



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RIO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMIA Y VETERINARIA

“Trabajo Final presentado
para optar al Grado de Ingeniero Agrónomo”

**Marcadores moleculares asociados con tolerancia al Mal de Río
Cuarto, floración y rendimiento en líneas de maíz**

NOMBRE DEL ALUMNO: BORGHI, MARIA LETICIA

DNI: 29.707.352

NOMBRE DEL DIRECTOR: DI RENZO, MIGUEL ANGEL

NOMBRE DEL CO-DIRECTOR: IBAÑEZ, MERCEDES ALICIA

Río Cuarto-Córdoba

Diciembre 2006

UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Titulo del Trabajo Final: **Marcadores moleculares asociados con tolerancia al Mal de Río Cuarto, floración y rendimiento en líneas de maíz**

Autor: Borghi, María Leticia

DNI: 29.707.352

Director: Di Renzo, Miguel Ángel

Co-Director: Ibañez, Mercedes Alicia

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias del Jurado Evaluador:

Fecha de Presentación: ____ / ____ / ____.

Aprobado por Secretaria Académica: ____ / ____ / ____.

Secretario Académico _____

AGRADECIMIENTOS

A mis padres: Stella y Rubén, por su presencia, comprensión y ayuda incondicional a lo largo de mis años de vida universitaria.

A mis hermanos: Paula, Mauricio y Fernando, y a todos los demás integrantes de mi familia, por haberme acompañado y alentado en toda la carrera.

A Natalia Bonamico, Miguel Di Renzo y Mercedes Ibáñez, por haberme permitido realizar mi trabajo final en la cátedra Mejoramiento Genético, por haber comprendido mis inquietudes, apoyar mis decisiones y haberme ayudado a dar el paso final para poder obtener mi título de grado.

A Malena Faricelli y Eugenia Cappellari, por haberme ayudado en las actividades de campo y laboratorio.

A mis amigas y a mis compañeras/ros de estudio, que compartieron junto a mí los momentos vividos en éstos años.

INDICE

Resumen	V
Summary	VI
Introducción	1
<i>Importancia del maíz</i>	1
<i>Descripción morfo-fisiológica del maíz</i>	2
Antecedentes	3
<i>Marcadores moleculares</i>	3
<i>Loci de caracteres cuantitativos (QTL)</i>	5
<i>El Mal de Río Cuarto en Zea mays</i>	6
<i>La floración en Z.mays</i>	9
<i>El rendimiento en Z.mays</i>	10
Materiales y métodos	13
<i>Datos fenotípicos</i>	13
<i>Datos genotípicos</i>	14
<i>Análisis de datos</i>	15
Resultados y discusiones	17
<i>Evaluación de las RIL frente al MRC</i>	17
<i>Análisis con marcadores microsatélites</i>	18
<i>Identificación de marcadores SSR asociados a QTL para tolerancia al MRC, IAE y rendimiento</i>	22
Conclusiones	29
Bibliografía	30
Anexos	34

RESUMEN

Marcadores moleculares asociados con tolerancia al Mal de Río Cuarto, floración y rendimiento en líneas de maíz

El Mal de Río Cuarto (MRC) es la patología más importante del maíz (*Zea mays* L.) causada por un reovirus (MRCV) transmitido de manera persistente-propagativa por *Delphacodes kuscheli* Fennah. La tolerancia genética al MRC se comporta como un carácter cuantitativo de moderada heredabilidad condicionado por la variación de varios loci genéticos individuales conocidos como QTL. La aparición de los estigmas ocurre después de la antesis; frente a un estrés durante la floración aumenta el intervalo antesis-estigma (IAE) (carácter cuantitativo secundario preciso y de alta heredabilidad). El rendimiento queda determinado por el número de granos por unidad de superficie y su peso individual. Los microsatélites permiten identificar segmentos cromosómicos involucrados en la determinación del carácter de interés. El objetivo de esta investigación fue identificar loci de microsatélites (SSR) asociados a loci de caracteres cuantitativos que contribuyen con la tolerancia al MRC, el IAE y el rendimiento en grano. Se evaluaron durante el 2005 y el 2006 las RIL F₆ obtenidas del cruzamiento entre Mo17, línea pública dentada susceptible, y BLS14, línea flint tolerante, bajo infección natural y artificial. A partir del grado medio de severidad de los síntomas se calculó el índice de severidad de la enfermedad (ISE). Para el IAE se registraron las fechas de inicio, 50% y fin de floración; el rendimiento en grano fue expresado a través del peso de 1000 granos. El análisis molecular con 30 microsatélites se realizó en las RIL que manifestaron comportamientos extremos frente a MRC. Microsatélites ubicados en los grupos de ligamiento 1, 4, 6 y 8 mostraron asociación significativa con tolerancia a MRC, IAE y rendimiento. El SSR bnlg 1043 (6.00) para ISE; umc 1612 (4.08) para rendimiento y bnlg 1627 (1.02) y bnlg 1043 (6.00) para IAE presentaron los más elevados R^2 y r , indicando que los mismos podrían tener relación con segmentos cromosómicos involucrados en la determinación de los mencionados caracteres.

Palabras claves: *Zea mays*; Mal de Río Cuarto; Intervalo antesis-estigma (IAE); Rendimiento; SSR; QTL .

SUMMARY

Microsatellites molecular markers associated with “Mal de Río Cuarto” disease resistance, flowering and yield in maize lines

“Mal de Río Cuarto” (MRC) is a disease of maize caused by a reovirus (MRCV) which is transmitted in a persistent, propagative manner by *Delphacodes kuscheli* Fennah. Resistance to MRC disease is a quantitative trait of moderate heredability principally controlled by individual genetic loci know as QTL. Silking appearance occurs after the anthesis; when stress during flowering increases the IAE (precise secondary quantitative trait of high heredability). Yield is determined by the number of grains by unit of surface and individual weight grains. Molecular markers allow to measure individual genes effects and to identify chromosome segments involved in the determination traits of interest. The objective of this investigation was to identify SSR loci associated whit quantitative trait loci, which contribute to disease resistance to MRC, IAE and grain yield. The RIL F₆ derived lines from the crossing between Mo17, a public dent line susceptible, and BLS14, a flint line tolerant, were evaluated during 2005 and 2006, under natural and artificial infection respectively. A disease severity index (ISE) was calculated from observed symptoms severity grade in field experiments. For IAE dates beginning 50% and ending flowering were registered. Grain yield was expressed in 1000 grains weight. The molecular analysis with 30 microsatellites was carried out in RIL with extreme reaction to the disease. Microsatellites with significant association to resistance to MRC, IAE and yield were identified in the linkage groups 1, 4, 6 y 8. The SSR umc 1612 (4.08), bnlg 1043 (6.00) and bnlg 1627 (1.02) shown the most high determination coefficient (R^2) and correlation coefficient (r). Furthermore, these results would indicate some kind of relation with chromosome segments involved in the determination of traits of interest.

Key words: *Zea mays*; “Mal de Río Cuarto” disease; Anthesis-Silking Interval; Yield; SSR; QTL.

INTRODUCCIÓN

Importancia del maíz

Originario de América, el maíz comenzó a cultivarse hace unos 7000 años entre los mayas y aztecas. En la primera mitad del siglo XVI se extendió por Europa y Asia Menor; la facilidad del cultivo y la seguridad de cosecha constituyeron los dos fundamentos por los cuales este cereal se expandió sin fronteras; llegando a la situación mundial actual en la que se lo cultiva en casi todos los países, en especial en zonas templadas en las cuáles se obtienen los mayores rendimientos.

El maíz, junto al arroz y el trigo, es uno de los principales cereales y ocupa luego de éstos el tercer lugar por el volumen de cosecha a nivel mundial. El mejoramiento genético permitió multiplicar su rinde al posibilitar el desarrollo de híbridos convencionales y transgénicos. En Europa fue utilizado como forraje y en América como alimento humano. Sus usos se han extendido en los últimos años, ya que constituye la materia prima de harinas, aceites, edulcorantes, alcohol, almidón, etc.; sin embargo su principal destino es la alimentación animal. Paralelamente, se diversificaron las posibilidades de utilización del grano; así surgieron nuevos destinos como el silaje de grano húmedo, producción de maíz pisingallo a escala comercial y en los últimos años la irrupción de maíces de alto valor (MAV).

La producción Argentina de maíz a comienzos de los '90 totalizaba 7,7 millones de tn, mostrando un constante crecimiento llegando a recolectar en la campaña 1997/98 19,4 millones de tn (récord histórico de producción), es decir, un volumen 152,9% superior al de siete años antes. Finalmente para la campaña 2004/05 la producción fue de aproximadamente 20,5 millones de tn, superando el máximo volumen alcanzando (SAGPYA, 2006) (Anexos: Figura 1).

Varias son las causas del crecimiento en la producción nacional de maíz. Entre las principales podemos citar el aumento de la superficie de cultivo, la disponibilidad en el mercado de nuevos híbridos de mayor potencial de rendimiento, la mejora para resistencia a enfermedades y plagas, la incorporación de riego complementario, el uso de materiales transgénicos y en la actualidad el advenimiento de tecnologías relacionadas con agricultura de precisión.

En la década del '90 nuestro país llegó a ocupar el quinto lugar como productor mundial y el segundo lugar como exportador luego de Estados Unidos. Debido al avance del cultivo de soja a partir de la campaña agrícola 1997/98 se ha verificado el

desplazamiento del maíz en Argentina, ocupando en la actualidad el sexto lugar como productor y el tercero como exportador.

La superficie sembrada y la cosechada se mantuvieron similares al promedio de los últimos 10 años, poniendo en evidencia que este cultivo es el de mayor estabilidad en la rotación agrícola por su uso como suplemento en la alimentación animal, su importancia en la recuperación de la fertilidad y estructura de los suelos y su demanda en la agroindustria (Anexos: Figura 2). En la campaña 2005/06 la superficie sembrada fue de 3.403.837 ha y se obtuvo un total cosechado de 2.783.436 ha (SAGPYA, 2006). En Argentina la producción se ubica en 7 regiones maiceras, correspondiendo Río Cuarto a la zona oeste (Anexos: Figura 3) (Álvarez y Mulin, 2004).

Descripción morfo-fisiológica del maíz

El maíz es una gramínea anual de ciclo primavero-estival, capaz de producir altos rendimientos. Es de porte alto, con tallo grueso y macizo, formado por entrenudos. Sus hojas son anchas y largas con nervadura central marcada; y pueden estar en número de 15 a 30. En cuanto a la altura llega a alcanzar aproximadamente 2 a 2,5 m. Las inflorescencias femenina (espiga cilíndrica) y masculina (panoja laxa) se encuentran en la misma planta, pero separadas. La espiga constituye el órgano a cosechar. Los granos (fruto: cariopse) se agrupan formando hileras alrededor de un eje o marlo, conteniendo los híbridos actuales entre 600 y 1000 granos en 16 a 20 hileras.

