



BONAMICO, N.C.  
Marcadores Molecular

2004

59898



59898

**Universidad Nacional de Río Cuarto**  
**Facultad de Ciencias Exactas, Físico-Químicas y Naturales**

**Tesis para optar al título de Magister en Biotecnología**

**MARCADORES MOLECULARES EN *Zea mays* L. ASOCIADOS A  
TOLERANCIA AL MAL DE RÍO CUARTO**

*2004*  
**Tesista: Ing Agr Natalia C. Bonamico**  
**Director: Ing Agr Miguel A. Di Renzo (MSc)**  
**Codirector: Ing Agr Mónica Balzarini (PhD)**

**Jurados:**

\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_  
\_\_\_\_\_

**Ing Agr Daniel G. Díaz (MSc)**  
**Lic Mercedes A. Ibañez (MSc)**  
**Ing Agr Adriana Marinelli (Dr)**

59893

REF:
Classif:
T-342

## ÍNDICE

	Página
AGRADECIMIENTOS	V
RESUMEN	VI
SUMMARY	VII
INTRODUCCIÓN	1
<i>Importancia del maíz</i>	1
<i>Mal de Río Cuarto</i>	2
<i>Tolerancia al MRC y forma de herencia del carácter</i>	9
<i>Marcadores genéticos</i>	10
<i>Loci de caracteres cuantitativos (QTL)</i>	14
<i>Análisis discriminante</i>	21
<i>Hipótesis</i>	22
<i>Objetivos</i>	22
MATERIALES Y MÉTODOS	23
<i>Materiales</i>	23
<i>Experimento de campo</i>	23
<i>Marcadores genéticos</i>	25
<i>Análisis estadístico de datos</i>	31
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	38
<i>Evaluaciones de datos experimentales de campo</i>	38
<i>Análisis con marcadores genéticos</i>	47
<i>Identificación de QTL</i>	51
<i>Análisis discriminante</i>	62
CONCLUSIONES	67
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	68
ANEXOS	78

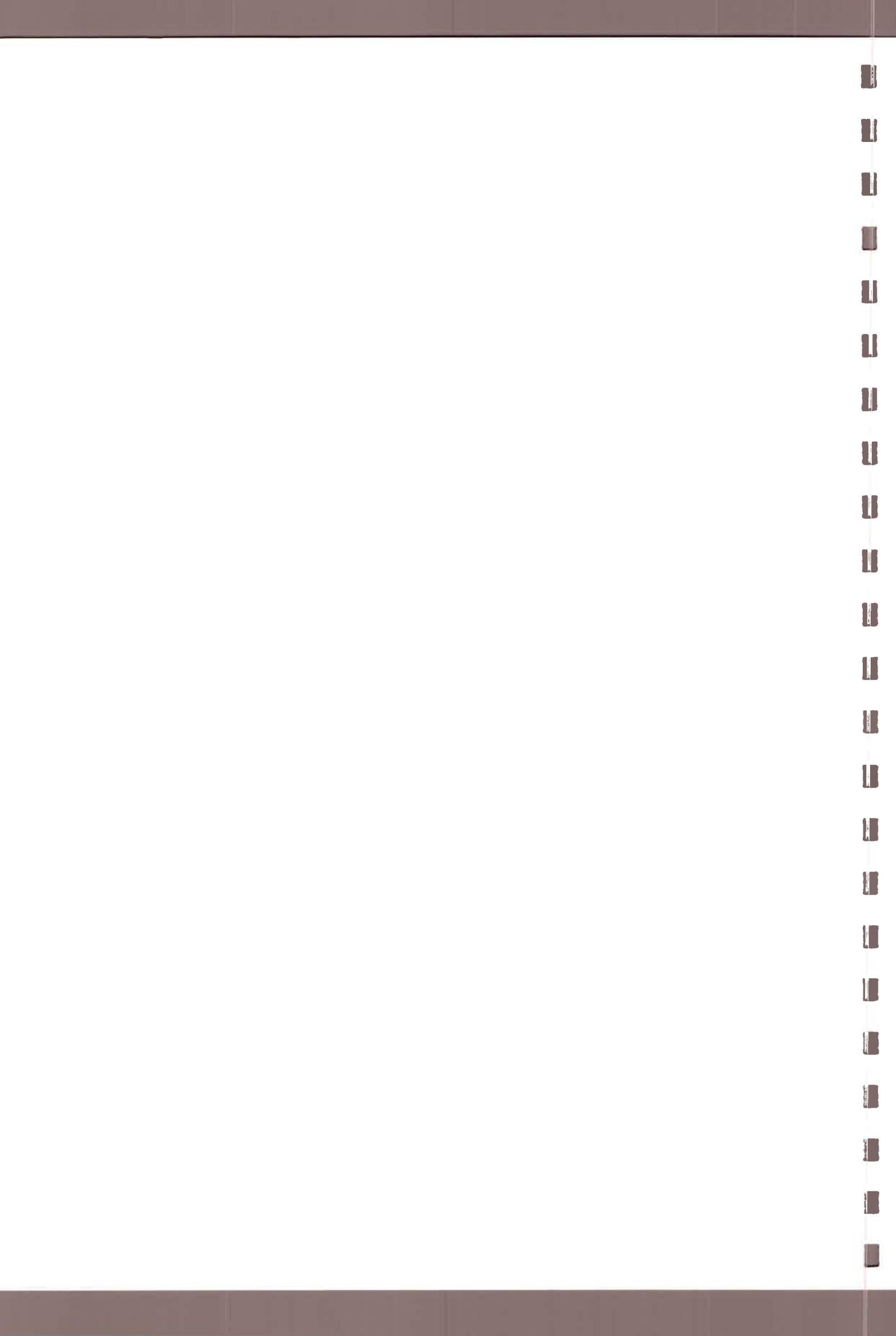


## ÍNDICE DE FIGURAS Y CUADROS

FIGURAS	Página
Figura 1. Área endémica de la enfermedad Mal de Río Cuarto en la zona Sur de la provincia de Córdoba.	3
Figura 2. Síntomas observados en plantas de maíz afectadas por la virosis Mal de Río Cuarto.	7
Figura 3. Síntomas observados en plantas de maíz afectadas por la virosis Mal de Río Cuarto.	8
Figura 4. Detección de QTL mediante marcadores moleculares en una población $F_2$ segregante para un carácter cuantitativo.	18
Figura 5. Distribución del índice de severidad de enfermedad (ISE) de las familias $F_3$ y de las líneas parentales a través de cuatro ambientes del área endémica.	40
Figura 6. Fenotipo molecular observado, con dos marcadores moleculares polimórficos, en los genotipos parentales y en el híbrido.	49
Figura 7. Mapa de ligamiento construido con 56 marcadores de microsatélites.	52
CUADROS	
Cuadro 1. Componentes de la reacción en cadena de la enzima <i>Taq</i> ADN polimerasa.	29
Cuadro 2. a) ANAVA en ambientes individuales y b) ANAVA a través de cuatro ambientes del área endémica.	32
Cuadro 3. Estimación de las medias del índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC en las líneas parentales (BLS14 y Mo17) y en las 227 familias $F_3$ , en ambientes individuales y a través de ambientes del área endémica.	39
Cuadro 4. Estimación de los componentes de varianza, heredabilidad en sentido amplio e intervalos de confianza del índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC en 227 familias $F_3$ , en ambientes individuales y a través de cuatro ambientes del área endémica.	42



Cuadro 5.	Correlación del índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC para las 227 familias F <sub>3</sub> entre ambientes del área endémica, y correlación fenotípica entre el ISE y otros caracteres no considerados en el ISE.	45
Cuadro 6.	Heredabilidad en sentido amplio para caracteres no considerados en el índice de severidad de enfermedad (ISE), con un límite de confianza del 90%, obtenidos a partir de 227 familias F <sub>3</sub> a través de ambientes del área endémica.	46
Cuadro 7.	Número de marcadores SSR probados.	48
Cuadro 8.	Índice de severidad de enfermedad (ISE), en %, de un subgrupo de familias F <sub>3</sub> (n = 36) con comportamiento extremo frente a la virosis en los ambientes individuales y a través de ambientes del área endémica.	50
Cuadro 9.	Parámetros relacionados con posibles QTL asociados significativamente con el índice de severidad de enfermedad (ISE) a través de ambientes del área endémica.	53
Cuadro 10.	Parámetros relacionados con posibles QTL asociados significativamente con el índice de severidad de enfermedad (ISE) en ambientes individuales del área endémica.	57
Cuadro 11.	Marcadores moleculares asociados con el índice de severidad de enfermedad (ISE), basado en el ANAVA a una vía de clasificación realizado por ambiente y a través cuatro ambientes del área endémica.	59
Cuadro 12.	Marcadores moleculares seleccionados por discriminar los grupos definidos previamente por su comportamiento frente a la enfermedad MRC.	63
Cuadro 13.	Tabla de clasificación cruzada.	66



## AGRADECIMIENTOS

A mi familia, por brindarme el afecto necesario para iniciar cada día con el empeño y entusiasmo que me permitieron realizar este trabajo:

Jorgelina, gracias por tu ternura y por tus juegos

Marcelo, gracias por tu fortaleza y tu paciencia

Mamá, gracias por tu optimismo y tu fresca sonrisa

Papá, gracias por tu silencio lleno de significados...

y por tu conmovedor ejemplo de voluntad.

A Miguel, por darme esta oportunidad, y su amistad; a Claudio, a Daniel y a Mónica, por su apoyo incondicional y a Mercedes por ser una gran compañera.

A la SECyT de la UNRC, a la Agencia Córdoba Ciencia S.E. y al FONCyT por el financiamiento otorgado.



## RESUMEN

### MARCADORES MOLECULARES EN *Zea mays* L. ASOCIADOS A LA TOLERANCIA AL MAL DE RÍO CUARTO

El Mal de Río Cuarto (MRC) constituye la enfermedad viral más importante del maíz en la República Argentina. El virus del MRC es transmitido naturalmente en forma persistente-propagativa por *Delphacodes kuscheli* Fennah (Homóptera: *Delphacidae*). La resistencia genética es la forma más eficiente de controlar enfermedades causadas por patógenos biotróficos en cultivos extensivos. En el caso del MRC cuyo agente causal es un *Fijivirus* de la familia *Reoviridae*, poco se conoce sobre el tipo de herencia de la resistencia parcial a la enfermedad. Los objetivos de este trabajo fueron: I) estimar la heredabilidad en sentido amplio del carácter tolerancia al MRC, II) identificar marcadores moleculares de microsatélites (SSR) asociados con segmentos cromosómicos (QTL) involucrados en la tolerancia al MRC y III) identificar marcadores con capacidad discriminante para clasificar familias en grupos susceptibles y tolerantes al MRC. El material está constituido por las generaciones F<sub>2</sub> y F<sub>3</sub> del cruzamiento entre una línea pública dentada susceptible, (Mo17), y una línea flint tolerante, (BLS14). Para evaluar el comportamiento fenotípico frente a la virosis bajo condiciones de infección natural, 227 familias F<sub>3</sub> fueron sembradas en la área endémica de la enfermedad durante los años 1999, 2000 y 2001. La tolerancia fue medida por medio de un índice de severidad de enfermedad (ISE) calculado según la incidencia y la severidad de los síntomas observados. La heredabilidad en sentido amplio de la tolerancia al MRC fue estimada para cada ambiente y a través de ambientes, en función de los componentes de varianza. El análisis molecular con marcadores de microsatélites polimórficos, 59 de 112 que revelaron bandas nítidas, se realizó con el ADN de un subgrupo de plantas F<sub>2</sub> cuyas familias F<sub>3</sub> mostraron comportamiento extremo frente a la virosis en los distintos años de evaluación a campo. Se realizó análisis de ligamiento entre marcadores y se identificaron posibles QTL a través del mapeo por intervalos. Además, se agruparon familias por su comportamiento fenotípico en dos grupos, grupo A con ISE menor a 35% y grupo B con ISE mayor a 55% y se realizó un análisis discriminante discreto (AD) con los marcadores como variables para discriminar o clasificar una familia en un grupo u otro. La tasa de error, en el que se podría incurrir usando la regla de clasificación para clasificar una familia en el grupo A o B, fue obtenida por validación cruzada. La expresión a campo de la enfermedad MRC es multifactorial, sin embargo, con los materiales utilizados y en las condiciones de este estudio, se estimó que la heredabilidad del carácter ISE asume un valor moderado entre 0,47 y 0,63. El análisis de asociación sugiere la presencia de dos posibles QTL en los grupos de ligamiento 1 y 8. Una regresión múltiple, utilizando un modelo con efectos genéticos aditivos y dominantes indicó que ambos QTL explican conjuntamente el 36,2% y el 62,4% de la varianza fenotípica y genotípica del ISE medio a través de ambientes, respectivamente. Un conjunto de diez marcadores fue seleccionado, a partir del AD, como predictores para la clasificación de familias en los grupos de ISE bajo o alto (tasa de error de clasificación: 5,56%). Estos resultados pueden ser de gran utilidad y contribuir al desarrollo de eficientes programas de mejoramiento, dentro de un esquema de selección asistida por marcadores, para tolerancia al MRC en maíz.

Palabras clave: Maíz, Mal de Río Cuarto, Heredabilidad, Marcadores moleculares, SSR, QTL, Análisis discriminante.



## SUMMARY

### MOLECULAR MARKERS ASSOCIATED WITH TOLERANCE TO MAL DE RÍO CUARTO IN *Zea mays* L.

In Argentina, Mal de Río Cuarto (MRC) is the most important viral disease of maize. The MRC virus is naturally transmitted in a persistent propagative manner by the insect *Delphacodes kuscheli* Fennah (Homoptera: *Delphacidae*). No genetic estimates for resistance to Mal de Río Cuarto (MRC) disease in *Zea mays* L. are currently available in the literature. The objectives of this investigation were: I) estimate the heritability of partial resistance to MRC disease, II) identify molecular markers SSR loci linked to quantitative trait loci (QTL) contributing to resistance to the MRC disease in maize and III) identify discriminant molecular markers for classification of maize lines into groups predefined according to available agronomic data. The materials consist of F<sub>2</sub> plants and F<sub>3</sub> families derived from crosses between Mo17, a public dent line susceptible, and BLS14, a flint line tolerant. The 227 F<sub>3</sub> families were evaluated during 1999, 2000 and 2001 in the endemic area of MRC disease. A disease severity index (DSI) based on disease grade was calculated for each plot and used to rate F<sub>3</sub> families for their resistance to MRC. A broad-sense heritability estimate based on variance component was calculated for each environment and across environments. A subset of parental F<sub>2</sub> plants belong to susceptible and resistant F<sub>3</sub> lines-derived from the field assessment were assayed with molecular markers to map resistance genes. The parents lines of the population were tested with 112 SSR markers to identify polymorphism. Fifty-nine polymorphic molecular markers SSR were employed for the testing of linkage among the DNA markers and the mapping of QTL through interval mapping. A discriminant discrete analysis (DA) procedure was used to detect statistical differences among groups (resistant vs. susceptible) and to determine which combination of markers can be used for classification of lines into a particular group. For disease severity index all estimates showed moderate heritabilities ranging from 0,47 to 0,63 and were similar when based on individual environments or across environment. Two putative QTL for DSI across environments were mapped with genetic markers. A simultaneous fit with all QTL, using a model with additive and dominance genetic effects, explained 36,2% and 62,4% of genetic and phenotypic variance for DSI, respectively. DA significant differences ( $p < 0,01$ ) were found at the molecular level between predefined groups using this procedure. Markers for DSI were identified by stepwise discriminant selection as those contributing the most to the differentiation between contrasting groups. Stepwise discriminant marker selection was an effective method for identification of ten useful markers for classification of maize lines into groups predefined according to available agronomic data. The proposed procedure could be used as a tool for germplasm improvement providing a discriminant model to integrate the information from markers selected for different predefined groups. In breeding for resistance to MRC disease the aim to mapping QTL was to use the marker-assisted selection (MAS) in the maize breeding programs.

Key words: Maize, Mal de Río Cuarto, Heritability, Molecular markers, SSR, QTL, Discriminant analysis.

## INTRODUCCIÓN

### *Importancia del maíz*

El maíz (*Zea mays* L.), cereal originario de América Central, fue domesticado en una pequeña región de México antes de la llegada de los europeos y constituyó para las civilizaciones precolombinas una de las especies cultivadas de mayor importancia socio-económica. Los Mayas en sus ceremonias religiosas adoraban a este cereal como a un Dios. Posteriormente su cultivo se expandió mundialmente no sólo por el potencial de producción sino por la calidad nutricional, siendo actualmente junto con el trigo y el arroz, uno de los tres cereales de mayor trascendencia. Es así, que en el ciclo agrícola 2001/02 las 138.755.400 ha cosechadas mundialmente con un rendimiento promedio de 4.343 Kg/ha generaron una producción de 602.589.189 t. En el mismo ciclo agrícola se cosecharon en América Latina 17.138.935 ha con un rinde promedio de 3.400 Kg/ha, y en nuestro país 2.419.288 ha con un rendimiento promedio de 6.000 Kg/ha (<http://www.fao.org>, verificado en octubre de 2003).

Los principales países productores de maíz en el mundo son Estados Unidos, China y Brasil, seguidos por Argentina, Sudáfrica y Europa (USDA. World Agriculture Production, 1995) (<http://www.usda.gov>, verificado en octubre de 2003). Mundialmente el maíz se utiliza principalmente para alimentación animal, sobre todo para bovinos, cerdos y aves. Un porcentaje inferior de la producción es utilizado como alimento directo por el hombre como por ejemplo los copos y la harina de maíz, y en forma elaborada en numerosos productos alimenticios como aceite de mesa, almidón, edulcorante, alcohol, bebidas alcohólicas, productos de panificación y pastelería, margarina, chicle, mayonesa, bebidas de chocolate, bombones, bebidas de frutas, aderezo para ensaladas, helados, salsas, sopas, baños y recubrimientos dulces. También se encuentra en medicamentos como la aspirina y los antibióticos, en productos cosméticos y en jabones, así como en productos industriales, productos químicos, insecticidas, pegamentos, pinturas, disolventes y barnices. En general las utilizacio-

nes del maíz pueden ser agrupadas de la siguiente forma: 78% alimentación animal; 10,1% edulcorantes; 6,4% alcohol; 3,1% almidón y 2,4% productos alimenticios para consumo humano (<http://www.syngentaseeds.es>, verificado en octubre de 2003).

#### *Mal de Río Cuarto*

Entre las adversidades de origen biótico que afectan al cultivo de maíz en la República Argentina se encuentra la virosis denominada Mal de Río Cuarto (MRC). Esta es la enfermedad con mayor potencial de impacto sobre los rendimientos en la zona maicera pampeana constituyendo la principal patología del maíz en nuestro país. En un comienzo estuvo circunscripta sólo al área endémica en la zona sur de la provincia de Córdoba (Fig. 1). Posteriormente se manifestó en otras zonas del centro Norte de Córdoba, Noreste de San Luis, cinturón maicero, Sudoeste de Buenos Aires, Noreste de La Pampa y también en Salta, Jujuy, Norte de Santa Fé y Mendoza.

La evolución del sistema productivo en el departamento Río Cuarto, Córdoba, muestra que los cambios ocurridos como resultado de la introducción de nuevas tecnologías influyeron directamente en la aparición y desarrollo del MRC. En esta área marginal para el cultivo de maíz solían sembrarse materiales genéticos de alto potencial productivo pero sin tolerancia a la enfermedad, ya que ésta se manifestaba puntualmente y con baja incidencia. Sin embargo al producirse cambios, especialmente climáticos, que alteran los factores involucrados en el patosistema se generan condiciones favorables para la producción de epidemias (March *et al.*, 1998).

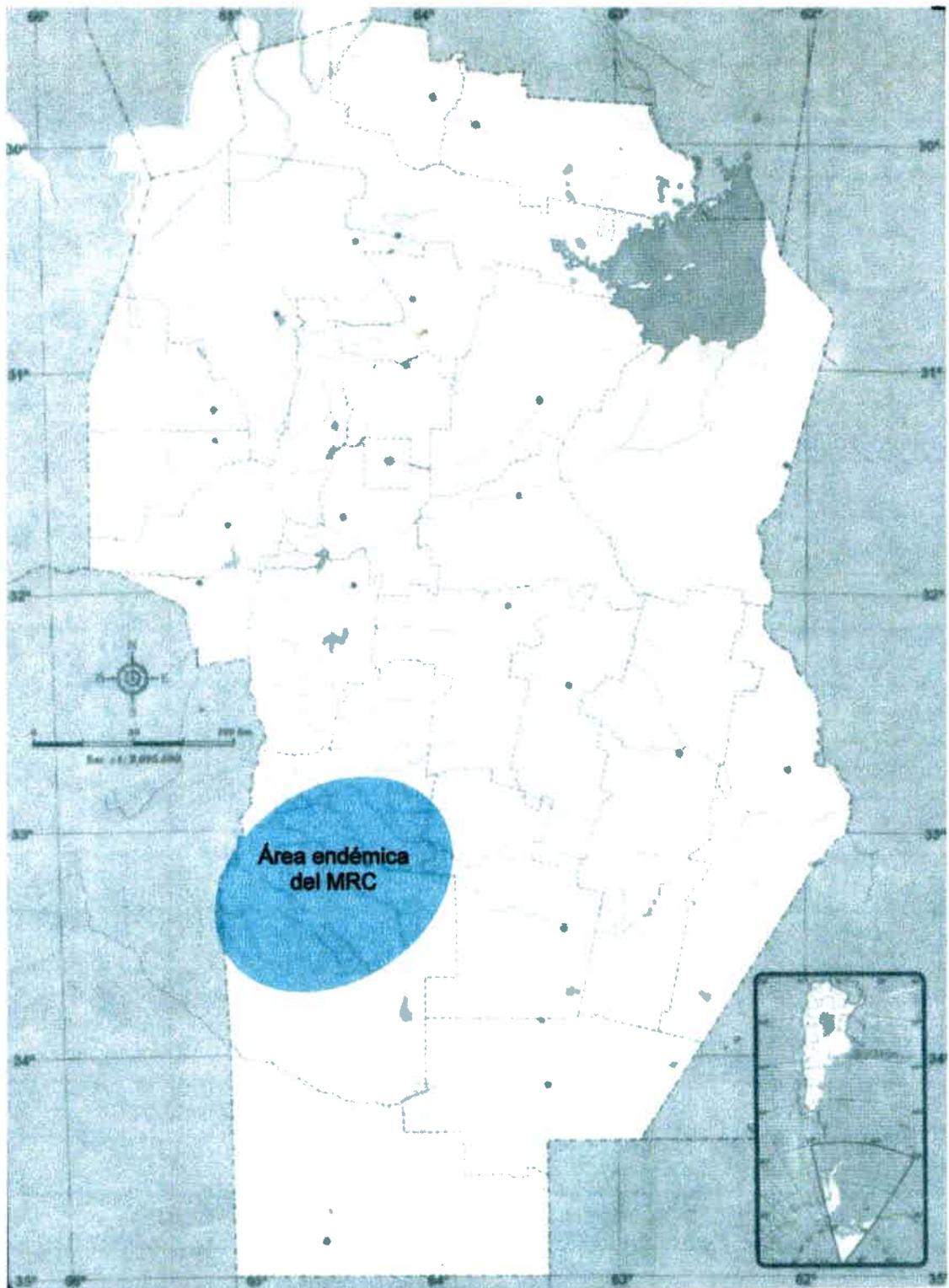


Figura 1. Área endémica de la enfermedad virósica Mal de Río Cuarto en la zona Sur de la provincia de Córdoba, Argentina.



La enfermedad fue detectada a fines de la década del '60 en cultivos ubicados en el departamento Río Cuarto, conjuntamente con la introducción de los primeros híbridos comerciales de maíz. La incidencia de la enfermedad en el área endémica ha sido variable y sólo algunos años alcanzó niveles de epidemia (March *et al.*, 1992; 1993). La primera epifitía severa ocurrió en el ciclo agrícola 1976/77. En 1996/97 la enfermedad se presentó nuevamente en forma aún más severa afectando 300.000 ha ubicadas en distintas zonas de la provincia de Buenos Aires, sur de Santa Fé, Entre Ríos y este-sudeste de Córdoba, causando daños en cultivares susceptibles que ocasionaron pérdidas de rendimiento de hasta el 70%. Si bien la enfermedad ocurre principalmente en el departamento Río Cuarto siendo las áreas rurales de Chaján, Sampacho y Suco las más afectadas (March *et al.*, 1995), en esta oportunidad fue estimada una importante disminución de la producción debida a la amplia zona afectada y a la incidencia sobre los rendimientos, lo que implicó una pérdida económica para nuestro país de aproximadamente 120 millones de dólares (Lenardón *et al.*, 1998).

Los síntomas de la enfermedad se describieron detalladamente a principios de la década del '80, y mediante microscopía electrónica se estableció como agente causal a un *Reovirus* del género *Fijivirus* (Bradfute *et al.*, 1981; Nome *et al.*, 1981). Luego Milne *et al.*, (1983) lo asociaron con el *Maize rough dwarf virus* (MRDV) por la analogía de los síntomas y el patrón electroforético de sus ácidos nucleicos. Finalmente se estableció que el virus del MRC pertenece a la familia *Reoviridae*, género *Fijivirus* (Uyeda y Milne, 1995) y se indicó que no estaría relacionado con el MRDV como se había señalado inicialmente (Marzachi *et al.*, 1995).

