantes (Lin *et al.*, 1995, Pereira y Lee 1995, Dingerdissen *et al.*, 1996, Grandillo y Tanksley, 1996).

Efectos epistáticos de la magnitud y la significancia como los detectados en esta investigación no han sido informados en trabajos precedentes. Pereira y Lee (1995) mencionan la existencia efectos significativos en 1 de las 6 posibles combinaciones entre los cuatro QTLs que detectaron afectando la altura de las plantas en sorgo; aunque no informaron la significancia de dicha interacción. También en sorgo y trabajando con altura de las plantas y la madurez, Lin *et al.* (1995) encontraron un solo efecto significativo ($p=0,04$) entre las 15 interacciones para distintos QTLs en ambos caracteres; sin embargo los autores encuentran que dicho efecto podría muy bien deberse al azar. En el estudio de QTLs asociados con la resistencia a *S. turcica* en maíz (Dingerdissen *et al.*, 1996) encontraron efectos que podrían deberse a epístasis pero que los autores atribuyen a la anomalía de la distribución de sus datos. Sills *et al.* (1995) no detectaron en caña de azúcar efectos epistáticos, determinando que de existir, estos efectos serían muy pequeños para ser detectados con el tamaño de la población que utilizaron ($N=44$). Otras investigaciones encontraron poca evidencia de acción digénica de

importancia (Edwards *et al.*, 1987; Stuber *et al.*, 1992; Paterson *et al.*, 1990, 1991, Grandillo y Tanksley, 1996). En una extensa recopilación de estudios sobre identificación de QTLs, Tanksley (1993) comenta que si bien en alguno de estos trabajos se menciona la existencia de efectos epistáticos, la mayoría se encontró cercana a los límites de significancia, sugiriendo que podrían ser "artefactos" estadísticos. Por otro lado, unas pocas excepciones que se presentaron como significativos efectos de interacción digénica, podrían atribuirse a alelos de genes de acción cualitativa.

El estudio de los determinantes genéticos del carácter brotado pre-cosecha es completamente inédito en el cultivo de sorgo. El antecedente que se registra corresponde al trabajo realizado en trigo por Anderson *et al.* (1993). En esta investigación los autores detectaron (mediante el AVFS) 6 marcadores en un cruzamiento y 4 en otro, asociados al BPC con valores de R^2 entre 5,9% y 10,7%. Este hecho estaría sugiriendo diferentes mecanismos de acción entre sorgo y trigo en el control del BPC, teniendo en cuenta el número de QTLs y la magnitud de sus efectos. Por un lado, en trigo el carácter se muestra asociado a varios QTLs con efectos relativamente pequeños ($R^2 < 15\%$) que en conjunto explican alrededor del 40% de la variación fenotípica. En cambio, en sorgo aparecen solamente 2 QTL con efectos de gran magnitud (cada uno con

$R^2 > 50\%$) explicando en forma conjunta más del 80% de la variación observada en el BPC.

La localización del QTL del grupo de ligamiento E en sorgo y maíz

La presencia del marcador RFLP UMC 3 asociado al QTL del grupo de ligamiento E (el de mayor magnitud) es de gran importancia informativa, ya que dicho marcador se encuentra localizado en mapas de maíz y sorgo previamente publicados. En maíz UMC 3 mapea en los cromosomas 3 y 8 (Coe *et al.*, 1990). Las regiones genómicas asociadas con UMC 3 en maíz presentan una posible vinculación con el carácter brotado pre-cosecha. En el brazo largo del cromosoma 3 de maíz (donde mapea UMC 3) se localiza el gen *VP1*, determinante de la mutación vivípara, a aproximadamente 40 cM de UMC 3 (Broockhaven National Laboratory map 1996). Esta correspondencia sinténica abre paso a una interesante hipótesis que se detalla en la sección "Relación entre loci cualitativos y cuantitativos".

En sorgo, Hulbert *et al.*, (1990) ubicaron al marcador UMC 3 en el grupo de ligamiento G, Melake Berhan *et al* (1993) en el grupo de ligamiento H y Ragab *et al.* (1994) en el grupo de

ligamiento A. La inexistencia de un mapa consenso de sorgo, hace que la denominación que cada autor utilice sea arbitraria y sólo descriptiva de cada estudio particular. La región genómica representada por marcadores ligados a UMC 3 (UMC 16, UMC 17, UMC 60 - región conservada en sorgo y maíz) se mostró influenciando el carácter altura de planta en un cruzamiento de *S. bicolor* x *S. propinquum* (Lin et al., 1995). Sin embargo, Pereira y Lee (1995) que estudiaron el mismo carácter en *S. bicolor* x *S. bicolor*, no encontraron ningún efecto relacionado con dicha región.