Las raíces constituyen un sistema de tipo fibroso en cabellera; las seminales se generan a partir de la semilla y cubren las necesidades de la primera etapa, mientras que las adventicias se desarrollan desde los nudos del tallo que profundizan en la capas del suelo.

El ciclo biológico del maíz se divide en las fases vegetativa y reproductiva. En la primera hay diferentes períodos, definidos por la cantidad de hojas que tiene la planta. En cuanto al período reproductivo, primero aparece la panoja y comienza la liberación de polen. Poco después, las flores de la espiga están listas para ser fecundadas. La floración es una etapa crucial, por esto es necesario que en la misma el agua sea suficiente como para poder cubrir los requerimientos del cultivo. Unos meses después de la fecundación, los granos insertos en el eje de la inflorescencia están totalmente llenos. (Álvarez y Mulin, 2004).

ANTECEDENTES

Marcadores moleculares

Desde sus comienzos, el objetivo del mejoramiento vegetal ha sido seleccionar genotipos superiores a partir de fenotipos superiores. El éxito en este proceso depende del control genético del carácter, es decir, del número de genes que lo codifican o controlan, así como de las relaciones interalélicas y del grado de influencia ambiental.

Una serie de *técnicas moleculares* desarrolladas en los últimos veinte años han permitido conocer la información genética de los organismos. Para que un carácter sea considerado un marcador genético debe mostrar una variación detectable entre los individuos de una población y una herencia predecible según las leyes de Mendel.

Existen diferentes tipos de marcadores genéticos, entre ellos están los morfológicos, las isoenzimas, las proteínas de reserva y los marcadores basados en ADN (Picca *et al.*, 2004).

Los *marcadores morfológicos* son características fenotípicas de fácil identificación visual (forma, color, tamaño, altura, etc). Presentan limitaciones por el bajo nivel de polimorfismo; pueden producir alteraciones fenotípicas que dificultan el desarrollo de la planta y muchos de ellos se expresan sólo en estadio de planta adulta, lo cual prolonga los tiempos de evaluación en los programas de mejoramiento. No obstante, los mismos son útiles dado que representan un conjunto de genes que pueden ser evaluados con métodos sencillos y a bajo costo.

Las *isoenzimas* se definen como diferentes formas moleculares de una enzima que poseen una actividad catalítica común, es decir, actúan sobre el mismo sustrato. Entre sus desventajas se mencionan el limitado número, con lo cuál se dificulta su aplicación en la construcción de mapas y por otro lado el reducido polimorfismo.

Las *proteínas de reserva* son las que se encuentran en el endosperma de los cereales, principal componente de la semilla.

Los *marcadores basados en ADN*, se pueden definir como un punto de referencia en un cromosoma, que puede o no corresponder a un gen. En general los marcadores de ADN son señaladores de diferentes regiones del genoma y se los conoce en forma genérica como *marcadores moleculares* (MM).

Los marcadores de ADN, permiten evidenciar variaciones o polimorfismos en la secuencia del ADN entre dos individuos, modifiquen o no su fenotipo. Los MM son utilizados en genética humana, animal, microbiana y vegetal; dentro de esta última son de

utilidad para realizar selección asistida por marcadores (MAS, Marker Assisted Selection). La misma es indirecta y permite incrementar la eficiencia del mejoramiento genético, ya que consiste en seleccionar un marcador ligado, susceptible de ser observado con anterioridad y de una manera más simple en el esquema de selección-carácter cualitativo de fácil identificación, en lugar de seleccionar directamente el carácter cuantitativo de interés (Tanksley, 1993).

Varios antecedentes demuestran la importancia que posee la identificación de MM ligados a loci de caracteres cuantitativos (QTL) de interés que puedan ser utilizados en la selección asistida por marcadores para detectar genotipos susceptibles o resistentes a determinadas patologías en maíz (Duble *et al.*, 2000, 2003; Pérez-Brito *et al.*, 2001; Di Renzo *et al.*, 2004; Kreff *et al.*, 2004; Xinhay y Shihuang, 2004; Dintinger *et al.*, 2005; Zhao *et al.*, 2006). Los MM constituyen una invaluable herramienta en los programas de mejoramiento genético ya que permiten medir el efecto de genes individuales e identificar segmentos cromosómicos involucrados en la determinación de caracteres de interés (Michelmore *et al.*, 1991). Para que un MM sea considerado ideal debe ser, altamente polimórfico o variable, de herencia mendeliana no epistática (sin interacción entre genes), insensible a los efectos ambientales, codominante, de rápida identificación, de simple análisis y de posible detección en los estadios tempranos del desarrollo de las plantas.

Los MM se pueden clasificar en tres grupos: marcadores basados en la hibridación del ADN; marcadores basados en la amplificación del ADN y marcadores mixtos. Los que amplifican el ADN están basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), técnica que se basa en la síntesis enzimática de millones de copias de un segmento específico de ADN en presencia de una polimerasa de ADN termoestable (*Taq polimerasa*). Se utilizan dos oligonucleótidos llamados "cebadores" o "primers". El segmento de ADN a amplificar está compuesto por dos hebras (*a* y *b*), la secuencia de uno de los oligonucleótidos hibrida en uno de los extremos del segmento y es complementaria a la hebra *a*, el segundo oligonucleótido hibrida en el otro extremo del segmento y es complementario a la hebra *b*. Ambos oligonucleótidos deben hibridar en secuencias complementarias presentes en las hebras de ADN para que exista amplificación del fragmento.

Dentro de los MM del primer grupo los más utilizados en plantas son los Polimorfismos en la Longitud de los Fragmentos de Restricción (RFLP) y los minisatélites o Número Variable de Repeticiones en Tándem (VNTR). Dentro del segundo grupo se encuentran los MM conocidos como Polimorfismos de ADN

Amplificados al Azar (RAPDs), y las Secuencias Simples Repetidas o microsatélites (SSR). En los MM mixtos están los Polimorfismos en la Longitud de Fragmentos Amplificados (AFLPs) (Picca *et al.*, 2004).

La creciente información sobre genomas animales y vegetales generada en los últimos años, junto a la disminución en los costos de secuenciación y PCR permitieron el desarrollo de marcadores basados en ésta con diferentes características; dentro de ellos los más utilizados en plantas son los SSR y AFLPs. Los SSR son regiones genómicas hipervariables constituidas por repeticiones en tándem de unos pocos pares de bases (1 a 4) flanqueadas por secuencias de copia única. La base genética del polimorfismo detectado se basa en la variabilidad del número de repeticiones y el tamaño del microsatélite amplificado. Luego de que el microsatélite es amplificado por PCR se somete a electroforesis en geles de alta resolución que permiten detectar diferencias de 2, 3 o 4 nucleótidos que corresponden al mínimo polimorfismo de longitud en un SSR. Los SSR son considerados como los marcadores ideales en el mejoramiento genético, debido al alto polimorfismo que presentan por locus (gran número de alelos por locus). Son marcadores codominantes, genoma-específicos, y presentan mayor nivel de polimorfismo en comparación con los RFLPs y RAPDs (Picca *et al.*, 2004).

En maíz han sido identificados alrededor de 2000 microsatélites y la secuencia de los iniciadores necesarios para su amplificación mediante PCR es de disponibilidad pública (MAIZE GDB, 2005). Por las numerosas ventajas mencionadas los SSR fueron los MM elegidos para realizar el presente estudio.

Loci de caracteres cuantitativos (QTL)

En una población los individuos pueden presentar caracteres de interés agronómico de variación tanto discreta como continua. Debido a que el ambiente no tiene efecto en la manifestación fenotípica de los marcadores moleculares (caracteres cualitativos de variación discontinua) y a que están regidos por uno o pocos genes, los mismos permiten clasificar a los individuos sin ambigüedades. Sin embargo, la mayoría de los caracteres de interés agronómico son cuantitativos, siendo los fenotipos determinados por muchos genes así como por las condiciones ambientales. En este caso los individuos son difíciles de clasificar en categorías discretas y para su análisis se deben emplear 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 han acordado la

conveniencia del uso de marcadores moleculares para asistir a la selección de caracteres cuantitativos.

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 solucionar a través de la selección indirecta, lo cual involucra el hecho de que la apreciación del carácter primario se hace a través de un carácter secundario de mayor heredabilidad (Gallais, 1990). Por ello los caracteres cualitativos asociados con los cuantitativos resultan ideales.

En numerosas especies cultivadas (Lee, 1995) se iniciaron importantes investigaciones en mapeo de QTL para caracteres cuantitativos tales como rendimiento, calidad, madurez y resistencia a estrés bióticos y abióticos. 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).

Los marcadores moleculares han permitido construir mapas genéticos en muchas especies de interés agronómico y usar éstos para detectar, mapear y estimar los efectos de loci de caracteres cuantitativos o QTL (Melchinger *et al.*, 1998). De esta manera un carácter de variación continua puede ser manejado de manera simple como si se tratara de un carácter de herencia mendeliana identificando loci de marcadores moleculares ligados genéticamente. 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.

El uso de líneas endocriadas recombinantes (RIL) que se producen autofecundando durante varias generaciones la progenie individual de una población F_2 hasta lograr un alto nivel de homocigosis, constituye uno de las poblaciones más precisas para la identificación de QTL (Burr y Burr, 1991) y supera al de poblaciones $F_{2:3}$ en cuanto al poder de detección y a la resolución de los QTL (Moreno-González, 1993). Esto es debido a la naturaleza permanente de las RIL lo que permite su aplicación en investigaciones para determinar asociaciones entre marcadores moleculares y caracteres de interés.

Disponer de marcadores cualitativos asociados a genes relacionados con caracteres agronómicos resulta de interés, tanto para permitir estimar su participación en el carácter, como para delimitar el segmento cromosómico involucrado en la expresión del mismo (Tanksley, 1993).

El Mal de Río Cuarto en *Zea mays*

Importancia de la enfermedad

El MRC es la patología más importante del cultivo de maíz en Argentina (March *et al.*, 1997). La enfermedad ocasiona frecuentes y elevadas pérdidas tanto en el sur de la provincia de Córdoba como en otras zonas maiceras. El MRC se observó por primera vez en el área comprendida entre Río Cuarto, Sampacho y Chaján ubicada al sur de la provincia de Córdoba y Villa Mercedes en San Luis. Actualmente también se presenta en una zona mayor que abarca el este de Córdoba, norte y oeste de la Pampa, oeste y sudoeste de Buenos Aires y sur de Santa Fé.