Las gramíneas silvestres (Nome *et al.*, 1983; Marinelli *et al.*, 1988) y algunas especies cultivadas como sorgo (Giorda *et al.*, 1993), trigo, avena (Ornaghi *et al.*, 1993; Arneodo *et al.*, 2002), triticale y cebada (Laguna *et al.*, 1991) son reservorios del principal insecto vector, *Delphacodes kuscheli* Fennah (Homóptera: *Delphacidae*), conocido como chicharrita. La transmisión del virus

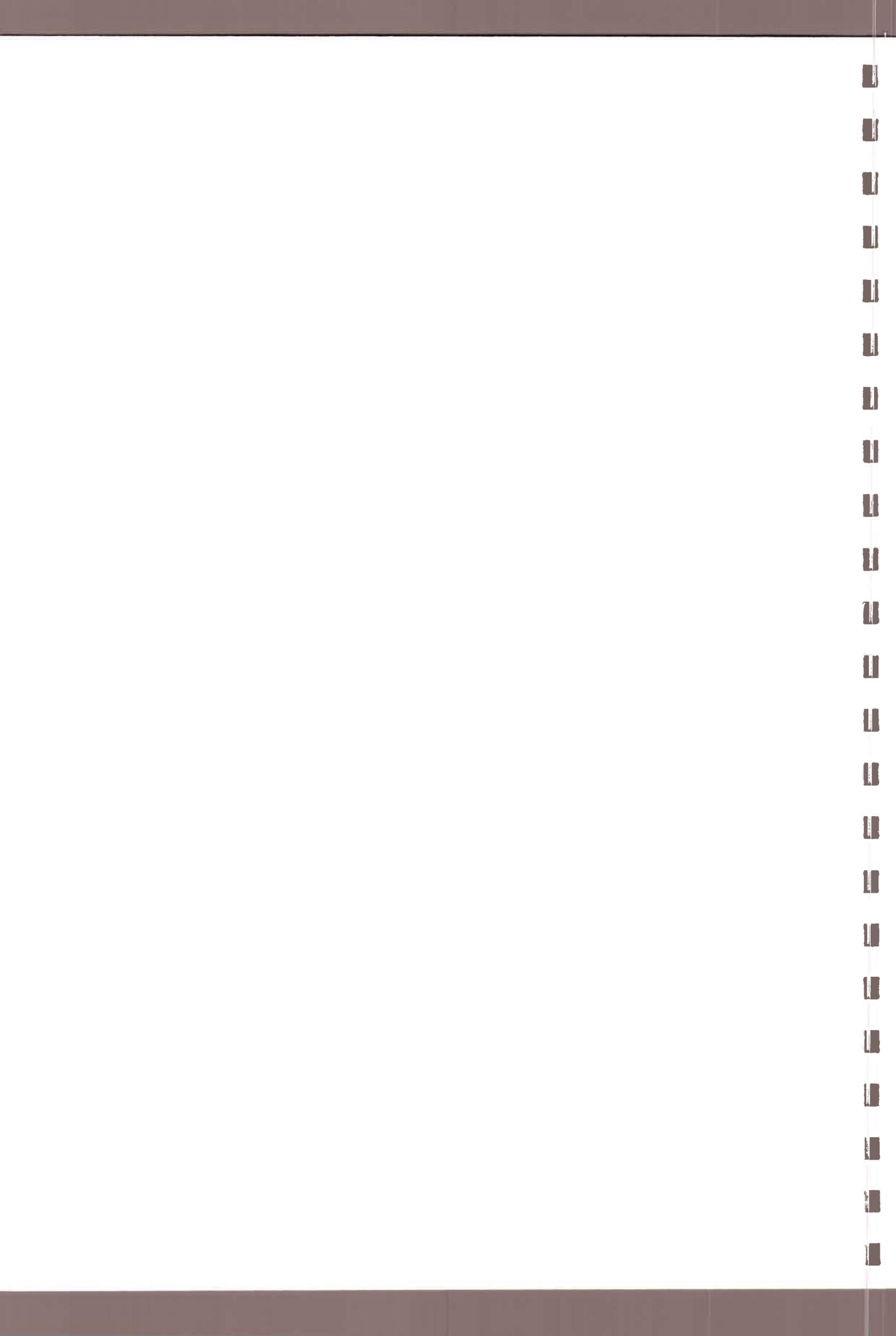
al maíz se realiza en forma persistente-propagativa, es decir que el virus se multiplica en el insecto vector (Remes Lenicov *et al.*, 1985; Lenardón *et al.*, 1985; Ornaghi *et al.*, 1993). Esta relación, común en los reovirus y sus vectores, es de gran interés epidemiológico pues el vector del virus es un reservorio natural del mismo y por lo tanto la población de macrópteros migrantes constituye el potencial inóculo que definirá las epidemias del MRC.

Cuando el insecto vector utiliza a malezas y a cultivos como sitios de oviposición y cría, éstas también resultan infectadas con el virus del MRC, adquiriendo la enfermedad y manifestando síntomas similares a los del maíz (March *et al.*, 1998). Cuando las malezas y gramíneas cultivadas invernales, reservorios naturales del virus por ser hospedantes del principal insecto vector, comienzan su senescencia, las chicharritas migran a los cultivos próximos de maíz (Ornaghi *et al.*, 1993). La densidad poblacional del insecto se incrementa sobre los verdeos invernales en función de las condiciones climáticas (temperaturas y precipitaciones) y del desarrollo de estos cultivos. Es así, que inviernos benignos seguidos por primaveras templadas y húmedas favorecen el desarrollo de verdeos y por ello el incremento de la densidad poblacional del insecto desde principios del mes de agosto. En cambio, inviernos severos y condiciones desfavorables para el desarrollo de los verdeos determinan que el incremento de la población del insecto no ocurra hasta mediados del mes de septiembre. Las poblaciones del insecto están constituidas por formas braquípteras, abundantes cuando las condiciones ambientales son estables al comienzo del período de crecimiento de las poblaciones, y por formas macrópteras, adaptadas a ambientes inestables con capacidad de desplazarse a los cultivos de maíz recién implantados (Ornaghi *et al.*, 1999).

Cuando la infección ocurre en estado de coleoptile, las plantas de maíz afectadas no superan los 30 cm de altura. Además como resultado de las modificaciones en los niveles de giberelinas endógenas de la planta se presentan otros síntomas tales como tallos achatados con entrenudos cortos, hojas del tercio superior reducidas a la vaina foliar, panojas atrofiadas y mazorcas múlti-



ples y sin granos (Abdala *et al.*, 1997; Vigliocco *et al.*, 1997) (Fig. 2 y 3). Además, en la mayoría de las plantas afectadas se forman enaciones, o verrugas, en el envés de las hojas sobre las nervaduras. Las enaciones pueden estar presentes también en vainas, brácteas y eventualmente en el tallo. La variabilidad en los síntomas causados por esta virosis depende del estado fenológico de la planta al adquirir el virus, del genotipo y de las condiciones ambientales en las que se desarrolla el cultivo. En general cuanto mayor desarrollo tiene la planta al momento de la infección, los síntomas son más leves y en consecuencia menores los daños causados (March *et al.*, 1998). Severas pérdidas ocurren cuando coincidentemente existen abundantes reservorios del virus, alta densidad del insecto vector y están presentes variedades o genotipos susceptibles en estados fenológicos juveniles (Harpaz, 1972; Conti, 1976 a, b, 1984).





(1)



(2)



(3)



(4)

**Figura 2. Síntomas observados en plantas de maíz afectadas por la virosis Mal de Río Cuarto (enaciones (1 y 2), acortamiento de entrenudos, afección de panoja (3 y 4)).**



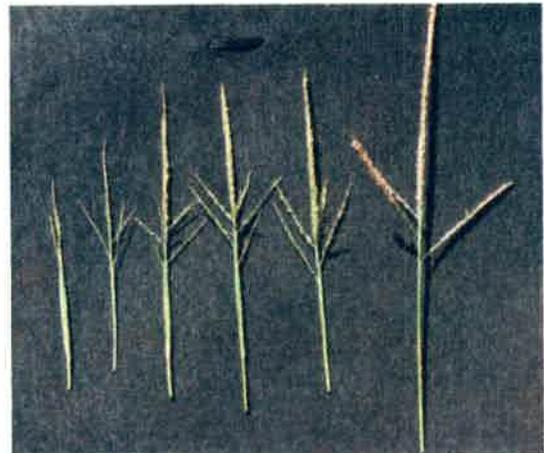
(1)



(2)



(3)



(4)

**Figura 3. Síntomas observados en plantas de maíz afectadas por la virosis Mal de Río Cuarto (deformación de hojas (1 y 2) y espigas (3), afección de panojas (4), acortamiento de entrenudos (1 y 2)).**



### *Tolerancia al MRC y forma de herencia del carácter*

Para reducir la incidencia de la enfermedad, en el área endémica se recurre a la siembra en fechas tempranas y al control del insecto vector con agroquímicos. El tratamiento químico con insecticidas sistémicos proporciona un efectivo control del vector y favorece el incremento de los rendimientos del cultivo de maíz (March *et al.*, 2002). La fecha de siembra se determina mediante el monitoreo de la población del insecto vector y de las condiciones climáticas. A partir de los sistemas de pronósticos de presiembra, basados en variables climáticas y durante la siembra, basados en la dinámica poblacional del insecto *D. kuscheli* en el cultivo de avena, se ha diseñado una estrategia de manejo integrado del MRC para el área endémica de la enfermedad (March *et al.*, 1999). Sin embargo el modo más eficaz de controlar enfermedades producidas por patógenos biotróficos, como los virus, en cultivos extensivos es por medio de la utilización de resistencia genética. Algunos autores sugieren que la tolerancia a este virus se comporta como un carácter cuantitativo controlado por efectos genéticos aditivos y epistáticos (Presello 1993; Presello *et al.*, 1995). Eyherabide (1991) propuso estudiar la forma de herencia de la resistencia genética al MRC y señaló que mediante el uso de marcadores moleculares es posible establecer con precisión el número de factores genéticos involucrados en la tolerancia. Di Renzo *et al.* (2002) sugieren que la expresión del carácter tolerancia al MRC está controlada por efectos genéticos de tipo no aditivos.

El mejoramiento de caracteres como la tolerancia a una enfermedad requiere de bastante tiempo además de ser una tarea compleja y de elevado costo. Si bien no han sido identificados genotipos de maíz completamente resistentes a MRC, algunos han mostrado una tolerancia a la enfermedad. Un objetivo común a distintos programas de mejoramiento de maíz está relacionado con la tolerancia al MRC, pero el escaso conocimiento sobre la herencia del carácter ha limitado el desarrollo de estrategias adecuadas y eficientes. Muchos caracteres morfológicos y reproductivos en maíz, particularmente los de



importancia económica, han sido clasificados como poligénicos o cuantitativos. La resistencia a enfermedades es considerada frecuentemente como un carácter de herencia simple, sin embargo, por la expresión del carácter éste puede ser analizado como semicuantitativo y oligogénico (Stuber, 1995). La heredabilidad estimada para un carácter debe estar referida al ambiente donde se realizan las mediciones (Falconer y Mackay, 1996), ya que dependen de los valores fenotípicos del mismo y éstos son influenciados por el tipo de acción genética, por las frecuencias genéticas, por los efectos ambientales y por la interacción genotipo-ambiente. Di Renzo *et al.* (2002) estimaron un valor moderado de heredabilidad entre 0,44 y 0,56 para el carácter tolerancia al MRC, según la evaluación realizada en tres ambientes del área endémica de la enfermedad.

#### *Marcadores genéticos*

La incorporación de la tolerancia genética al MRC en híbridos comerciales por medio de mejoramiento convencional, puede ser complementada mediante el uso de técnicas de biología molecular basadas en marcadores moleculares. Este tipo de marcadores es de gran utilidad en programas de mejoramiento genético por presentar importantes ventajas sobre los marcadores morfológicos y bioquímicos. Los marcadores moleculares fueron y son usados ampliamente en construcción de mapas genéticos, introducción de caracteres, selección asistida, identificación de genes, protección de variedades, certificación de pureza genética, etc. La combinación de métodos de mejora clásicos con nuevas técnicas moleculares de análisis, brinda una perspectiva interesante para ampliar el conocimiento sobre las bases genéticas de la tolerancia al MRC y hacer más eficientes los programas de mejoramiento. Si bien estas nuevas técnicas moleculares no son una solución definitiva en cuanto a estrategias de análisis genético, constituye un componente importante en el continuo proceso de generación de información y conocimiento (Ferreira y Grattapaglia, 1995).

Cabe recordar que la información genética heredable de cada organismo está codificada por el ADN o ácido desoxirribonucleico, polímero lineal formado por cientos, miles o millones de nucleótidos ligados por uniones fosfodiéster. Un nucleótido está formado por una base nitrogenada que puede ser púrica (A-G) ó pirimidica (C-T), un azúcar y un grupo fosfato. La expresión de los genes resulta en la síntesis de dos tipos de proteínas, proteínas estructurales y proteínas con actividad enzimática, estas últimas esenciales en la síntesis de metabolitos celulares. La producción organizada de proteínas y metabolitos resulta finalmente en las propiedades específicas de cada organismo. Por lo tanto diferencias determinadas genéticamente entre individuos de una misma especie reflejan cambios en la secuencia de nucleótidos en el ADN. Estos cambios son debidos a distintos tipos de mutaciones, entre ellas sustitución de bases, inserciones, inversiones, deleciones. Las sustituciones de bases pueden ser causadas por errores durante la replicación del ADN o por mutágenos ambientales (por ejemplo la radiación UV). Las inserciones y deleciones son frecuentemente causadas por trasposones, retrotrasposones o por deslizamiento durante la replicación del ADN altamente repetitivo.

Por otra parte se sabe que en las especies superiores las regiones codificantes del ADN son una porción muy pequeña comparada con el contenido total. Esto hace que la mayoría de las modificaciones que diferencian a los individuos a nivel del ADN, ocurran en la porción no codificante del mismo. Las técnicas empleadas actualmente en biología molecular permiten estudiar las variaciones en el ADN aún en las zonas más variables y no codificantes del genoma. Los marcadores moleculares constituyen una importante herramienta biotecnológica para estudiar la variabilidad del ADN en forma directa o indirecta. Un marcador molecular podría ser definido como todo fenotipo molecular visible, resultante de la expresión de la constitución genética de un individuo. Entre las ventajas que presentan los marcadores moleculares respecto a los marcadores morfológicos y bioquímicos es importante mencionar el elevado nivel de polimorfismo que permite la construcción de mapas genéticos a partir de pocos cruzamientos segregantes. En general son codominantes por lo que



dan mayor información por *locus* y de efecto fenotípico neutro con bajos o nulos efectos epistáticos o pleiotrópicos. Además, los marcadores moleculares pueden ser identificados en etapas juveniles, su número es potencialmente ilimitado y no dependen del ambiente o del estado fisiológico de la planta.

En la actualidad son de amplia difusión diferentes marcadores moleculares que desde el punto de vista técnico pueden ser clasificados en dos grupos, marcadores moleculares de proteínas y marcadores moleculares de ADN. Entre los primeros están las proteínas totales y de reserva y las isoenzimas. Entre los marcadores de ADN podemos mencionar a los que están basados en restricción, o corte con enzimas, e hibridación del ADN como los RFLP (polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción) y los VNTR o minisatélites (número variable de secuencias repetidas en tándem), a los que están basados en productos de reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) como los RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar) y los SSR o microsatélites (secuencias simples repetidas) y a los que están basados en restricción y amplificación como los AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados).

La técnica de PCR, que utiliza la enzima *Taq* ADN polimerasa de la bacteria *Thermus aquaticus*, es una herramienta de extrema utilidad en biología molecular concebida por Kary Mullis a mediados de la década del '80 (Mullis y Faloona, 1987; Saiki *et al.*, 1985), quién por ello fue galardonado con el premio Nobel de medicina a principios de la década del '90. La sensibilidad y simplicidad hacen de esta técnica una poderosa herramienta en estudios genéticos de secuenciación y de análisis de polimorfismos del ADN. La técnica de PCR se fundamenta en los mecanismos de replicación del ácido desoxirribonucleico e involucra la síntesis *in vitro* de millones de copias de un segmento específico de éste, lo que permite su posterior detección en geles. La técnica de PCR consta de tres etapas que consisten, la primera en la desnaturalización de la cadena de ADN, la segunda en la hibridación de los iniciadores o cebadores (oligonucleótidos de ADN de cadena simple) cuya secuencia es complementa-

ria con parte de la molécula de ADN desnaturalizada y la tercera en la síntesis del segmento de ADN que se encuentra flanqueado por los iniciadores.

Experimentos realizados a comienzos de la década del 80' mostraron que los genomas eucariotas presentan diferentes clases de secuencias repetidas y un tipo de éstas son los SSR denominados más tarde microsatélites (Litt y Luty, 1989; Morgante y Olivieri, 1993). Los microsatélites son una clase relativamente nueva de marcadores de ADN que consisten en secuencias de 1 a 5 pares de bases repetidas en tándem, están ampliamente distribuidas en los genomas eucarióticos, son altamente variables y se heredan en forma estable siguiendo las leyes de Mendel. Las regiones que contienen las secuencias simples repetidas son amplificadas mediante PCR utilizando un juego de iniciadores. Estos iniciadores tienen una secuencia de bases complementaria, y altamente conservada, a la del ADN flanqueante del microsatélite. Los productos de amplificación consisten en segmentos de diferente longitud, que constituyen la expresión del polimorfismo resultante de la variación en el número de elementos simples repetidos. Los polimorfismos ocurren debido a la presencia de distintos alelos pertenecientes a un mismo *locus* genético altamente variable. Cada uno de los *loci* de microsatélites es analizado en forma individual al usarse iniciadores específicos para cada uno de ellos.

Cabe destacar que, independientemente del tipo de repetición, los microsatélites son altamente variables, permitiendo la existencia de gran cantidad de alelos (multialélicos) y por ello un alto contenido informativo ("PIC", Polymorphism Information Content). Se ha logrado obtener polimorfismos aún sobre especies caracterizadas por la falta de variabilidad a través de otras técnicas (Powell *et al.*, 1996). Debido a estas características cualquier población segregante puede ser utilizada para mapeo genético, siempre que los microsatélites estén desarrollados para la especie. En maíz han sido mapeados alrededor de 2000 microsatélites y la secuencia de los iniciadores necesarios para su amplificación a través de PCR es de disponibilidad pública (GENBANK Database, Maize Cooperation Stock Center, Missouri University). Los productos



de amplificación por PCR pueden ser separados por electroforesis en geles de agarosa o de poliacrilamida. La visualización en geles de agarosa se realiza a través de coloración con bromuro de etidio y luz UV, mientras que en geles de poliacrilamida se realiza mediante tinción con nitrato de plata o a través de radiografía cuando se utilizan iniciadores marcados con radioisótopos.

#### *Locí de caracteres cuantitativos (QTL)*

En una población los individuos pueden presentar caracteres de interés agronómico de variación tanto discreta como continua. Dado que el ambiente no tiene efecto en la manifestación fenotípica de los marcadores moleculares, estos caracteres cualitativos de variación discontinua, además de estar regidos por uno o por pocos genes, permiten clasificar a los individuos sin ambigüedades. Sin embargo, la mayoría de los caracteres de interés agronómicos son cuantitativos, siendo los fenotipos determinados por poligenes u oligogenes así como por las condiciones ambientales. En este caso los individuos son difíciles de clasificar en categorías discretas y para su análisis deben emplearse métodos biométricos que miden el efecto de todo el genotipo en lugar del efecto de genes individuales o de segmentos cromosómicos específicos (Falconer y MacKay, 1996). Por ello, mejoradores tradicionales y genetistas moleculares consensuaron sobre la conveniencia del uso de marcadores moleculares para asistir a la selección de caracteres cuantitativos (MAS, Marker Assisted Selection),

Por otra parte, algunos caracteres agronómicos son de baja a moderada heredabilidad y su evaluación requiere de ensayos a campo durante varios años. El problema de la baja heredabilidad se puede superar mediante selección indirecta, es decir que la apreciación del carácter primario se hace a través de un carácter secundario de mayor heredabilidad (Gallais, 1990). Los caracteres cualitativos que en general son de alta heredabilidad, resultan ideales cuando están asociados con caracteres cuantitativos. En el caso del MRC, la realización de infecciones artificiales en gran cantidad de material es una tarea



laboriosa, por lo que el proceso de selección está relacionado con la infección natural a campo. Con este tipo de infección, altamente dependiente de los distintos factores que inciden en el desarrollo de la enfermedad, no todos los años se observan síntomas suficientemente severos como para realizar una selección certera. La identificación de marcadores moleculares asociados con la expresión de la tolerancia al MRC podría ayudar a superar este inconveniente.

Si miramos hacia el pasado, la genética de las plantas como ciencia se remonta a la época de Mendel. Desde esos tiempos los investigadores han realizado un enorme esfuerzo en identificar, catalogar y mapear marcadores de genes simples en las plantas superiores. Los mapas genéticos de las plantas cultivadas fueron los primeros en ser desarrollados. Hasta hace poco tiempo los marcadores genéticos para construir esos mapas eran aquellos que afectaban características morfológicas, incluyendo genes de enanismo, albinismo, alteración de la morfología de las hojas, etc. Muchos son los científicos que han elaborado teorías sobre el uso de los mapas genéticos y los marcadores para acelerar el proceso de mejoramiento de plantas y animales y existen referencias de hace 80 años sobre la asociación de un marcador genético de herencia simple con un carácter cuantitativo en plantas (Sax, 1923). En las últimas décadas ha surgido nuevamente un interés especial sobre estas asociaciones moleculares discretas debido a que estudios realizados en tomate y maíz mostraron cómo algunos marcadores explicaban una sustancial proporción de la varianza fenotípica de caracteres complejos (Tanskley, 1993). En 1923 Sax propuso la utilización de marcadores genéticos de "genes mayores" para localizar segmentos cromosómicos ligados a caracteres de valor agronómico codificados por "genes menores" o de herencia cuantitativa. Dicho investigador observó la segregación para tamaño de semilla asociada con la segregación para marcadores de color de la cubierta de la semilla en *Phaseolus vulgaris* L., siendo el primero en informar en plantas la asociación de un marcador genético de herencia simple con un carácter cuantitativo. Dado el escaso número de marcadores morfológicos disponibles en ese momento la tarea resultaba muy difi-



cil, y sólo en los últimos años la idea ha sido favorecida por las nuevas tecnologías, de la biología molecular, que permiten disponer de miles de marcadores.

En numerosas especies cultivadas se iniciaron importantes investigaciones en mapeo de QTL para rasgos cuantitativos tales como rendimiento, calidad, madurez, y resistencia a estrés bióticos y abióticos (Lee, 1995). Los resultados de estos estudios indican la posibilidad de incrementar la eficiencia del proceso de selección ya que permiten la identificación temprana de genotipos deseables (Melchinger, 1990). La construcción de mapas genéticos saturados con numerosos marcadores moleculares hace posible la ubicación de regiones de actividad cuantitativa en el genoma. Los marcadores moleculares son una tecnología que ha permitido a los genetistas vegetales construir mapas genéticos de alta densidad en muchas especies de interés agronómico y usar éstos para mapear y estimar los efectos de *loci* de caracteres cuantitativos o QTL (Melchinger *et al.*, 1998 a).

Por lo tanto, en los últimos años las diversas y nuevas herramientas de genética molecular aplicadas con el propósito de resolver problemas relacionados al incremento en la producción de cultivos de interés agronómico, ha resultado en la generación de mapas moleculares de ligamiento altamente saturados y en la localización de numerosos QTL de interés. La capacidad de identificar, manipular y potencialmente clonar genes individuales involucrados en caracteres de herencia cuantitativa, combinado con la demostrada existencia de numerosos bloques de genes altamente conservados entre especies, enfatiza la contribución de los análisis basados en mapas genéticos tanto a la investigación básica como a la aplicada. La tecnología de los marcadores moleculares le permitió a los genetistas vegetales construir mapas genéticos para muchas especies de interés. Estos mapas pueden ser útiles tanto para mapear y estimar los efectos de *loci* de rasgos cuantitativos, así como durante el proceso de selección y recombinación genética (Tanksley, 1993; Stuber, 1995). La tecnología permite que un carácter de variación continua pueda ser manejado de manera simple como si se tratara de un carácter de herencia mendeliana. Es

así, que los QTL representan un nuevo modo de enfocar el estudio básico y el manejo de la genética cuantitativa y de los sistemas poligénicos.

En un cruzamiento entre formas alternativas de un carácter es posible determinar marcadores asociados con el mismo. Para ello se necesita gran cantidad de marcadores moleculares distribuidos en el genoma de manera uniforme, característica que tienen los denominados microsatélites (Morgante y Olivieri, 1993). La conveniencia de los microsatélites para ser utilizados en el mejoramiento asistido mediante marcadores moleculares ha sido ampliamente reconocida por mejoradores y genetistas. La disponibilidad de marcadores cualitativos asociados a genes relacionados con caracteres agronómicos resulta de interés ya que permite además de estimar su participación en el carácter, delimitar el segmento cromosómico involucrado en la expresión del mismo ( Tanksley, 1983) (Fig. 4).