Relación entre loci cualitativos y cuantitativos

La hipótesis de Robertson (1989) sugiriendo que los genes cualitativos podrían ser alelos mutantes extremos de loci que controlen caracteres cuantitativos, fue respaldada por recientes investigaciones. En maíz, Beavis et al. (1991) y Edwards et al. (1992) localizaron QTLs vinculados a la altura de las plantas asociados con los genes *Dw* que afectan el mismo carácter. Asociados a los genes *Dw* pero en sorgo, Lin et al. (1995) y Pereira y Lee (1995) también localizaron QTLs controlando la altura de las plantas. Leonards-Schippers et al. (1994) detectaron QTLs para la resistencia a *Phytophthora infestans* en la misma región donde mapea el gen *R1* de resistencia extrema a dicho

patógeno. Dingerdissen *et al.* (1996) encontró 1 QTL asociado con la resistencia a *S. turcica* en maíz, localizado en la misma región que el gen de resistencia vertical *Ht2*.

En el contexto descrito en el párrafo anterior resulta interesante discutir el tipo de herencia atribuible a los loci detectados en la presente investigación. Los QTLs reportados en las investigaciones precedentemente citadas, que tuvieran efectos de la magnitud de los detectados en el presente estudio, estuvieron ligados a regiones que presentaban un locus ya descrito afectando el mismo carácter y hasta directamente mencionados perteneciendo al mismo gen (Pereira y Lee, 1995). Tanksley (1993) sugiere que la acción génica dominante y los efectos epistáticos (ambos también observados aquí) son principalmente atribuibles a genes de herencia cualitativa.

Discernir si la variación observada en el BPC en sorgo, se debe a QTLs localizados en la misma región que genes cualitativos o si se puede atribuir directamente a esta clase de genes, requiere de nuevas estrategias. Estas podrían estar orientadas a redefinir al carácter (Goldenberg, 1972, 1974) tratando de encontrar componentes bioquímicos y/o fisiológicos determinantes del mismo, aspectos que suelen ser más sencillamente estudiables. Para esto sería preciso utilizar metodologías tendientes a aislar y caracterizar loci involucrados en procesos biológicos, que permitan diferenciar entre individuos

resistentes y susceptibles a partir de su genotipo para dichos loci (Gibson y Somerville, 1993; Alpert y Tanksley, 1996). Alternativamente se podría intentar establecer si loci descritos en otras especies, afectando la dormición, presentan variantes sinténicas (homeólogas) localizadas en las regiones descritas en la presente investigación. La utilización de marcadores RFLP con efectos sobre BPC en trigo (Anderson *et al.*, 1993), para establecer si las regiones asociadas a dichos marcadores tenían alguna relación con las regiones detectadas en sorgo brindó pocas evidencias. El marcador RFLP CDO 64, que fue mapeado en el grupo de ligamiento D (Figura 11), no presentó ningún tipo de asociación con el BPC en el presente estudio. Este hecho no resulta sorprendente, ya que ninguno de los marcadores que Anderson *et al.* (1993) detectaron asociados al BPC en cada uno de los cruzamientos que analizaron, mostraba asociación con el carácter en otro cruzamiento dentro de la misma especie trigo. McCarty *et al.* (1991) y Willams (1994) en maíz, y Koornneef *et al.* (1984) en *Arabidopsis*, reportaron la presencia de mutantes insensibles al ABA. Este mismo comportamiento se presenta en embriones de sorgo de los genotipos B2, en estudios fisiológicos del BPC (Steinbach *et al.*, 1995).

Las sondas correspondientes a los alelos mutantes reportadas por Koornneef *et al.* (1984), McCarty *et al.* (1991) y Willams (1994) podrían ser interesantes candidatos para ser

