

Avances Recientes en la Identificación de Genes de Resistencia a Mosca Blanca, *Aleurotrachelus socialis* Bondar (Homoptera: Aleyrodidae) en Yuca (*Manihot esculenta* Crantz)



A. BELLOTTI¹, A. BOHÓRQUEZ¹, J. VARGAS¹, B. ARIAS¹, H.L. VARGAS², G. TRUJILLO¹, C. MBA¹, M.C. DUQUE¹, J. TOHME¹

¹Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), AA 6713, Cali, Colombia
²CORPOICA, Espinal, Tolima, Colombia
<http://www.ciat.cgiar.org/jpm/index.htm>

INTRODUCCIÓN

El complejo de especies de Mosca Blanca (cerca de 1200 especies) es considerado uno de los mayores grupos de plagas que atacan un amplio rango de cultivos en el mundo, ocasionando considerables pérdidas. La mosca blanca causa un gran daño en los agroecosistemas de yuca (*Euphorbiaceae*; *Manihot esculenta* Crantz) en Latinoamérica, África y parte de Asia, al alimentarse directamente de la planta. La especie que causa más daño en yuca en el norte de Suramérica es *Aleurotrachelus socialis*. Entre los síntomas del daño que causan están, encrespamiento de las hojas apicales, amarillamiento y necrosis en las hojas basales y retardo en el desarrollo de la planta (Fig. 1). Los adultos de mosca blanca son más frecuentemente observados sobre el envés de las hojas apicales, donde se alimentan de los fluidos de la planta y ovipositan. La miel excretada es un sustrato para el desarrollo de un hongo llamado "fumagina" el cual interfiere con la fotosíntesis (Fig. 1C). La combinación del daño causado por la alimentación directa y la baja tasa de fotosíntesis, reduce el rendimiento de las raíces en un 4 a 79%, dependiendo de la duración del ataque (Bellotti, 2002). Actualmente, la mayor fuente de resistencia en yuca es el genotipo MEcu-72 (Bellotti y Arias, 2001) (Fig. 1D). Cuando *A. socialis* se alimenta sobre MEcu-72 hay una reducción en la oviposición, el periodo de desarrollo es más largo, el tamaño es reducido y hay una mortalidad más alta que cuando se alimenta sobre el genotipo susceptible, (Fig. 2). Debido a la importancia de la mosca blanca como plaga, es relevante entender la naturaleza de los genes que confieren resistencia al genotipo MEcu-72. Para estudiar la genética de esta resistencia, se hizo un cruce entre MEcu-72 (genotipo resistente) x MCol 2246 (un genotipo muy susceptible), para evaluar la segregación de la F1, utilizando marcadores moleculares. Lo anterior aceleraría la selección de germoplasma resistente a mosca blanca y el aislamiento de los genes de resistencia.



Fig. 1. A: Estados ninfales de *A. socialis*, sobre hoja de yuca. B: Hojas con encrespamiento en una planta de yuca con alta población de *A. socialis*. C: Presencia de fumagina sobre hojas de yuca, atacadas por *A. socialis*. D: Genotipo Resistente MEcu 72 y un genotipo susceptible.

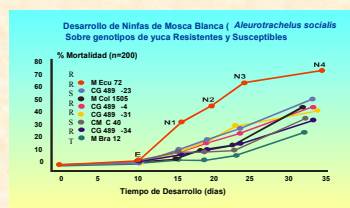


Fig. 2. A: Mortalidad de Ninfas de Mosca Blanca (*A. socialis*) sobre clones de yuca resistentes (R), tolerantes (T) y susceptibles (S).

MATERIALES Y MÉTODOS

MATERIAL VEGETAL

Para el presente trabajo se utilizó el cruce MEcu 72 (Parental resistente) x MCol 2246 (parental susceptible). De este cruce se obtuvo una progenie F1 de 286 genotipos (familia CM 8996). Estos materiales fueron sembrados y evaluados en el campo durante mayo de 2001, marzo y agosto de 2002 en dos diferentes localidades: Espinal-Tolima, Colombia (CORPOICA-NATAIMA) a 350 m.s.n.m. y Santander de Quilichao, Cauca, Colombia, a 990 m.s.n.m. El objetivo de estas evaluaciones era lograr identificar la segregación en la progenie y lograr seleccionar los materiales resistentes y susceptibles. Las evaluaciones fueron hechas en el campo utilizando escalas de daño y población, cuyos rangos oscilan entre 1-6, (Tabla 1). Tres evaluaciones fueron hechas en el 2002 utilizando los datos de daño y población más altos para el análisis estadístico.

Tabla 1. Escalas de Daño y Población para evaluación de la resistencia a mosca blanca en germoplasma de yuca.*

Escala de Población (ninfas y pupas)	
1=	No hay estados de mosca blanca presentes
2=	de 1-200 individuos por hoja de yuca
3=	201-500 por hoja
4=	501-2000 por hoja
5=	2001-4000 por hoja
6=	>4000 por hoja
Escala de Daño	
1=	hojas sin daño
2=	hojas jóvenes aún verdes pero ligeramente fídicidas
3=	hojas jóvenes con entorchamiento, ligero encrespamiento en las hojas.
4=	hojas apicales entorchadas y encrespadas; puntos amarillos en las hojas.
5=	igual a 4, pero con amarillamiento de las hojas y presencia de fumagina.
6=	Defoliación y necrosis en las hojas, fumagina en las hojas medias y bajas y en los tallos jóvenes.