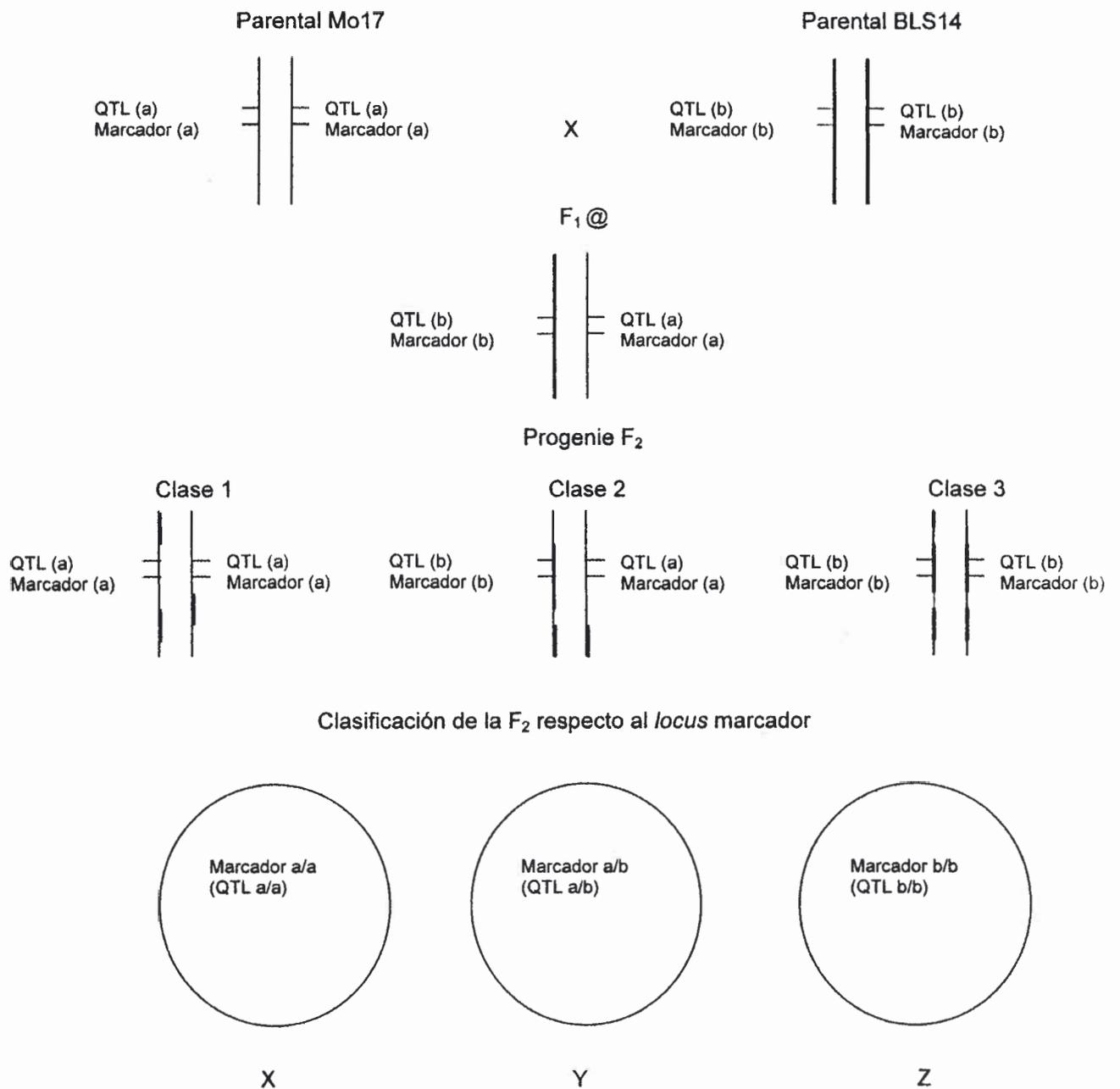


Figura 4. Detección de QTL mediante marcadores moleculares en una población F<sub>2</sub> segregante para un carácter cuantitativo. El QTL es detectado sólo si es observada una diferencia significativa entre las medias de las subgrupos X, Y y Z.

Como ya se mencionó, una forma de mapear QTL es a partir de un cruzamiento entre líneas fenotípicamente diferentes para el carácter de interés. Dado que estas líneas tienen alelos homocigotas alternativos en varios *loci*, el híbrido resulta heterocigota para estos *loci*. Al autofecundar el híbrido se origina una población segregante que muestra la máxima variación tanto genotípica como fenotípica. Esta población es caracterizada con marcadores moleculares que difieren entre las líneas parentales. Las familias  $F_3$  correspondientes son evaluadas por su comportamiento fenotípico respecto al carácter de interés y la asociación del mismo con el fenotipo molecular observado en las plantas  $F_2$  que les dieron origen, se realiza mediante la utilización de distintos métodos estadísticos (Liu, 1998).

En el mapeo de QTL una consideración importante se relaciona con el tamaño de la muestra. Muchos experimentos publicados citan la utilización de entre 100 y 200 progenies, lo cual implica un excesivo trabajo y costo requerido en la caracterización fenotípica y genotípica de una población de gran tamaño. La detección de un QTL para un carácter cuantitativo depende del tamaño de la muestra ( $N$ ) y de la heredabilidad del carácter ( $h^2$ ) (Beavis *et al.* 1994). Acorde a investigaciones teóricas de Lande y Thompson (1990), la proporción de la varianza genética aditiva explicada por el QTL detectado, está inversamente relacionada con el producto de  $h^2N$ . En consecuencia, para un carácter con moderada a baja heredabilidad, las posibilidades de detectar un QTL en una población con tamaño de muestra de alrededor de 100 individuos es baja. Con este número sólo se puede detectar un QTL de efecto mayor.

En los últimos años han sido propuestas nuevas estrategias experimentales de mapeo, que permiten reducir el número de individuos analizados con marcadores moleculares, obteniendo la misma potencia estadística en la detección de QTL. Una de estas estrategias es el "selective genotyping", propuesto por Lander y Bostein (1989), cuyo principio ya había sido descrito por Stuber *et al.* (1980). Esta estrategia se basa en el hecho de que una diferencia significativa en las frecuencias alélicas en los QTL, en los extremos alto y bajo



de una distribución fenotípica, puede ser utilizada para examinar ligamiento entre marcadores y QTL. Lander y Bostein (1989) consideraron que los fenotipos con una unidad de desvío por encima ó por debajo de la media constituyen el 33% de la población y contribuyen con el 81% de la información del ligamiento genético.

El maíz ha sido utilizado de forma efectiva como modelo en el desarrollo y evaluación de marcadores moleculares en plantas para la identificación, mapeo y manipulación de genes mayores afectando la expresión de caracteres cuantitativos (Stuber, 1992). Diversos artículos citan la identificación de marcadores moleculares asociados con genes o *loci* cuantitativos de tolerancia a enfermedades así como también con otros caracteres de interés agronómico en maíz (Schön *et al.*, 1994; Berke y Rocheford, 1995, 1999; Bohn *et al.*, 1996, 1997; Khairallah *et al.*, 1998; Melchinger *et al.*, 1998 b; Kerns *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 1999; Flint-García *et al.*, 2003). Stuber (1995) destaca un aspecto de trascendencia sobre la tecnología de los marcadores moleculares que es su utilización para realizar selección asistida y para transferir genes deseables entre líneas o genotipos mejorados.

Louie *et al.* (1991) identificaron de uno a cinco genes confiriendo tolerancia a *Maize dwarf mosaic virus* (MDMV) en maíz. Por otra parte un gen mayor de tolerancia a MDMV fue mapeado en el brazo corto del cromosoma 6 (McMullen y Louie, 1989). Pernet *et al.* (1999) mapearon regiones que proporcionan resistencia a *Maize streak mosaic virus* (MSMV) en el cromosoma 1, 2, 3 y 10. Otros estudios revelan la presencia de tres genes, ubicados en los cromosomas 6, 3 y 10, involucrados en la tolerancia a *Wheat streak mosaic virus* (WSMV) en maíz (McMullen y Louie, 1991; McMullen *et al.*, 1994). También McMullen y Simcox (1995) reportan la posición de varios QTL para tolerancia a enfermedades e insectos informados en la literatura. En el INTA de Castelar se está trabajando en el mapeo de QTL para MRC con poblaciones segregantes provenientes de otros cruzamientos (Pacheco *et al.*, 2003). Hasta el momento, en la bibliografía, no se mencionan trabajos en maíz relacionados con la identi-

ficación de marcadores moleculares ligados a genes de tolerancia la enfermedad MRC.

La identificación de marcadores moleculares de microsatélites asociados a genes de tolerancia al MRC permitirá ampliar los conocimientos sobre sus bases genéticas y determinar los factores involucrados en la tolerancia así como su participación en la expresión del carácter. Estos estudios serán de gran utilidad en programas de mejoramiento de maíz por permitir la incorporación del carácter tolerancia al MRC en germoplasma de interés agronómico de comportamiento susceptible. El uso de genotipos tolerantes, en este caso de maíz a la enfermedad MRC, es el método de control más económico y sustentable de ser utilizado en el cultivo extensivo de este cereal de importancia agrícola para nuestro país.

#### *Análisis discriminante*

El análisis multivariado comprende procedimientos y técnicas para el resumen, presentación y análisis de observaciones multidimensionales de caracteres cuali y cuantitativos realizadas sobre un número importante de genotipos. Las variables son consideradas en forma simultánea por lo que este análisis permite realizar interpretaciones diferentes a las que surgen mediante la utilización de métodos univariados (Johnson y Wichern, 1998). Cuando los genotipos se agrupan en dos o más clases definidas antes de realizar el análisis, es importante describir según un conjunto de variables las diferencias entre clases e identificar las variables con mayor potencial para discriminar si un nuevo individuo tiene más posibilidades de pertenecer a uno u otro de los grupos definidos previamente. El análisis discriminante (AD) se basa en el tratamiento de situaciones multigrupales para dar respuesta a los cuestionamientos antes establecidos. El AD lineal se basa en encontrar combinaciones lineales entre variables con una habilidad máxima de discriminar grupos de individuos. Estas combinaciones (función discriminante lineal) permiten identificar el grupo al cual pueden ser asignados nuevos individuos (genotipos) y además posibilita identificar cuál



o cuáles de las variables independientes (marcadores) contribuye más a la diferenciación entre grupos. Cuando las variables independientes son discretas, como es el caso de observaciones de marcadores moleculares, diversas metodologías relacionadas al análisis discriminante discreto pueden ser implementadas. Capdevielle *et al.* (2001) informaron sobre esta técnica de análisis multivariado para clasificar líneas de arroz en grupos predefinidos.

### *Hipótesis*

La variabilidad fenotípica existente para el carácter tolerancia al MRC, en diferentes genotipos de maíz hace suponer la presencia de regiones en el genoma involucradas en la expresión del carácter mencionado.

### *Objetivos*

Los objetivos de este trabajo fueron: I) estimar la heredabilidad en sentido amplio del carácter tolerancia al MRC, II) identificar marcadores moleculares de microsatélites asociados con segmentos cromosómicos (QTL) involucrados en la tolerancia al MRC y III) identificar marcadores moleculares con capacidad discriminante para la clasificación de familias en grupos susceptibles y tolerantes al MRC.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Materiales*

La identificación de segmentos cromosómicos asociados con caracteres de interés agronómicos en maíz, constituye una de las líneas de trabajo del Instituto de Genética del INTA Castelar y de la UNRC. Distintos materiales fueron probados en la zona endémica de la enfermedad virósica Mal de Río Cuarto durante la fecha de siembra crítica según el servicio de alarma de la Facultad de Agronomía y Veterinaria de la UNRC. Esto permitió identificar materiales tolerantes y obtener generaciones  $F_2$  y  $F_3$  del cruzamiento entre líneas susceptibles y líneas tolerantes al MRC. En este estudio se trabajó con un cruzamiento entre Mo17, línea pública dentada susceptible y BLS14, línea flint parcialmente tolerante registrada por el Instituto de Genética en el INASE (Salerno, 1995).

Para asociar los marcadores moleculares y la reacción frente a la enfermedad MRC se usaron las generaciones  $F_2$  y  $F_3$ , respectivamente. Para obtener las familias  $F_3$  se sembró y autofecundó la  $F_2$  en una zona no endémica (Castelar, Bs. As., 30° 40' S; 58° 39' O; 22 msnm; 1056 mm de precipitación anual), para no someter las plantas madres a selección. La  $F_2$  proviene de tres plantas  $F_1$  y se registró su genealogía. Al usar familias  $F_3$  para registrar los síntomas del MRC fue posible hacer repeticiones y así reducir el riesgo de errores de clasificación por escape a la inoculación.

### *Experimento de campo*

Las 227 familias  $F_3$  fueron evaluadas a campo en un DBCA con dos repeticiones en dos localidades del área endémica durante el año 1999, y en una localidad durante los años 2000 y 2001. Cada familia estuvo representada por un surco de 3,0 m de longitud, con un espacio de 0,15 m entre plantas y 0,7 m entre surcos. Las localidades ubicadas en el área endémica de la enfermedad dentro de la región semiárida central de la República Argentina fueron Bulnes

1999 (BU99) (33° 30' S; 64° 41' O; 433 msnm; 671 mm de precipitación anual) y Sampacho 1999, 2000 y 2001 (SA99, SA00 y SA01) (33° 19' S, 64° 42' O; 510 msnm, 676 mm de precipitación anual). La infección fue realizada bajo condiciones naturales, es decir a partir de poblaciones no experimentales de delfácidos. Cada una de las cuatro combinaciones localidad-año fue considerada como un ambiente diferente. Las líneas parentales fueron incluidas en los distintos ambientes, excepto en BU99.

En el ciclo agrícola 1999/2000 las fechas de siembra fueron el 15/11/1999 en la localidad de BU99 y el 07/12/1999 en la localidad de SA99. A los 60-70 días de la siembra, inicio de floración masculina, se evaluó el comportamiento fenotípico frente a la virosis de las familias F<sub>3</sub>. Los caracteres evaluados a campo en las familias F<sub>3</sub> fueron altura de planta, tipo de panoja, acortamiento de entrenudos, hojas del tercio superior en cuanto a tamaño, superficie, escotaduras y presencia de enaciones. A los 80-90 días de la siembra, sobre las mismas plantas, se registró el dato de espigas teniendo en cuenta si se presentaban curvas, múltiples así como el estado de granado. En los ciclos agrícolas 2000/2001 y 2001/2002 las fechas de siembra fueron el 07/12/2000 y el 06/12/2001, sólo en la localidad de Sampacho. La evaluación del comportamiento fenotípico frente a la virosis se realizó con el mismo criterio utilizado el primer año. En SA99 y SA00 los ensayos fueron establecidos en un lote cuyo cultivo antecesor invernal fue avena. En los otros dos ensayos, BU99 y SA01, el cultivo invernal de avena estuvo en lotes próximos al ensayo.

Las plantas enfermas pueden presentar gran diversidad de síntomas para un mismo nivel de incidencia (% de plantas enfermas, independientemente de la severidad de los síntomas) y ser caracterizadas según grados de severidad según la escala de Ornaghi *et al.* (1999). La escala consta de cuatro grados, grado 0: planta asintomática; grado 1: síntomas leves (presencia de enaciones); grado 2: síntomas severos (enaciones y espiga curva) y grado 3: síntomas muy severos (enaciones, enanismo, espigas pequeñas, a veces numerosas y sin granos). La tolerancia de las familias F<sub>3</sub> fue estimada mediante un

índice de severidad de enfermedad (ISE) calculado según Grau *et al.* (1982), que puede tomar valores de 0 a 100, siendo éste último valor el correspondiente a familias severamente afectadas por la enfermedad:

$$ISE = \sum_{i=0}^3 \left( \frac{\text{grado}_i \times \text{n}^\circ \text{ de plantas en el grado}_i}{\text{n}^\circ \text{ total de plantas} \times 3} \right) \times 100$$

Otros caracteres observados y no considerados en el ISE fueron altura de planta, tipo de panoja y superficie, borde y longitud de hoja. La altura de planta fue medida en cm como la distancia entre el nivel del suelo y el extremo distal de la panoja o flor masculina. Los otros caracteres fueron evaluados visualmente: tipo de panoja (de normal a deformada y totalmente estéril); superficie de hoja (normal vs. con pliegues); borde de hoja (normal vs. con escotaduras) y longitud de hoja (de normal a completamente acortada).

#### *Marcadores genéticos*

La extracción de ADN de las plantas pertenecientes a la generación F<sub>2</sub> fue realizada en Castelar. La cosecha de hojas se realizó en la etapa de floración a principios de enero del año 1999 en las primeras horas del día, para evitar exceso de metabolitos. La extracción del ADN se realizó con una parte del tejido fresco, el resto fue liofilizado, según el método propuesto por Saghai-Marooft *et al.*, (1984).



#### Extracción del ADN genómico:

1. El tejido fresco (hoja más joven) se mantuvo en nitrógeno líquido o por razones de tiempo, refrigerado a  $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$  hasta el momento de realizar la extracción del ADN. Para ello se maceró el material en mortero de porcelana enfriado con nitrógeno líquido. Se colocó 300 a 400 mg de tejido macerado en un tubo de polipropileno de 15 ml para centrifugación.

2. A los 300 a 400 mg de tejido macerado en nitrógeno líquido, se les agregó 9 ml de solución amortiguadora CTAB para extracción, a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$  (Anexo 1). El tejido se distribuyó sobre las paredes laterales del tubo antes de agregar la solución amortiguadora. Se agregó 120  $\mu\text{l}$  de 2-mercaptoetanol más una punta de espátula de PVP. Se mezcló invirtiendo los tubos con suavidad durante 10 min.

3. Se incubaron los tubos agitando con suavidad durante 60 a 90 min en un horno, o en baño térmico a  $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

4. Luego de 5 min de retirados los tubos del horno se agregaron 4,5 ml de cloroformo/octanol (24:1). Se agitaron suavemente los tubos durante 10 min para mezclar.

5. Se centrifugó durante 15 min a 1.300-1.500 rpm y  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .

Nota: a menos de  $15\text{ }^{\circ}\text{C}$ , el complejo CTAB/ácido nucleico puede precipitar, arruinando la preparación.

6. Se trasvasó la capa acuosa superior a otros tubos de 15 ml. Se agregó 4,5 ml de cloroformo/octanol y se agitaron suavemente durante 10 min.

7. Se centrifugó durante 15 min a 1.300-1.500 rpm y  $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ .



8. Con una pipeta, se trasvasó la capa acuosa superior a otros tubos de 15 ml y se agregó 15  $\mu$ l de ARNasa de 10 mg/ml. Luego se mezclaron con suavidad los tubos e incubaron 60 min a 37 °C.

9. Se agregó 6 ml de isopropanol (2-propanol) frío, invirtiendo con suavidad los tubos hasta lograr la formación de la medusa de ADN.

10. Se dejaron los tubos 24 hs a 4 °C para favorecer la precipitación, y luego se centrifugaron durante 5 min a 1.500 rpm y 10 °C. Una vez precipitado el ADN en el fondo del tubo, se descartó el sobrenadante y se comenzó con los lavados (Anexo 2). Lavado 1 (1 ml, 20 min); lavado 2 (1 ml, 30 s); lavado 3 (1 ml, 20 min). Entre los lavados 1 y 2 el ADN se trasvasó a un microtubo (Eppendorf) de 1,5 ml y se centrifugó brevemente (20 s).

11. Luego del lavado 3 el ADN se dejó secar en el flujo laminar, y fue resuspendido en 400  $\mu$ l de buffer TE (Anexo 3).

Antes de cuantificar el ADN extraído, fue rehidratado con buffer TE durante 24 hs a 10 °C y luego los stocks de ADN se colocaron 5 min a 65 °C para su resuspensión homogénea.

#### Liofilización:

Una parte del material vegetal cosechado en bolsas de tejido plástico, que permite una deshidratación rápida y homogénea, fue sumergido en nitrógeno líquido y colocado a -40 °C y  $130 \times 10^{-3}$  bar durante cinco días en un liofilizador LABCONCO. Una vez liofilizado, el tejido se colocó en bolsas de papel en un recipiente de cierre hermético con sílica gel a temperatura ambiente. Se guardó tejido liofilizado de cada planta F<sub>2</sub> por eventuales problemas con los stocks de ADN.



#### Cuantificación:

La cantidad y calidad de ADN obtenido de la extracción, se evaluó en geles de agarosa (BIO-RAD) al 0,8% p/v disuelta en buffer TBE 1X (Anexo 4) (Maniatis *et al.*, 1982), con el agregado de 1,5 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) cada 100 ml de buffer. Previamente a los stocks de ADN se les agregó 400 µl de buffer TE, llevando a 800 µl el volumen final de los mismos, se dejaron durante 24 hs a 10 °C y luego se colocaron durante 15 min a 65 °C para una resuspensión homogénea. El ADN se sembró por inmersión en un volumen final de 10 µl, con buffer de carga 5X (Anexo 5). Se utilizó un marcador de peso molecular 1 Kb (Gibco BRL) cuya banda de 1600 pb es cuantificable (100 ng/µl). La corrida electroforética se realizó con buffer de electrodos TBE 0,5X (Anexo 4) manteniendo 60 V constantes durante 60 min aproximadamente. Terminada la electroforesis, el gel fue expuesto en un transiluminador UV y fotografiado (Kodak Digital Science DC260) para su documentación final.

Luego de evaluar la cantidad y calidad de ADN los stocks fueron fraccionados y 450 µl se colocaron en tubos sellados con parafilm a -20 °C para preservarlos de la actividad de ADNasas. A los 350 µl restantes se les agregó 100 µl más de buffer TE y luego de dejarlos durante 24 hs a 10 °C se hicieron las diluciones de uso para la caracterización molecular.

#### Caracterización molecular:

Las secuencias de 180 juegos de iniciadores o cebadores de microsatélites distribuidos ampliamente en el genoma de maíz fueron obtenidas a partir de la base de datos de maíz (<http://www.maizegdb.org>, verificado en octubre de 2003) y sintetizadas por el laboratorio Alpha DNA (<http://www.alphadna.com>, verificado en julio de 2003).



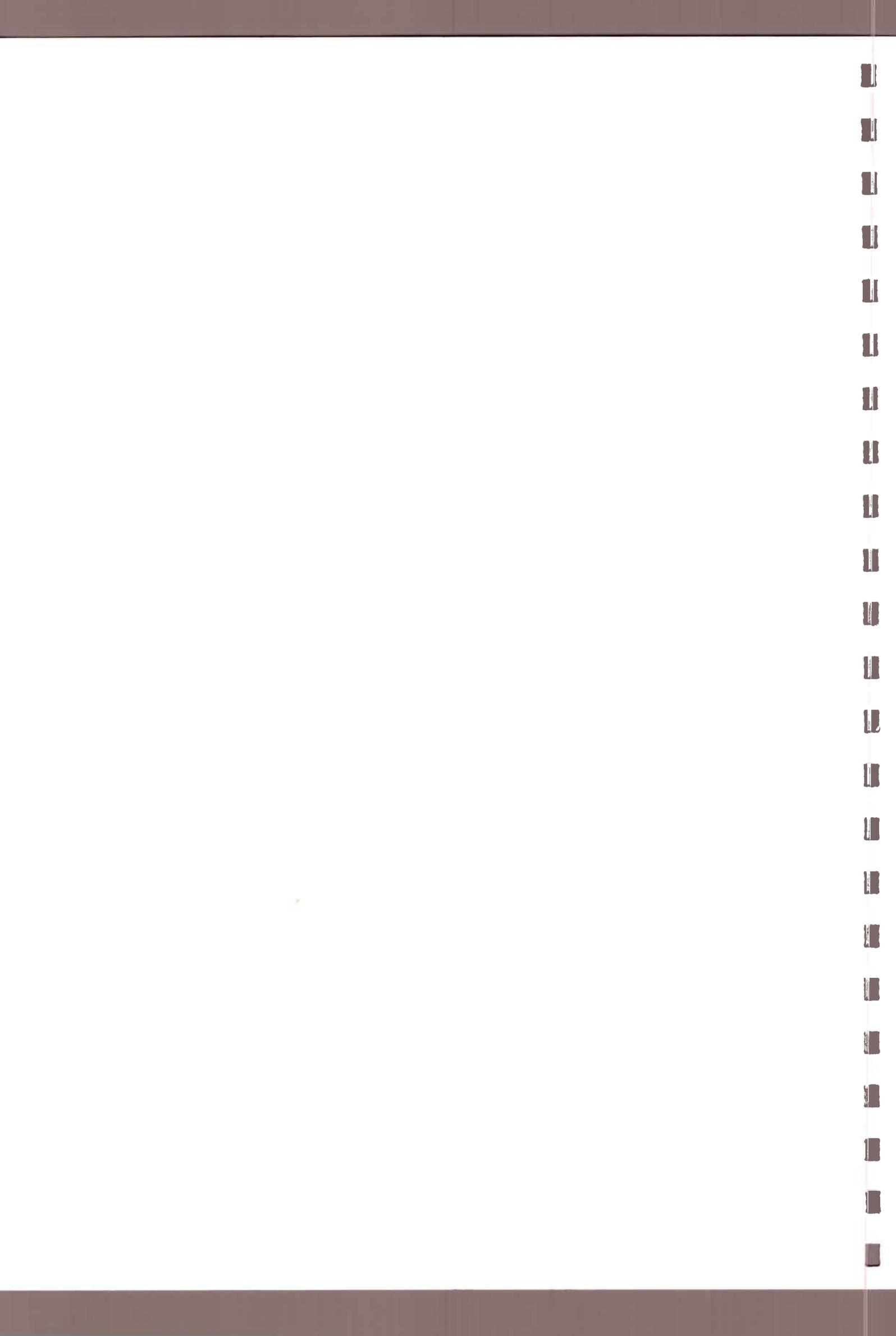
Los componentes de la reacción de PCR fueron los que se presentan en el Cuadro 1.

Cuadro 1. Componentes de la reacción en cadena de la enzima *Taq* ADN polimerasa.

Reactivo	[Stock]	Volumen por tubo ( $\mu$ l)
$dH_2O$ (HPLC)	-----	12,0 $\mu$ l
Buffer de la enzima (Promega)	10X	2,0 $\mu$ l
$Cl_2Mg$ (Promega)	25,0 mM	1,2 $\mu$ l
Iniciador derecho	5,0 mM	1,0 $\mu$ l
Iniciador izquierdo	5,0 mM	1,0 $\mu$ l
$4_dNTP$	10,0 mM	0,4 $\mu$ l
<i>Taq</i> ADN polimerasa	1,2 u/ $\mu$ l	0,4 $\mu$ l
ADN	25,0 ng/ $\mu$ l	2,0 $\mu$ l
Volumen final		20,0 $\mu$ l

La reacción de amplificación por PCR fue realizada en un termociclador BIOMETRA UNO-Thermoblock, bajo los tres programas de amplificación que se detallan en el Anexo 6, siendo el programa 1 el más utilizado.