mapeados mediante RFLPs en sorgo, a fin de establecer su relación con los QTLs detectados afectando al BPC. Por un lado, Steibach *et al.* (1995) encontraron que los embriones de sorgo de los genotipos B2 (susceptibles al BPC) fueron 10 veces menos sensibles a la acción inhibitoria de la germinación por parte del ABA, que los embriones de los genotipos IS (resistentes al BPC). Por el otro lado, Koornneef *et al.* (1984), McCarty *et al.* (1991) y Williams (1994), describieron la acción los loci *ABI*, *VP1* y *Dh1* respectivamente, cuya presencia esta asociada en distintas especies a la insensibilidad al ABA de los embriones. Se suman a estos elementos los hallazgos en sorgo (Lin *et al.*, 1995; Pereira y Lee, 1995) y tomate (Grandillo *et al.*, 1996) de QTLs comunes, provenientes de diferentes especies, afectando los mismos caracteres. Hipotéticamente, se podría postular que los QTLs detectados en la presente investigación son variantes alélicas (o secuencias homeólogas) de alguno de los loci citados. En este sentido, se destaca el gen *VP1*, que se localiza en el mismo brazo del cromosoma 3 de maíz que el marcador UMC 3 (ligado al QTL del grupo de ligamiento E) y distanciado a aproximadamente 40 cM.

Aplicaciones al mejoramiento vegetal

La selección asistida por marcadores ("marker assisted selection") también llamada mejoramiento molecular ("molecular breeding") puede ser definida como la aplicación de las tecnologías de marcadores de ADN en los programas de mejoramiento vegetal. Entre las consideraciones a tener en cuenta, para facilitar este tipo de mejoramiento asistido para caracteres cuantitativos en especies autógamas se encuentran:

- i) contar con marcadores ligados a QTLs con efectos de gran magnitud (Tanksley, 1993);
- ii) disponer de QTLs con importantes efectos de aditividad (Anderson *et al.*, 1993);
- iii) identificar estos QTLs en genomas relativamente sencillos (Lin *et al.*, 1995); iv) que los costos en tiempo, materiales y labores sean menores que los utilizados en el mejoramiento tradicional en base al fenotipo (Anderson *et al.*, 1993; Tanksley, 1993; Michelmore, 1995).

En el presente estudio se han identificado marcadores moleculares ligados estrechamente a 2 QTLs con muy importantes efectos sobre el BPC, siendo los componentes aditivos los que contribuyeron fundamentalmente a la variación observada en el carácter. Por otro lado, el sorgo está considerado como un sistema genético modelo para el estudio comparativo entre las gramíneas, debido a ser diploide y al

tamaño y simplicidad de su genoma (Bennetzen y Freeling, 1993).

Todos estos factores abren la posibilidad de utilizar la selección asistida por marcadores para el mejoramiento de la resistencia al brotado pre-cosecha del cultivo de sorgo. La determinación de si el mejoramiento molecular pueda tener menores costos que el tradicional, dependerá en gran medida de que los marcadores ligados al BPC, encontrados en el presente estudio, sean útiles como herramientas de selección temprana y/o para asistir procesos de retrocruza. Contar con marcadores estrechamente ligados al BPC representa un enorme ahorro en tiempo, trabajo y espacio. Es posible determinar el fenotipo de los individuos a seleccionar a través su genotipo para uno (o pocos) marcadores moleculares al estado de plántula. Se requiere para esto pocos gramos de hoja, se evita mantener a todas la plantas hasta la madurez y sobre todo, no es necesario realizar trabajosos ensayos biológicos para la determinación del fenotipo.

Estudios de simulación realizados sobre los 93 individuos de la población F_2 utilizada en la presente investigación, brindan evidencias de que los marcadores flanqueantes al QTL del grupo de ligamiento E (OP Y11.1 y RflpX02.1) podrían utilizarse en la selección temprana para la resistencia al BPC. Esta simulación consistió en tomar los 11 individuos que presentaran el genotipo

correspondiente al padre resistente (IS9530) en ambos marcadores simultáneamente (11/93 = 12% de la población). Todos individuos considerados presentaron bajos valores de IG (≤ 6) salvo 1 que tuvo 14. La media de estos 11 F₂ fue de 3,27. Estos valores sugieren que, seleccionando para ambos marcadores simultáneamente, se podría tener una buena estimación del comportamiento fenotípico de las plantas.

Concluyendo, la información generada en la presente investigación es trascendente tanto en aspectos teóricos como prácticos. No sólo se consiguieron detectar marcadores moleculares ligados al BPC, potencialmente utilizables para la selección asistida, sino que también se logró a través de dichos marcadores, identificar 2 regiones genómicas (QTLs) que explican el 83% de la varianza fenotípica observada de dicho carácter. Estos QTLs presentaron un comportamiento, en distintos aspectos, atribuible al de genes mayores fenómeno que a partir de las investigaciones en sorgo (Steibach *et al.*, 1995), en *Arabidopsis* (Koornneef *et al.*, 1984) y en maíz (McCarty *et al.*, 1991; Williams, 1994), permitiría formular una hipótesis de homeología con genes descritos en maíz y *Arabidopsis*.