Las pérdidas ocasionadas por esta enfermedad han sido y son importantes. Se puede citar la campaña agrícola 1981/82 en la que se perdieron más de 55.000 ha de las 360.000 ha sembradas en el departamento Río Cuarto; calculándose que en el decenio 1981/91 las pérdidas han sido de 10 millones de dólares. Posteriormente, en 1996/97 se produjo la epifitía más severa de las ocurridas hasta el momento, ocasionando pérdidas por US\$ 120 millones (Lenardon *et al.*, 1998). El primer híbrido tolerante fue comercializado en 1982; sin embargo, muchos de los híbridos con tolerancia media no soportaron la presión de la enfermedad (Álvarez y Mulin, 2004).

Agente causal

El agente causal es un virus perteneciente a la familia *Reoviridae*, genero *Fijivirus*, denominándose Virus del Mal de Río Cuarto. Éste se transmite en forma persistente-propagativa a través de un insecto vector que pertenece al orden Homóptera, familia Delphacidae, *Delphacodes kuscheli* Fennah, comúnmente conocidos como "chicharrita" (Figura 1).

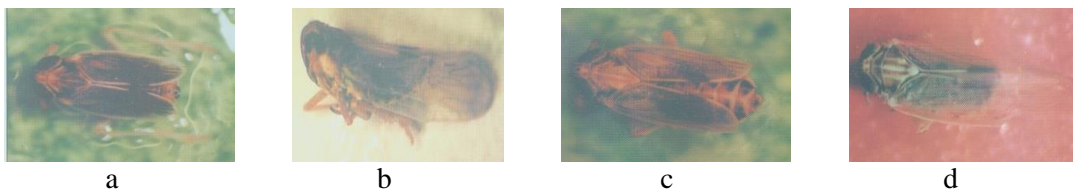


Figura 1. *Delphacodes kuscheli* Fennah. a- Macho de alas cortas (braquíptero)
b- Macho de alas largas (macróptero) c- Hembra de alas cortas (braquíptera)
d- Hembra de alas largas (macróptera).

Hospedantes

Cultivos anuales invernales y primavera-estivales tales como avena (*Avena sativa* L.), trigo (*Triticum aestivum* L.), centeno (*Secale cereale* L.), sorgo granífero (*Sorghum bicolor* (L.) Moench), mijo común (*Panicum miliaceum* L.), moha de Hungría (*Setaria italica* (L.) Beauv.), como así también malezas anuales primavera-estivales (*Digitaria sanguinalis*, *Setaria verticillata*, etc) y perennes primavera-estivales (*Sorghum halepense*), constituyen reservorios naturales del virus y hospedantes alternativos del insecto vector (Nome *et al.*, 1981; Marinelli *et al.*, 1988; Ornaghi *et al.*, 1993 a, b).

Sintomatología

Los síntomas que origina el MRC resultan de variable intensidad en función del estado fenológico de la planta en que se produce la transmisión del virus por el vector, del genotipo de maíz y de las condiciones ambientales en las que se desarrolla el cultivo. Las plantas afectadas presentan una marcada reducción del crecimiento o enanismo, tallos achatados, entrenudos cortos, las hojas superiores se reducen de tamaño y en algunos casos presentan sólo la vaina. Las plantas pueden morir prematuramente, las panojas presentan malformaciones con la ausencia total o parcial de flores masculinas que con frecuencia tienen sólo el raquis, las espigas pueden ser con proliferación o múltiples, además de pequeñas y malformadas, con reducción de la producción. (Anexos: Figuras 4 y 5).

Todas las plantas con síntomas, presentan en el envés de las hojas enaciones fácilmente observables principalmente, en las superiores. Las mismas pueden ser muy prominentes "callo" o pequeñas como un punteado sobre las nervaduras denominadas comúnmente "nervaduras en rosario" (Anexos: Figura 6). La importancia de la observación de enaciones es que además de ser un síntoma característico de esta enfermedad, puede ser la única manifestación que presenten las plantas enfermas (Lenardon *et al.*, 2003).

Manejo de la enfermedad

Diversas técnicas se pueden mencionar para llevar a cabo el manejo de la enfermedad MRC, dentro de ellas está la resistencia genética. Como la mayoría de los caracteres de interés agronómicos, la tolerancia genética al MRC se comporta como un carácter de herencia cuantitativa condicionado por la variación de varios loci genéticos individuales conocidos con el nombre de poligenes o QTL (Tanksley, 1993). En el

carácter tolerancia al MRC Di Renzo *et al.* (2002) estimaron valores de heredabilidad entre 0,44 y 0,56; indicando que el carácter está afectado por el ambiente y por la interacción genotipo-ambiente, sugiriendo que los genotipos son poco estables frente a diferentes condiciones ambientales. Los SSR pueden ser utilizados en la detección, localización y caracterización de los principales factores genéticos que contribuyen a la variación de un QTL (Groh *et al.*, 1998; Xu *et al.*, 1999). La identificación de marcadores moleculares asociados a genes de tolerancia al MRC permitirá ampliar los conocimientos sobre sus bases genéticas y determinar los factores involucrados en la tolerancia.

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 económica-social para nuestro país. Investigadores de la actividad estatal y privada estudian la herencia de la resistencia a esta enfermedad y trabajan para el logro de cultivares tolerantes ó de mejor comportamiento debido a que con los mismos disminuyen las pérdidas causadas por MRC (Anexos: Figura 7).

La floración en maíz

Cuando las plantas de maíz presentan entre cuatro y seis hojas completamente expandidas, el meristema apical finaliza la diferenciación de hojas y comienza a diferenciar las espiguillas correspondientes a la panoja. Después de iniciado el desarrollo de la panoja, cuando la planta tiene alrededor de siete a nueve hojas expandidas, se comienzan a diferenciar los primordios florales de la yema axilar que darán origen a la espiga.

En cada yema axilar que ha entrado a su fase reproductiva, queda determinado tempranamente el número de hileras de espiguillas de la futura espiga. La diferenciación de espiguillas sobre las hileras continúa hasta una o dos semanas antes de la aparición de los estigmas, fuera de la envoltura de las chalas. La finalización de la diferenciación suele coincidir con el comienzo de la elongación de los estigmas de las espiguillas; en este momento queda determinado el total de espiguillas diferenciadas, y con ello el número máximo de flores fértiles capaces de ser fecundadas, es decir, el número potencial de granos que puede tener la planta. La floración femenina, consiste en la emergencia progresiva de los estigmas fuera de la envoltura de las chalas.

El panojamiento consiste en la emergencia de la panoja o inflorescencia masculina, a través del cogollo formado por las hojas superiores, y se completa al expandirse la última hoja. Luego de la emergencia total de la panoja ocurre la antesis, que

se define como la aparición de las anteras de las flores en las espiguillas de la panoja y el comienzo de la liberación del polen; éste período y la aparición de estigmas se extiende por varios días. En genotipos tradicionales la liberación de polen y la aparición de estigmas dura de una a dos semanas, mientras que en los híbridos de última generación estos procesos se completan en tres o cuatro días.

La polinización ocurre cuando el polen de las flores estaminadas de la panoja se adhiere a los estigmas de las flores pistiladas de la espiga. Dado que tanto la liberación de polen como la receptividad de los estigmas son limitados, cuanto mayor sea la sincronía floral en el desarrollo de la panoja y la espiga, mayor será la posibilidad de fecundación en condiciones de campo. (Andrade *et al.*, 1996).

En condiciones ambientales normales la aparición de los estigmas en general ocurre poco después del comienzo de la antesis (protandria), si bien el proceso puede invertirse (protoginia) (Fischer y Pandey, 1984). Cuando se produce un estrés durante el período de floración, tal como sequía, baja irradiación, deficiencias minerales, etc., la floración femenina se retrasa, incrementándose la asincronía floral o intervalo entre las floraciones masculina y femenina, conocido como intervalo antesis-estigma (IAE) (Hall *et al.*, 1982; Westgate y Bassetti, 1990; Bolaños y Edmeades, 1993). Un incremento en el IAE produce severas reducciones en el rendimiento.

Actualmente, el mejoramiento de maíz para la tolerancia al estrés hídrico está basado en la disminución del IAE; el cual es considerado un carácter cuantitativo secundario preciso y de alta heredabilidad, además de resultar fácilmente observable en plantas bajo estrés en la etapa fenológica de floración. La existencia de correlación significativa con caracteres cuantitativos de interés, principalmente el rendimiento en grano y además la tolerancia al MRC, tendría importantes implicancias en la mejora genética. Xin-Hai *et al.* (2003) encontraron que bajo condiciones de sequía el IAE tiene alta heredabilidad y está correlacionado negativamente con la producción de granos; por lo tanto la selección indirecta por medio del IAE puede incrementar significativamente la producción de granos.

La identificación de marcadores moleculares asociados a genes involucrados en el IAE permitirá ampliar los conocimientos sobre sus bases genéticas, lo cual es importante por la correlación que tiene con el rendimiento en grano (Xin-Hai *et al.*, 2003 y Ribaut *et al.*, 1997).

El rendimiento en *Zea mays*

El rendimiento en grano generado en un cultivo se puede explicar a través del producto entre la biomasa total y el índice de cosecha. En cuanto al primer término el maíz por su sistema fotosintético C₄ es más eficiente que los cereales de invierno que son C₃, para convertir radiación en biomasa. El índice de cosecha refleja la partición de fotoasimilados hacia los granos y se lo define como la proporción del rendimiento seco total que se acumula en los granos cosechados.

Los componentes numéricos del rendimiento son el número de granos (NG) por unidad de superficie y su rendimiento individual. El NG es producto del número de plantas por unidad de superficie, del número de espigas granadas por planta (prolificidad) y del número de granos por espiga. El rendimiento del grano, por su parte, es función de la duración del período de llenado y de la tasa de llenado.

El NG queda establecido en una parte del ciclo ontogénico denominada “*período crítico*”, el cual se ubica 15-20 días pre y post floración, en los días previos a la floración se define el número de espigas fértiles por planta y en los 15 días posteriores el número final de granos. Si un estrés hídrico o lumínico ocurre en este lapso de tiempo, se produce una merma en el NG. El período coincide con el crecimiento activo de la espiga, la emergencia de estigmas y el inicio del llenado del grano.