El producto de amplificación por PCR fue separado, en principio, en geles de agarosa (BIO-RAD) al 3% p/v en buffer TBE 1X con el agregado de 1,5  $\mu$ l de bromuro de etidio por cada 100 ml de buffer, sembrando 12,5  $\mu$ l de los 25  $\mu$ l totales (20  $\mu$ l del producto de la PCR + 5  $\mu$ l de buffer de carga con colorante 5X). Posteriormente se utilizaron geles de agarosa Metaphor (BMA-FMC BioWhittaker, Rockland, ME USA) que permite detectar diferencias de hasta sólo dos pares de bases. Estos geles al 4% p/v fueron también realizados con buffer TBE 1X con el agregado de 4  $\mu$ l de bromuro de etidio cada 100 ml de buffer. Un marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Promega) fue utili-



zado para estimar el tamaño del fragmento amplificado. La corrida electroforética se realizó con buffer de electrodos TBE 0,5X manteniendo 60 V constantes 90-180 min aproximadamente. Terminada la electroforesis, el gel fue expuesto en un transiluminador UV y fotografiado (Kodak Digital Science DC260) para su documentación final.

En gran parte de las reacciones realizadas se decidió implementar un cambio en el buffer de la reacción. A los componentes normales (Tris-ClH 100 mM, pH 9; ClK 500 mM; Triton X-100 1%) se le agregó 20 % de sacarosa y 0,05 % de Rojo de Cresol. De este modo el producto de PCR tiene suficiente densidad y un indicador, lo cual permite sembrarlo en el gel de agarosa directamente. El ahorro de tiempo y material descartable, por eliminar un paso posterior a la reacción de PCR es la principal ventaja de este procedimiento.

Entre las familias  $F_3$  evaluadas en la zona endémica bajo infección natural en SA99, BU99, SA00 y SA01, se identificaron las que mostraron comportamiento extremo frente a la virosis. Fueron definidos dos grupos de familias  $F_3$ , grupo A con ISE menor a 35% y grupo B con ISE mayor a 55%. Los marcadores de microsátélites que resultaron polimórficos entre los parentales fueron utilizados para realizar el análisis molecular con el ADN de las plantas  $F_2$  correspondientes a las familias  $F_3$  de los grupos mencionados.

### *Análisis estadístico de datos*

Para probar la hipótesis nula de distribución normal de los residuales del ISE y de los otros caracteres medidos en la población segregante  $F_3$ , para cada ambiente y a través de ambientes del área endémica se usó el estadístico de Shapiro-Wilks, mediante PROC UNIVARIATE de SAS versión 6.12 (SAS Institute, 1997). El nivel de significancia usado fue  $\alpha = 0,05$ . No fue necesario realizar transformación de los datos del ISE y de altura de planta. Los caracteres tipo de panoja, superficie, borde y longitud de hoja se transformaron mediante la función  $f(y) = \sqrt{y + 0,5}$ , para obtener distribuciones aproximadamente normales.

El análisis de la varianza (ANAVA) fue realizado usando PROC GLM de SAS. Para cada carácter se consideró familias  $F_3$  (genotipos) y ambientes como efectos aleatorios. Sobre la base de los siguientes modelos estadísticos fueron realizados los análisis de varianza para: a) el ISE del MRC en 227 familias  $F_3$  en ambientes individuales y b) el ISE del MRC y otros caracteres observados y no considerados en el ISE en 227 familias  $F_3$  a través de ambientes del área endémica:

$$a) y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \varepsilon_{ij}$$

donde  $y_{ij}$  es la observación de la respuesta del  $i$ -ésimo genotipo en el  $j$ -ésimo bloque;  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto del  $i$ -ésimo genotipo,  $\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo bloque y  $\varepsilon_{ij}$  es el término de error aleatorio asociado a la  $ij$ -ésima observación.

$$b) y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \rho_k + (\alpha\rho)_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

donde  $y_{ijk}$  es la observación de la respuesta del  $i$ -ésimo genotipo en el  $j$ -ésimo bloque en el  $k$ -ésimo ambiente,  $\mu$  es la media general,  $\alpha_i$  es el efecto del  $i$ -ésimo genotipo,  $\beta_j$  es el efecto del  $j$ -ésimo bloque,  $\rho_k$  es el efecto del  $k$ -ésimo ambiente,  $(\alpha\rho)_{ik}$  es la interacción genotipo-ambiente y  $\varepsilon_{ijk}$  es el término de error aleatorio asociado a la  $ijk$ -ésima observación.

De acuerdo a los modelos estadísticos establecidos, en el Cuadro 2 se presentan los análisis de varianza y las esperanzas de los cuadrados medios para: a) ambientes individuales y b) a través de ambientes del área endémica.

Cuadro 2. a) ANAVA en ambientes individuales y b) ANAVA a través de ambientes del área endémica.

a) ANAVA para el ISE del MRC en 227 familias  $F_3$  en ambientes individuales.

Fuente de Variación	GL	E (CM)
Bloque	(r-1)	
Genotipo	(g-1)	$\sigma_e^2 + r\sigma_g^2$
Error	(r-1) x (g-1)	$\sigma_e^2$

b) ANAVA para el ISE del MRC y para otros caracteres observados y no considerados en el ISE en 227 familias  $F_3$  a través de ambientes.

Fuente de Variación	GL	E (CM)
Bloque	(r-1)	
Ambiente	(a-1)	$\sigma_e^2 + r\sigma_{ga}^2 + rg\sigma_a^2$
Genotipo	(g-1)	$\sigma_e^2 + r\sigma_{ga}^2 + ra\sigma_g^2$
Ambiente-Genotipo	(a-1) x (g-1)	$\sigma_e^2 + r\sigma_{ga}^2$
Error	(r-1) x (ag-1)	$\sigma_e^2$

GL = grados de libertad; E (CM) = esperanza de los cuadrados medios; r = n° de repeticiones por familia  $F_3$  o genotipos, dentro de ambientes; a = n° de ambientes; g = n° de genotipos;  $\sigma_g^2$  = varianza genotípica;  $\sigma_a^2$  = varianza ambiental;  $\sigma_{ga}^2$  = varianza de la interacción genotipo-ambiente;  $\sigma_e^2$  = varianza asociada al error residual.

Los estimadores de los componentes de varianzas y de la heredabilidad en sentido amplio fueron calculados para cada carácter a partir de los valores medios del ISE de las familias  $F_3$  en cada ambiente y a través de ambientes. La estimación de los componentes de varianzas, varianza genotípica, varianza ambiental, varianza de la interacción genotipo-ambiente y varianza del error residual fueron estimados mediante la esperanza de los cuadrados medios de la siguiente forma:



a) en ambientes individuales del área endémica.

varianza genotípica:

$$\sigma^2_g = (CM_g - CM_e)/r$$

donde  $CM_g$  = cuadrado medio de genotipo;  $CM_e$  = cuadrado medio del error residual;  $r$  = n° de repeticiones.

varianza del error:

$$\sigma^2_e = CM_e$$

b) a través de ambientes del área endémica.

varianza genotípica:

$$\sigma^2_g = (CM_g - CM_{ga})/ra$$

donde  $CM_g$  = cuadrado medio de genotipo;  $CM_{ga}$  = cuadrado medio de la interacción genotipo-ambiente;  $r$  = n° de repeticiones y  $a$  = n° de ambientes.

varianza ambiental:

$$\sigma^2_a = (CM_a - CM_{ga})/rg$$

donde  $CM_a$  = cuadrado medio de ambiente y  $g$  = n° de genotipos.

varianza de la interacción genotipo-ambiente:

$$\sigma^2_{ga} = (CM_{ga} - CM_e)/r$$

donde  $CM_e$  = cuadrado medio del error residual.

varianza del error:

$$\sigma^2_e = CM_e$$

En los Anexos 7 y 8 se presentan los cuadrados medios y grados de libertad correspondientes a los análisis de varianza realizados en ambientes individuales y a través de ambientes del área endémica.



La heredabilidad en sentido amplio fue estimada en función de los componentes de varianza según Hallauer y Miranda (1981), para cada ambiente:

$$h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + (\sigma_e^2 / r))$$

donde  $\sigma_g^2$  = varianza genotípica;  $\sigma_e^2$  = varianza asociada al error residual y  $r$  = nº de repeticiones dentro de ambientes.

y a través de ambientes:

$$h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + (\sigma_{ga}^2 / a) + (\sigma_e^2 / ra))$$

donde  $\sigma_g^2$  = varianza genotípica;  $\sigma_{ga}^2$  = varianza de la interacción genotipo-ambiente;  $\sigma_e^2$  = varianza asociada al error residual;  $r$  = nº de repeticiones dentro de ambientes y  $a$  = nº de ambientes.

Un intervalo de confianza del 90%, calculado según Knapp *et al.* (1985), se utilizó para determinar la precisión de la heredabilidad estimada. Los límites del intervalo de confianza del 90% para la  $h^2$  fueron calculados usando:

$$1 - [F_{1-\alpha/2; g1, g2} / F] \leq h^2 \leq 1 - [F_{\alpha/2; g1, g2} / F]$$

donde  $F = (1-h^2)^{-1}$ ;  $\alpha/2 = 0,05$ ;  $1-(\alpha/2) = 0,95$ ;  $g_1$  = grados de libertad de genotipo y  $g_2$  = grado de libertad del error residual.

Además se estimaron los coeficientes de correlación simple de Pearson, mediante PROC CORR de SAS, para establecer la asociación entre los valores medios de severidad de las familias  $F_3$  provenientes de cuatro ambientes del área endémica. La asociación entre el ISE con altura de planta y con los otros caracteres se analizó para tres ambientes del área endémica.

Para evaluar el ligamiento entre marcadores, considerando los cromosomas como grupos de ligamiento, se estimaron las frecuencias de recombinación

ción entre *loci* a través de un análisis multipunto. Dichas frecuencias fueron transformadas en distancias (cM) según la función de mapeo de Haldane (1919) utilizando el programa MAPMAKER/Exp. versión 3.0 (Lander *et al.*, 1987; Lincoln *et al.*, 1993). MAPMAKER es un programa desarrollado para la construcción de mapas genéticos de ligamiento el cuál calcula las distancias genéticas según el porcentaje de recombinación. Si el valor del estadístico LOD ("log<sub>10</sub> of the likelihood of odds" ó log<sub>10</sub> de la expresión de verosimilitud del cociente probabilidad de ligamiento/probabilidad de independencía) es mayor que un umbral y la distancia de ligamiento es menor a un valor límite, los marcadores pueden considerarse ligados y posteriormente se calcula en cada grupo de ligamiento el orden de los mismos. En este estudio se usó un LOD mínimo de 3,0 y una distancia máxima de 40 cM para identificar ligamiento entre marcadores. Para ingresar los datos en el programa fue necesario generar un archivo que contenía una matriz con las familias en el sentido de las columnas y los *loci* marcadores en el sentido de las filas. El valor asignado a cada fenotipo molecular fue A, B o H según si cada individuo F<sub>2</sub> fue similar al padre 1 (Mo17), al padre 2 (BLS14) o al heterocigota, respectivamente.

Para declarar la presencia de un posible QTL y estimar sus efectos genéticos se utilizó el programa PLABQTL versión 1.0 (Utz y Melchinger, 1995), el cual emplea el mapeo por intervalo mediante la técnica de regresión múltiple. Se utilizó el ISE medio a través de ambientes como variable dependiente (Haley y Knott, 1992), en combinación con marcadores seleccionados como cofactores. Los cofactores fueron seleccionados por una regresión "stepwise" (paso a paso). Los datos del ISE fueron transformados con la función log<sub>10</sub>(y+1). El mínimo LOD fijado para declarar la presencia de un posible QTL fue 3,0 y su posición fue asignada al punto donde el valor de LOD era máximo. La variación fenotípica total explicada por los posibles QTL detectados fue estimada a través de un modelo de regresión múltiple donde éstos fueron incluidos. El LOD total y la estimación de los efectos genéticos aditivos y dominantes de cada QTL individual, así como la variación fenotípica parcial explicada por cada QTL teniendo en cuenta la presencia de otros posibles QTL también fueron



calculados a partir de este modelo. La relación  $|d/a|$ , grado de dominancia (Falconer, 1996), fue utilizada para determinar el tipo de acción génica de cada QTL. Según un criterio arbitrario fijado por Stuber *et al.* (1987), si  $|d/a| < 0.2$  la acción génica es aditiva; si  $0,2 < |d/a| < 0,8$  la acción génica es parcialmente dominante; si  $0,8 < |d/a| < 1,2$  la acción génica es dominante y si  $|d/a| > 1,2$  la acción génica es sobredominante. Los QTL detectados en el análisis fueron evaluados por la presencia de interacción QTL-ambiente y de interacciones epistáticas digénicas entre QTL según Lübberstedt *et al.* (1997). La proporción de la varianza genotípica explicada por los posibles QTL identificados fue obtenida a partir de un modelo de regresión múltiple que incluyó los valores de ISE medio de cada QTL, según Schön *et al.* (1994):

$$\sigma^2_{g \text{ expl}} = \sigma^2_p \text{ expl} / h^2$$

donde  $h^2$  = heredabilidad del ISE y  $\sigma^2_p \text{ expl}$  = varianza fenotípica del ISE explicada por los QTL.

Para ingresar los datos en el programa PLABQTL fue necesario generar un archivo con las familias en el sentido de las columnas y los *loci* marcadores polimórficos (Anexo 9) en el sentido de las filas. El valor asignado a cada fenotipo molecular (Anexo 10) fue A, B o H según si el individuo  $F_2$  fue similar al padre 1 (Mo17), al padre 2 (BLS14) o al heterocigota, respectivamente. Además, en el archivo, se indicaron los valores del carácter ISE de las familias  $F_3$  a través de ambientes y para cada uno de los cuatro ambientes, así como la posición y las distancias entre marcadores en cada grupo de ligamiento (Anexo 11). Las sentencias correspondientes para el análisis fueron indicadas en otro archivo como se detalla en el Anexo 12.

La asociación entre el ISE y los marcadores fue evaluada también a través de un ANAVA a una vía de clasificación (un marcador a la vez) que contrastó las medias del ISE entre los genotipos de cada uno de los marcadores pertenecientes a los grupos de ligamiento significativamente asociados con el ISE en el mapeo por intervalos. Los datos del ISE fueron transformados con  $\log_{10}(y+1)$ . Este análisis se realizó por ambiente y utilizando el ISE medio a

través de ambientes. La proporción de la varianza fenotípica explicada por un marcador significativo fue determinada a través del valor de  $R^2$ . Los marcadores que se asociaron con diferencias estadísticamente significativas ( $p < 0,05$ ) con el ISE medio fueron evaluados de a pares mediante un ANAVA a dos vías de clasificación para detectar posibles interacciones epistáticas entre marcadores. Los análisis de varianza fueron realizados con el programa INFOSTAT versión 1.6 (2003).

Con el conjunto de familias  $F_3$  con comportamiento fenotípico extremo frente a la virosis se formaron dos grupos, grupo A con ISE bajo y grupo B con ISE alto, y se realizó un análisis discriminante discreto con los marcadores como variables para discriminar o clasificar un genotipo en un grupo u otro (SAS Institute, 1997). Previo al análisis discriminante se realizó un procedimiento de selección de variables (marcadores) "stepwise". Como resultado se obtuvo una regla de clasificación basada en un subconjunto de marcadores, la cual fue evaluada mediante la tasa del error en el que se podría incurrir usando la función discriminante para clasificar un genotipo en el grupo A o en el grupo B. La tasa de error fue obtenida por validación cruzada.



## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### *Evaluaciones de datos experimentales de campo*

Los valores de severidad de enfermedad observados en las familias  $F_3$  mostraron un amplio rango, lo que indicó un importante nivel de infección a través de los ambientes. Por otra parte dichos valores de severidad no fueron consistentes en los distintos ambientes ya que en SA99 y SA00 la incidencia fue mayor que en BU99 y SA01 (Cuadro 3). En SA99 y SA00 la presencia de de avena en como cultivo antesesor en el campo experimental donde se realizaron las evaluaciones de las familias  $F_3$  fue probablemente la causa del elevado nivel de ISE observado. Este cereal invernal es uno de los hospedantes preferidos del insecto vector ya que le proporciona el ambiente adecuado para su completo desarrollo y constituye un factor importante para que ocurran epifitias del MRC.

La línea parental parcialmente resistente, BLS14, mostró menor nivel de enfermedad que la línea parental susceptible, Mo17, en SA99, SA00, SA01 y a través de ambientes ( $p < 0,01$ ) (Cuadro 3). El carácter ISE, calculado según la incidencia y la severidad de los síntomas observados, presentó una distribución normal en los ambientes individuales y a través de todos los ambientes (Fig. 5). En todos los casos el valor de ISE medio de las familias  $F_3$  tuvo una diferencia no significativa ( $p > 0,05$ ) con el valor medio del ISE del parental susceptible (Cuadro 3). Las familias  $F_3$  mostraron entre sí diferencias altamente significativas en los diferentes ambientes, y además en SA00 los valores medios fenotípicos excedieron al de los genotipos parentales. Es decir que algunas familias  $F_3$  fueron más resistentes que BLS14 y otras fueron más susceptibles que Mo17, lo que estaría indicando una segregación transgresiva significativa ( $p < 0,05$ ) en la reacción al MRC. La reacción a la enfermedad MRC, la cual es de herencia cuantitativa y probablemente controlada por un sistema poligénico, sugiere por mostrar una segregación transgresiva, la posibilidad de obtener un incremento de la tolerancia a partir de un cruzamiento de genotipos sencibles



Cuadro 3. Estimación de las medias del índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC en las líneas parentales (Mo17 y BLS14) y en las 227 familias F<sub>3</sub>, en ambientes individuales y a través de cuatro ambientes del área endémica.

Genotipo	Ambiente				A través de ambientes
	SA99	BU99	SA00	SA01	
Mo17	53,33±0,35a	-	61,90±1,90a	54,39±0,40a	55,07±0,14a
BLS14	12,73±0,04b	-	7,21±0,11b	9,72±0,29b	10,88±0,02b
F <sub>3</sub>	45,79±1,11a	29,35±0,99	64,42±1,03a	38,70±1,23a	44,62±0,41a

SA99 = Sampacho 1999; BU99 = Bulnes 1999; SA00 = Sampacho 2000; SA01 = Sampacho 2001.

± Error estándar.

Medias seguidas por la misma letra en la columna indican diferencias no significativas con un nivel de significancia de 0,05 según la prueba de LSD.



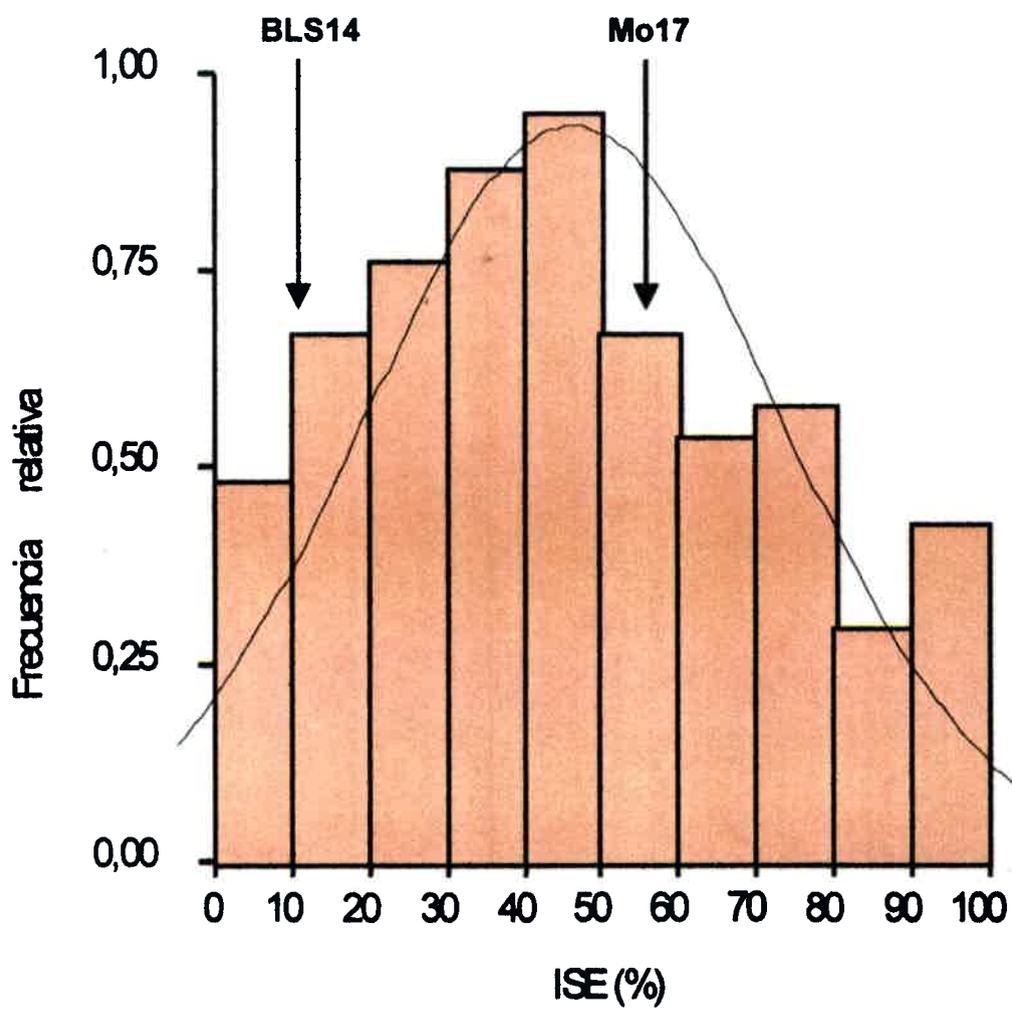


Figura 5. Distribución del índice de severidad de enfermedad (ISE) de las familias F<sub>3</sub> y de las líneas parentales a través de cuatro ambientes del área endémica.



por tolerantes. La ausencia de diferencias entre el valor medio del ISE del parental susceptible, Mo17, y el valor medio de las familias  $F_3$  indica la presencia de resistencia parcial recesiva tal como ya fue sugerido por Di Renzo *et al.* (2002). La recesividad parcial de la resistencia al MRC señala que una importante proporción de la varianza genética para la reacción al MRC es debida a componentes no aditivos (dominancia, sobredominancia y/o epistasias). Estos resultados coinciden, en parte, con trabajos previos relacionados con la forma de herencia de la resistencia al MRC que informan la presencia de efectos genéticos aditivos y no aditivos (Presello, 1993; Presello *et al.*, 1995).

Los estimadores de componente de varianza genotípica de la resistencia al MRC fueron altamente significativos ( $p < 0,01$ ) y mostraron reducido error estándar en los ambientes ensayados (Cuadro 4). Los estimadores de la varianza de la interacción genotipo-ambiente fueron significativos para los valores medios de severidad de enfermedad a través de ambientes. Como ya se mencionó, se producen epidemias del MRC cuando conjuntamente ocurren determinadas condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de poblaciones abundantes de formas migratorias de *D. kuscheli*, y éstas migran al maíz en una fase temprana de crecimiento, estado de coleoptile (Ornaghi *et al.*, 1993). La respuesta de las familias  $F_3$  a través de los ambientes fue poco consistente, como lo muestra la significativa interacción genotipo-ambiente y la baja asociación del ISE entre los diferentes ambientes. Este tipo de respuesta puede estar relacionada tal vez con un proceso de escape asociado básicamente a una distribución desuniforme de los insectos infectivos, así como por diferentes grados de eficiencia de los mismos en la transmisión del virus. Estos resultados indican que la evaluación para resistencia a MRC de familias  $F_3$ , requiere de varios ambientes, así como también explican por qué el mejoramiento para tolerancia al MRC resulta laborioso e insume tanto tiempo.

La heredabilidad estimada del carácter ISE exhibió valores moderados entre 0,47 y 0,63 tanto en ambientes individuales como considerando todos los

Cuadro 4. Estimación de los componentes de varianza, heredabilidad en sentido amplio e intervalos de confianza del índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC en 227 familias F<sub>3</sub>, en ambientes individuales y a través de cuatro ambientes del área endémica.

Parámetro	Ambiente				
	SA99	BU99	SA00	SA01	A través de ambientes
Componente de varianza					
Genética ( $\sigma_g^2$ )	173,5±39,23	172,74±37,9	158,62±33,90	216,36±34,81	86,79±7,26
Ambiental ( $\sigma_e^2$ )	390,4±36,73	269,5±25,52	325,89±30,66	259,09±24,27	93,96±14,65
Interacción G-A <sup>3</sup> ( $\sigma_{ga}^2$ )	-	-	-	-	310,72±15,44
Heredabilidad					
$h^2$	0,47 <sup>1</sup>	0,56 <sup>1</sup>	0,49 <sup>1</sup>	0,63 <sup>1</sup>	0,58 <sup>2</sup>
IC de 90%	0,34-0,58	0,45-0,65	0,37-0,59	0,53-0,70	0,50-0,65
Amplitud relativa <sup>4</sup> (%)	49,82	34,88	45,57	26,54	26,56

SA99 = Sampacho 1999; BU99 = Bulnes 1999; SA00 = Sampacho 2000; SA01 = Sampacho 2001.

± Error estándar.

<sup>1</sup>  $h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_e^2 / r)$ ; r = nº de repeticiones.

<sup>2</sup>  $h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_{ga}^2 / l + \sigma_e^2 / ra)$ ; r = nº de repeticiones y a = nº de ambientes.

<sup>3</sup> Interacción genotipo-ambiente.

<sup>4</sup> Amplitud relativa expresada como la relación (%) del intervalo de confianza (IC) con respecto a la heredabilidad estimada ( $h^2$ ).

ambientes en conjunto (Cuadro 4). El valor de heredabilidad estimado a través de los cuatro ambientes ensayados fue de 0,58, siendo moderadamente superior al calculado por Di Renzo *et al.* (2002) sobre tres ambientes. Los mayores valores de heredabilidad fueron estimados para SA01, donde además se observó un valor moderado de severidad de enfermedad. Tal vez esta razón podría justificar la diferencia observada en la heredabilidad estimada sobre la base de tres ambientes respecto a la heredabilidad calculada teniendo en cuenta cuatro ambientes del área endémica. La heredabilidad fue estimada en sentido amplio ya que está basada en las diferencias entre familias  $F_3$  segregantes, quienes manifiestan diferencias genéticas aditivas y no aditivas. Si bien el valor de la heredabilidad para la tolerancia al MRC fue similar en los ambientes individuales y a través de los ambientes, debido a la interacción genotipo-ambiente significativa, pocos ambientes no proporcionan un valor confiable de la misma. Además, los intervalos de confianza con un rango de 34 a 70%, fueron consistentes en cada uno de los ambientes, así como a través de todos los ambientes. La heredabilidad fue estimada con mayor precisión cuando se consideraron todos los ambientes en conjunto ( $F_{0,05;226;898} = 1,20$ ; amplitud relativa 26,56%) que cuando se consideraron los ambientes en forma individual ( $F_{0,05;226;227} = 1,25$ , amplitud relativa 49,82; 34,88 y 45,57% respectivamente, excepto en SA01, donde la amplitud relativa fue similar a la obtenida a través de ambientes (26,54%).