REFERENCIAS

- Al-Janabi, S.M.; Honeycutt, R.J.; McClelland, M. y Sobral, B.W.S. (1993). A genetic Linkage Map of *Saccharum spontaneum* L. 'SES 208'. *Genetics* 134:1249-1260.
- Alpert, K.B. y Tanksley, S.D. (1996). High-resolution mapping and isolation of YAC contig fw2.2: a major fruit weight QTL in tomato. *Mol. Gen. Genet.*, en prensa.
- Anderson, J.A., Sorrells, M.E. y Tanksley, S.D. (1993). RFLP analysis of genomic regions associated with resistance to pre-harvest sprouting in wheat. *Crop Sci.* 33:453-459.
- Balintkurti, P.J.; Dixon, M.S.; Jones, D.A.; Narkott, D.A. y Jones, J.D.G. (1994). RFLP linkage analysis of the *CF-4* and *CF-9* genes for resistance to *Cladosporium fulvum* in tomato. *Theor. Appl. Genet.* 88:691-700.
- Barone, A.; Ritter, E.; Schachtschabel, U.; Debener, T.; Salamini, F. y Gebhardt, C. (1990). Localization by restriction fragment length polymorphisms mapping in potato of a mayor dominant gene conferring resistance to the potato cyst nematode *Globodera rostochiensis*. *Mol. Gen. Genet.* 224:177-182.
- Beavis, W.D.; Grant, D.; Albertsen, M. y Fincher, R. (1991). Quantitative trait loci for plant height in four maize populations and their associations with qualitative genetic loci. *Theor. Appl. Genet.* 83:141-145.

- Becker, J.; Vos, M.K.; Salamini, F. y Heun, M. (1995). Combined mapping of AFLP and RFLP markers in barley. *Mol. Gen. Genet.* 249:65-73.
- Benech Arnold, R.L.; Fenner, M. y Edwards, P.J. (1991). Changes in germinability, ABA content and ABA embryonic sensitivity in developing seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. induced by water stress during grain filling. *New Phytol.* 118:339-347.
- Benech Arnold, R.L.; Fenner, M. y Edwards, P.J. (1995b). Influence of potassium nutrition on germinability, abscisic acid content and sensitivity of the embryo to abscisic acid in developing seeds of *Sorghum bicolor* (L.) Moench. *New Phytol.* 130:207-216.
- Benech Arnold, R.L.; Kristof, G.; Steinbach, H.S. y Sánchez, R.A. (1995a). Fluctuating temperatures have different effects on embryonic sensitivity to ABA in *Sorghum* varieties with contrasting pre-harvest sprouting susceptibility. *Journal of Experimental Botany* 46:711-717.
- Bennetzen, J. y Freeling, M. (1993). Grasses as a single genetic system: genome composition, collinearity and compatibility. *Trends in Genetics* 9:259-292.
- Bentolila, S.; Guitton, C.; Bouvet, N.; Sailland, A.; Nykaza, S. y Freyssinet, G. (1991). Identification of an RFLP marker tightly linked to the *Htl* gene in maize. *Theor. Appl. Genet.* 82:393-398.

- Bhatt, G.M.; Derera, N.F. y McMaster, G.J. (1976). Breeding white-grained wheat for low alpha-amylase synthesis and insensitivity to gibberellic acid in grain. *Cereal Res. Commun.* 4:245.
- Bhavanishankara Gowda, P.S.; Xu, Guo-Wei; Frederiksen, R.A. y Magill, C.W. (1995). DNA markers for downy mildew resistance genes in sorghum. *Genome* 38:823-826.
- Binnelli, G.; Gianfranceschi, L.; Pè, M.E.; Taramino, G.; Busso, C.; Stenhouse, J. y Ottaviano, E. (1992). Similarity of maize and sorghum genomes as revealed by maize RFLP probes. *Theor. Appl. Genet.* 84:10-16.
- Botstein, D.; White, R.L.; Scolnick, M. y Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum.* 32:314-331.
- Burr, B; Burr, F.A.; Thompson, K.H.; Albertson, M.C.; y Stuber, C.W. (1988). Gene Mapping with Recombinant Inbreds in Maize. *Genetics* 118:519-526.
- Castor, L.L. y Frederiksen, R.A. (1977). Seed moulding of grain sorghums caused by *Fusarium* and *Curvularia*. *Proceedings of the Annual Phytopathology Society* 4:151.
- Chittenden, L.M.; Schertz, K.F.; Lin, Y.-R.; Wing, R.A. y Paterson A.H. (1994). A detailed RFLP map of *Sorghum bicolor* x *S. propinquum*, suitable for high-density mapping, suggests ancestral duplication of *Sorghum* chromosomes or chromosomal segments. *Theor. Appl. Genet.* 87:925-933.

