



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

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

Modalidad: Proyecto

MAPEO DE QTL PARA UNA MEDIDA MULTIVARIADA DE LA
REACCIÓN AL VIRUS DEL MAL DE RÍO CUARTO EN MAÍZ

Alumno: Paula Ivana FELIÚ

DNI: 34.966.030

Director: Natalia Cecilia BONAMICO

Co-Director: María Leticia BORGHI

Río Cuarto – Córdoba

Noviembre de 2013



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final:

**MAPEO DE QTL PARA UNA MEDIDA MULTIVARIADA DE LA
REACCIÓN AL VIRUS DEL MAL DE RÍO CUARTO EN MAÍZ**

Autor: Paula Ivana FELIÚ

DNI: 34.966.030

Director: Natalia Cecilia BONAMICO

Co-Director: María Leticia BORGHI

Aprobado y corregido de acuerdo con las sugerencias de la comisión
evaluadora:

Fecha de presentación: ____/____/____.

Secretario Académico

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

A Dios por la bendición de estudiar esta hermosa carrera.

A mi familia que me acompaña y apoya incondicionalmente, especialmente a la persona que hoy no está físicamente conmigo pero donde estés, es para vos Papá.

A Natalia Bonamico, Miguel Di Renzo y Leticia Borghi por permitirme realizar mi tesis en su grupo de trabajo, por guiarme y ayudarme constantemente.

A mis amigas de toda la vida por estar siempre. A las maravillosas personas que conocí a lo largo de la carrera con los cuales compartimos muchas horas de estudio, buenos momentos, con las cuales espero compartir muchos años más de amistad.

A todos aquellos profesores de la Facultad de Agronomía y Veterinaria que dejaron un gran aprendizaje en mí.

MUCHAS GRACIAS

ÍNDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	III
RESUMEN	VIII
ABSTRACT	IX
INTRODUCCIÓN	1
Importancia del maíz en Argentina	1
El Mal de Río Cuarto en maíz	2
Marcadores moleculares y <i>loci</i> para caracteres cuantitativos (QTL)	9
HIPÓTESIS	12
OBJETIVOS	12
MATERIALES Y MÉTODOS	13
Material vegetal	13
Ensayo de campo	13
Análisis estadístico	16
Análisis fenotípico	16
Análisis molecular	17
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	19
Fenotípicos	19
Caracterización de los ambientes de evaluación	19
Heredabilidad	21

Genotípicos	23
Análisis con SSR y mapa de ligamiento	23
Detección de QTL	25
CONCLUSIONES	31
BIBLIOGRAFÍA	32

ÍNDICE DE CUADROS

- Cuadro 1. Gramíneas hospedantes alternativas del virus del Mal de Río Cuarto y del vector *Delphacodes kuscheli*. 7
- Cuadro 2. Grados de severidad de la enfermedad Mal de Río Cuarto. 15
- Cuadro 3. Estimación de las medias del índice de severidad de enfermedad (ISE) del Mal de Río Cuarto y demás variables evaluadas en las líneas parentales (LP116 y B73) y en las 208 familias $F_{2,3}$, en ambientes individuales y a través de ambientes en donde la enfermedad es endémica. 20
- Cuadro 4. Estimación de los componentes de varianza, heredabilidad en sentido amplio e intervalos de confianza del índice de severidad de enfermedad (ISE) del Mal de Río Cuarto en 208 familias $F_{2,3}$, en ambientes individuales y a través de tres ambientes en donde la enfermedad es endémica. 23
- Cuadro 5. Fenotipo molecular de las líneas parentales (B73 y LP116) de marcadores SSR que revelaron bandas nítidas bajo el programa de amplificación por PCR ensayado. 24
- Cuadro 6. Parámetros asociados con QTL para el índice de severidad (ISE) del Mal de Río Cuarto en 208 familias $F_{2,3}$ derivadas del cruzamiento entre B73 \times LP116 en ambientes individuales en donde la enfermedad es endémica. 26
- Cuadro 7. Parámetros asociados con QTL para el índice de severidad (ISE) del Mal de Río Cuarto en 208 familias $F_{2,3}$ derivadas del cruzamiento entre B73 \times LP116 a través de ambientes en donde la enfermedad es endémica. 30

ÍNDICE DE FIGURAS

- Figura 1. Áreas de producción de maíz en Argentina. 2
- Figura 2. Tetraedro vector-hospedante-virus-ambiente de la enfermedad Mal de Río Cuarto. 3
- Figura 3. Insecto vector del Mal de Río Cuarto. A. *Delphacodes kuscheli* macho. B. *Delphacodes kuscheli* hembra. 5
- Figura 4. Síntomas característicos de la enfermedad Mal de Río Cuarto. A. Espiga reducida, con pocos granos. B. Nervadura con presencia de enaciones. C. Enanismo. D. Tallo achatado y acortamiento de los entrenudos. 6
- Figura 5. Áreas afectadas por epidemias del Mal de Río Cuarto en las campañas agrícolas 1981/82, 1996/97 y 2006/07. 8
- Figura 6. A. Marcación de surco de forma manual para posterior siembra de maíz. B. Colocación del insecto vector en túneles de malla fina para realizar infecciones controladas al maíz. C. Chicharrita posada sobre coleoptile de maíz dentro del túnel de malla fina. D. Vista del ensayo de campo con familias $F_{2,3}$ en la localidad de La Aguada. 14
- Figura 7. Distribución del índice de severidad de enfermedad (ISE) de las familias $F_{2,3}$ a través de tres ambientes del área en donde la enfermedad Mal de Río Cuarto es endémica. El comportamiento medio del parental tolerante (LP116) y del parental susceptible (B73) está indicado. 21
- Figura 8. Mapa de ligamiento construido con nueve SSR. El mapa tiene una longitud de 353,8 cM y un intervalo promedio entre marcadores de 27,21 cM. La posición de QTL para el índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC está indicada. • Río Cuarto ○ La Aguada ⊕ La Aguada 2011-2012 • A través de ambientes. 27