La significativa interacción genotipo-ambiente y la moderada heredabilidad estimada indicarían que la selección para producir incrementos de resistencia a la enfermedad MRC en maíz puede requerir la evaluación de germoplasma a través de varios ambientes, es decir en diferentes años y localidades. Por lo cual sería importante tener en cuenta el modelo para predecir la intensidad de la enfermedad MRC desarrollado utilizando variables ambientales durante la estación invernal (March *et al.*, 1995). De acuerdo a este modelo la intensidad de la enfermedad puede ser inferida con anterioridad a la época de siembra. La selección de genotipos con buen comportamiento puede ser realizada a campo cuando el cultivo de maíz es implantado acorde a este modelo

predictivo, sobre lotes donde el cultivo antecesor fue algún cereal invernal tal como avena, trigo o centeno.

La tolerancia a MRC mostró una baja correlación entre ambientes, confirmando la significativa interacción genotipo-ambiente ya mencionada. En el Cuadro 5 puede observarse la correlación altamente significativa del ISE de SA99 con SA00 y SA01, así como de BU99 con SA00 y SA01. Lo mismo ocurrió para SA00 con SA01, mientras que para BU99 con SA99 la correlación fue no significativa ( $p > 0,05$ ). El ISE mostró una correlación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) con altura de planta, tipo de panoja y los caracteres de la hoja. Además en los ambientes con mayor nivel de daño, SA99 y SA00, la correlación del carácter ISE con los otros caracteres observados no considerados en el ISE fue altamente significativa ( $p < 0,001$ ). El carácter altura de planta está correlacionado negativamente con el ISE en los ambientes SA99 y BU99, así como en SA00 y a través de todos los ambientes ( $r = -0,60, -0,55, -0,61$  y  $-0,73$ , respectivamente). El carácter tipo de panoja está correlacionado positivamente con el ISE en los tres ambientes individuales ( $r = 0,54, 0,44$  y  $0,64$ , respectivamente) y a través de todos los ambientes ( $r = 0,62$ ). Por otra parte el ISE mostró una correlación positiva tanto con superficie, como con borde y largo de hoja a través de todos los ambientes y en los ambientes individuales (Cuadro 5).

Las observaciones de altura de planta, superficie de hoja, borde de hoja, longitud de hoja y tipo de panoja de las familias  $F_3$  en los ambientes por separado así como a través de todos los ambientes siguieron una distribución aproximada a la normal, con herencia transgresiva en ambas direcciones. La heredabilidad estimada para estos cinco caracteres, usando los componentes de varianza a partir de las medias de las familias  $F_3$  a través de todos los ambientes, mostró un rango entre 0,00 y 0,54, siendo para altura de planta y tipo de panoja de 0,54 y 0,41 respectivamente y muy baja para los demás caracteres (Cuadro 6). La correlación entre el ISE del MRC con altura de planta, tipo de panoja así como superficie, borde y largo de hoja a través de todos los ambien-



Cuadro 5. Correlación del índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC para las 227 familias F<sub>3</sub> entre cuatro ambientes del área endémica, y correlación fenotípica entre el ISE y otros caracteres no considerados en el ISE entre tres ambientes del área endémica.

Ambiente	Ambiente			Carácter no considerado en el ISE				
	BU99	SA00	SA01	Altura de planta	Superficie de hoja	Borde de hoja	Longitud de hoja	Tipo de panoja
SA99	0,06ns	0,19***	0,13**	-0,60***	0,27***	0,34***	0,42***	0,54***
BU99		0,19***	0,21***	-0,55***	0,12***	0,26***	0,32***	0,44***
SA00			0,20***	-0,61***	0,41***	0,52**	0,40***	0,64***
A través de ambientes				-0,73***	0,38***	0,57***	0,44***	0,62***

SA99 = Sampacho 1999; BU99 = Bulnes 1999; SA00 = Sampacho 2000; SA01 = Sampacho 2001.

\*\*, \*\*\* Correlación significativa con un nivel de significancia de 0,01 y 0,001, respectivamente; ns, no significativo.

Cuadro 6. Heredabilidad en sentido amplio para caracteres no considerados en el índice de severidad de enfermedad (ISE), con un límite de confianza del 90%, obtenidos a partir de 227 familias F<sub>3</sub> a través de tres ambientes del área endémica.

Carácter	Heredabilidad	Límite inferior	Límite superior	Amplitud <sup>1</sup>
Altura de planta	0,54	0,44	0,62	33,75
Superficie de hoja	0,00	-	-	-
Borde de hoja	0,13	0,00	0,28	261,00
Longitud de hoja	0,00	-	-	-
Tipo de panoja	0,41	0,28	0,51	56,74

<sup>1</sup>Amplitud expresada como la relación (%) del intervalo de confianza con respecto a la heredabilidad estimada.



tes indicó que la mayor susceptibilidad está asociada con menor altura, panojas parcial o totalmente estériles y hojas deformadas. Por otra parte los caracteres de hoja mostraron una baja heredabilidad y una escasa asociación con el ISE, mientras que con altura de planta y tipo de panoja, cuya heredabilidad fue moderada, la asociación fue significativa. Los caracteres altura de planta y tipo de panoja podrían ser utilizados como predictores del ISE por la alta asociación con éste, la moderada heredabilidad y por ser caracteres de fácil medición.

#### *Análisis con marcadores genéticos*

De un total de 180 juegos de microsatélites, 112 (62,2%) revelaron bandas nítidas en alguno de los tres programas de amplificación por PCR utilizados. De estos 112 microsatélites, 59 (52,7%) resultaron polimórficos y 53 (47,3%) monomórficos (Cuadro 7; Anexo 9). De los 59 juegos de iniciadores de microsatélites que mostraron polimorfismos moleculares en los genotipos parentales (Fig. 6), 12 fueron probados en geles de agarosa común al 3% p/v mientras que los 47 restantes sólo mostraron patrones polimórficos en geles de agarosa Metaphor al 4% p/v. Los 12 juegos de iniciadores evaluados en agarosa común fueron probados sobre el total de las 227 plantas  $F_2$  de la generación segregante. El resto de los marcadores polimórficos fue probado en las 36 plantas  $F_2$  cuyas  $F_3$  mostraron comportamiento extremo frente a la virosis en los cuatro ambientes ensayados durante tres años consecutivos en el área endémica de la enfermedad. En el Cuadro 8 se presenta el ISE de las familias  $F_3$  con comportamiento extremo frente a la virosis en los cuatro ambientes y a través de ambientes. En el Anexo 10 se muestra el fenotipo molecular observado, con los 59 microsatélites polimórficos, en las plantas  $F_2$  correspondientes a las familias  $F_3$  con comportamiento extremo frente a la virosis así como en las líneas parentales y el híbrido.

Cuadro 7. Número de marcadores SSR probados por cromosoma (grupo de ligamiento).

Cromosoma	Polimórficos	Monomórficos	Total
1	10	9	19
2	5	2	7
3	9	7	16
4	11	6	17
5	2	4	6
6	8	6	14
7	0	9	9
8	6	3	9
9	6	2	8
10	3	4	7
Total	59	53	112

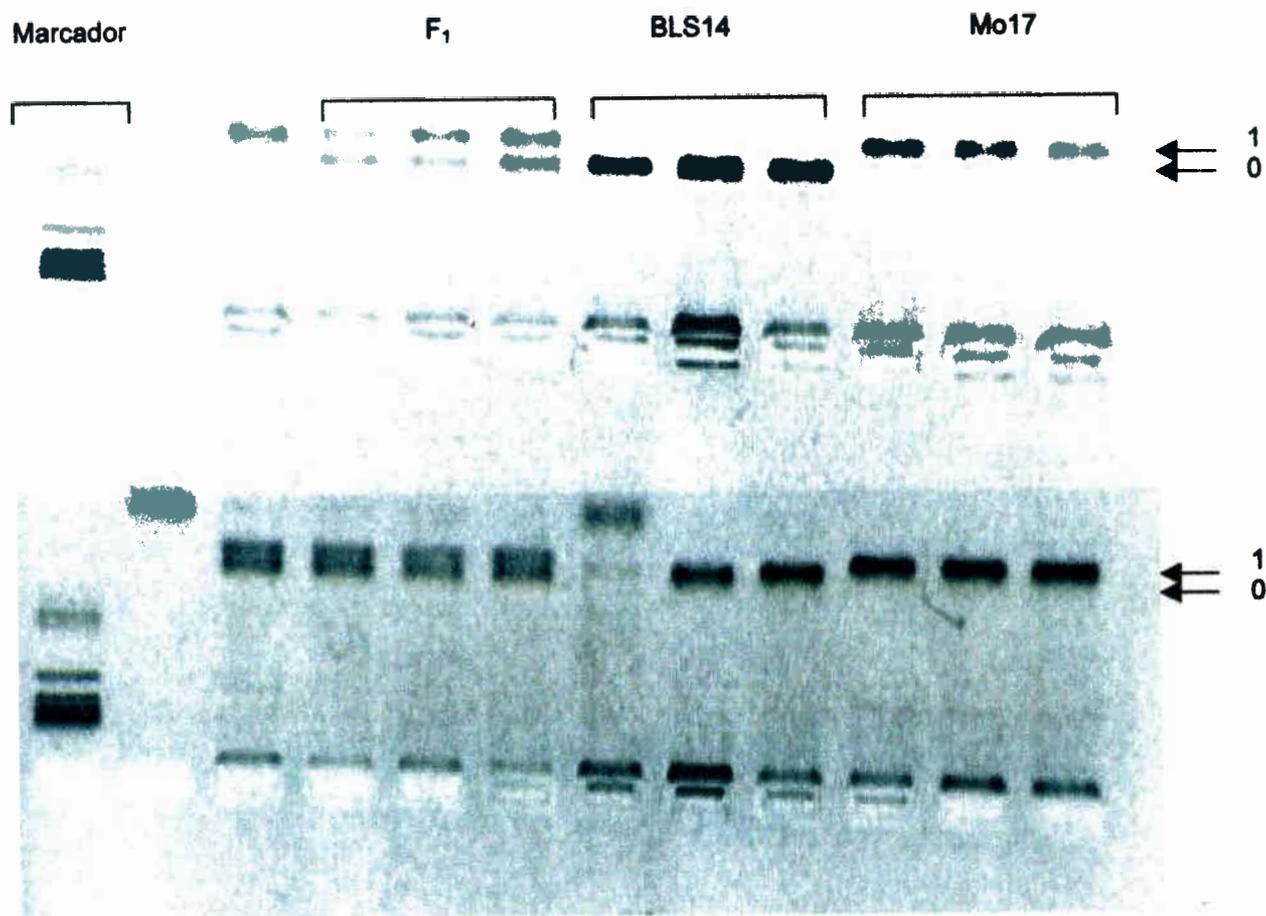


Figura 6. Fenotipo molecular observado, con dos marcadores moleculares polimórficos, en los genotipos parentales y en el híbrido, 1 = banda rápida y 0 = banda lenta.



Cuadro 8. Índice de severidad de enfermedad (ISE), en %, de un subgrupo de familias F<sub>3</sub> (n = 36) con comportamiento extremo frente a la virosis en los ambientes individuales y a través de cuatro ambientes del área endémica.

	Ambiente				
	SA99	BU99	SA00	SA01	A través de ambientes
ISE de familias F <sub>3</sub> tolerantes al MRC (%) (n = 17)	0	0	33	20	13
	39	8	19	23	22
	31	6	31	17	21
	24	21	23	37	26
	31	6	33	35	26
	29	0	43	27	25
	26	13	33	23	24
	19	29	33	24	26
	26	20	36	31	28
	28	31	31	25	29
	41	17	33	17	27
	31	33	31	27	31
	29	31	36	24	30
	23	37	37	37	33
	38	27	33	24	30
	22	40	38	24	31
	27	36	40	33	34
ISE de familias F <sub>3</sub> susceptibles al MRC (%) (n = 19)	62	49	58	65	58
	74	42	60	15	48
	63	40	78	55	59
	63	63	64	68	63
	89	18	80	53	60
	77	63	50	55	61
	67	47	76	49	60
	65	42	86	47	60
	100	0	100	50	63
	58	52	90	77	69
	67	45	92	20	56
	81	55	70	49	64
	64	50	100	67	70
	83	52	87	54	69
	90	46	90	78	76
	76	63	92	35	67
	84	65	86	41	69
67	82	100	80	82	
74	92	100	52	80	

SA99 = Sampacho 1999; BU99 = Bulnes 1999; SA00 = Sampacho 2000; SA01 = Sampacho 2001.

En el Anexo 11 se muestra el archivo utilizado para realizar el análisis con el programa PLABQTL. El mismo fue generado con el fenotipo molecular observado en las plantas F<sub>2</sub> (Anexo 10) y los datos fenotípicos del ISE de las familias F<sub>3</sub> correspondientes (Cuadro 8), con comportamiento extremo frente a la enfermedad MRC en los ambientes individuales y a través de los cuatro ambientes del área endémica. Además se consignan las distancias (cM), calculadas con MAPMAKER/EXP, para 56 de los 59 marcadores probados en este estudio, ya que tres marcadores fueron sacados del análisis porque las distancias eran inadecuadas.

#### *Identificación de QTL*

Con los 56 marcadores SSR polimórficos que fueron utilizados en el análisis, la longitud del genoma evaluada en este estudio fue de 1838,9 cM. Si bien alguno de los 43 intervalos entre marcadores fue superior a 30 cM (Fig. 7), el espaciamiento promedio entre marcadores de este mapa de ligamiento fue de 36,8 cM, por lo tanto coincide con el máximo de 50 cM definido por Davasi *et al.* (1994). Los marcadores del grupo de ligamiento 7 no fueron incluidos en el análisis, debido a que la longitud del intervalo promedio entre ellos fue inadecuada. El mapeo por intervalos basado en la regresión múltiple de los valores del ISE medio a través de ambientes, realizado con el programa PLABQTL, permitió observar dos grupos de ligamiento con QTL significativos. A su vez, también fueron dos los posibles QTL identificados (Cuadro 9 y Fig. 7). El pico correspondiente al QTL identificado en el grupo de ligamiento 1, (LOD = 3,77), se observó a 4,2 cM del marcador bnlg1866, en el intervalo entre bnlg1866 y phi095 y mostró una acción génica sobredominante. La variación fenotípica explicada por este QTL en forma independiente, es decir sin tener en cuenta la presencia de otros posibles QTL fue de 39,1%, mientras que teniendo en cuenta la presencia de otros QTL la variación fenotípica parcial explicada por este QTL fue de 24,4%. El otro QTL, identificado en el grupo de ligamiento 8, (LOD = 3,81), cuyo pico estuvo a 5,3 cM del marcador phi115, en el intervalo

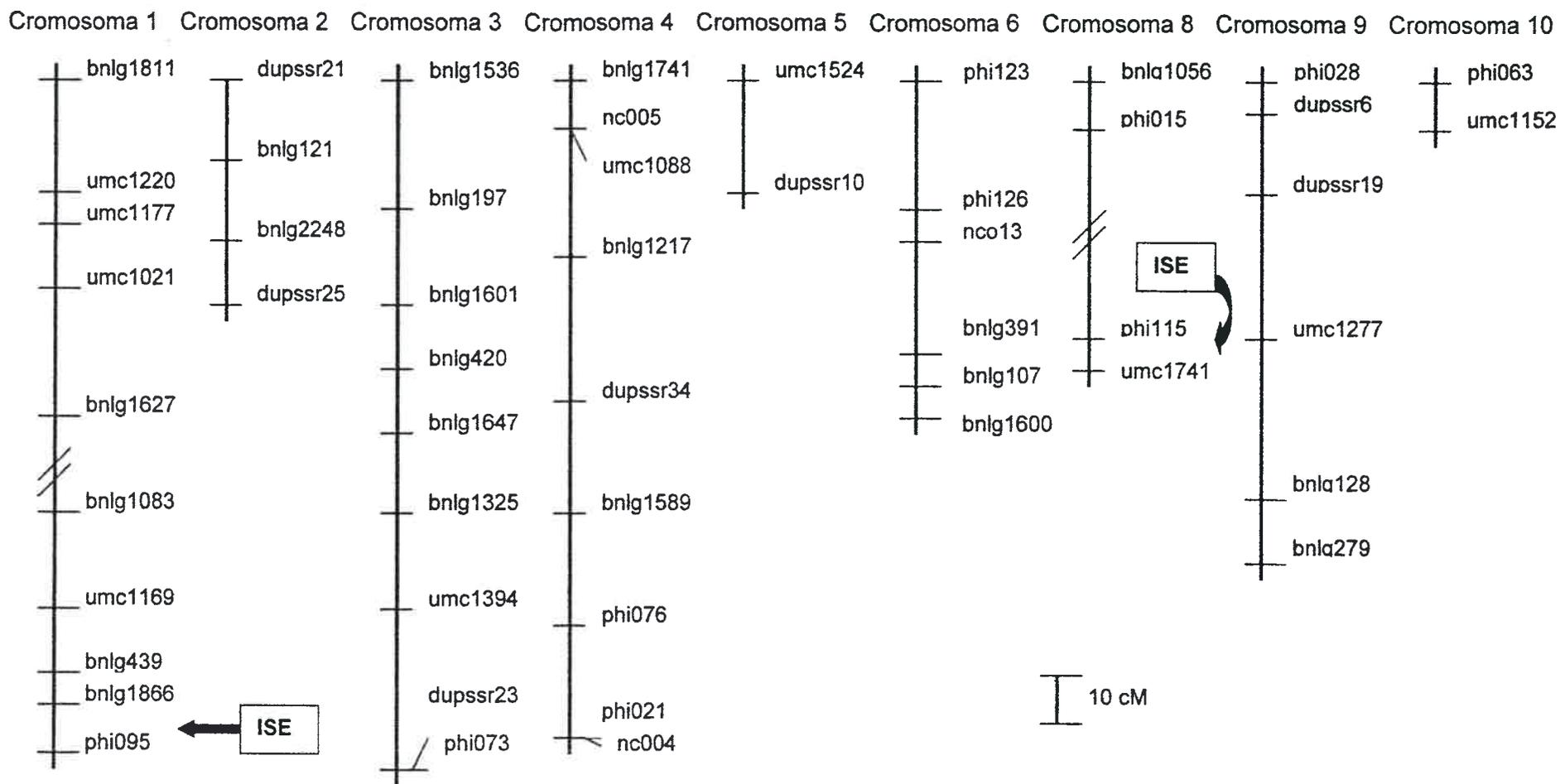


Figura 7. Mapa de ligamiento construido con 56 marcadores de microsatélites. El mapa tiene una longitud de 1838,9 cM y un intervalo promedio entre marcadores de 36,8 cM. La posición de QTL para el índice de severidad de enfermedad (ISE) de MRC es indicada.

Cuadro 9. Parámetros relacionados con posibles QTL asociados significativamente con el índice de severidad de enfermedad (ISE) a través de cuatro ambientes del área endémica.

Cromosoma (bin)	Intervalo	Longitud del intervalo (cM)	Posición <sup>1</sup>	QTL- Ambiente <sup>2</sup>	LOD	$R^2(\%)^3$	Efecto genético <sup>4</sup>		Acción génica <sup>5</sup>
							a	d	
1 (1.03)	bnlg1866-phi095	13,8	4,2	**	3,77	24,4	0,120	-0,167	SD
8 (8.03/4)	phi115-umc1741	8,1	5,3	ns	3,81	24,0	-0,107	0,090	PD
Total <sup>6</sup>				**	4,98	36,2			

Bins publicados en el mapa de maíz (<http://www.agron.missouri.edu>). La localización es designada por el código X.Y, donde X es el grupo de ligamiento que contiene el bin e Y es la localización del bin dentro del grupo de ligamiento.

<sup>1</sup>Posición estimada del QTL, donde el LOD es máximo, representada por la distancia en cM a partir del primer marcador del intervalo.

<sup>2</sup>Significancia del valor F de la interacción QTL-Ambiente.

<sup>3</sup> $R^2(\%)$  Coeficiente de determinación, considerado como la proporción de la varianza fenotípica del ISE explicada por cada QTL teniendo en cuenta la presencia de otros posibles QTL a través de una regresión múltiple.

<sup>4</sup>a = efecto de aditividad y d = efecto de dominancia del QTL. Efecto aditivo con signo negativo indica que los alelos que disminuyen el valor del ISE fueron aportados por el parental parcialmente tolerante, BLS14.

<sup>5</sup>Acción génica (d/a), SD = sobredominancia y PD = dominancia parcial para el *locus*.

<sup>6</sup>Los estimadores totales del LOD y de la varianza fenotípica explicada fueron obtenidos a partir de una regresión múltiple con todos los posibles QTL afectando el ISE, usando un modelo que incluyó efectos de aditividad y de dominancia. Los marcadores seleccionados como cofactores fueron: phi095; bnlg1811; bnlg2248 y umc1741.

entre phi115 y umc1741 mostró una acción génica parcialmente dominante. La variación fenotípica explicada por este QTL en forma independiente, sin tener en cuenta la presencia de otros posibles QTL fue de 38,6%, mientras que teniendo en cuenta la presencia de otros QTL la variación fenotípica parcial explicada por este QTL fue de 24,0%. Los dos QTL identificados explicaron conjuntamente, a través de una regresión múltiple usando un modelo con efectos genéticos de aditividad y dominancia, el 36,2% de la varianza fenotípica del ISE medio a través de los cuatro ambientes ensayados con un valor de LOD total de 4,98. Los marcadores seleccionados como cofactores fueron: phi095 y bnlg1811 en el grupo de ligamiento 1; bnlg2248 en el grupo de ligamiento 2 y umc1741 en el grupo de ligamiento 8.

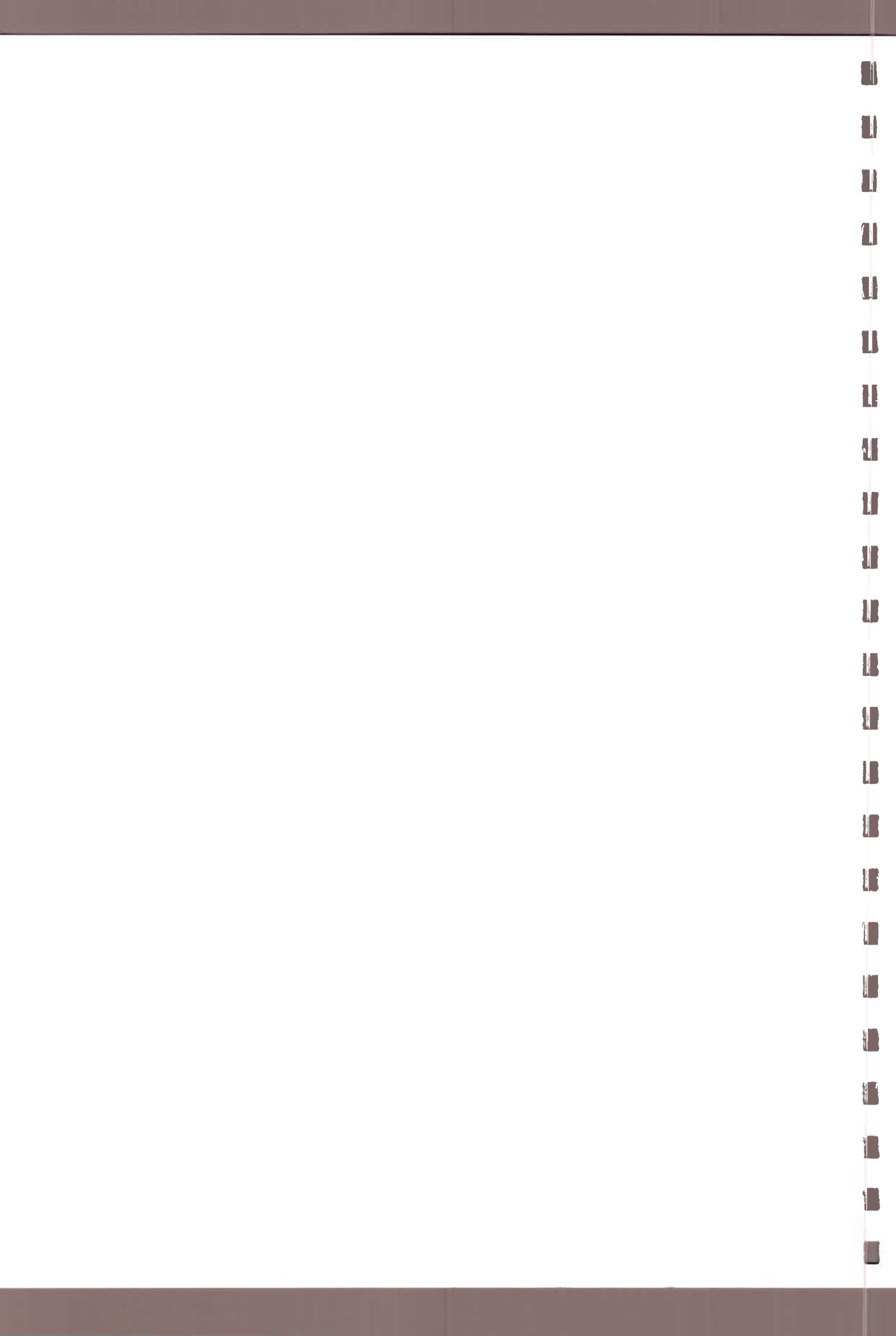
El tipo de acción génica indicó la presencia de efectos genéticos no aditivos en la expresión del carácter tolerancia al MRC, tal como sugieren estudios previos (Presello, 1993; Presello *et al.*, 1995; Di Renzo *et al.*, 2002). Estudios relacionados con otras virosis de maíz (MDMV y WSMV) también indican un tipo de herencia oligogénica y en la mayoría de los casos la acción génica es dominante (McMullen y Louie, 1989; Louie *et al.*, 1991; Xu *et al.*, 1999; Xia *et al.*, 1999), mientras que el modo de acción génica parcialmente dominante o aditivo es raramente informado (Xu *et al.*, 1999). Louie *et al.* (1991) discuten sobre el grado de resistencia conferido por el gen de tolerancia al MDMV, y sugieren que éste depende del parental susceptible y del parental tolerante utilizados y que además puede estar fuertemente influenciado por el ambiente. Coincidentemente, Xu *et al.* (1999) mencionan que la estimación del número de genes y el modo de acción génica de la tolerancia a MDMV y SCMV en maíz depende del parental susceptible, del parental tolerante, y de las condiciones ambientales durante el ensayo de evaluación. Por otra parte, la relación de dominancia estimada para un carácter puede estar influenciada por la escala de evaluación utilizada para describirlo (Falconer y Mackay, 1996). Los QTL identificados en este estudio pueden resultar de gran utilidad en programas de mejoramiento que utilicen cruzamientos entre líneas endocriadas, no requiriendo

do que ambas líneas sean tolerantes debido al modo de acción génica observada.