- Churchill, G.A. y Doerge, R.W. (1994). Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138:963-971.
- Coe, E.H.; Hoisington, D.A y Neuffer, M.G. (1990). Linkage map of corn (maize) (*Zea mays* L.) (2n=20). En O'Brien, S.J. (ed) *Genetic Maps*, 5th edn. Cold Spring harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY, pp. 6.39-6.67.
- CREA. (1987). Producción de Sorgo Granífero. *Cuaderno de Actualización Técnica* N° 43. Comisión de Sorgo Granífero, Convenio AACREA-Maracó.
- Darvasi, A.; Weinreb, A.; Minke, V.; Weller, J.I. y Soller, M. (1993). Detecting marker-QTL linkage and estimating QTL gene effect and map location using a saturated genetic map. *Genetics* 134:943-951.
- Derera, N.F. y Bhatt, G.M. (1980). Germination inhibition of the bracts in relation to pre-harvest sprouting tolerance in wheat. *Cereal Res. Commun.* 8:199-201.
- Dingerdissen, A.L.; Geiger, H.H.; Lee, M.; Schechert, A. y Welz H.G. (1996). Interval mapping of genes for quantitative resistance of maize to *Setosphaeria turcicca*, cause of northern leaf blight, in a tropical environment. *Molecular Breeding* 2:143-156.
- Doebley, J. y Stec, A. (1991). Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics* 129:285-295.

- Doerge, R.W. (1993). Statistical methods for locating quantitative trait loci with molecular markers. Ph.D. Thesis. North California State University.
- Doerge, R.W. y Churchill, G.A. (1994). Issues in genetic mapping of quantitative trait loci. Analysis of Molecular Marker Data. Join Plant Breeding Symposia Series, Corvallis, Oregon.
- Doggett, H. (1988). Sorghum, 2nd edn. Longmans Scientific Technical,UK, pp 150-165.
- Edwards, M.D.; Helentjaris, T.; Wright, S. y Stuber C.W. (1992). Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. 4. Analysis based on genome saturation with isozyme and restriction fragment length polymorphism markers. Theor. Appl. Genet. 83:765-774.
- Edwards, M.D.; Stuber, C.W. y Wendel, J.F. (1987). Molecular-marker-facilitated investigation of quantitative-trait loci in maize. I. Number, genomic distribution and types of gene action. Genetics 116:113-125.
- Gebhardt, C.; Ritter, E.; Barone, A.; Debener, T.; Walkemeier, B.; Schanckschabel, U; Kaufmann, H.; Thompson, R.D.; Bonierbale M.W.; Ganai, M.W.; Tanksley, S.D. y Salamini, F. (1991). RFLP maps of potato and their alignment with the homeologous tomato genome. Theor. Appl. Genet. 83:49-57.
- Gibson, S. y Somerville C. (1993). Isolating plant genes. TIBTech 11:306-313.

- Giraudat, J.; Hauge, B.; Valon, C.; Smalle, J.; Parcy, F. y Goodman, H. (1992). Isolation of the Arabidopsis *ABI3* Gene by Positional Cloning. *Plant Cell*. 4:1251-1261.
- Goldenberg, J.B. (1972). Mendelian and biometrical genetical analysis of the induction of flowering time in *Antirrhinum majus*. Ph.D. Thesis. University of Cambridge, Inglaterra.
- Goldenberg, J.B. (1974). Redefinición de caracteres métricos. *Rev. Agronómica N.O. Argentino*. XI (1-2):119-128.
- Grandillo, S. y Tanksley, S.D. (1996). QTL analysis of horticultural traits differentiating the cultivated tomato from the closely related species *Lycopersicon pimpinellifolium*. *Theor. Appl. Genet.* 92:935-951.
- Grandillo, S.; Ku, H. y Tanksley, S. (1996). Characterization of *fs8.1*, a mayor QTL influencing fruit shape in tomato. *Molecular Breeding* 2:251-260.
- Grivet, L.; D'Hont, A.; Dulfour, P.; Hamon, P.; Roques, D. y Glaszmann J.C. (1994). Comparative genome mapping of sugar cane with other species within the Andropogoneae tribe. *Heredity* 73:500-508.
- Hart, G.E. (1994). RFLP maps of bread wheat. R.L. Phillips and Vasil I.K. (eds.) Kluwer Academic Publishers. The Netherlands. 327-358.