El rendimiento del grano se genera durante una sucesión de etapas a partir de la fecundación del ovario. Así, la primera fase denominada “lag” corresponde a un período formativo, de lenta acumulación de biomasa en el grano; luego continúa una segunda fase donde ocurre más del 80% del incremento de rendimiento y se depositan los principales componentes del grano (Carcova *et al.*, 2004).

El rendimiento puede verse afectado por varios factores, entre ellos se puede mencionar la disponibilidad de agua y nutrientes (especialmente nitrógeno, fósforo y potasio). Resulta claro entonces, la importancia del control de malezas durante el período de barbecho y en las primeras etapas del ciclo del maíz, ya que estamos en presencia de un cultivo que no se destaca por su capacidad de competencia inicial, con lo cual podría permitir el desarrollo de malezas que consumen el agua y los nutrientes que el cultivo necesitará posteriormente. La aparición de la panoja indica el comienzo del período en que el agua y los nutrientes resultan más importantes para el rendimiento final del cultivo.

El efecto que las malezas provocan sobre el rendimiento varía en función de la competitividad de cada especie, su densidad, las condiciones ambientales y el tiempo durante el cual se mantenga la competencia. Las pérdidas serán significativas en el

rendimiento del cultivo cuando uno o varios de esos factores determinen una situación de alta presión de competencia.

En la campaña 2004/05 se obtuvo un rendimiento de 7359 kg/ha, registrándose a su vez la mayor producción nacional, aproximadamente 20,5 millones de tn, superando el récord de la obtenida en 1997/98 (19,36 millones de tn). (Anexo: Figura 1). El principal factor que explica esta elevada producción es el rendimiento promedio total alcanzado, que por primera vez en la historia de este cereal, supera los 70 qq/ha, siendo las provincias de Córdoba, Santa Fe y parte de Buenos Aires, las que en mayor parte contribuyeron a lograr dicha productividad. Los oportunos aportes de lluvias durante la etapa de llenado de grano, permitieron alcanzar muy buenos rendimientos que en algunos casos, superaron los 100 qq/ha.

La identificación de marcadores moleculares asociados al carácter rendimiento permitirá ampliar los conocimientos sobre sus bases genéticas (Xin-Hai *et al.*, 2003 y Ribaut *et al.*, 1997).

HIPÓTESIS

La identificación de microsatélites con genes involucrados en la determinación de caracteres cuantitativos, facilita el mejoramiento a tolerancia al Mal de Río Cuarto, intervalo anthesis-estigma y rendimiento en grano.

OBJETIVOS

General

Identificar SSR asociados a caracteres cuantitativos que contribuyen con tolerancia al MRC, IAE y rendimiento en grano en maíz.

Específicos

- Evaluar el comportamiento fenotípico de RIL de maíz para tolerancia al MRC, el IAE y el rendimiento en grano durante el ciclo agrícola 2004/05 y 2005/06.
- Caracterizar el fenotipo molecular de las RIL con SSR polimórficos.
- Identificar asociaciones entre el fenotipo molecular de las RIL con el comportamiento fenotípico frente al MRC, el IAE y el rendimiento en grano.
- Estudiar la asociación entre los diferentes caracteres fenotípicos evaluados.

MATERIALES Y MÉTODOS

Datos fenotípicos

Se evaluaron un total de 192 RIL resultantes de seis generaciones de autofecundación (F_6) obtenidas a partir de una F_2 proveniente del cruzamiento entre una línea tolerante, línea flint BLS14 registrada por el Instituto de Genética en el INASE (Salerno, 1995) y una línea susceptible, línea pública dentada Mo17; con respecto a su comportamiento frente al MRC, IAE y rendimiento en grano durante los años 2005 y 2006. Los ensayos se realizaron en la localidad de Río Cuarto, ubicada en la zona endémica, en el sur de la provincia de Córdoba, siguiendo un diseño en bloques con dos repeticiones. Las fechas de siembra fueron el 1/12/2004 y el 14/12/2005. El primer ensayo fue realizado bajo infección natural y el segundo bajo infección artificial. En el último ensayo las líneas en estado de coleoptile fueron sometidas durante 72 hs a infecciones controladas mediante macrópteros del insecto vector provenientes de cultivos de avena en pastoreo, que presentaron niveles de virulencia acordes a los esperados según análisis DAS ELISA realizado.

La evaluación del comportamiento fenotípico de las líneas frente al MRC se realizó midiendo individualmente sobre cada planta los siguientes caracteres: altura de planta; presencia de hojas del tercio superior acortadas o reducidas a la vaina foliar y/o rasgadas; presencia de entrenudos acortados; presencia y tipo de enaciones; tipo de panoja; presencia de espigas vanas, curvas y/o múltiples. Seguidamente a cada planta se le asignó un grado (0: planta asintomática; 1: presencia de enaciones; 2: enaciones + espiga curva; 3: enaciones + enanismo + espiga pequeña, múltiple y sin granos), de acuerdo a una escala que agrupa a las plantas en cuatro grados de severidad (Ornaghi et al., 1999). Por último se calculó, para cada línea, un índice de severidad de la enfermedad (ISE) (Grau y Radke, 1982) según la siguiente fórmula: $ISE = \sum (\text{grado} \times \text{número de plantas en cada grado}) \times 100 / (3 \times \text{número total de plantas})$, donde $3 = n^\circ \text{ grados} - 1$.

Para el cálculo del IAE se registraron las fechas de inicio, 50% y fin de floración masculina y femenina de cada una de las RIL en el 2005, en el 2006 no se pudo ser realizar. El rendimiento en grano de las RIL, fue medido a través del peso de 1000 granos, corregido a una humedad de 14,5 % y a la temperatura media del mes de marzo (19,2 °C para el 2005 y 22,26 °C para el 2006), mes en el cual se realizó la recolección de espigas y el registro de peso.

Datos genotípicos

El ADN de las RIL, de las líneas parentales y del híbrido F1 se extrajo siguiendo el método propuesto por Saghai-Marooof *et al.* (1984). El tejido vegetal fresco cosechado de plántulas de maíz crecidas en invernáculo se mantuvo en refrigeración a $-70\text{ }^{\circ}\text{C}$ hasta el momento de realizar la extracción. Para la misma, se maceró el material con nitrógeno líquido en un mortero de porcelana. El tejido macerado (300-400 mg) se colocó en un tubo de polipropileno de 15 ml para centrifugación. Se agregaron 9 ml de solución amortiguadora CTAB (bromuro mixto de alquiltrimetil-amonio) para extracción a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$ (Anexos: Cuadro 1). Se adicionaron luego 120 μl de 2-mercaptoetanol. Se mezcló invirtiendo los tubos durante 10 min. Se incubó agitando los tubos durante 60-90 min en un horno a $65\text{ }^{\circ}\text{C}$. Retirados los tubos del horno y luego de 5 min se agregaron 4,5 ml de cloroformo/octanol (24:1). Se invirtieron los tubos durante 10 min para mezclar. Se centrifugó durante 15 min a 1300-1500 rpm y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se trasvasó el sobrenadante a otros tubos de 15 ml. Se agregaron 4,5 ml de cloroformo/octanol (24:1) y se invirtieron los tubos durante 10 min para mezclar. Se centrifugó durante 15 min a 1300-1500 rpm y $25\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se trasvasó el sobrenadante a otros tubos de 15 ml y se agregaron 15 μl de ARNasa de 10 mg/ml. Luego se invirtieron los tubos para mezclar y se incubaron 60 min a $37\text{ }^{\circ}\text{C}$. Se agregaron 6,0 ml de isopropanol (2-propanol) frío, invirtiendo con suavidad los tubos hasta lograr la formación de la medusa de ADN. Se dejaron los tubos 24 hs a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ para favorecer la precipitación, y luego se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y $10\text{ }^{\circ}\text{C}$. Una vez precipitado el ADN se descartó el sobrenadante y se realizaron los lavados: lavado 1 (1 ml, 20 min); lavado 2 (1 ml, 30 s); lavado 3 (1 ml, 20 min) (Anexos: Cuadro 2). Entre los lavados 1 y 2 se trasvasó a un microtubo (Eppendorf) de 1,5 ml y se centrifugó brevemente (20 s). Luego del lavado 3, el ADN se dejó secar en flujo laminar y se resuspendió en 400 μl de buffer TE (Anexos: Cuadro 3).

La cantidad y la calidad del ADN extraído fueron evaluadas en geles de agarosa al 0,8% p/v disuelta en buffer TBE 1X (Anexos: Cuadro 4) con el agregado de 10 μl de bromuro de etidio para el revelado, utilizando como marcador de peso molecular el ADN del fago Lambda digerido con la enzima de restricción Hind III.

A partir del ADN extraído, se caracterizó el fenotipo molecular de las líneas con SSR usando un único programa de amplificación por PCR (Anexos: Cuadros 5 y 6).

La caracterización molecular con marcadores SSR se realizó con 30 iniciadores que resultaron polimórficos en estudios previos desarrollados a partir de un total de 85 marcadores evaluados. El análisis de los SSR polimórficos se llevó a cabo sobre el ADN

perteneciente a RIL que manifestaron un comportamiento extremo frente al MRC en las evaluaciones a campo: plantas con ISE < 25% y plantas con ISE > 75%. Los productos de amplificación de la PCR fueron separados por electroforesis en geles de agarosa Metaphor al 4% p/v disueltos en buffer TBE 1X con el agregado de 10 µl de bromuro de etidio. Para la electroforesis se utilizó buffer de electrodos TBE 0,5X y se mantuvieron 80 V constantes durante 2 hs. Una vez concluida la electroforesis, los geles fueron expuestos en un transiluminador UV (ultravioleta) para la documentación del fenotipo molecular de las RIL.

Análisis de datos

Se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) declarando la presencia de un posible QTL cuando la asociación entre los datos fenotípicos y el fenotipo molecular de cada SSR tuvo un nivel de significancia $\leq 0,05$. Como fuente de variación del análisis se consideró ambiente, microsatélite e interacción ambiente x microsatélite. La ecuación matemática del modelo estadístico fue la siguiente:

$$Y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + (\alpha\beta)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde y_{ijk} es la observación de cada carácter (ISE y rendimiento) en el ambiente i con el microsatélite j en la repetición k ; μ es la media poblacional de cada carácter, α_i es el efecto debido al ambiente i ; β_j es el efecto debido al microsatélite j ; $(\alpha\beta)_{ij}$ es el efecto de la interacción ambiente i x microsatélite j ; ε_{ijk} es el error experimental.

Para el IAE registrado sólo en el 2005 se realizó un ANAVA a una vía de clasificación considerando como variable de clasificación al microsatélite.