La heredabilidad estimada puede ser usada como límite superior del valor de la variación fenotípica explicada por el posible QTL identificado (Knapp *et al.*, 1990). La heredabilidad estimada para el ISE a través de los ambientes fue de 0,58, en consecuencia el 62,4% ( $36,2/0,58$ ) de la variación genética fue explicada por estos dos QTL considerados en el modelo de regresión múltiple. Los factores ambientales conjuntamente con diferentes mecanismos biológicos influyen en la expresión de la tolerancia al MRC y por ello en la estimación de la heredabilidad del carácter, como así también de la variación genética explicada por los QTL detectados. El efecto genético aditivo del QTL identificado en el grupo de ligamiento 8 indicó, por el valor negativo de su signo, que los alelos favorables que contribuyen a reducir el valor del ISE provienen del parental BLS14, línea parcialmente tolerante, mientras que en el caso del QTL identificado en el grupo de ligamiento 1 los alelos provienen del padre susceptible (Cuadro 9). Es decir que ambos padres contribuyen en la expresión de la tolerancia al MRC. La distribución fenotípica del ISE medio de las familias  $F_3$  mostró un rango que supera el valor correspondiente a cada uno de los dos parentales (Figura 5). La segregación transgresiva puede estar justificada por el tipo de acción génica de los QTL identificados en el análisis.

El uso de cofactores mejoró notablemente el poder de detección de QTL. Según Lande y Thompson (1990) el poder de detección de QTL es directamente proporcional a la heredabilidad y al tamaño de la muestra por lo que el aumento de la misma podría mejorar aún más la detección de QTL para MRC y sobre todo la estimación de los efectos genéticos de los posibles QTL identificados.

Estudios previos de mapeo de QTL en maíz han mostrado interacciones epistáticas significativas sólo en algunos casos (Stuber *et al.*, 1992; Schön *et al.*, 1994; Berke y Rocheford, 1995). En este estudio se observó que los efectos



epistáticos entre QTL fueron no significativos. Por otra parte, la interacción QTL-ambiente fue altamente significativa ( $p < 0,01$ ) debido seguramente al QTL identificado en el grupo de ligamiento 1 (Cuadro 9). El análisis de QTL mostró que si bien los dos posibles QTL fueron identificados consistentemente en los cuatro ambientes ensayados, los valores de los efectos aditivos y dominantes variaron según el ambiente que se considere. Esto ocurre en contraste con otros estudios de mapeo de QTL para resistencia a virus, donde la interacción QTL-ambiente no ha sido observada (Ming *et al.*, 1997; Welz *et al.*, 1998). La explicación de la significativa interacción QTL-ambiente encontrada en este estudio al igual que en el de Xu *et al.* (1999) podría estar relacionada con diferencias en los patosistemas investigados, el tipo de población de mapeo utilizada, el tipo de infección aplicada, el procedimiento biométrico y el software empleado en el mapeo de QTL. En cada uno de los ambientes individuales los dos posibles QTL identificados presentaron efectos genéticos de tipo no aditivos. Los valores de LOD totales variaron entre 2,87 y 4,42 mientras que la variación fenotípica total explicada por los dos QTL fue entre 16,4% y 31,5% según los ambientes. En el caso de la variación fenotípica parcial explicada por cada QTL varió entre 12,1% y 21,5% para el QTL identificado en el grupo de ligamiento 1 y entre 9,0% y 21,6% para el QTL identificado en el grupo de ligamiento 8 (Cuadro 10).



Cuadro 10. Parámetros relacionados con posibles QTL asociados significativamente con el índice de severidad de enfermedad (ISE) en ambientes individuales del área endémica.

Ambiente	Cromosoma (bin)	Intervalo	LOD	$R^2(\%)^1$	Efectos genéticos <sup>2</sup>		Acción génica <sup>3</sup>
					a	d	
SA99	1 (1.03)	bnlg1866-phi095	-	21,5	19,040	-9,875	PD
	8 (8.03/4)	phi115-umc1741	-	21,6	-12,391	11,112	D
Total <sup>4</sup>			4,42	31,5			
BU99	1 (1.03)	bnlg1866-phi095	-	17,7	5,452	-23,545	SD
	8 (8.03/4)	phi115-umc1741	-	13,5	-10,350	5,264	PD
Total <sup>4</sup>			3,29	20,7			
SA00	1 (1.03)	bnlg1866-phi095	-	13,2	16,111	-13,008	D
	8 (8.03/4)	phi115-umc1741	-	9,0	-6,736	11,568	SD
Total <sup>4</sup>			2,88	16,5			
SA01	1 (1.03)	bnlg1866-phi095	-	12,1	9,511	-9,829	D
	8 (8.03/4)	phi115-umc1741	-	14,7	-7,618	8,285	D
Total <sup>4</sup>			2,87	16,4			

SA99 = Sampacho 1999; BU99 = Bulnes 1999; SA00 = Sampacho 2000; SA01 = Sampacho 2001.

Bins publicados en el mapa de maíz (<http://www.agron.missouri.edu>). La localización es designada por el código X.Y, donde X es el grupo de ligamiento que contiene el bin e Y es la localización del bin dentro del grupo de ligamiento.

<sup>1</sup> $R^2(\%)$  Coeficiente de determinación, considerado como la proporción de la varianza fenotípica parcial del ISE explicada por cada QTL teniendo en cuenta la presencia de otros posibles QTL, a través de una regresión múltiple.

<sup>2</sup>a = efecto de aditividad y d = efecto de dominancia del QTL.

<sup>3</sup>Acción génica (d/a), D: dominancia, SD: sobredominancia y PD: dominancia parcial para el *locus*.

<sup>4</sup>Los estimadores totales del LOD y de la varianza fenotípica explicada fueron obtenidos a partir de una regresión múltiple con todos los posibles QTL afectando el ISE, usando un modelo que incluyó efectos de aditividad y dominancia.



El ANAVA a una vía de clasificación fue realizado para cada uno de los marcadores pertenecientes a los dos grupos de ligamiento significativamente asociados con el ISE en el mapeo por intervalos. Éste análisis permitió identificar siete marcadores que mostraron una asociación significativa ( $p < 0,05$ ) con el ISE a través de los ambientes en los grupos de ligamiento 1 y 8. El ANAVA a una vía de clasificación mostró dos marcadores, bnlg1866 y phi095 en el cromosoma 1, que estuvieron asociados significativamente ( $p < 0,05$ ) con el ISE en tres de los ambientes ensayados. Estos marcadores, además mostraron asociación altamente significativa ( $p < 0,001$ ) con el ISE medio a través de ambientes, explicando el 30% y el 29% de la variación fenotípica observada, respectivamente. Por otra parte los marcadores bnlg439 y umc1169 en el cromosoma 1 que explicaron el 18% y el 16% de la variación observada a través de ambientes, estuvieron asociados significativamente con el ISE sólo en dos de los cuatro ambientes ensayados. El marcador bnlg1811 en el cromosoma 1 y el bnlg240 en el cromosoma 8, estuvieron asociados significativamente con el ISE únicamente en uno de los cuatro ambientes y explicaron el 14% y el 13% de la variación observada en el ISE a través de los ambientes. En el cromosoma 8 el marcador umc1304 explicó el 10% de la variación y solamente estuvo asociado con el ISE a través de los ambientes (Cuadro 11).

El ANAVA a dos vías de clasificación, realizado para los marcadores pertenecientes a los grupos de ligamiento significativamente asociados con el ISE en el análisis a una vía de clasificación mencionado anteriormente, no mostró interacciones epistáticas significativas ( $p > 0,05$ ) entre marcadores.

Cuadro 11. Marcadores moleculares asociados con el índice de severidad de enfermedad (ISE), basado en el ANAVA a una vía de clasificación realizado por ambiente y a través de ambientes del área endémica.

Microsatélite	Cromosoma (bin)	Ambiente									
		SA99		BU99		SA00		SA01		A través de ambientes	
		p	R <sup>2</sup> (%)	p	R <sup>2</sup> (%)	p	R <sup>2</sup> (%)	p	R <sup>2</sup> (%)	p	R <sup>2</sup> (%)
bnlg1866	1 (1.03)	**	23	*	18	**	24	ns	-	***	30
phi095	1 (1.03)	***	30	*	13	**	24	ns	-	***	29
bnlg439	1 (1.03)	ns	-	*	13	*	13	ns	-	*	18
bnlg1811	1 (1.04)	ns	-	ns	-	*	16	ns	-	*	14
umc1169	1 (1.04)	ns	-	*	17	*	12	ns	-	*	16
umc1304	8 (8.02)	ns	-	ns	-	ns	-	ns	-	*	10
bnlg240	8 (8.06)	ns	-	ns	-	ns	-	*	12	*	13

SA99 = Sampacho 1999; BU99 = Bulnes 1999; SA00 = Sampacho 2000; SA01 = Sampacho 2001.

\*, \*\*, \*\*\* significativo con un nivel de significancia de 0,05, 0,01 y 0,001 respectivamente; ns = no significativo.

Bíns publicados en el mapa de maíz (<http://www.agron.missouri.edu>). La localización es designada por el código X.Y, donde X es el grupo de ligamiento que contiene el bin e Y es la localización del bin dentro del grupo de ligamiento.

Si bien en la bibliografía no se encuentran referencias de mapeo de QTL para MRC, varios trabajos mencionan la existencia de factores genéticos involucrados en la resistencia a virus en maíz (Louie *et al.*, 1991; McMullen y Simcox, 1995). Algunos autores informan sobre la presencia de genes que confieren tolerancia a dos tipos de virosis en maíz en los cromosomas 3, 6 y 10 (McMullen y Louie, 1991; McMullen *et al.*, 1994; McMullen y Simcox, 1995; Melchinger *et al.*, 1998 b). Pernet *et al.* (1999) mapearon regiones que proporcionan resistencia a otras virosis del maíz en el cromosoma 1, 2, 3 y 10, e informaron que los QTL presentes en el cromosoma 1 eran de efecto mayor. Por lo tanto, la identificación del QTL en el grupo de ligamiento 1 coincide con lo descrito por estos autores. Por otra parte McMullen y Simcox (1995) informan que la mayoría de los genes o QTL que confieren resistencia a enfermedades e insectos están por grupos presentes en todos los cromosomas de maíz, excepto en el cromosoma 7 y 9, es decir que podríamos sugerir que el QTL ubicado en el grupo de ligamiento 1 está ubicado en un agrupamiento de genes de resistencia a enfermedades en maíz. Por último, es importante mencionar que según revisión realizada de la base de datos de maíz de la Universidad de Missouri en octubre de 2003 (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>) han sido identificados varios genes o QTL que confieren resistencia a enfermedades causadas por hongos, virus e insectos en las regiones genómicas correspondientes a los grupos de ligamiento 1 y 8 donde se identificaron los dos posibles QTL para MRC.

En el INTA de Castelar se está trabajando en el mapeo de QTL para MRC con poblaciones segregantes provenientes de otros cruzamientos. Según Pacheco *et al.* (2003), diferentes QTL relacionados a distintos síntomas de MRC mapean en los grupos de ligamiento 1, 4, 8 y 10, y consideran que los QTL pertenecientes a los cromosomas 1 y 4 indican regiones que permitirían evaluar la factibilidad de la selección asistida por marcadores. Estos resultados son, en parte, similares a los obtenidos en la presente experiencia, en la cual no se trabajó con los síntomas de la enfermedad por separado sino con un ín-



dice de severidad de enfermedad. Esto, justificaría tal vez el mayor número de QTL identificados por el mencionado grupo de trabajo.

El 40% de la variación genética no es explicada por los dos posibles QTL detectados en este estudio, lo que estaría indicando la presencia de otros QTL para MRC que no han sido detectados. Incrementar la densidad del mapa con marcadores SSR con el propósito de mejorar la saturación del genoma y aumentar el poder de detección de QTL, resultaría entonces de gran interés. La expresión del carácter tolerancia al MRC, probablemente resulte de la combinación de diferentes mecanismos biológicos y de distintas condiciones ambientales. Esto podría justificar la baja proporción de la varianza explicada por los QTL detectados en este estudio. En el mejoramiento para resistencia a la enfermedad MRC en maíz, el mapeo de QTL está relacionado con el uso de la selección asistida por marcadores en programas de mejoramiento. La eficiencia relativa de la selección asistida, estimada como  $RE = \sqrt{Q^2/h^2}$  según Lande y Thompson (1990), fue cercana a 1. Si bien estos resultados indican que bajo similar intensidad de selección ambos métodos, selección indirecta y selección directa, tienen la misma eficiencia, la selección asistida por marcadores promete ser superior a la selección fenotípica convencional debido a que los genotipos pueden ser seleccionados en estadios juveniles, no son necesarios experimentos con vectores y además puede ser controlada la variación debido al ambiente. Además, la selección asistida permite seleccionar fuera del área endémica y hacer generaciones adicionales a contra estación. Por lo tanto la aplicación de marcadores moleculares puede mejorar notablemente la eficiencia del mejoramiento no sólo porque los experimentos de campo para la evaluación de materiales son costosos e insumen un gran esfuerzo y trabajo, sino porque el ambiente influye notablemente en la expresión del carácter.

La detección de QTL involucrados en la tolerancia al MRC, los cuales pueden ser usados en un proceso de selección asistida por marcadores moleculares, podría ser mejorada notablemente con la reducción de los efectos ambientales, con una mejor saturación del mapa de ligamiento y con la utilización

de poblaciones segregantes completas así como poblaciones en estados avanzados de homocigosis. Como ya se mencionó, en INTA Castelar están trabajando en el mapeo de QTL para MRC en poblaciones  $F_3$  provenientes de otros cruzamientos diferentes. Por otra parte, INTA junto con la UNRC iniciaron estudios de mapeo de QTL para MRC en líneas endocriadas de maíz ( $F_6$  derivadas de las mismas  $F_3$  utilizadas en este estudio). Los resultados obtenidos hasta el momento, junto con los que se obtendrán de las investigaciones a realizar a partir de ahora, podrán contribuir al desarrollo de eficientes programas de mejoramiento para tolerancia al MRC en maíz.

#### *Análisis discriminante*

El análisis discriminante identificó un conjunto de diez marcadores que permiten discriminar el grupo con ISE bajo (A), menor a 35%, del grupo con ISE alto (B), mayor a 55%. Los diez marcadores pertenecen a seis grupos de ligamiento diferente. Entre estos diez marcadores se encuentran phi095, quien delimita el intervalo del posible QTL identificado en el grupo de ligamiento 1 a través del mapeo por intervalos, y el bnlg1811 utilizado como cofactor en dicho análisis. Entre los diez marcadores seleccionados por discriminar a los grupos de comportamiento extremo, cuatro fueron además asociados significativamente con el ISE en el ANAVA a una vía de clasificación realizado previamente (Cuadro 12).

Cuadro 12. Marcadores moleculares seleccionados por discriminar los grupos definidos previamente por su comportamiento frente a la enfermedad.

Microsatélite (bin)	Cromosoma
phi095 (1.03)	1
bnlg1811 (1.04)	1
bnlg420 (3.05)	3
bnlg1536 (3.09)	3
bnlg1217 (4.05)	4
umc1612 (4.08)	4
pdk1 (6.05)	6
umc1304 (8.02)	8
bnlg240 (8.06)	8
dupssr6 (9.01-9.02)	9

Bins publicados en el mapa de maíz (<http://www.agron.missouri.edu>). La localización es designada por el código X.Y, donde X es el grupo de ligamiento que contiene el bin e Y es la localización del bin dentro del grupo de ligamiento.



Como sólo fueron dos los grupos definidos a priori, grupo con ISE bajo y grupo con ISE alto, se obtuvo una función discriminante canónica ( $F_1$ ):

$$F_1 = 1,50 - 1,47(X_1) + 0,46(X_2) + 1,29(X_3) + 1,24(X_4) - 1,09(X_5) + 1,12(X_6) - 0,69(X_7) - 1,11(X_8) + 1,71(X_9) - 1,14(X_{10})$$

donde  $X_1 = \text{phi095}$ ;  $X_2 = \text{bnlg1811}$ ;  $X_3 = \text{bnlg1217}$ ;  $X_4 = \text{umc1612}$ ;  $X_5 = \text{pdk1}$ ;  $X_6 = \text{bnlg420}$ ;  $X_7 = \text{bnlg1536}$ ;  $X_8 = \text{umc1304}$ ;  $X_9 = \text{bnlg240}$  y  $X_{10} = \text{dupssr6}$ .

La función discriminante con los datos estandarizados con la varianzas comunes ( $F_2$ ) fue:

$$F_2 = -0,87(X_1) + 0,31(X_2) + 0,77(X_3) + 1,07(X_4) - 0,78(X_5) + 1,00(X_6) - 0,59(X_7) - 0,59(X_8) + 1,10(X_9) - 1,10(X_{10})$$

donde  $X_1 = \text{phi095}$ ;  $X_2 = \text{bnlg1811}$ ;  $X_3 = \text{bnlg1217}$ ;  $X_4 = \text{umc1612}$ ;  $X_5 = \text{pdk1}$ ;  $X_6 = \text{bnlg420}$ ;  $X_7 = \text{bnlg1536}$ ;  $X_8 = \text{umc1304}$ ;  $X_9 = \text{bnlg240}$  y  $X_{10} = \text{dupssr6}$ .

La función discriminante con los datos estandarizados indica que los marcadores  $\text{bnlg240}$  ( $X_9$ ),  $\text{umc1612}$  ( $X_4$ ) y  $\text{bnlg420}$  ( $X_6$ ), son los más importantes para la discriminación entre grupos. Los centroides en el espacio discriminante o funciones promedio por grupo, mostraron que el grupo A (tolerantes) recibe un valor menor que el grupo B (susceptibles) en el eje canónico 1 (-1,23 vs. 1,10). Cuando el fenotipo molecular de un genotipo sea 1 con los marcadores  $\text{bnlg240}$ ,  $\text{umc1612}$  y  $\text{bnlg420}$ , dicho genotipo tiene mayor probabilidad de ser clasificado como susceptible debido a que el coeficiente de estos marcadores es positivo. Otro marcador importante en la discriminación entre grupos es  $\text{dupssr6}$ , en donde el fenotipo molecular 1 en un genotipo hace que el mismo sea clasificado como tolerante, debido a que el coeficiente en este caso es negativo.

En la tabla de clasificación cruzada las filas representan el grupo al que pertenece la observación y las columnas el grupo al que es asignada la obser-



vación al usar la función discriminante. Esta tabla señala que los 17 genotipos del grupo A fueron correctamente asignados al grupo A cuando se utilizó la función discriminante, siendo la tasa de error de 0,00%. Por otra parte de los 19 genotipos del grupo B, 17 fueron bien clasificados, siendo la tasa de error de 10,53%. Por lo tanto la tasa de error aparente promedio es del 5,56% (Cuadro 13). Estos resultados sugieren que relativamente pocos marcadores serían capaces de predecir el comportamiento de genotipos o líneas de maíz frente a la enfermedad. La validación de estos resultados con nuevos genotipos proporcionaría una valiosa herramienta práctica a programas de mejoramiento relacionados al MRC en maíz.

El procedimiento utilizado en esta experiencia, así como en trabajos previos (Capdeville *et al.*, 2001), el cual combina datos moleculares y agronómicos en un análisis multivariado, muestra que podría ser una herramienta de gran utilidad en programas de mejoramiento genético de caracteres complejos como la resistencia a enfermedades. Los autores mencionados compararon los resultados del análisis discriminante con los obtenidos en el mapeo de QTL mediante el mapeo por intervalo compuesto y encontraron coincidencias entre los mismos, lo que también puede observarse en la presente experiencia de MRC. Al comparar los marcadores SSR listados en los intervalos de los dos posibles QTL identificados en el mapeo por intervalo compuesto, los cofactores utilizados en dicho análisis, así como los marcadores listados como significativamente asociados a partir del ANAVA a una vía de clasificación, con los marcadores SSR identificados por tener el mayor poder discriminante entre los grupos tolerantes y susceptibles, se encontraron coincidencias similares a la de los autores antes mencionados.

Cuadro 13. Tabla de clasificación cruzada

Grupo	A	B	Total	Tasa de error (%)
A	17	0	17	0,00
B	2	17	19	10,53
Total	19	17	36	5,56

## CONCLUSIONES

Con estos materiales y en las condiciones mencionadas en este estudio se determinó efectivamente el comportamiento fenotípico de poblaciones segregantes para el carácter tolerancia al MRC y se puede concluir que:

La correlación del carácter ISE entre ambientes fue baja indicando un comportamiento inestable de las familias  $F_3$ .

La heredabilidad del carácter ISE mostró valores moderados entre 0,47 y 0,63.

Los caracteres altura de planta y tipo de panoja podrían ser utilizados como predictores del ISE por la alta asociación, moderada heredabilidad y fácil medición.

El análisis de asociación sugiere la presencia de dos posibles QTL, en el grupo de ligamiento 1 y en el grupo de ligamiento 8, explicando el 36,2% y el 62,4% de la varianza fenotípica y genotípica del ISE medio a través de ambientes, respectivamente.

Un conjunto de diez marcadores fue seleccionado por discriminar el grupo con ISE bajo del grupo con ISE alto.

Estos resultados, obtenidos en el área endémica, pueden resultar de gran utilidad y contribuir al desarrollo de eficientes programas de mejoramiento para tolerancia al MRC en maíz.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abdala, G.; Vigliocco, A.; Boito, G. and Lorenzo, E.** 1997. Dwarfism in Mal de Río Cuarto disease - Histology of maize stems and endogenous gibberellin levels. *Biocell* **20**: 211-220.
- Arneodo, J. D.; Guzmán, F. A.; Conci, L. R.; Laguna, I. G. and Truol, G. A.** 2002. Transmission features of Mal de Río Cuarto virus in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. *Annals of Applied Biology* **141**: 195-200.
- Beavis, W. D.; Smith, O. S.; Grant, D. and Fincher, R.** 1994. Identification of quantitative trait loci using a small sample of topcrossed and F<sub>4</sub> progeny from maize. *Crop Science* **34**: 882-896.
- Berke, T. G. and Rocheford, T. R.** 1995. Quantitative trait loci for flowering, plant and ear height, and kernel traits in maize. *Crop Science* **35**: 1542-1549.
- Berke, T. G. and Rocheford, R.** 1999. Quantitative trait loci for tassel traits in maize. *Crop Science* **39**: 1439-1443.
- Bhon, M.; Khairallah, M. M.; González-de-León, D. A.; Hoisington, H. F.; Utz, J. A.; Deutsch, D. C.; Jewell, D. C.; Mihm, J. A. and Melchinger, A. E.** 1996. QTL mapping in tropical maize: I. Genomic regions affecting leaf feeding resistance to sugarcane borer and other traits. *Crop Science* **36**: 1352-1361.
- Bhon, M.; Khairallah, M. M.; González-de-León, D. A.; Hoisington, H. F.; Utz, J. A.; Deutsch, D. C.; Jewell, D. C.; Mihm, J. A. and Melchinger, A. E.** 1997. QTL mapping in tropical maize: II. Comparison of genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. *Crop Science* **37**: 1892-1902.
- Bradfute, O. E.; Teyssandier, E. E.; Marino, E. M. and Dodd, J. L.** 1981. Reolike virus associated with maize Río Cuarto disease in Argentina. *Phytopathology* **71**: 205.
- Capdevielle, F. M.; Aluko, G. K.; Pinson, S. R. M.; Fjelstrom, B.; Balzarini M.; Zhang, N. and Oard, J.** 2001. Application of discriminant analysis using molecular markers for classification of rice lines into sheath blight

- and blast resistance groups: a comparison with QTL interval analysis. *Plant and Animal Genome Meeting*. USA.
- Conti, M.** 1976 a. Epidemiology of maize rough dwarf virus. II. Role of the different generations of vector in virus transmission. *Agriculture Compectus Scientificus* **39**: 149-156.
- Conti, M.** 1976 b. Epidemiology of maize rough dwarf virus. III. Field symptoms, incidence and control. *Maydica* **21**: 165-175.
- Conti, M.** 1984. Epidemiology and vectors of plant reoviruses. *Current Topics in Pathogen-Vector-Host Research*. (Ed. Harris, K. F.). Praeger Publishers. NY. USA. pp. 111-139.
- Darvasi, A. and Soller, M.** 1994. Optimum spacing of genetic markers for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics* **89**: 351-357.
- Di Renzo, M. A.; Bonamico, N. C.; Díaz, D. D.; Salerno, J. C.; Ibañez, M. A. and Gesumaría, J. J.** 2002. Inheritance of resistance to Mal de Río Cuarto (MRC) disease in *Zea mays* (L.). *Journal of Agricultural Science, Cambridge* **139**: 47-53.
- Eyherabide, G.** 1991. Estudio de la resistencia genética del Mal de Río Cuarto mediante el uso de marcadores moleculares. *Taller de Actualización sobre Mal de Río Cuarto*, pp. 51-57. INTA-Pergamino.
- Falconer, D. S. and MacKay, T. F. C.** 1996. *Introduction to Quantitative Genetics*. 4th Edn. Longman. London.
- Ferreira, M. E. e Grattapaglia, D.** 1995. *Introducao ao Uso de Marcadores RAPD e RFLP em Análise Genética*. Brasilia. Brasil. pp. 70.
- Flint-García, S. A.; Jampatong, C.; Darrah, L. L. and McMullen, M. D.** 2003. Quantitative trait locus analysis of stalk strength in four maize populations. *Crop Science* **43**: 13-22.
- Gallais, A.** 1990. Théorie de la sélection en amélioration des plantes. *Masson*, pp. 588.
- Giorda, L.; Ornaghi, J. y Boito, G.** 1993. Identificación de germoplasma de sorgo resistente al Mal de Río Cuarto. *Actas Workshop "Mal de Río Cuarto del Maíz"*, pp. 70-71. Córdoba.