*Extraída de Bellotti & Arias, 2001 Crop Protection. 813-823.

ANÁLISIS CON MARCADORES MOLECULARES

Se utilizaron marcadores Microsatélites y AFLPs (Amplified Fragment Length Polymorphism, AFLP Analysis System I kit y AFLP Analysis System II de Invitrogen® siguiendo sus instrucciones con algunas modificaciones) para encontrar marcadores asociados con la resistencia y finalmente mapear el/los gene(s). Como parte de un proyecto colaborativo con Clemson University financiado por USAID, fue construida una librería BAC para yuca utilizando el genotipo MEcu 72. La librería contiene 73,728 clones con un promedio de tamaño de insertos de 93 kb. Basados en que el tamaño del genoma de yuca es de 760 Mb, la librería tiene un cubrimiento de aproximadamente 10 genomas haploides equivalentes. Se utilizarían las librerías BAC como herramientas para clonación de los genes de Resistencia a mosca blanca. Se utilizó la técnica de tinción con nitrato de plata para visualizar la segregación de los alelos, sobre geles de poliacrilamida. Se amplificaron secuencias RGAs (previamente aisladas en yuca) en los parentales y los polimórficos fueron mapeados en la F1. Se utilizaron geles de agarosa y los polimorfismos fueron visualizados con bromuro de etidio.

RESULTADOS

Evaluación de campo

Las evaluaciones de campo en la localidad de Nataima (Tolima) mostraron que estos materiales estuvieron sometidos a una alta presión de mosca blanca, ya que presentaron unos altos niveles de daño y población (de 4 a 6 en la escala, Tabla 1). Sin embargo, algunos materiales, a pesar de la alta presión, mostraron niveles bajos en las evaluaciones (inferior a 2). Podría concluirse que estos materiales presentan un nivel de resistencia similar al del parental resistente MEcu 72. (Fig. 3 y 4).

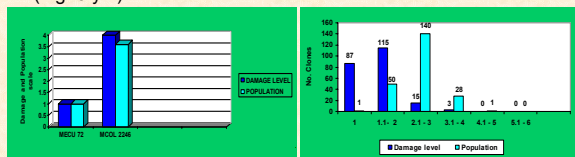


Fig. 3. Rangos de daño y población de mosca blanca en yuca, ocasionado por *A. socialis* alimentándose sobre: A: genotipos parentales MEcu 72 y MCol 2246 y B: en clones de la familia CM 8996 (MEcu 72 x MCol 2246) en CORPOICA, Nataima (Tolima, Colombia).

ANÁLISIS MOLECULAR

Los parentales MEcu 72 y MCol 2246 fueron evaluados con 343 marcadores microsatélites de yuca (Mba et al, 2001) incluyendo 156 microsatélites de cDNA (Mba et al, sometido). Aproximadamente 155 de los microsatélites fueron polimórficos en los parentales y se evaluaron en la F1 (Fig. 4).

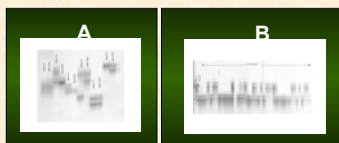


Fig. 4. Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata, mostrando: A: los parentales MEcu 72 y MCol 2246 evaluados con seis microsatélites de yuca. B: alelos únicos en MEcu 72 del micro 234 de yuca. Segregación de este alelo en 41 individuos de la progenie.

Se generó un mapa genético de ligamiento de yuca del parental heterocigoto hembra (MEcu 72) de un cruce intraespecífico. Para la construcción de este mapa fueron analizados 103 microsatélites, de los cuales 71 quedaron en los grupos. El mapa consiste de 19 grupos de ligamiento, lo cual representa el genoma haploide de yuca (Fig. 6). Estos grupos tienen un cubrimiento de 550,2 cM y el promedio de densidad de los marcadores es 1 por 7,9 cM. La posición de los 71 microsatélites, y del RGA es mostrada en la figura 6, sobre el mapa genético molecular de yuca (LOD = 25 y theta (θ) = 25). Las distancias en el mapa son mostradas en unidades Kosambi. Además, 26 microsatélites (mostrados en verde, Fig. 6) han sido localizados previamente en el mapa molecular de yuca publicado por Fregene et al, 1997. Los otros 45 microsatélites son nuevos. De los 71 microsatélites mapeados 31 fueron aislados de secuencias de cDNA (Mba, en prep.) los demás fueron aislados a partir de DNA genómico.

ANÁLISIS DE AFLPs

En el análisis se utilizaron 128 combinaciones de primers en ambos parentales (MEcu 72 y MCol 2246) y en dos bulks (análisis de segregantes agrupados) compuestos por 10 DNAs de individuos resistentes y 10 DNAs de susceptibles a mosca blanca. Se obtuvieron 53 combinaciones polimórficas, en las cuales se encontraron 425 bandas polimórficas entre los resistentes y los susceptibles (Fig. 5).