El análisis de la varianza permitió estimar el coeficiente de determinación, que mide la proporción de la varianza fenotípica explicada por un marcador significativamente asociado con el ISE, el IAE y el rendimiento, según la siguiente fórmula:

$$R^2 = 1 - (\text{SC error} / \text{SC total})$$

donde R^2 es el coeficiente de determinación, SC error es la suma de cuadrados del error experimental, SC total es la suma de cuadrados total de las fuentes de variación del análisis de la varianza.

Además se calculó el coeficiente de correlación de Pearson, que es una medida de la magnitud de la asociación lineal entre los caracteres evaluados y el fenotipo molecular de las RIL, de acuerdo con la siguiente fórmula:

$$r_{jk} = S_{jk} / \sqrt{(S_j^2 S_k^2)}$$

donde r_{jk} es el coeficiente de correlación de Pearson entre ISE, IAE y peso de las RIL (variable j) y el fenotipo molecular (variable k); S_{jk} es la covarianza entre la variable j y la variable k ; S_j^2 y S_k^2 son las varianzas de las variables j y k respectivamente.

Los análisis fueron realizados con el programa estadístico Infostat (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de las RIL frente al MRC

En el ensayo de evaluación del comportamiento de las RIL frente al MRC realizado en el 2005 no se realizaron infecciones virósicas artificiales. Esto hace que el proceso de selección dependa de la infección natural que tiene lugar bajo condiciones ambientales de campo. Por esta razón es posible que tanto una baja como una elevada incidencia y severidad de la enfermedad, se manifiesten de manera aleatoria año tras año y dificulten la precisión de trabajos de identificación de loci que contribuyen a la tolerancia a la enfermedad.

El ensayo desarrollado en el 2005 en la localidad de Río Cuarto, presentó una severa infección con manifestación de síntomas característicos de la enfermedad. Esto fue debido a las condiciones ambientales de la primavera 2004 que favorecieron el incremento de la densidad poblacional de macrópteros del insecto vector los cuales al abandonar los verdes senescentes migran hacia los cultivos de maíz recientemente emergidos (March *et al.*, 1997).

En el ensayo 2006 se realizaron infecciones virósicas artificiales aumentando de esta manera la precisión en la identificación de loci para tolerancia al MRC. En esta oportunidad también se observó una severa infección asociada a la eficiencia obtenida en la infección artificial, la cual permite independizarnos de las condiciones ambientales que pueden o no favorecer al aumento en la densidad poblacional de las chicharritas.

Las líneas parentales Mo17 y BLS14 mostraron diferencias significativas para el ISE (Cuadro 1). El ISE de las RIL difirió significativamente del ISE de los parentales. La distribución del ISE de las RIL no se ajustó a la normalidad y la mayoría de las líneas manifestaron la enfermedad con grados de severidad extremos, ISE inferiores a 3,79 y superiores a 62,30. De acuerdo a ésto, las RIL mostraron segregación transgresiva para el carácter ISE; es decir que algunas líneas se comportaron más sensibles que Mo17 y otras más tolerantes que BLS14 (Fig. 2).

Cuadro 1. Índice de Severidad promedio del parental Mo17 (S: sensible), del parental BLS14 (T: tolerante) y de las RIL en los ambientes de evaluación.

Genotipo	Ambiente		
	R5	R6	Combinado (R5-R6)
	Media±E.E.	Media±E.E.	Media±E.E.
Parental BLS14 (T)	2,73±0,98 <i>a</i>	4,97±2,83 <i>a</i>	3,79±1,42 <i>a</i>
Parental Mo17 (S)	57,25±6,94 <i>b</i>	68,37±7,45 <i>b</i>	62,30±5,10 <i>b</i>
RIL	35,77±2,29 <i>c</i>	40,70±2,52 <i>c</i>	38,31±1,71 <i>c</i>

R5: Río Cuarto 2005; R6: Río Cuarto 2006; EE: Error Estándar; Letras distintas en columnas indican diferencias significativas ($p \leq 0,05$) según la prueba LSD.

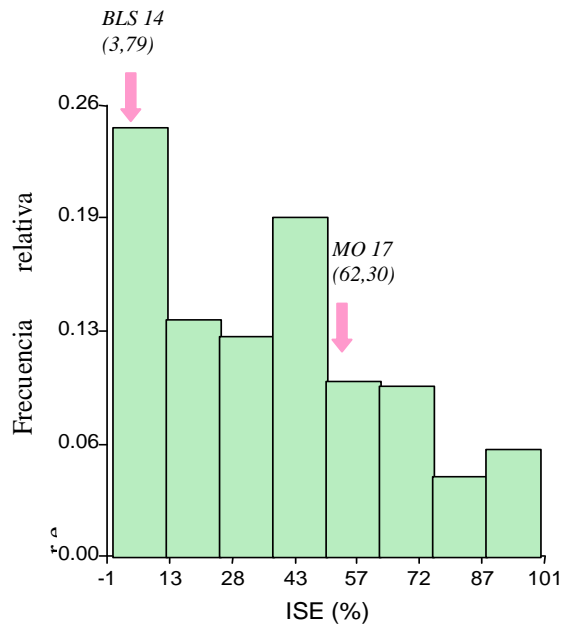


Figura. 2. Distribución del ISE de las RIL en los dos ambientes de evaluación

Análisis con marcadores microsatélites

A partir de un total de 85 iniciadores SSR utilizados, 82 amplificaron y revelaron bandas nítidas al ser expuestos en el transiluminador. De estos 82 microsatélites, 52 (63%) resultaron monomórficos al ser evaluados sobre el ADN de las líneas parentales y 30 (37%) evidenciaron polimorfismos (Cuadro 2 y Fig. 3). Estos 30 SSR polimórficos fueron usados en las RIL.

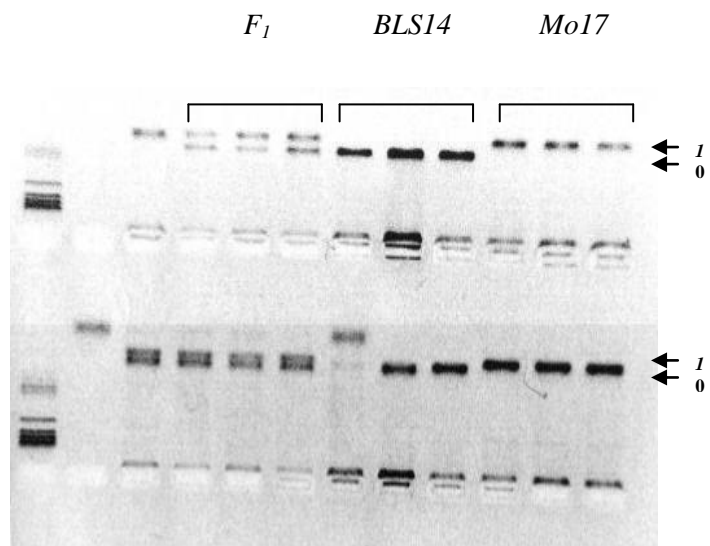


Figura 3. Electroforesis de los productos amplificados con dos de los microsatélites utilizados en gel de agarosa Metaphor al 4 %. En la figura se indica el fenotipo molecular polimórfico observado en los parentales (Mo17 y BLS14) y del híbrido (F_1). (0= banda lenta; 1= banda rápida)

Cuadro 2. Marcadores SSR probados en las RIL

Cromosoma (bin)	Microsatélite	Fenotipo molecular de las líneas parentales
1 (1.00)	umc 1354	Monomórfico
1 (1.01)	bnlg1179	Monomórfico
1 (1.01)	umc1177	Polimórfico
1 (1.02)	bnlg1083	Polimórfico
1 (1.02)	bnlg1627	Polimórfico
1 (1.03)	bnlg1863	Polimórfico
1 (1.03)	bnlg2204	Monomórfico
1 (1.03)	phi095	No amplificó
1 (1.03)	umc1021	Polimórfico
1 (1.03)	umc1598	Polimórfico
1 (1.04)	bnlg2238	Monomórfico
1 (1.04)	umc1472	Monomórfico
1 (1.04)	umc1169	Polimórfico
1 (1.04)	bnlg1811	Polimórfico
1 (1.05)	umc1515	Monomórfico
1 (1.05)	bnlg1832	Monomórfico
1 (1.05)	bnlg6521	Monomórfico
1 (1.06)	bnlg1556	Polimórfico
1 (1.06)	bnlg1598	Polimórfico
1 (1.06)	bnlg2057	Monomórfico
1 (1.09/10)	bnlg1720	Monomórfico
1 (1.10)	bnlg1347	Monomórfico
1 (1.10)	bnlg2123	Monomórfico
1 (1.11)	umc1220	Polimórfico
1 (1.11)	umc1331	Monomórfico
2 (2.01)	bnlg1092	Monomórfico
2 (2.01)	bnlg1338	Monomórfico
2 (2.02)	bnlg1327	Monomórfico
2 (2.02)	bnlg469b	Monomórfico
2 (2.02)	bnlg2042	Monomórfico
2 (2.06)	bnlg1225	Polimórfico
2 (2.07)	umc0271	Monomórfico
2 (2.07)	umc1497	Monomórfico
2 (2.09)	bnlg1520	Monomórfico
2 (2.09)	umc1252	Monomórfico
3 (3.05)	bnlg 1246b	Monomórfico
3 (3.06)	bnlg2241	Monomórfico
3 (3.09)	bnlg1754	Monomórfico
4 (4.01)	bnlg1434	Monomórfico
4 (4.03)	phi021	Polimórfico
4 (4.05)	umc1088	Polimórfico
4 (4.05)	bnlg1217	Polimórfico
4 (4.05)	nc005	Polimórfico
4 (4.06)	bnlg1741	No amplificó
4 (4.07)	bnlg1189	Polimórfico
4 (4.08)	umc1086	Polimórfico
4 (4.08)	umc1612	Polimórfico
4 (4.09)	bnlg292b	Polimórfico
4 (4.11)	bnlg589	No amplificó
4 (4.11)	phi076	Polimórfico
5 (5.00)	bnlg1006	Monomórfico
5 (5.01)	bnlg1382	Monomórfico
5 (5.03)	bnlg1700	Monomórfico
5 (5.03)	bnlg1902	Monomórfico
5 (5.05)	umc0282	Monomórfico
5 (5.06)	bnlg609	Monomórfico
5 (5.09)	bnlg389	Monomórfico
6 (6.01)	bnlg1597b	Monomórfico
6 (6.00)	bnlg1043	Polimórfico
6 (6.01)	bnlg1047	Monomórfico
6 (6.01)	bnlg1246	Monomórfico
6 (6.01)	bnlg1538	Monomórfico
6 (6.01)	bnlg1426	Polimórfico
6 (6.02)	bnlg1371	Polimórfico
6 (6.02)	bnlg2151	Monomórfico