- Grau, C. R.; Radke, V. L. and Gillespie, F. L.** 1982. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Disease* **66**: 506-508.
- Haley, C. S. and Knott, S. A.** 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* **69**: 315-324.
- Haldane, J. B. S.** 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. *Journal of Genetics* **8**: 299-309.
- Hallauer, A. R. and Miranda, J. B.** 1981. *Quantitative Genetics in Maize Breeding*. Iowa State University Press. Ames. USA.
- Harpaz, I.** 1972. *Maize Rough Dwarf. A planthopper virus disease affecting maize, rice, small grains and grasses*. Israel University Press. Tel Aviv. Israel.
- InfoStat.** 2003. Grupo InfoStat. Versión 1.6. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba. Argentina.
- Johnson, R. A. and Wichern, D. W.** 1998. *Applied Multivariate Statistical Analysis*. Fourth Edition. Prentice Hall, Upper Saddle River. NJ.
- Kerns, M. R.; Dudley, J. W. and Rufener, G. K.** 1999. QTL for resistance to common rust smut in maize. *Maydica* **44**: 37-45.
- Khairallah, M. M.; Bhon, M.; Jiang, J. A.; Deutsch, D. C.; Jewell, J. A.; Mihm, A. E. and Melchinger, A. E.** 1998. Molecular mapping of QTL for southwestern corn borer resistance, plant height and flowering in tropical maize. *Plant Breeding* **117**: 309-318.
- Knapp, S. J.; Bridges, W. C. J. and Birkes, D.** 1990. Mapping quantitative trait loci using molecular marker linkage maps. *Theoretical and Applied Genetics* **79**: 583-592.
- Knapp, S. J.; Stroup, W. W. and Ross, W. M.** 1985. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. *Crop Science* **25**: 192-194.
- Laguna, I. G.; Conci, L. R.; Valdivia, B.; Giménez Pecci, M. P.; Altamira, C. y Trumper, E.** 1991. Epidemiología del virus del "Mal de Río Cuarto"



- (Maize Rough Dwarf Virus). *Actas Taller de Actualización sobre Mal de Río Cuarto*, pp. 16-43. Pergamino. Argentina.
- Lande, R. and Thompson, R.** 1990. Efficiency of marker-assisted selection in the improvement of quantitative traits. *Genetics* **124**: 743-756.
- Lander, E. S. and 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.; Daley, M. J.; Lincoln, S. E. and Newburg, L.** 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* **1**: 174-781.
- Lee, M.** 1995. DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy* **55**: 265-344.
- Lenardón, S. L.; March, G. J.; Ornaghi, J. A. y Beviacqua, E. J.** 1985. Virosis del maíz en Argentina. Mal de Río Cuarto. *Jornadas de Actualización Técnica*. Northrup King Semillas S. A, pp. 11. Chacabuco. Bs. As. Argentina.
- Lenardón, S. L.; March, G. J.; Nome, S. F. and Ornaghi, J. A.** 1998. Recent outbreak of "Mal de Río Cuarto" virus on corn in Argentina. *Plant disease* **82**: 448.
- Lincoln, S. E.; Daly, M. J. and Lander, E. S.** 1993. Constructing Genetic Linkage Maps with MAPMAKER/EXP versión 3.0: a tutorial and reference manual. *A Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report*. 3rd Edn. Cambridge.
- Litt, M. and Luty, J. A.** 1989. A hypervariable microsatellite revealed by *in vitro* amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *American Journal Human Genetics* **44**: 398-401.
- Liu, Ben Hui.** 1998. *Statistics genomics: linkage, and QTL analysis*. CRC Press. NY. USA.
- Louie, R.; Findley, W. R.; Knoke, J. K. and McMullen, M. D.** 1991. Genetic basis of resistance in maize dwarf mosaic virus strains. *Crop Science* **31**: 14-18.

- Lübberstedt, T.; Melchinger, A. E.; Schön, C.C.; Utz, H. F. and Klein, D.** 1997. QTL mapping in testcrosses of European flint lines of maize: I. Comparison of different testers for forage yield traits. *Crop Science* **37**: 921-931.
- Maniatis, T.; Frisch, E. F. and Sambrook, J.** 1982. *Molecular cloning: a laboratory manual*. Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring, NY. USA.
- March, G. J.; Balzarini, M.; Ornaghi, J. A.; Beviacqua, J. E. and Marinelli, A.** 1995. Predictive model for "Mal de Río Cuarto" disease intensity. *Plant Disease* **79**: 1051-1053.
- March, G. J.; Lenardón, S. L.; Ornaghi, J. A.; Beviaqua, J. E.; Boito, G.; Giuggia, J. y Marinelli, A.** 1999. Manejo integrado del mal de Río Cuarto. *XXVI Congreso de la Sociedad Mexicana de Fitopatología. X Congreso Latinoamericano de Fitopatología*, pp. 202. Guadalajara. México.
- March, G. J.; Ornaghi, J. A.; Beviacqua, J. E. y Lenardón, S. L.** 1998. *Manual Técnico del mal de Río Cuarto*. Ed. Morgan. Argentina.
- March, G. J.; Ornaghi, J. A.; Beviaqua, J. E. y Marinelli, A.** 1992. Intensidad del Mal de Río Cuarto y pérdidas causadas a la producción en las campañas agrícolas 1981/82 a 1990/91. *III Jornadas Científico - Técnicas de la Facultad de Agronomía y Veterinaria-UNRC*. Río Cuarto, Argentina.
- March, G. J.; Ornaghi, J. A.; Beviaqua, J. E. y Marinelli, A.** 1993. Intensidad del Mal de Río Cuarto y pérdidas causadas a la producción en las campañas agrícolas 1981/82 a 1990/91. *Gaceta Agronómica* **76**: 384-388.
- March, G. J.; Ornaghi, J. A.; Beviaqua, J. E.; Rago, A. and Lenardón, S. L.** 2002. Systemic insecticides for control of *Delphacodes kuscheli* and the Mal de Río Cuarto virus on maize. *International Journal of Pest Management* **48**: 127-132.
- Marinelli, A.; Muñoz, J. O.; Lenardón, S. L. y Martino, C. A.** 1988. Detección de un retrovirus semejante al causal del Mal de Río Cuarto del maíz en



sorgo de alepo (*Sorghum halepense* P.) y mijo (*Panicum milliaceum* L.).  
*II Jornadas de Investigación-UNC*. Córdoba. Argentina.

- Marzachi, C.; Boccardo, G.; Milne, R.; Isogai, M. and Uyeda, I.** 1995. Genome structure and variability of Fijiviruses. *Seminars in Virology* **6**: 103-108.
- McMullen, D. M. and Louie, R.** 1989. The linkage of molecular markers to a gene controlling the symptom response in maize dwarf mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **6**: 309-314.
- McMullen, D. M. and Louie, R.** 1991. Identification of a gene for resistance to wheat streak mosaic virus in maize. *Phytopathology* **81**: 624-627.
- McMullen, D. M.; Jones, M. W.; Simcox, K. D. and Louie, R.** 1994. Three genetic loci control resistance to wheat streak mosaic virus in the maize inbred Pa405. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **7**: 708-712.
- McMullen, M. D. and Simcox, K.** 1995. Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions* **8**: 811-815.
- Melchinger, A. E.** 1990. Use of molecular marker in breeding for oligogenic disease resistance. *Plant Breeding* **104**: 11-19.
- Melchinger, A. E.; Kuntze, L.; Gumber, R. K.; Lübberstedt, T. and Fuchs, E.** 1998 b. Genetic basis of resistance to sugarcane mosaic virus in European maize germplasm. *Theoretical Applied Genetics* **96**: 1151-1161.
- Melchinger, A. E.; Utz, H. F. and Schön, C. C.** 1998 a. Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population sample in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics* **149**: 383-403.
- Milne, R. G.; Boccardo, G.; Dal Bo, E. and Nome, S. F.** 1983. Association of Maize Rough Dwarf Virus with Mal de Río Cuarto in Argentina. *Phytopathology* **73**: 1290-1292.
- Ming, R.; Brewbaker, J. L.; Pratt, R. C.; Musket, T. A. and McMullen, M. D.** 1997. Molecular mapping of a major gene conferring resistance to maize mosaic virus. *Theoretical Applied Genetics* **95**: 271-275.



- Morgante, M. and Olivieri, A. M.** 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *The Plant Journal* **3**: 175-182.
- Mullis, K. and Faloona, F.** 1987. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase catalysed chain reaction. *Methods Enzymol* **55**: 335-350.
- Nome, S. F.; Lenardón, S. L.; Raju, B. C.; Laguna, I. G.; Lowe, S. K. and Docampo, D.** 1981. Association of retrovirus-like particles with "Enfermedad de Río Cuarto" of maize in Argentina. *Journal of Phytopathology* **101**: 7-15.
- Nome, S. F.; Lenardon, S. L.; Muñoz, J. O. y Zumelzu, G.** 1983. *Digitaria sanguinalis* L. Scop. y *Setaria verticillata* L. beauvois reservorios naturales del virus causal del Mal de Río Cuarto del maíz. *RIA XVIII*: 321-328.
- Ornaghi, J. A.; Boito, G. T.; Sánchez, G. y March, G. J.** 1993. Estudio de las poblaciones de *Delphacodes kuscheli* Fennah en avena, trigo y centeno. *Actas Workshop "Mal de Río Cuarto del Maíz"*, pp. 39-40. Córdoba. Argentina.
- Ornaghi, J. A.; Boito, G.; Sánchez, G.; March, G. J. and Beviacqua, J. E.** 1993. Studies on the populations of *Delphacodes kuscheli* Fennah in different years and agricultural areas. *Journal of Genetics and Breeding* **47**: 277-282.
- Ornaghi, J. A.; March, G. J.; Boito, G. T.; Marinelli, A.; Beviacqua, J. E.; Giuggia, J. and Lenardón, S. L.** 1999. Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli* vector of "Mal de Río Cuarto" virus. *Maydica* **44**: 219-223.
- Pacheco, M. G.; Kreff, E. D.; Díaz, D. G.; Robredo, C. G. y Salerno, J. C.** 2003. Detección de factores genéticos que afectan la tolerancia al Mal de Río Cuarto en maíz. *XXXII Congreso Argentino de Genética. Journal of Basic & Applied Genetics XV*: 48.
- Pernet, A.; Hoisington, D.; Franco, J.; Isnard, M.; Jewell, D.; Jiang, C.; Marchand, L.; Reynaud, B.; Glaszmann, J. and González de Leon, D.** 1999. Genetic mapping of maize streak virus resistance from the

- Mascarene source. I. Resistance in line D211 and stability against different virus clones. *Theoretical Applied Genetics* **99**: 524-539.
- Powell, W.; Machray, G. and Provan, J.** 1996. Polymorphism revealed by simple sequence repeats. *Trends Plant Science* **1**: 215-222.
- Presello, D.** 1993. Herencia de la tolerancia a Mal de Río Cuarto en tres líneas endocriadas de maíz. *Workshop Mal de Río Cuarto del Maíz*, pp. 72-73. INTA-IFIVE. Córdoba. Argentina.
- Presello, D.; Celiz, A. y Frutos, E.** 1995. Efectos genéticos asociados con la resistencia a la enfermedad Mal de Río Cuarto en líneas endocriadas de maíz. *Proceedings of III Latin American and XVI Andean Zone of Maize Researchers Meeting*. Tomo I (Eds. Avila, L. G. and Céspedes, L. M.). Fundación S. I. Patiño. Bolivia. pp. 407-413.
- Remes Lenicov, A. M.; Teson, A.; Dagoberto, E. y Huguet, N.** 1985. Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto en maíz. *Gaceta Agropecuaria* **V**: 251-258.
- Saghai-Marouf, M. A.; Soliman, K.; Jorgensen, R. A. and Allard, R. W.** 1984. Ribosomal DNA spacer-length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proceedings of the Natural Academy of Science of USA* **81**: 8014-8018.
- Saiki, R. K.; Scharf, S. J.; Faloona, F.; Mullis, K. B.; Horn, G. T.; Erlich, H. A. and Arnheim, N.** 1985. Enzymatic amplification of beta-globin genomic sequences and restriction site analysis for diagnosis of sickle cell anemia. *Science* **230**: 1350-1354.
- Salerno, J. C.** 1995. Título de propiedad dispuesto por el INASE de la SAGyP del cultivar de maíz denominado BLS14 (art. 22 de la Ley 20.247 y el art. 37 del Decreto 2183/91) bajo el n° 571; expd. 126/92 del 28/03/95.
- Sax, K.** 1923. The association of size differences with seed-coat pattern and pigmentation in *Phaseolus vulgaris*. *Genetics* **8**: 552-560.
- SAS Institute.** 1997. *SAS/STAT software: changes and enhancements through release 6.12*. SAS Institute. Cary. NC.
- Schön, C. C.; Melchinger, A. E.; Boppenmaier, J.; Brunklaus-Jung, E.; Herrmann, R. and Seitzer, J. F.** 1994. RFLP mapping in maize:

- Quantitative trait loci affecting testcross performance of elite european flint lines. *Crop Science* **34**: 378-389.
- Stuber, C. W.** 1995. Mapping and manipulating quantitative traits in maize. *Plants* **11**: 477-481.
- Stuber, C. W.; Edwards, M. D. and Wendel, J. F.** 1987. Molecular-markers facilitated investigations of quantitative trait loci in maize. II Factors influencing yield and its component traits. *Crop Science* **27**: 639-648.
- Stuber, C. W.; Lincoln, S. E.; Wolff, D. W.; Helentjaris, T. and Lander, E. S.** 1992. Identification of genetic factors contributing to heterosis in a hybrid from two elite maize inbred lines using molecular markers. *Genetics* **132**: 823-839.
- Stuber, C. W.; Mull, R. H.; Goodman, N. M.; Shaffer, H. E. and Weir, B. S.** 1980. Allozyme frequency changes associated with selection for increased grain yield in maize (*Zea mays* L.). *Genetics* **95**: 225-236.
- Tanksley, S. D.** 1983. Gene Mapping. In: *Isozymes in Plant Genetics and Breeding*. Part A. (Eds. Tanksley, S. D. and Orton, T. J.). Elsevier Science Publishers B. V. Amsterdam.
- Tanksley, S. D.** 1993. Mapping polygenes. *Annals Review of Genetics* **27**: 205-233.
- Taramino, G. and Tingey, S.** 1996. Simple sequence repeats for germplasm analysis and mapping in maize. *Genome* **39**: 277-287.
- Utz, H. F. and Melchinger, A. E.** 1995. *PLABQTL. A computer program to map QTL*. Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics. Univ. of Hohenheim, D-70593 Stuttgart, Germany.
- Uyeda, I. and Milne, R. G.** 1995. Introduction: genomic organization, diversity and evolution of plant Reoviruses. *Seminars in Virology* **6**: 85-88.
- Vigliocco, A.; Lorenzo, E. and Abdala, G.** 1997. Exogenous IAA and Ba on enation constitution of maize leaves affected by Mal de Río Cuarto Virus in Argentina. *Biocell* **21**: 65-70.
- Xia, X. C.; Melchinger, A. E.; Kuntze, L. and Lübberstedt, T.** 1999. Quantitative trait loci mapping of resistance to sugarcane mosaic virus in maize. *Phytopathology* **89**: 660-667.



- Xu, M. L.; Melchinger, A. E.; Xia, X. C. and Lübberstedt, T.** 1999. High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR, and AFLP markers. *Molecular General Genetics* **261**: 474-581.
- Welz, H. G.; Schechert, A.; Pernet, A.; Pixley, K. V. and Gelger, H. H.** 1998. A gene for resistance to the maize streak virus in the African CIMMYT maize inbred line CML202. *Molecular Breeding* **4**:147-154.

## ANEXOS

### Anexo 1. Solución amortiguadora con CTAB para extracción<sup>1</sup>.

	[Final]	1000 ml
1 M Tris-ClH; pH 7,5	100 mM	100 ml
5 M ClNa	700 mM	140 ml
0,5 M EDTA; pH 8,0	50 mM	100 ml
Agua deionizada		600 ml
CTAB <sup>2</sup> (10%)	2% (v/v)	20 gr

<sup>1</sup> 65 °C

<sup>2</sup> CTAB= bromuro mixto de alquiltrimetil-amonio

### Anexo 2. Soluciones de lavado.

#### Lavado 1: 76% de EtOH; 0,2 M NaOAc

Solución concentrada	500 ml
EtOH absoluto	380 ml
2,5 M NaOAc	40 ml
Agua deionizada	80 ml

#### Lavado 2: 76% de EtOH; 10 mM NH<sub>4</sub>OAc

Solución concentrada	500 ml
EtOH absoluto	380 ml
1 M NH <sub>4</sub> OAc	5 ml
Agua deionizada	115 ml

#### Lavado 3: 76% de EtOH

Anexo 3. Buffer TE.

Componentes	Volumen
1 M Tris-ClH; pH 8,0	500 $\mu$ l
0,5 M EDTA	100 $\mu$ l
Agua deionizada	50 ml

Anexo 4. Buffer Tris-borato-EDTA; pH 8 (TBE).

Stock 1000 ml	[Final]
10X: 108 g Tris 0,9 M	1X: 0,090 M Tris-borato
55 g Ácido bórico 0,9 M	0,002 M EDTA
40 ml 0,5 M EDTA; pH 8,0	0,5X: 0,045 M Tris-borato
	0,001 M EDTA

Anexo 5. Buffer de carga 5X.

Componentes	[Final]
Glicerol	50% (v/v)
Azul de bromofenol	0,1% (p/v)
Ficoll 400	2% (p/v)
EDTA	100 mM



Anexo 6. Programas de amplificación por PCR utilizados.

Programa 1

94 °C	2 min		
94 °C	30 s		
65 °C	1 min ( $\Delta t^{\circ} -1^{\circ}\text{C}$ por ciclo)	}	10 ciclos
72 °C	2 min		
94 °C	30 s		
55 °C	1 min	}	25 ciclos
72 °C	2 min		
72 °C	5 min		
100 °C	temperatura de tapa		

Programa 2

94 °C	2 min		
94 °C	30 s		
66 °C	1 min ( $\Delta t^{\circ} -1^{\circ}\text{C}$ por ciclo)	}	16 ciclos
72 °C	2 min		
94 °C	30 s		
50 °C	1 min	}	25 ciclos
72 °C	2 min		
72 °C	5 min		
100 °C	temperatura de tapa		

Programa 3

94 °C	2 min		
94 °C	30 s		
60 °C	1 min ( $\Delta t^{\circ} -1^{\circ}\text{C}$ por ciclo)	}	7 ciclos
72 °C	2 min		
94 °C	30 s		
53 °C	1 min	}	25 ciclos
72 °C	2 min		
72 °C	5 min		
100 °C	temperatura de tapa		

Anexo 7. Análisis de varianza del índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC en 227 familias F<sub>3</sub> en ambientes individuales del área endémica.

Fuente de Variación	GL	SA99 (CM)		GL	BU99 (CM)		GL	SA00 (CM)		GL	SA01 (CM)
Bloque	1	79,6646 ns		1	22,4867 ns		1	167,1191 ns		1	250,1516 ns
Genotipo	226	736,0652 ***		221 <sup>1</sup>	614,9866 ***		225 <sup>1</sup>	642,4249 ***		224 <sup>1</sup>	693,7408 ***
Error	224	390,4342		221	269,4994		224	325,8945		226	259,0966

GL = Grados de libertad.

SA99 = Sampacho 1999; BU99 = Bulnes 1999; SA00 = Sampacho 2000; SA01 = Sampacho 2001.

CM = Cuadrados medios.

\*\*\* Significativo con un nivel de significancia de 0,001; ns, no significativo.

<sup>1</sup>Datos desbalanceados debido a la pérdida de observaciones.





Anexo 8. Análisis de varianza del índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC y de caracteres no considerados en el ISE en 227 familias F<sub>3</sub> a través de ambientes del área endémica.

Fuente de Variación	GL	ISE (CM)		GL	Altura de planta (CM)		GL	Superficie de hoja (CM)		GL	Borde de hoja (CM)		GL	Longitud de hoja (CM)		GL	Tipo de panoja (CM)
Bloque	1	68,7081 ns	1	0,0006 ns	1	0,0000 ns	1	0,0003 ns	1	0,0270 ns	1	0,3626 ns					
Ambiente (A)	3	99372,8713 ***	2	37,7227 ***	1	0,3359 ***	2	2,6932 ***	2	1,7988 ***	2	46,6882 ***					
Genotipo (G)	226	1195,8992 ***	226	0,1501 ***	226	0,0099 ***	226	0,0102 ***	226	0,0471	226	0,4883 ***					
G-A	670	498,4562 ***	446	0,0694 ***	224	0,0105 ***	445	0,0088 ***	445	0,0553	446	0,2910 ***					
Error	898	310,7167	671	0,0353	449	0,0020	671	0,0066	671	0,0298	671	0,2107					

GL = Grados de libertad.

CM = Cuadrados medios.

\*\*\* Significativo con un nivel de significancia de 0,001; ns, no significativo.



Anexo 9. Juegos de iniciadores que revelaron bandas nítidas bajo los tres programas de amplificación por PCR ensayados.

Microsatélite (bin)	Fenotipo molecular de las líneas parentales
bnlg1014 (1.01)	Monomórfico
umc1177 (1.01)	Polimórfico
bnlg1083 (1.02)	Polimórfico
bnlg1007 (1.02)	Monomórfico
bnlg1627 (1.02)	Polimórfico
bnlg176 (1.02)	Monomórfico
bnlg439 (1.03)	Polimórfico
bnlg1866 (1.03)	Polimórfico
phi095 (1.03)	Polimórfico
umc1021 (1.03)	Polimórfico
umc1044 (1.03)	Monomórfico
umc1169 (1.04)	Polimórfico
bnlg1811 (1.04)	Polimórfico
bnlg1016 (1.04)	Monomórfico
bnlg421 (1.06)	Monomórfico
bnlg1025 (1.07)	Monomórfico
bnlg1671 (1.10)	Monomórfico
bnlg1055 (1.11)	Monomórfico
umc1220 (1.11)	Polimórfico
umc1542 (2.02)	Polimórfico
bnlg2248 (2.03)	Polimórfico
bnlg108 (2.04)	Monomórfico
dupssr21 (2.05/6)	Polimórfico
bnlg121 (2.06)	Polimórfico
dupssr25 (2.08)	Polimórfico
umc1551 (2.09)	Monomórfico
phi453121 (3.00)	Monomórfico
umc1394 (3.01)	Polimórfico

phi049 (3.01)	Monomórfico
phi099 (3.02)	Monomórfico
bnlg1325 (3.03)	Polimórfico
bnlg1647 (3.04)	Polimórfico
phi029 (3.04)	Monomórfico
phi036 (3.04)	Monomórfico
phi053 (3.05)	Monomórfico
phi073 (3.05)	Polimórfico
bnlg420 (3.05)	Polimórfico
dupssr23 (3.06)	Polimórfico
bnlg1601 (3.06)	Polimórfico
bnlg197 (3.07)	Polimórfico
mmc0251 (3.08)	Monomórfico
bnlg1536 (3.09)	Polimórfico
bnlg1370 (4.00)	Monomórfico
umc1022 (4.01)	Monomórfico
nc004 (4.03)	Polimórfico
umc1509 (4.02)	Monomórfico
bnlg1126 (4.03)	Monomórfico
phi021 (4.03)	Polimórfico
gpc1 (4.04)	Monomórfico
umc1088 (4.05)	Polimórfico
bnlg1217 (4.05)	Polimórfico
nc005 (4.05)	Polimórfico
umc1362 (4.05)	Monomórfico
bnlg1741 (4.06)	Polimórfico
dupssr34 (4.06/7)	Polimórfico
bnlg1189 (4.07)	Polimórfico
umc1612 (4.08)	Polimórfico
bnlg589 (4.11)	Polimórfico
phi076 (4.11)	Polimórfico
bnlg143 (5.01)	Monomórfico



bnlg565 (5.02)	Monomórfico
umc1475 (5.03)	Monomórfico
dupssr10 (5.04)	Polimórfico
bnlg2323 (5.04)	Monomórfico
umc1524 (5.06)	Polimórfico
phi126 (6.00)	Polimórfico
bnlg1600 (6.00)	Polimórfico
phi075 (6.00)	Monomórfico
bnlg1188 (6.01)	Monomórfico
bnlg391 (6.01)	Polimórfico
bnlg107 (6.01)	Polimórfico
phi077 (6.01)	Monomórfico
nc009 (6.04)	Polimórfico
nc013 (6.05)	Polimórfico
phi129 (6.05)	Monomórfico
pdk1 (6.05)	Polimórfico
dupssr15 (6.06)	Monomórfico
phi123 (6.07)	Polimórfico
tlk1 (6.07)	Monomórfico
umc1066 (7.01)	Monomórfico
bnlg1070 (7.03)	Monomórfico
umc1456 (7.03)	Monomórfico
dupssr9 (7.03/4)	Monomórfico
bnlg2259 (7.04)	Monomórfico
bnlg469 (7.05)	Monomórfico
umc1406 (7.05)	Monomórfico
phi116 (7.06)	Monomórfico
phi051 (7.06)	Monomórfico
bnlg1189 (7.07)	Monomórfico
umc1304 (8.02)	Polimórfico
bnlg666 (8.02)	Monomórfico
phi115 (8.03)	Polimórfico

umc1470 (8.03)	Monomórfico
dupssr3 (8.03)	Monomórfico
umc1741 (8.03/4)	Polimórfico
bnlg240 (8.06)	Polimórfico
phi015 (8.08)	Polimórfico
bnlg1056 (8.08)	Polimórfico
phi028 (9.01)	Polimórfico
dupssr6 (9.01-9.02)	Polimórfico
dupssr19 (9.02)	Polimórfico
bnlg1012 (9.05)	Monomórfico
phi040 (9.05)	Monomórfico
bnlg279 (9.07)	Polimórfico
bnlg128 (9.07)	Polimórfico
umc1277 (9.08)	Polimórfico
umc1152 (10.02)	Polimórfico
phi063 (10.02)	Polimórfico
phi052 (10.02)	Monomórfico
bnlg640 (10.03)	Monomórfico
bnlg137 (10.05)	Monomórfico
umc1045 (10.06)	Monomórfico
umc1556 (10.07)	Polimórfico

---

Bins publicados en el mapa de maíz (<http://www.agron.missouri.edu>). La localización es designada por el código X.Y, donde X es el grupo de ligamiento que contiene el bin e Y es la localización del bin dentro del grupo de ligamiento.