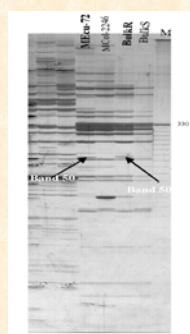
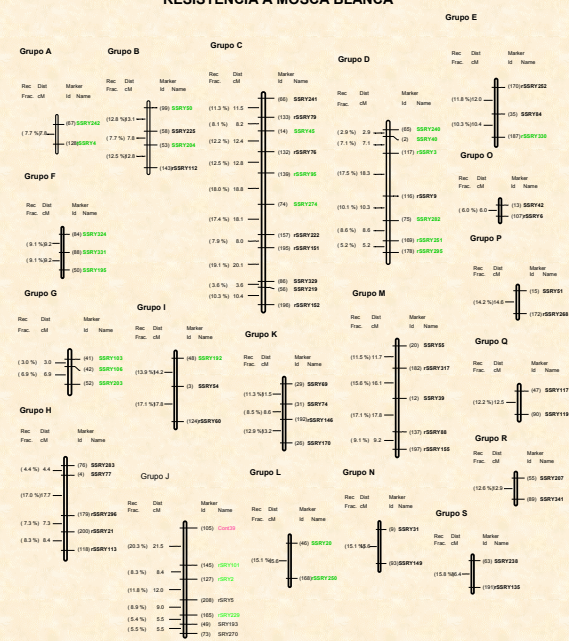


Fig. 5: Gel de poliacrilamida teñido con nitrato de plata, mostrando: AFLP de ambos parentales (R resistente, S susceptible) y de los Bulks resistentes y susceptibles, con la combinación ACA-CTT, en el cual se observa la banda polimórfica 50 sólo encontrada en los resistentes.

Fig. 6: MAPA GENÉTICO MOLECULAR DE YUCA (MEcu 72) PARA RESISTENCIA A MOSCA BLANCA



ASOCIACIÓN ENTRE MARCADORES MOLECULARES Y LA RESISTENCIA

Los datos moleculares fueron analizados utilizando los paquetes estadísticos de análisis de QTL (QTL cartographer, Qgene) para determinar la asociación entre los marcadores y la caracterización fenotípica. Se hizo un análisis preliminar de X² con un nivel de significancia del 5% utilizando el paquete SAS. Probables asociaciones fueron encontradas entre 43 microsatélites y la caracterización fenotípica (puntaje de 1.0 a 2.0 de las escalas de daño y población, Tabla 1).

CONCLUSIONES

- Las evaluaciones de campo sobre la familia CM 8996 y sus parentales confirmaron la resistencia a mosca blanca del genotipo MEcu 72, la alta susceptibilidad del genotipo MCol 2246 y permitieron seleccionar preliminarmente algunos individuos de la F1 resistentes y susceptibles a mosca blanca.
- Utilizando marcadores microsatélites fueron encontradas asociaciones probables con las líneas resistentes.
- Un mapa de ligamiento fue construido utilizando los datos de los microsatélites, un RGA y la caracterización fenotípica hecha en campo.

TRABAJO EN DESARROLLO

Saturación del mapa de ligamiento de MEcu 72, utilizando marcadores AFLPs y RGAs de yuca.

Aislamiento, clonación, secuenciación y mapeo de bandas polimórficas de AFLPs entre los genotipos resistentes y susceptibles.

Diseño de SCARs para selección asistida por marcadores y análisis de QTLs para resistencia a mosca blanca.

Aislamiento de secuencias expresadas de MEcu 72 durante la respuesta de defensa al ataque de mosca blanca.

Siguiendo al aislamiento de secuencias expresadas, una nueva tecnología conocida como DNA chips o Microarray está disponible para analizar un significativo número de clones. La expresión con Microarray sería utilizada para identificar probables vías de respuesta tempranas al ataque de mosca blanca.

REFERENCIAS

- Arias B. 1995. Tesis de Maestría. Universidad Nacional de Colombia, Palmira, Valle.
- Bellotti, A.C. and B. Arias. 2001. Crop Protection 20:813-823.
- Bellotti, A.C. 2002. (Eds. R.J Hillocks, J.M. Thresh and A.C. Bellotti). CAB International 2002. 332pp.
- CIAT, 1995. Cassava program annual report. 54p.
- Fregene, MA, Angel, F, Gomez, R, Rodriguez, F, Roca, W, Tohme, J. and M. Bonierbale. 1997. Theor. Appl. Genet. 95: 431-441.
- Mba, R.E.C., Stephenson, P., Edwards, K., Melzer, S., Mkumbira, J., Gullberg, U., Apel, K., Gale, M., Tohme, J. and Fregene, M. 2001. Theoretical and Applied Genetics Journal. 102:21-31.

AGRADECIMIENTOS

Agradecemos a New Zealand Agency for International Development (NZAID) por proveer la financiación de la investigación realizada en este trabajo.