6 (6.04)	phi031	Monomórfico
6 (6.05)	bnlg1443	Monomórfico
6 (6.06)	mact02	Monomórfico
8 (8.01)	bnlg2037	Monomórfico
8 (8.02)	bnlg1352	Polimórfico
8 (8.02)	umc1304	Polimórfico
8 (8.03)	umc1487	Monomórfico
8 (8.03/04)	umc1741	Polimórfico
8 (8.05)	bnlg2046	Monomórfico
8 (8.07)	umc1055	Monomórfico
8 (8.08)	bnlg1056	Polimórfico
9 (9.03)	bnlg430	Monomórfico
9 (9.03)	phi027	Monomórfico
9 (9.04)	bnlg1714	Monomórfico
10 (10.00)	phi041	Monomórfico
10 (10.02)	umc1152	Polimórfico
10 (10.02)	phi063	Polimórfico
10 (10.03)	bnlg1079	Monomórfico
10 (10.04)	bnlg1518	Monomórfico
10 (10.07)	umc1556	Polimórfico

Identificación de marcadores SSR asociados a QTL para tolerancia al MRC, IAE y rendimiento

El ANAVA a dos vías de clasificación permitió identificar siete SSR ligados significativamente con el ISE, ubicados en cuatro grupos de ligamiento (Cuadro 3). En los microsatélites bnlg 1083 (1.02), umc 1612 (4.08), bnlg 1043 (6.00) y umc 1741 (8.03) el efecto de la interacción ambiente x microsatélite fue no significativa, indicando que los genes de tolerancia al MRC que pudieran estar ligados a estos microsatélites tuvieron el mismo comportamiento independientemente del ambiente. Estos SSR explicaron 6, 6, 8 y 7% de la variación fenotípica observada, respectivamente. A diferencia de esta situación, en los SSR umc 1021 (1.03), bnlg 1352 (8.02) y bnlg 1056 (8.08), el efecto de la interacción ambiente x microsatélite fue significativo (Cuadro 3), indicando que los genes de tolerancia al MRC ligados a los mismos no tuvieron el mismo comportamiento en los diferentes ambientes. Di Renzo *et al.* (2002), al trabajar con una población $F_{2:3}$, indicaron que el efecto significativo de la interacción genotipo x ambiente, que es la causa de la inconsistencia del comportamiento de los genotipos a través de los ambientes, revela la necesidad de llevar a cabo ensayos en ambientes múltiples en los trabajos de mejoramiento genético para la tolerancia al MRC.

Cuadro 3. Microsatélites ligados a ISE, interacción genotipo x ambiente, coeficiente de determinación (R^2) y coeficiente de correlación de Pearson (r) entre ISE y SSR. obtenidos mediante ANAVA a dos vías de clasificación.

Cromosoma (bin)	Microsatélite	P	SSR	x	R^2	R
				Ambiente	(%)	
1 (1.02)	bnlg 1083	0,043	ns		6	-0,12 ns
1 (1.03)	umc 1021	0,672	*		7	0,20 *
4 (4.08)	umc 1612	0,052	ns		6	-0,17 *
6 (6.00)	bnlg 1043	0,023	ns		8	-0,20 **
8 (8.02)	bnlg 1352	0,341	*		6	0,03 ns
8 (8.03)	umc 1741	0,033	ns		7	0,13 ns
8 (8.08)	bnlg 1056	0,353	*		5	0,12 ns

ns= no significativo; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$

El ANAVA a una vía de clasificación (Cuadro 4), permitió determinar que umc 1021 (1.03) y bnlg 1056 (8.08) están asociados significativamente con el ISE sólo en el ambiente 2005, explicando un 7 y 8% de la variación fenotípica observada respectivamente y que el bnlg 1352 (8.02) lo está sólo en el 2006, explicando un 7% de la variación fenotípica observada.

Cuadro 4. Microsatélites ligados a ISE, coeficiente de determinación (R^2) y coeficiente de correlación de Pearson (r) entre ISE y SSR obtenidos mediante ANAVA a una vía de clasificación.

Ambiente	Cromosoma (bin)	Microsatélite	p	R^2 (%)	R
2005	1 (1.03)	umc 1021	0,050	7	0,17 ns
2005	8 (8.08)	bnlg 1056	0,043	8	0,24 **
2006	8 (8.02)	bnlg 1352	0,041	7	-0,05 ns

ns= no significativo; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$

McMullen y Simcox (1995) encontraron que la mayoría de los genes y QTL de resistencia a varias enfermedades o a insectos, están localizados en segmentos cromosómicos, que a su vez contienen factores de resistencia a otras enfermedades o insectos.

En estudios previos con SSR probados sobre una población proveniente del mismo cruzamiento pero en la generación $F_{2,3}$, se identificaron dos posibles QTL para la tolerancia a la enfermedad MRC en el cromosoma 1 y 8 que explicaron un 36,2% de la varianza fenotípica (Di Renzo *et al.*, 2004). Otros autores (Kreff *et al.*, 2004) mapearon QTL relacionados a tolerancia a MRC, trabajando con otras poblaciones de mapeo, en los grupos de ligamiento 1, 4, 8 y 10.

Xinhay y Shihuang (2004) trabajaron con la enfermedad virósica más importante del maíz en China, causada por *Sugarcane mosaic virus* (SCMV). Ellos evaluaron una población F_3 bajo inoculación artificial y detectaron tres QTL de resistencia a la virosis, uno de ellos en el cromosoma 6 en un ambiente y bajo otro ambiente de evaluación encontraron otro QTL en el cromosoma 1, ambos explicaron un 14% de la varianza fenotípica. Doble *et al.*, (2000) hallaron dos QTL para resistencia a la virosis SCMV, uno

de ellos localizado en el cromosoma 6. Pérez-Brito *et al.* (2001) identificaron QTL asociados con resistencia genética a *Fusarium. moniliforme*, que causa la pudrición de la espiga, y detectaron nueve QTL en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 6, 7 y 10 que explicaron entre 30 y 44% de la varianza fenotípica.

En cuanto a las regiones cromosómicas identificadas como involucradas en la tolerancia o resistencia a diversas patologías, coinciden con las encontradas para tolerancia a MRC, ya que en los dos ambientes analizados se detectaron marcadores SSR en los cromosomas 1, 4, 6 y 8.

Los porcentajes de variación fenotípica que explicaron los marcadores no presentaron grandes diferencias con los hallados por los autores citados anteriormente (Pérez-Brito *et al.*, 2001; Di Renzo *et al.*, 2004; Xinhay y Shihuang, 2004).

Dentro de los microsatélites encontrados (Cuadro 3), el bnlg 1043 (6.00) presentó los más elevados coeficientes de determinación ($R^2= 8\%$) y de correlación ($r= -0.20$) calculados entre el ISE de las RIL y los fenotipos moleculares de las mismas. La correlación indica que existe una asociación lineal negativa entre el ISE y los fenotipos moleculares obtenidos con el mencionado SSR.

El ANAVA a dos vías de clasificación para el carácter rendimiento permitió identificar cuatro SSR ligados significativamente, ubicados en dos grupos de ligamiento. En los microsatélites umc 1086 (4.08) y bnlg 1056 (8.08) el efecto de la interacción ambiente x microsatélite fue no significativa (Cuadro 5). Este resultado indica que los genes para rendimiento que pudieran estar ligados a estos microsatélites tuvieron el mismo comportamiento independientemente del ambiente en el que se expresaron. Ambos microsatélites explicaron 31 y 28% de la variación fenotípica observada, respectivamente. Para umc 1021(1.03) y umc 1612 (4.08) la interacción ambiente x microsatélite fue altamente significativa, lo cual indica que los genes para rendimiento ligados a estos microsatélites no tuvieron el mismo comportamiento en los diferentes ambientes. El ANAVA a una vía de clasificación (Cuadro 6) permitió identificar que estos dos SSR están asociados significativamente con el rendimiento sólo en el ambiente 2005, explicando 7 y 22% de la variación fenotípica observada, respectivamente.

Cuadro 5. Microsatélites ligados a rendimiento, interacción genotipo x ambiente, coeficiente de determinación (R^2) y coeficiente de correlación de Pearson (r) entre rendimiento y SSR obtenidos mediante ANAVA a dos vías de clasificación.

Cromosoma (bin)	Microsatélite	P	SSR	x	R^2 (%)	R
				Ambiente		
1 (1.03)	umc 1021	0,215	*	32		-0,10 ns
4 (4.08)	umc 1086	0,029	ns	31		0,18 ns
4 (4.08)	umc 1612	0,0001	**	39		0,30 **
8 (8.08)	bnlg 1056	0,024	ns	28		-0,19 *

ns= no significativo; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$

Cuadro 6. Microsatélites ligados a rendimiento, coeficiente de determinación (R^2) y coeficiente de correlación de Pearson (r) entre rendimiento y SSR obtenidos mediante ANAVA a una vía de clasificación.

Ambiente	Cromosoma (bin)	Microsatélite	p	R^2 (%)	R
2005	1 (1.03)	umc 1021	0,049	7	-0,10 ns
2005	4 (4.08)	umc 1612	0,0004	22	0,25 **

ns= no significativo; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$

Xin-Hai *et al.*, (2003) al trabajar en dos situaciones ambientales, bajo riego encontraron cuatro QTL para producción de granos, dos de ellos ubicados en el cromosoma 3 y los otros en los cromosomas 6 y 7, explicando 18,4% de la variación fenotípica total. Bajo sequía hallaron cinco QTL ubicados en los cromosomas 1, 2, 4 y 8, explicando 71,5% de la variación fenotípica total. Ribaut *et al.*, (1997) encontraron bajo riego cuatro QTL para producción de granos, uno de ellos ubicado en el cromosoma 1, explicando 9% de la variación fenotípica y bajo estrés encontraron un QTL en el cromosoma 4, explicando 5,7% de la variación fenotípica. Estos resultados coinciden con las posiciones hallados en los ambientes de evaluación, cromosomas 1, 4 y 8, indicando

que éstas serían regiones del genoma del maíz que estarían involucradas en la determinación del rendimiento en grano.

Los porcentajes de variación fenotípica que explican los microsatélites ligados a rendimiento en el presente trabajo no difirieron de los encontrados por Xin-Hai *et al.* (2003).