Anexo 10. Fenotipo molecular observado, con los 59 microsatélites polimórficos, en las plantas F<sub>2</sub> correspondientes a las familias F<sub>3</sub> con comportamiento extremo frente a la virosis, en las líneas parentales y en el híbrido.

Microsatélite (bin)	Fenotipo molecular de las 17 plantas F <sub>2</sub> cuyas F <sub>3</sub> correspondientes son tolerantes al MRC <sup>1</sup>
umc1177 (1.01)	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 0 1
bnlg1083 (1.02)	2 1 2 2 2 2 0 1 2 2 2 2 1 1 1 0 1
bnlg1627 (1.02)	- 2 0 1 1 2 1 1 1 1 2 2 2 0 0 1 2
bnlg439 (1.03)	2 2 2 2 1 2 2 1 1 1 2 1 0 0 2 1 0
bnlg1866 (1.03)	2 2 2 2 0 2 2 0 0 0 2 0 0 1 2 0 2
phi095 (1.03)	2 2 2 - 2 2 2 0 0 2 2 2 2 1 2 2 2
umc1021 (1.03)	1 1 1 - 2 1 1 0 0 2 1 1 1 1 1 1 1
umc1169 (1.04)	2 2 2 - 2 2 2 0 0 2 2 1 0 0 2 2 0
bnlg1811 (1.04)	0 0 2 - 1 2 2 1 1 0 0 1 1 1 0 1 2
umc1220 (1.11)	1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 0 1 1 2 2
umc1542 (2.02)	0 2 0 2 2 0 2 2 2 2 0 2 2 1 2 0 0
bnlg2248 (2.03)	0 0 0 0 0 0 - 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0
dupssr21 (2.05/6)	2 2 0 2 0 2 1 - - - 2 1 0 2 0 - 2
bnlg121 (2.06)	1 2 1 1 1 1 - 0 1 1 1 0 1 1 - 0 2
dupssr25 (2.08)	1 2 1 1 0 1 1 0 0 2 1 2 2 1 - 1 1
umc1394 (3.01)	- 2 1 1 0 0 0 0 0 0 2 2 0 1 0 0 0
bnlg1325 (3.03)	0 2 1 2 2 0 2 2 2 0 2 1 2 1 2 2 0
bnlg1647 (3.04)	0 2 2 2 2 0 1 1 2 0 2 2 1 2 0 2 0
phi073 (3.05)	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1

bnlg420 (3.05)	0 2 0 - 0 0 2 2 2 0 2 2 2 1 0 2 0
dupp23 (3.06)	1 1 1 - 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1
bnlg1601 (3.06)	2 2 2 2 1 - 2 2 2 1 2 2 1 0 2 2 2
bnlg197 (3.07)	2 2 1 2 2 2 2 0 2 2 0 0 1 0 2 0 1
bnlg1536 (3.09)	1 2 2 - 2 1 1 0 2 2 0 1 - 2 0 2 2
phi021 (4.03)	1 1 1 1 0 1 1 2 2 2 1 1 0 1 1 2 0
umc1088 (4.05)	2 2 2 1 1 1 1 2 - 2 1 2 2 2 2 2 2
bnlg1217 (4.05)	0 0 0 - 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0
nc005 (4.05)	2 2 2 1 1 1 1 2 - 2 1 2 2 2 2 2 2
bnlg1741 (4.06)	- 2 0 1 2 1 2 2 0 2 2 2 2 - - 2 2
dupssr34 (4.06/7)	2 2 0 2 2 2 0 0 0 1 0 1 2 2 2 2 2
umc1612 (4.08)	2 0 1 - 2 2 1 1 1 2 2 0 0 2 2 2 0
bnlg589 (4.11)	0 2 2 1 2 1 - 2 - 2 1 1 0 2 2 2 2
phi076 (4.11)	- 2 2 1 2 1 1 1 0 2 1 2 1 2 1 1 1
dupssr10(5.04)	0 1 2 - 0 2 2 2 0 0 - 1 1 1 1 0 0
umc1524 (5.06)	2 1 2 1 2 2 2 1 1 2 1 2 0 1 1 1 0
phi126 (6.00)	- 0 0 - 1 0 0 2 1 2 0 0 0 0 0 0 0
bnlg1600 (6.00)	0 0 2 2 2 2 2 2 2 1 1 2 0 2 2 0 0
bnlg391 (6.01)	0 0 1 - 2 0 1 1 1 1 2 2 0 2 2 0 0
bnlg107 (6.01)	0 0 1 - 2 0 2 2 1 1 1 2 0 2 2 0 0
nc009 (6.04)	1 0 1 1 1 0 2 2 1 0 1 2 1 2 0 0 1
nco13 (6.05)	0 0 - - - 0 2 - - - - 0 - 0 - - -
pdk1 (6.05)	0 1 0 1 0 1 1 2 2 0 1 1 0 0 1 2 0
phi123 (6.07)	1 2 2 2 2 2 1 1 2 1 2 2 2 1 2 2 2
umc1304 (8.02)	0 0 0 - 1 0 0 1 1 1 1 0 1 - 1 1 1



phi115 (8.03)	1 0 1 - 1 2 2 2 1 0 2 2 0 1 2 1 2
umc1741 (8.03/4)	0 1 0 2 0 2 2 2 0 1 2 2 0 0 2 0 2
bnlg240 (8.06)	0 0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 1 2
phi015 (8.08)	1 - 0 1 - 2 2 2 2 2 - 0 2 0 - 2 2
bnlg1056 (8.08)	1 0 0 1 2 2 2 1 - 2 2 0 2 2 1 2 0
phi028 (9.01)	2 2 1 2 2 2 2 2 0 1 2 1 1 2 2 2 1
dupssr6 (9.01/2)	2 0 0 2 1 2 2 - 2 0 2 0 0 2 2 2 2
dupssr19 (9.02)	0 1 1 2 2 0 2 1 1 1 2 1 2 1 1 - 2
bnlg279 (9.07)	2 1 2 2 - 2 0 0 0 0 1 0 0 1 0 0 0
bnlg128 (9.07)	2 2 2 2 0 2 0 0 0 0 1 0 0 2 - 0 0
umc1277 (9.08)	0 0 0 0 0 0 0 2 2 2 0 0 0 0 0 0 0
umc1152 (10.01)	1 1 1 1 1 1 1 1 0 2 1 1 0 1 1 2 0
phi063 (10.02)	- 1 1 1 2 1 1 1 0 0 1 1 0 - 1 0 0
umc1556 (10.07)	1 2 2 2 1 2 0 0 1 0 2 1 0 2 2 0 2

Microsatélite (bins)	Fenotipo molecular de las 19 plantas F <sub>2</sub> cuyas F <sub>3</sub> correspondientes fueron susceptibles al MRC <sup>1</sup>	Fenotipo molecular <sup>2</sup>		
		Mo17	BLS14	F <sub>1</sub>
umc1177 (1.01)	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0	0	1	2
bnlg1083 (1.02)	0 1 2 0 1 2 1 1 2 0 1 0 2 0 2 0 2 1 0	0	1	2
bnlg1627 (1.02)	0 0 2 0 0 2 0 0 2 2 2 0 0 1 2 0 2 0 1	0	1	2
bnlg439 (1.03)	0 0 - 0 0 2 0 1 2 0 0 0 2 1 0 0 2 0 1	1	0	2



bnlg1866 (1.03)	1 1 2 1 1 2 1 0 2 1 1 1 2 0 1 1 1 1 0 0	1	2
phi095 (1.03)	1 1 2 1 1 2 1 2 2 1 1 1 2 2 1 1 1 1 2 0	1	2
umc1021 (1.03)	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 1 1 1	0	2
umc1169 (1.04)	0 0 2 2 0 2 0 1 2 0 0 0 2 1 0 0 0 0 1 1	0	2
bnlg1811 (1.04)	1 1 2 0 1 2 1 1 2 1 1 1 1 1 2 1 2 1 1 1	0	2
umc1220 (1.11)	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1 1 2 1	0	2
umc1542 (2.02)	2 0 2 2 2 1 2 2 2 2 2 1 2 2 2 1 2 2 2 1	0	2
bnlg2248 (2.03)	0 2 0 0 0 2 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 2 0	1	2
dupssr21 (2.05/6)	2 1 1 0 2 2 2 2 2 0 1 2 2 - 2 2 1 1 1 0	1	2
bnlg121 (2.06)	1 0 1 1 1 1 2 1 2 1 0 1 1 1 1 1 0 0 - 1	0	2
dupssr25 (2.08)	1 1 1 1 1 1 0 1 - 1 1 1 1 2 1 1 1 1 2 1	0	2
umc1394 (3.01)	2 2 2 1 2 0 2 0 0 1 1 1 2 - 2 2 2 - 0 0	1	2
bnlg1325 (3.03)	2 - 2 1 0 0 2 0 1 1 1 1 1 - 2 1 0 1 0 0	1	2
bnlg1647 (3.04)	2 2 2 2 2 0 0 0 1 2 1 1 1 2 1 1 0 2 0 0	1	2
phi073 (3.05)	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1	0	2
bnlg420 (3.05)	2 1 2 0 2 2 0 2 1 2 1 1 2 2 1 1 0 0 1 0	1	2
dupp23 (3.06)	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 1	0	2
bnlg1601 (3.06)	2 0 1 2 2 1 1 2 0 0 0 2 2 2 0 0 2 2 0 1	0	2
bnlg197 (3.07)	2 2 2 2 2 2 1 0 0 2 0 0 2 2 0 2 0 2 2 1	0	2
bnlg1536 (3.09)	2 2 0 2 0 2 1 0 1 2 1 0 1 2 2 2 0 0 0 1	0	2
phi021 (4.03)	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 2 1 1 2 1 0 1	0	2
umc1088 (4.05)	1 1 2 0 1 2 2 1 1 2 2 2 0 2 0 0 2 0 1 0	1	2
bnlg1217 (4.05)	0 0 0 1 0 0 0 0 0 0 0 0 0 - 0 2 1 0 1 0	1	2
nc005 (4.05)	1 1 2 0 - 2 2 1 - 2 2 2 0 2 0 0 2 0 1 1	0	2
bnlg1741 (4.06)	2 2 2 2 1 2 2 1 1 2 2 2 0 2 0 0 2 0 2 0	1	2



dupssr34 (4.06/7)	2 2 0 2 2 1 2 2 0 2 2 0 2 2 1 1 0 1 2	1	0	2
umc1612 (4.08)	2 2 1 2 0 0 2 2 1 2 2 1 2 2 0 0 1 0 2	1	0	2
bnlg589 (4.11)	2 2 0 2 1 2 2 2 0 2 0 0 2 2 1 1 1 2 2	1	0	2
phi076 (4.11)	1 2 2 1 1 1 2 2 2 0 0 0 1 1 1 1 1 1 1	1	0	2
dupssr10(5.04)	2 2 0 0 2 0 0 1 1 2 0 2 2 2 2 1 - 0 2	1	0	2
umc1524 (5.06)	1 2 2 0 2 2 2 1 1 0 2 1 1 0 2 1 1 0 0	1	0	2
phi126 (6.00)	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 1 0 0 2 0 1	0	1	2
bnlg1600 (6.00)	1 2 2 2 0 1 0 0 2 2 0 2 2 1 2 2 0 2 2	0	1	2
bnlg391 (6.01)	2 1 2 2 0 1 0 0 2 2 0 2 2 1 2 1 1 2 2	0	1	2
bnlg107 (6.01)	1 2 2 2 0 1 0 0 2 2 0 2 2 1 2 2 2 2 2	0	1	2
nc009 (6.04)	2 2 2 2 0 2 0 0 2 1 0 1 2 - 2 2 1 2 1	1	0	2
nco13 (6.05)	- 0 0 - 0 2 0 0 0 - 0 - - - - - - - -	0	1	2
pdk1 (6.05)	1 1 1 1 0 0 0 - 0 1 0 1 1 0 - 1 0 1 0	1	0	2
phi123 (6.07)	2 2 2 1 1 1 1 1 2 1 2 2 2 1 2 1 2 1 1	1	0	2
umc1304 (8.02)	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 0 0 1 1 1	1	0	2
phi115 (8.03)	0 1 0 2 2 0 1 0 2 1 1 2 2 2 2 0 2 2 2	0	1	2
umc1741 (8.03/4)	1 0 1 2 2 1 2 1 2 0 2 2 2 2 2 1 0 2 2	1	0	2
bnlg240 (8.06)	0 0 1 0 0 1 1 0 0 0 0 2 0 1 1 1 2 1 1	0	1	2
phi015 (8.08)	2 1 2 1 0 2 0 2 2 0 2 0 2 0 1 - - - 2	1	0	2
bnlg1056 (8.08)	2 1 2 1 0 2 0 2 2 0 2 2 2 2 1 1 2 0 1	1	0	2
phi028 (9.01)	2 1 1 1 1 2 1 2 1 1 0 2 2 2 2 1 2 1 2	1	0	2
dupssr6 (9.01/2)	2 0 0 0 0 2 0 0 0 0 1 2 2 2 2 0 2 0 2	0	1	2
dupssr19 (9.02)	2 1 2 1 2 2 1 1 1 1 2 2 - 1 1 1 2 1 1	1	0	2
bnlg279 (9.07)	2 0 0 1 1 2 1 1 1 1 0 1 0 - 1 0 1 1 -	0	1	2
bnlg128 (9.07)	2 0 0 2 2 2 2 2 2 1 0 2 0 - 2 0 1 1 -	0	1	2



umc1277 (9.08)	0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 0 2 0 0 2 2 0 0 1 2
umc1152 (10.01)	1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 1 0 1 1 2 1 1 1 0 2
phi063 (10.02)	1 1 - 1 - 0 - 1 - 1 - 1 1 0 1 1 0 1 0 1 0 2
umc1556 (10.07)	1 2 2 2 0 1 1 1 1 2 1 0 2 2 2 2 1 2 1 0 1 2

Bins publicados en el mapa de maíz (<http://www.agron.missouri.edu>). La localización es designada por el código X.Y, donde X es el grupo de ligamiento que contiene el bin e Y es la localización del bin dentro del grupo de ligamiento.

<sup>1</sup>1 = fenotipo homocigota banda rápida; 0 = fenotipo homocigota banda lenta; 2 = fenotipo heterocigota y (-) = dato faltante.

<sup>2</sup>Mo17 = parental susceptible; BLS14 = parental parcialmente tolerante y F<sub>1</sub> = híbrido entre Mo17 y BLS14.



Anexo 11. Archivo utilizado para el análisis con el programa PLABQTL.

c ISEMEDIO

36 59 1 9 1 0 0 2 1

0,58

\*phi073 AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAHAA  
\*dupssr9 HHBHHHBBBABAHHHHHHHBHHAHHBHHBHHAABAH  
\*phi115 BAB-BHHHBAHHABHBHABAHHABAHBBHHHHAHHH  
\*phi015 A-BA-HHHHH-BHB-HHHAHABHBHHBHBHBA---H  
\*nc009 ABAAABHHABAHAHBBAHHHHBHBHBHABAH-HHAHA  
\*dupssr6 HAAHBHH-HAHAHHHHHAAAAHAAAABHHHHAHAAH  
\*pdk1 BABABAHHBAABBAHBAAAABBB-BABAAB-ABAB  
\*dupssr25 AHAABAABBHAHHA-AAAAAABA-AAAAHAAAAH  
\*nc004 AAAABAHHHAABAABHBAAAAAAAAAAAAAHAABAB  
\*bnlg439 HHHHAHHAAAHABBHABBB-BBHBABBBBHABHBA  
\*bnlg197 HHAHHHHBHHBBABHBAHHHHHHABBHBBHBBHBBH  
\*phi076 -HHAHAAABHAAHAAAHAAAHHHBBBAAAAAAA  
\*phi063 -AAAHAAABBAAB-ABBAA-A-B-A-A-AABAABAB  
\*umc1152 AAAAAAABHAABAABHBAAAAAAAAAAAAAABAHAHA  
\*umc1277 AAAAAAHHHAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAHAHHA  
\*umc1304 BBB-ABBAAAABA-AAAAAAAAAAAAAABABBAAA  
\*bnlg2248 AAAAAA-ABAAAAAAAAAHAAHAAAAAAAAAABAH  
\*umc1612 HBA-HHAAAHBBHHHBHHAHBBHHAHHAHHBBABH  
\*bnlg240 AAAABAAAAAAAAABABHAABAABBAAAAHABBBHBB  
\*bnlg391 AAB-HABBBBHHAHHAABHHAABAANHAHNBHBBHH  
\*bnlg107 AAB-HAHHBBBHAAHHAABHHHABAANHAHNBHHHHH  
\*umc1524 HAHANHHAAHABAAABAHNBHHHAABHAABHAABB  
\*dupssr19 BAAHNBHAAAHAAHAA-HHAHAAHAAAAHH-AAAAHA  
\*nco13 AA---AH----A-A----AA-AHAAA-A-----  
\*umc1556 BHHHBHAABAABAHBAHHAHBBHHABBBBHBAHHHHBHB  
\*dupssr10 BAH-BHHHBB-AAAABBBHBBHBBAAHBBHHHA-BH  
\*bnlg1083 HBHHHHABHHHHBBBABABHABHBBHABAHAAHBA

\*phi126 -AA-BAAHBHAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAABAAB  
 \*bnlg420 AHA-AAHHHAHHHBAHAHBHAHHAHBHBHBBHHBBAAB  
 \*umc1169 HHH-HHHBVBHABVHVBVHVBHVAHVBBHABBBBA  
 \*bnlg1647 AHHHHABVHAHHVHAHAHHHHHAAABHBBVBHBAHA  
 \*bnlg1536 AHH-HAABVHVA-HVHHHHVBHVAHABAHAHHHBBB  
 \*bnlg1217 BBB-BBBBBBBBBBBBBBBBBBABBVBVVVVV-BHABAB  
 \*dupssr23 AAA-AAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAHAA  
 \*bnlg1811 BVH-AHHAABBAABAHAHVAHAHAHAHAHAHAHA  
 \*bnlg1601 HHHHA-HHHAHHABHHHHBAHHAHVBVHVVHVVHVB  
 \*umc1021 AAA-HAABVHAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 \*phi021 AAAABAHHHAABAABAAAAAAAAAAAAAAAAAAHAB  
 \*bnlg1741 -HABVHHAHHHH--HHHHHHVBHVBHVVHVAHAHAH  
 \*nc005 HHHBBBBH-HVHHHHHHVBVA-HHV-HHHHAHAHAB  
 \*umc1088 HHHBBBBH-HVHHHHHHVBHABHVVHVVHVVHVAHAHAB  
 \*umc1542 VBHVVHVVHVVHVAHVBVHVVHVVHVVHVVHVVHVVHVVH  
 \*bnlg589 VHHHAH-H-HAABVHHHHHVBHVVHVVHVVHVVHVAHH  
 \*umc1220 AAAAAAAAAHABAHHAAAAAAAAAAAAAAAAAAHAAH  
 \*bnlg1056 AVBAHHHA-HHVHHAHVHAHABVHVVHVVHVVHVAHVA  
 \*phi028 HHAHHHHHVAHAHHHHAHAHAHAHAAHVAHVVHVVHVAH  
 \*umc1741 VAVHVVHVVHVAHVVHVAHVAHVAHVAHVVHVVHVVHVVH  
 \*phi123 AHHHHHAHAHHHHAHHHHHAAAAAAAAHVVHVAHVAHAA  
 \*bnlg1600 AHHHHHHHVBHVAHVAHVAHVAHVAHVAHVAHVAHVAH  
 \*bnlg1866 HHHHAHHAHAHAAHVAHVVHVVHVAHVVHVVHVAHVAH  
 \*bnlg1627 -HABVHVVVBHVAHVAHVAHVAHVAHVAHVAHVAHVAH  
 \*umc1177 AAAAAAAAAAABAABAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA  
 \*bnlg128 HHHHAHAAAABAHA-AAHAAHHHHHHVAHA-HABV-  
 \*dupssr21 HHAHVAH---HVAHA-HHVBAHHHHHABHH-HHVVV  
 \*bnlg279 HVHH-HAAAABAABAHAHAAHVVHVVVBABA-BABV-  
 \*bnlg1325 AVHVAHVVHVAHVVHVAH-HVAHVVVVVV-HVABA  
 \*bnlg121 AHAAAA-BAAABA-BHABAHAHVAHVAHVAHVAHVAHVAH  
 \*umc1394 -HVBAAAAHVAHVAHVAHVAHVAHVAHVAHVAHVAHVAH  
 \*phi095 HHH-HHHAAHHHHHVBHVVHVVHVVHVVHVVHVVHVVH



\*ISEMEDIO 13 22 21 26 26 25 24 26 28 29 27 31 30 33 30 31 34 58 48 59 63  
60 61 60 60 63 69 56 64 70 69 76 67 69 82 80

\*chrom1 10

35 59,9 44 7,5 52 19,2 37 65,2 51 345,4 27 51,2 30 15,9 10 6,1 50 13,8 59

\*chrom2 4

54 42,6 57 39,4 17 31,2 8

\*chrom3 9

32 72,4 11 44,9 36 24,8 29 28,8 31 26,6 56 35,0 58 75,4 34 0,0 1

\*chrom4 9

39 16,5 40 0,0 41 50,1 33 72,7 2 40,8 43 45,8 12 80,7 38 1,4 9

\*chrom5 2

22 64,3 26

\*chrom6 6

48 65,7 28 9,4 24 59,8 20 11,8 21 6,3 49

\*chrom8 4

45 13,0 4 104,2 3 8,1 47

\*chrom9 6

46 8,2 6 29,3 23 50,3 15 62,0 53 17,0 55

\*chrom10 2

13 16,2 14

*env 2	1 12 31	1 24 67	1 36 74
--------	---------	---------	---------

1 1 1	1 13 29	1 25 65	2 1 1
-------	---------	---------	-------

1 2 39	1 14 23	1 26 100	2 2 8
--------	---------	----------	-------

1 3 31	1 15 38	1 27 58	2 3 6
--------	---------	---------	-------

1 4 24	1 16 22	1 28 67	2 4 21
--------	---------	---------	--------

1 5 31	1 17 27	1 29 81	2 5 6
--------	---------	---------	-------

1 6 29	1 18 62	1 30 64	2 6 1
--------	---------	---------	-------

1 7 26	1 19 74	1 31 83	2 7 13
--------	---------	---------	--------

1 8 19	1 20 63	1 32 90	2 8 29
--------	---------	---------	--------

1 9 26	1 21 63	1 33 76	2 9 20
--------	---------	---------	--------

1 10 28	1 22 89	1 34 84	2 10 31
---------	---------	---------	---------

1 11 41	1 23 77	1 35 67	2 11 17
---------	---------	---------	---------



2 12 33	3 1 33	3 26 100	4 15 24
2 13 31	3 2 19	3 27 90	4 16 24
2 14 37	3 3 31	3 28 92	4 17 33
2 15 27	3 4 23	3 29 70	4 18 65
2 16 40	3 5 33	3 30 100	4 19 15
2 17 36	3 6 43	3 31 87	4 20 55
2 18 49	3 7 33	3 32 90	4 21 68
2 19 42	3 8 33	3 33 92	4 22 53
2 20 40	3 9 36	3 34 86	4 23 55
2 21 63	3 10 31	3 35 100	4 24 49
2 22 18	3 11 33	3 36 100	4 25 47
2 23 63	3 12 31	4 1 20	4 26 50
2 24 47	3 13 36	4 2 23	4 27 77
2 25 42	3 14 37	4 3 17	4 28 20
2 26 1	3 15 33	4 4 37	4 29 49
2 27 52	3 16 38	4 5 35	4 30 67
2 28 45	3 17 40	4 6 27	4 31 54
2 29 55	3 18 58	4 7 23	4 32 78
2 30 50	3 19 60	4 8 24	4 33 35
2 31 52	3 20 78	4 9 31	4 34 41
2 32 46	3 21 64	4 10 25	4 35 80
2 33 63	3 22 80	4 11 17	4 36 52
2 34 65	3 23 50	4 12 27	
2 35 82	3 24 76	4 13 24	
2 36 92	3 25 86	4 14 37	

Anexo 12. Sentencias utilizadas en el análisis realizado con el programa PLABQTL.

```
c env  
log  
first_analysis  
c with QTLxENV analysis over 4 environments  
load env.qdt  
out 1 1 0 0  
trait 1  
scan 10 3,0  
model D  
cov S  
environments 4  
stop
```





59898