- Hoisington, D.; Khairallah, M. y González de León, D. (1994). Laboratory Protocols: CIMMYT Applied Molecular Genetics Laboratory. CIMMYT. Segunda edición, México, D.F.
- Hulbert, S. H.; Richter, T.E.; Axtell, J.D.y Bennetzen, J.L. (1990). Genetic mapping characterization of sorghum and related crops by means of maize DNA probes. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 87:4251-4255.
- Jansen, R. (1996). Complex plant traits time for polygenic analysis. Trends in Plant Science 1:89-94.
- Knott, S.A. y Haley, C.S. (1992). Aspects of maximum likelihood methods for the mapping of quantitative trait loci in line crosses. Genet. Res. 60:139-151.
- Koornneef, M.; Reuling, G. y Karssen, C.M. (1984). The isolation and characterization of abscisic acid-insensitive mutants of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol. 61:377-383.
- Lander, E.S. y Botstein, D. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics 121:185-199.
- Lander, E.S.; Green, P.; Abrahamson, J.; Barlow, A.; Daly, M.; Lincoln, S. y Newburg, L. (1987). MAPMAKER: An Interactive Computer Package for Constructing Primary Genetic Linkage Maps of Experimental and Natural Populations. Genomics 1:174-181.

- León, A.J.; Lee, M.; Kufener, G.K.; Berry, S.T. y Mowers, R.P. (1995). Use of RFLP markers for genetic linkage analysis of oil percentage in sunflower seed. *Crop Sci.* 35:558-564.
- Leonards-Schippers, C.; Gieffers, W.; Salamini, F. y Gebhardt, C. (1992). The R1 gene conferring race-specific resistance to *Phytophthora infestans* in potato is located on potato chromosome V. *Mol. Gen. Genet.* 223:278-283.
- Leonards-Schippers, C.; Gieffers, W.; Schäfer-Pregl, R.; Ritter, E.; Knapp, S.J.; Salamini, F. y Gebhardt, C. (1994). Quantitative resistance to *Phytophthora infestans* in potato: a case study for QTL mapping in an allogamous plant species. *Genetics* 137:67-77.
- Lin, Y.-R.; Schertz, K.F. y Paterson, A.H. (1995). Comparative analysis of QTL affecting plant height and maturity across the *Poaceae*, in reference to an intraspecific sorghum population. *Genetics* 141:391-411.
- Lincoln, S.E., Daly M. y Lander, E.S. (1992a). Constructing Genetics Maps with MAPMAKER/EXP 3.0. Whitehead Institute Technical Report. 3a edición.
- Lincoln, S.E., Daly M. y Lander, E.S. (1992b). Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMAKER/QTL. Whitehead Institute Technical Report. 2a edición.

- Maiti, R K, Raju, P S y Bindinger, F R (1985). Studies on germinability and some aspects of pre-harvest physiology of sorghum grain. *Seed Science and Technology* 13:27-35.
- Mariotti, J.A. (1986). Fundamentos de genética biométrica. Aplicaciones al mejoramiento genético vegetal. Serie de Biología. Monografía N° 32. O.E.A.
- Martin, G.B.; Brommonschenkel, S.H.; Chunwongse, J.; Frary, A.; Ganai, M.; Spivey, R.; Wu, T.; Earle, E. y Tanksley, S.(1993). *Science*. 262:1432-1436.
- Martin, G.B.; de Vicente, M.C. y Tanksley, S.D. (1992). High-resolution linkage analysis and physical characterization of the *Pto* bacterial resistance locus in tomato. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 6:26-34.
- Martin, G.B.; Williams, J.G.K. y Tanksley, S.D. (1991). Rapid identification of markers linked to a *Pseudomonas* resistance gene in tomato by using random primers and isogenic lines. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:2336-2340.
- Mather, K. y Jinks, J.L. (1971). *Biometrical genetics*. 2a edición. Chapman and Hall, London.
- Mazur, B. y Tingey S. (1995). Genetic mapping and introgression of genes of agronomic importance. *Current Opinion in Biotechnology* 6:175-182.