Dentro de los microsatélites encontrados (Cuadro 5), el umc 1612 (4.08) presentó los más elevados coeficientes de determinación ($R^2= 39\%$) y de correlación ($r= 0.30$) calculados entre el rendimiento de las RIL y los fenotipos moleculares de las mismas. La correlación indica que existe una asociación lineal positiva entre el rendimiento y los fenotipos moleculares obtenidos con el mencionado SSR.

El carácter IAE medido en la campaña 2004/05 fue analizado por medio de un ANAVA a una vía de clasificación (Cuadro 7) con el cual se encontró que los marcadores bnlg 1627 (1.02) y bnlg 1043 (6.00) están asociados significativamente explicando 11 y 7% de la variación fenotípica observada.

Cuadro 7. Microsatélites ligados a IAE, coeficiente de determinación (R^2) y coeficiente de correlación de Pearson (r) entre IAE y SSR obtenidos mediante ANAVA a una vía de clasificación.

Ambiente	Cromosoma (bin)	Microsatélite	p	R^2 (%)	r
2005	1(1.02)	bnlg 1627	0,0122	11	0,10 ns
2005	6(6.00)	bnlg 1043	0,0416	7	-0,28 **

ns= no significativo; *: $p \leq 0,05$; **: $p \leq 0,01$

Xin-Hai *et al.* (2003) hallaron bajo riego tres QTL para IAE en los cromosomas 1, 2 y 3, explicando 30,3% de la variación fenotípica total y bajo sequía dos QTL en los cromosomas 2 y 5, explicando 6,4 y 7,2% de la variación fenotípica, respectivamente. Ribaut *et al.*, (1997) encontraron QTL para IAE en los cromosomas 1, 2, 5, 6, 8 y 10. En base a éstos antecedentes y a los resultados obtenidos se infiere que alguna región del cromosoma 1 y 6 estarían involucradas en la determinación del IAE.

El microsatélite bnlg 1627 (1.02) presentó el coeficiente de determinación más elevado ($R^2= 11\%$) y el bnlg 1043 el coeficiente de correlación más elevado ($r= -0,28$)

calculado entre el IAE de las RIL y los fenotipos moleculares de las mismas (Cuadro 7). El valor de correlación indica que existe una asociación lineal negativa entre el IAE y los fenotipos moleculares obtenidos con el mencionado SSR.

Al igual que para ISE y rendimiento, los porcentajes de variación fenotípica que explican los MM ligados a IAE no difirieron de los encontrados por otros autores (Xin-Hai *et al.*, 2003).

Los coeficientes de determinación (R^2) más altos fueron los obtenidos con los MM ligados a rendimiento, luego con los ligados a IAE y por último, los más bajos los presentaron los ligados a ISE. En líneas generales lo mismo fue observado por los autores mencionados a lo largo de la discusión.

Los coeficientes de correlación de Pearson (r) se encuentran para los tres caracteres analizados dentro del mismo rango, siendo el más bajo el presentado por el bnlg 1352 (8.02) asociado a ISE (Cuadro 3) y el más alto el presentado por el umc 1612 (4.08) asociado a rendimiento (Cuadro 5).

Una correlación negativa significativa entre IAE y rendimiento fue observada en el ambiente de evaluación 2005 (Cuadro 8), lo cual indica que a medida que el IAE aumenta, el rendimiento disminuye. El IAE es por lo tanto un posible predictor del rendimiento. Xin-Hai *et al.* (2003) también encontró una correlación negativa y significativa entre IAE y rendimiento. Por otro lado, entre ISE y IAE la correlación fue positiva y no significativa. Entre ISE y rendimiento, la correlación fue negativa y altamente significativa en los ambientes de evaluación, lo cual indica que a medida que el ISE aumenta el rendimiento disminuye.

Cuadro 8. Correlación entre ISE, IAE y rendimiento de las RIL.

Caracter	IAE	Rendimiento
ISE	0,17 ns	-0,25 **
Rendimiento	-0,25 *	

*, **correlación significativa con un nivel de significancia de 0.05 y 0.01 respectivamente, ns= correlación no significativa

En los tres caracteres analizados se observaron marcadores ligados en los cromosomas 1, 4, 6 y 8. Estos resultados indicarían que los microsatélites ubicados en

éstos cromosomas podrían tener relación con segmentos cromosómicos involucrados en la determinación de los caracteres de interés: MRC, IAE y rendimiento. La identificación de marcadores asociados con éstos caracteres resulta de gran utilidad por las ventajas que pueden ser obtenidas dentro de los programas de mejoramiento. Así la MAS permite incrementar la eficiencia del mejoramiento (Tanksley, 1993), además aporta una ventaja muy importante basada en su naturaleza molecular y es que la selección se independiza del fenotipo y el ambiente. Estas características permiten identificar rápidamente genotipos únicos en poblaciones segregantes e incorporar varios genes de interés, proceso denominado “piramidización” de genes (Picca *et al.*, 2004).

La consistencia de los posibles QTL identificados en distintos ambientes, generaciones y poblaciones de mapeo incrementarían el éxito de la selección asistida por marcadores. Dado que los SSR asociados con los caracteres estudiados en este trabajo fueron detectados sólo mediante el método de análisis de la varianza a una vía de clasificación, es requerida una estimación más precisa de la posición de los posibles QTL y de la magnitud de sus efectos, aplicando otros métodos de análisis más complejos tales como mapeo por intervalo (MI) Jansen y Stam (1994), mapeo por intervalo compuesto (CIM) Zeng (1994) y mapeo por intervalo múltiple (MIM) Kao *et al.* (1999)

CONCLUSIONES

- ✓ El ANAVA permitió identificar microsatélites con efecto interacción ambiente x microsatélite no significativa: cuatro para tolerancia a MRC, dos para rendimiento y dos para IAE.
- ✓ La correlación de los caracteres IAE e ISE con el rendimiento fue negativa y entre ISE e IAE fue positiva. La correlación entre IAE y rendimiento indicaría que este carácter podría ser usado como carácter secundario en el mejoramiento de germoplasma.
- ✓ Los cromosomas 1, 4 6 y 8 podrían controlar la expresión de los caracteres de interés.
- ✓ 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, IAE y rendimiento en maíz.

BIBLIOGRAFÍA

- ÁLVAREZ, C. y E. MULIN 2004 **El gran libro de la siembra directa**. Editorial Clarín, Buenos Aires, Argentina.
- ANDRADE, F.; A. CIRILO; S. UHART y M. OTEGUI 1996 **Ecofisiología del cultivo de maíz**. Editorial La Barrosa, Buenos Aires, Argentina.
- BOLAÑOS, J. y G. EDMEADES 1993 Eight cycles of selection for drought tolerance in lowland tropical maize. II. Responses in reproductive behavior. **Field Crops Res.** 31: 253-268.
- BURR, B. y F. BURR 1991 Recombinant inbreeds for molecular mapping in maize: theoretical and practical considerations. **TAG.** 7: 55-60.
- CARCOVA, J.; L. BORRAS y M. OTEGUI 2004 Ciclo ontogénico, dinámica del desarrollo y generación del rendimiento y la calidad en maíz. En: SATORRE, E; R. BENECH; G. SLAFER; E. DE LA FUENTE; D. MIRALLES; M. OTEGUI y R. SAVIN. **Producción de granos**. Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires.
- DINTINGER, J.; D. VERGER; S. CAIVEAU; A. RISTERUCCI; J. GILLES; F. CHIROLEU; B. COURTOIS; B. REYNAUD y P. HAMON 2005 Genetic mapping of maize stripe disease resistance from the Mascarene source. **Theor. Appl. Genet.** 111: 347-359.
- DI RENZO, M.; N. BONAMICO; D. DÍAZ; J. SALERNO; M. IBAÑEZ y J. GESUMARÍA 2002 Inheritance of resistance to Mal de Río Cuarto (MRC) disease in *Zea mays* (L.). **J. Agric. Sci.** 139: 47-53.
- DI RENZO, M.; N. BONAMICO; D. DÍAZ; M. IBAÑEZ; M. FARICELLI; M. BALZARINI y J. SALERNO 2004 Microsatellite markers linked to QTL for resistance to Mal de Río Cuarto disease in *Zea mays* L. **J. Agric. Sci.** 142 (3): 289-295.
- DOEBLEY, J. F.; 1990. Molecular evidence and the evolution of maize. **Econ. Bot.** 44 (3): 6-27.
- DUBLE, C.; A. MELCHINGER; L. KUNTZE; A. STORK y T. LUBBERSTEDT 2000 Molecular mapping and gene action of Scm1 and Scm2, two major QTL contributing to SCMV resistance in maize. **Plant Breeding** 119: 299-303.
- DUBLE, C.; M. QUINT; A. MELCHINGER; M. XU y T. LUBBERSTEDT 2003 Saturation of two chromosome regions conferring resistance to SCMV with SSR and AFLP markers by targeted BSA. **Theor. Appl. Genet.** 106: 485-493.
- FALCONER, D. S y T. F. C. MACKAY 1996 **Introduction to Quantitative Genetics**. 4 th Edn. Longman, London.
- FISCHER, K. y F. PANDEY 1984 Tropical maize. En: Goldsworthy, P. R. y Fisher, N. M. (Eds.). **The physiology of tropical field crops**. Wiley and Sons, U.K.

- GALLAIS, A. 1990 **Théorie de la sélection en amélioration des plantes**. Masson, 588.
- GRAU, C. y V. RADKE 1982 Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Dis.** 66: 506-508.
- GROH, S.; D. GONZÁLEZ DE LEÓN; M. KHAIRALLAH; C. JIANG,; D. BERGVINSON; M. BOHN; D. HOISINGTON; A. MELCHINGER 1998 QTL mapping in tropical maize: III. Genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. and associated traits in two RIL populations. **Crop Sci.** 38, 1062-1072.
- HALL, A.; F. VILELLA; N. TRAPANI y C. CHIMENTI 1982 The effects of water stress and genotype on the dynamics of pollen-shedding and silking in maize. **Field Crops Res.** 5: 349-363.
- INFOSTAT version 2004 Grupo InfoStat, FCA, Facultas de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.
- JANSEN, R.C. y P. STAM 1994 High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping **Genetics** 136:1447-1455.
- KAO, C.H.; Z.B. ZENG, y R.D. TEASDALE 1999 Multiple interval mapping for Quantitative Trait Loci **Genetics** 152: 1203-1216.
- KREFF, D.; G. PACHECO; D. DIAZ y J. SALERNO 2004 Genetic mapping and quantitative trait loci analysis for resistance to Mal de Río Cuarto, the major disease of maize in Argentina. **Plant & Animal Genomes XII Conferenc:** P501.
- LEE, M. 1995 DNA markers and plant breeding programs. *Advances in Agronomy* 55: 265-344.
- LENARDON, S.; G. MARCH; S. NOME y J. ORNAGHI 1998 Recent outbreak of “Mal de Río Cuarto” virus on corn in Argentina. **Plant disease** 82: 448.
- LENARDON, S.; A. MARINELLI; M. ALCALDE y M. KEARNEY 2003 **Fitopatología. Mal de Río Cuarto: 150-152**. Universidad Nacional de Río Cuarto.
- MCMULLEN, M. y D. SIMCOX 1995 Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. **Molec. Plant-Microbe Interac.** 8: 811-815.
- MAIZE GDB 2005 En: <http://www.agronmissouri.edu/ssr.html>. Consultado: 10-10-2005.
- MARCH, G.; J. ORNAGHI; J. BEVIACQUA y S. LENARDÓN 1997 Manual técnico del Mal de Río Cuarto. *Morgan, Tecnología Mycogen*. Buenos Aires, Argentina.
- MARINELLI, A.; J. MUÑOZ; S. LENARDÓN y C. MARTINO 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 millaceum* L.). **II Jornadas de Investigación UNC - IV Congreso Nacional de Maíz:** III:1-10. Córdoba, Argentina.