- McCarty, D.R.; Hattori, T.; Carson, C.B.; Vasil, V.; Lazar, M. y Vasil, I.K. (1991). The *viviparous-1* developmental gene of maize encodes a novel transcriptional activator. *Cell* 66:895-905.
- McCouch, S.R.; Kochert, G.; Yu, Z.H.; Khush, G.S.; Cofman, W.R. y Tanksley, S.D. (1988). Molecular mapping of rice chromosomes. *Theor. Appl. Genet.* 76:815-829.
- Melake Berhan, A.; Hulbert, S.H.; Butler, L.G. y Bennetzen, J.L. (1993). Structure and evolution of the genomes of *Sorghum bicolor* and *Zea mays*. *Theor. Appl. Genet.* 86:598-604.
- Melchinger, A.E. (1990). Use of Molecular Markers in Breeding for Oligogenic Disease Resistance. *Plant Breeding* 104:1-19.
- Michelmore, R y Shaw, D. (1988). Character dissection. *Nature* 335:672-673.
- Michelmore, R. (1995). Isolation of disease resistance genes from crop plants. *Current Opinion in Biotechnology* 6:145-152.
- Michelmore, R.W.; Paran, I. y Kesseli, R.V. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:9828-9832.
- Muehlbauer, G.J.; Staswick, P.E.; Specht, J.E. Graef, G.L.; Shoemaker, R.C. y Keim, P. (1991). RFLP mapping using near-isogenic lines in the soybean [*Glycine max* (L.) Merr.]. *Theor. Appl. Genet.* 81:189-198.

- Nelson, C.J. (1994). Molecular mapping in bread wheat. Ph.D. Thesis. Cornell University, Ithaca, N.Y.
- Oh, B.J.; Frederiksen, R.A. y Magill, C.W. (1994). Identification of molecular markers linked to head smut resistance gene (*Shs*) in sorghum by RFLP and RAPD analyses. *Phytopathology* 84:830-833.
- Palmer, G.H. (1992). Sorghum-Food, Beverage and Brewing Potentials. *Process Biochemistry* 27:145-153.
- Paran, I.; Kesseli, R. y Michelmore, R. (1991). Identification of restriction fragment length polymorphism and random amplified polymorphic DNA markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce, using near-isogenic lines. *Genome* 34:1021-1027.
- Paterson, A.H.; Damon, S.; Hewitt, J.D.; Zamir, D.; Rabinovitch, H.D.; Lincoln, S.E.; Lander, E.S. y Tanksley, S.D. (1991). Mendelian factors underlying quantitative traits in tomato: comparison across species, generations y environments. *Genetics* 127:181-197.
- Paterson, A.H.; DeVerna, J.W.; Lanini, B. y Tanksley, S.D. (1990). Fine mapping of quantitative trait loci using selected overlapping recombinant chromosomes, in an interspecies cross of tomato. *Genetics* 124:735-742.
- Paterson, A.H.; Lander, E.S.; Hewitt, J.D.; Paterson, S.; Lincoln, S.E. y Tanksley, S.D. (1988). Resolution of quantitative traits into

Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335:721-726.

Pereira, M.G. y Lee, M. (1995). Identification of genomic regions affecting plant height in sorghum and maize. *Theor. Appl. Genet.* 90:380-388.

Pereira, M.G.; Lee, M.; Bramel-Cox, P.; Woodman, W.; Doebley, J. y Whitkus, R. (1994). Construction of a RFLP map in sorghum and comparative mapping in maize. *Genome* 37:236-243.

Ragab, R.A.; Dronvalli, S.; Shagai Maroof, M.A. y YU, Y.G. (1994). Construction of a sorghum RFLP linkage map using sorghum and maize DNA probes. *Genome* 37:590-594.

Reddy, L.V.; Metzger, R.J. y Ching, T.M. (1985). Effect of temperature on seed dormancy on wheat. *Crop Sci.* 25:455-458.

Reiter, R.S.; Williams, J.G.K.; Feldman, K.A.; Rafalski, J.A.; Tingey, S.V. y Scolnik, P.A. (1992). Global and local genome mapping in *Arabidopsis thaliana* by using recombinant inbred lines and random amplified polymorphic DNA. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:1477-1481.

Ritter, E.; Debener, T.; Barone, A.; Salamini, F. and Gebhardt, C. (1991). RFLP mapping on potato chromosomes of two genes controlling extreme resistance to potato virus X (PVX). *Mol. Gen. Genet.* 227:81-85.

- Robertson, D.S. (1989). Understanding the relationship between qualitative and quantitative genetics. En Development and Application of Molecular Markers to Problems in Plant Genetics. Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory. Ed., Timothy Helentjaris.
- Ronald, P.C.; Albano, B.; Tabien, R.; Abenes, L.; Wu, K.S.; McCouch, S. y Tanksley, S.D. (1992). Genetic and physical analysis of the rice bacterial blight disease resistance locus, *Xa21*. Mol. Gen. Genet. 236:113-120.
- Saghai-Maroof, M.A.; Soliman, K.M.; Jorgensen, R.A. y Allard, R.W. (1984). Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley. Mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. Proc. Natl. Acad. Sci. 81:8014-8018.
- Sambrook, J.; Fritsch, E.F. y Maniatis, T. (1989). Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd. ed. Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sills, G.R.; Bridges, W.; Al-Janabi, S.M. y Sobral, B. (1995). Genetic analysis of agronomic traits in a cross between sugarcane (*Saccharum officinarum* L.) and its presumed progenitor (*S. robustum* Brandes & Jesw. Ex Grassl). Molecular Breeding, en prensa.
- Springer, P.S.; Zimmer, E.A. y Bennetzen, J.L. (1989). Genomic organization of the ribosomal DNA of sorghum and its close relatives. Theor. Appl. Genet. 77:844-850.

- Steinbach, H.S.; Benech Arnold, R.L. y Sánchez, R.A. (1996). Hormonal regulation of dormancy in developing sorghum seeds. *Plant Physiol.*, en prensa.
- Steinbach, H.S.; Benech Arnold, R.L.; Kristof, G.; Sánchez, R.A. y Marcucci Poltri, S. (1995). Physiological basis of pre-harvest sprouting resistance i *Sorghum bicolor* (L.) Moench. ABA levels and sensitivity in developing embryos of spouting-resistant and -susceptible varieties. *Journal of Experimental Botany* 46:701-709.
- Stuber, C.W.; Edwards, M.D. y Wendel, J.F. (1987). Molecular marker-facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II. Factors influencing yield and its component traits. *Crop Sci.* 27:639-648.
- Stuber, C.W.; Lincoln, S.E.; Wolff, D.W.; Helentjaris T. y Lander, E.S. (1992). Identification of genetic factors contributing to heterosis in hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* 132:823-839.
- Tanksley SD, Ganai MW, Prince JP, de Vicente MC, Bonierbale MW, Broun P, Fulton TM, Giovannoni JJ, Grandillo S, Martin GB, Messeguer R, Miller JC, Miller L, Paterson AH, Pineda O, Röder MS, Wing RA, Wu W, Young ND (1992). High density molecular linkage maps of the tomato and potato genomes. *Genetics* 132:1141-1160

- Tanksley, S.D. (1993). Mapping Polygenes. *Annu. Rev. Genet.* 27:205-233.
- Tanksley, S.D.; Ganai, M.W. y Martin, G.B.(1995). Chromosome landing: a paradigm for map-based gene cloning in plants with large genomes. *Trends genet.* 11:63-68.
- Tanksley, S.D.; Young, N.D.; Paterson, A.H.; Bonierbale, M.W. (1989). RFLP mapping in plant breeding: new tools for an old science. *Biotechnology.* 7: 257-264.
- Vos, P.; Hogers, R.; Bleeker, M.; Lee, T.; Hornes, M.; Frijters, A.; Pot, J.; Peleman, J.; Kuiper, M. y Zabeau, M. (1995). AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acids Res.* 23:4407-4414.
- Walker-Simmons, M. (1987). ABA levels and sensitivity in developing wheat embryos of sprouting resistance and susceptible cultivars. *Plant Physiol.* 84:61-66.
- Weller, J.I.; Soller, M. y Brody, T. (1988). Linkage analysis of quantitative traits in an interspecific cross of tomato (*Lycopersicon esculentum* x *Lycopersicon pimpinellifolium*) by means of genetic markers. *Genetics* 118:329-339.
- Welsh, J. y McClelland, M. (1990). Fingerprinting genomes using PCR with arbitrary primers. *Nucleic Acids Res.* 18:7213-7218
- Whitkus, R.; Doebley, J. y Lee M. (1992). Comparative genome mapping of sorghum and maize. *Genetics.* 132:1119-1130.

Wicking, C. y Williamsom, B. (1991). From the linked marker to gene. *Trends in Genet.* 7:288-293.

Williams, J.G.K.; Kubelik, A.R.; Livak, K.J.; Rafalski, J.A. y Tingey, S.V. (1990). DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers. *Nucleic Acids Res.* 18:6531-6535.

Williams, M. (1994). Analysis of multiple classes of abscisic acid-responsive genes during embryogenesis in *Zea mays*. *Dev. Genet.* 15:415-424.