- MELCHINGER, A. 1990 Use of molecular marker in breeding for oligogenic disease resistance. **Plant Breeding** 104: 11-19.
- MELCHINGER, A.; H. UTZ y C. SCHON 1998. 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. **Gentetics** 149: 383-403.
- MICHELMORE, R.; I. PARAN y R. KESSELI 1991 Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 88: 9828-9832.
- MORENO-GONZALEZ, J. 1993 Efficiency of generations for estimating marker-associated QTL effects by multiple regression. **Gentetics** 135, 223-231.
- NOME, S.; S. LENARDÓN; B. RAJU; I. LAGUNA; S. LOWE y D. DOCAMPO 1981 Association of retrovirus-like particles with disease of Río Cuarto of Argentina. **Phytopathol.** 101: 7-15.
- ORNAGHI, J.; G. BOITO; G. SÁNCHEZ y G. MARCH 1993 a. Estudio de las poblaciones de *Delphacodes kuscheli* Fennah en avena, trigo y centeno. **Workshop “Mal de Río Cuarto del Maíz”**: 39-40. Córdoba, Argentina.
- ORNAGHI, J.; G. BOITO; G. SANCHEZ; G. MARCH y J. BEVIACQUA 1993 b. Studies on the populations of *Delphacodes kuscheli* Fennah, in different years and agricultural areas. **J. Gen. Breed.** 47: 277-282.
- ORNAGHI, J.; G. MARCH; G. BOITO; A. MARINELLI; J. BEVIACQUA; J. GIUGGIA y S. LENARDÓN 1999 Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli* vector of “Mal Río Cuarto” Virus. **Maydica** 44: 219-223.
- PEREZ-BRITO, D.; D. JEFFERS; D. GONZALEZ DE LEON; M. KHAIRALLAH; M. CORTES-CRUZ; G. VELAZQUEZ-CARDELAS; S. AZPIROZ-RIVERO Y G. SRINIVASAN 2001 QTL mapping of *Fusarium moniliforme* ear rot resistance in highland Maize, Mexico. **Agrociencia** 35: 181-196.
- PICCA, A.; M. HELGUERA; N. SALOMON y A. CARRERA 2004 Marcadores moleculares. **En: ECHENIQUE, V.; C. RUBINSTEIN; L. MROGINSKI. Biotecnología y mejoramiento Vegetal.** INTA. Buenos Aires, Argentina.
- RIBAUT, J.; C. JIANG y D. GONZALEZ DE LEON 1997 Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize.2. Yield components and marker-assisted selection strategies. **Theor. Appl. Gent.** 94: 887-896.

- SAGHAI-MAROOF, M.; K. SOLIMAN; R. JORGENSEN y R. ALLARD 1984 Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **PNAS** 81: 8014-8018.
- SAGPYA 2006 Estimaciones agrícolas – Cereales Maíz. En: www.sagpya.mecon.gov.ar. Consultado: 15-09-2006.
- SALERNO, J. 1995 Título de propiedad dispuesto por el INASE de la SAGPyA del cultivar de maíz denominado BLS14 (art. 22 de la Ley 20.247 y art. 37 del Decreto 2183/91) bajo el n° 571; expd. 126/92 del 28/03/95.
- TANKSLEY, S. 1993 Mapping polygenes. **Ann. Rev. Gen.** 27: 205-233.
- WESTGATE, M. y P. BASSETTI 1990 Heat and drought stress in corn: what really happens to the corn plant at pollination. **En: Wilkinson, D. (Ed.). Proceeding of the 45 th Annual Corn & Sorghum Research Conference.** ASTA, Washington.
- XIN-HAI, L.; L. XIAN-DE y Z. SHI-HUANG 2003 Identification of Quantitative Trait Loci Anthesis-Silking Interval and Yield Components Under Drought Stress in Maize. **Acta Botanica Sínica** 45: 852-857.
- XINHAI, L. y Z. SHIHUANG 2004 Molecular mapping of resistance to Sugarcane Mosaic Virus in Maize. **Proceedings of the 4 th International Crop Science.** Brisbane, Australia.
- XU, M.; A. MELCHINGER; X. XIA; T. LÜBBERSTEDT 1999 High-resolution mapping of loci conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize using RFLP, SSR, and AFLP markers. **Molecular and General Genetics.** 261 574-581.
- ZENG, Z. 1994 Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics** 136: 1457-1468
- ZHAO, M.; Z. ZHANG; S. ZHANG; W. LI; D. JEFFERS; T. ROANG y G. PAN 2006 Quantitative trait loci for resistance to Banded Leaf and Sheath Blight in maize. **Crop Sci.** 46: 1039-1045.

ANEXOS



Figura 1. Evolución de la producción y rendimiento de maíz.

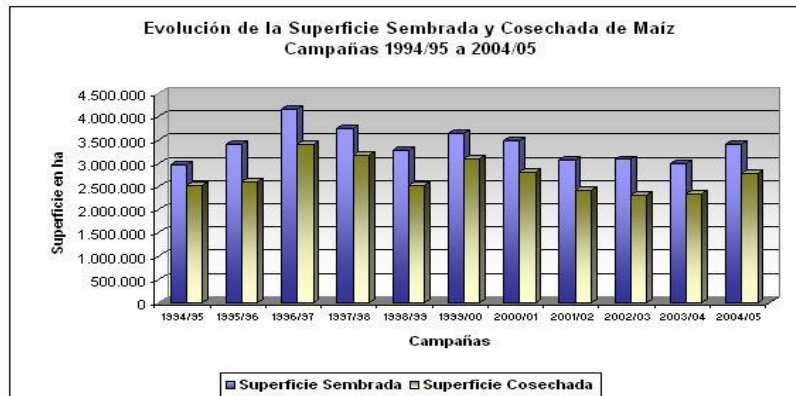


Figura 2. Evolución de la superficie sembrada y cosechada de maíz.

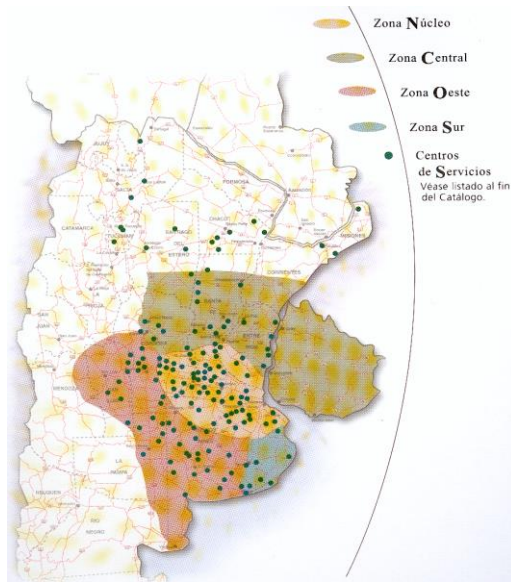


Figura 3. Zonas maiceras argentinas



Figura 4. Inflorescencia femenina malformada



Figura 5. Planta de maíz severamente afectada por MRC: acortamiento de entrenudos, hojas del tercio superior reducidas y panojas atrofiadas



Figura 6. Enaciones en rosario y callos en el envés de la hoja de maíz.



Figura 7. Híbridos susceptibles a MRC con sintomatología característica en surcos centrales; híbridos tolerantes a MRC en surcos laterales.

Cuadro 1. Solución amortiguadora con CTAB para extracción

	[Final]	1000 ml
1 M Tris 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 dionizada		600 ml
CTAB	2 %	20 gr

Cuadro 2. Soluciones de lavado

<u>Solución 1:</u> 76% de EtOH, 0,2 M Na OAc	
Sol. Conc.	500ml
EtO H absoluto	380 ml
2,5 M NaOAc	40 ml
Agua deionizada	80 ml
<u>Solución 2:</u> 76% de EtOH, 10 mM NH ₄ OAc	
Sol. Conc.	500 ml
EtOH absoluto	380 ml
1 M NH ₄ OAc	5 ml
Agua deionizada	115 ml
<u>Solución 3:</u> 76% de EtOH	

Cuadro 3. Buffer TE

1 M Tris-8,0	500 µl
0,5 M EDTA	100 µl
Agua deionizada	50 ml

Cuadro 4. Buffer Tris-borato

Buffer [Stock]	[Final]
TBE 10X: 108 g Tris 0,9 M	1,0X: 0,090 M Tris-borato
55 g Ac. Bórico	0,002 M EDTA
40 ml 0,5 M EDTA pH 8,0	0,5X: 0,045 M Tris-borato
	0,001 M EDTA

Cuadro 5. Solución de reacción por PCR

Reactivo	Stock	Volumen por tubo
dH ₂ O (HPLC)	-	12,0 µl
Buffer	10 X (Promega)	2,0 µl
Cl ₂ Mg	25 mM (Promega)	1,2 µl
Iniciador 1	5 mM	1,0 µl
Iniciador 2	5 mM	1,0 µl
4 dNTP	10 Mm	0,4 µl
Taq polimerasa	1,25 u/µl	0,4 µl
ADN	25 ng/µl	2,0 µl
		20,0 µl

Cuadro 6. Programa de amplificación por PCR.

Programa		
94 °C	2'	
94 °C	30''	} 10 ciclos
65 °C	1' (Δ t ° -1 °C)	
72 °C	2'	
94 °C	30''	
55 °C	1'	} 25 ciclos
72 °C	2'	
72 °C	5'	
10 °C	∞	
100 °C	t° de tapa	