RESUMEN

El Mal de Río Cuarto (MRC) es la enfermedad viral más importante del maíz en Argentina. La tolerancia genética al MRC se comporta como un carácter cuantitativo controlado por *loci* de distintas regiones genómicas. El objetivo general de este trabajo fue identificar *loci* SSR asociados al índice de severidad de la enfermedad (ISE). Se evaluaron familias F_{2:3} derivadas del cruzamiento entre una línea susceptible al MRC (B73) y otra tolerante (LP116), se realizó en tres localidades del área en donde la enfermedad es endémica con un diseño en bloques completos al azar con dos repeticiones. A partir del grado medio de severidad de los síntomas se calculó el índice de severidad de la enfermedad (ISE). La heredabilidad en sentido amplio del ISE del MRC fue estimada para cada ambiente y a través de ambientes, en función de los componentes de varianza. La heredabilidad de la variable ISE asumió valores moderados y fueron similares en ambientes individuales y a través de ambientes. El análisis de QTL por ambiente y a través de ambientes identificó dos regiones asociadas con el ISE ubicadas en los bins 1.03 y 1.07. El parental tolerante contribuyó en la expresión de la tolerancia al MRC.

Palabras claves: Mal de Río Cuarto, QTL, índice de severidad de la enfermedad.

SUMMARY

“QTL mapping for a multidimensional indicator of the reaction to Mal de Río Cuarto virus in maize”

Mal de Río Cuarto (MRC) is the most important viral disease of maize in Argentina. Resistance to MRC disease is a quantitative trait controlled by individual genetic *loci* known as QTL. The disease severity index (DSI), as a multidimensional indicator of reaction to Mal de Río Cuarto Virus (MRCV), is a weighted average of the severity and incidence of this viral disease. The general objective of this research was to map quantitative trait *loci* (QTL) for reaction to MRCV. A population of 208 families $F_{2:3}$ derived from a cross between resistant line (LP166) and susceptible line (B73) was phenotyping for DSI in three environments where the disease is endemic. From the medium grade of severity it was calculated DSI. The heritability of DSI variable assumed moderate values that were similar in individual environments and across environments. QTL analysis by individual environment and across environments identified two regions associated with DSI bins located in the 1.03 and 1.07. The parental tolerant expression contributes tolerance MRC.

Key words: Mal de Río Cuarto disease, QTL, disease severity index.

INTRODUCCIÓN

Importancia del maíz en Argentina

El Maíz (*Zea mays sp.*) es una planta gramínea, anual, con vainas foliares que se superponen y con láminas alternas anchas. Posee espigas (inflorescencias femeninas encerradas por "chaldas") de 7 a 40 cm de largo y flores estaminadas que en conjunto forman grandes panojas terminales o inflorescencias masculinas. Se propaga por semillas producidas mayormente por fecundación cruzada también denominada alógama, la cual depende del movimiento del polen por medio del viento (Gear *et al.*, 2006).

En Latinoamérica existe una gran diversidad genética de maíz. En nuestro país se han descrito más de 40 razas autóctonas de maíces y las zonas con mayor variabilidad genética son las del noroeste y noreste. El mejoramiento genético de maíz más simple ha sido el realizado durante siglos en forma masal por los agricultores, al seleccionar por sus características externas las espigas o granos que reservarían para la siembra del año siguiente.

La planta de maíz ha evolucionado en el transcurso de la historia; hasta el siglo XX, se fue mejorando a partir de variedades de polinización abierta, que son una colección de individuos heterocigotas y heterogéneos. Estas variedades fueron modificándose gracias a la selección realizada por las distintas civilizaciones americanas. Sin embargo, el avance en el conocimiento de su genética permitieron desarrollar líneas genéticamente uniformes con características particulares, a partir de las cuales los mejoradores lograron construir semillas híbridas, con cualidades agronómicas superiores (Gear *et al.*, 2006).

El maíz en Argentina es muy importante tanto para el consumo humano como así también para la alimentación animal. Córdoba es la segunda provincia de mayor producción de maíz en la Argentina, produce el 27% de la producción nacional; Buenos Aires es la primera con el 39% de participación, y en tercer lugar se ubica Santa Fe con un 17% (Figura 1). Argentina participa en un 2% de la producción mundial, exporta cerca del 65% (es el segundo exportador mundial) de lo que se cosecha y destina al mercado interno la diferencia (CRA, 2013). La producción de maíz, que a comienzos de la década del '90 totalizaba unos 8 millones de toneladas anuales, ha experimentado un crecimiento constante, con un rinde promedio nacional de 7.300 kg.ha⁻¹ (SAGPyA, 2012). Durante la campaña 2011-2012, en todo el país hubo una superficie sembrada de 5 millones de ha, una superficie cosechada de 3,7 millones de ha, y una producción de 21 millones de toneladas, con un rendimiento de 5.735 kg.ha⁻¹. En cuanto a la

provincia de Córdoba la superficie sembrada fue de 1 millón de ha, la superficie cosechada fue de 866.100 ha; con una producción de 4,7 millones de toneladas con un rendimiento medio de 5.536 kg.ha⁻¹ (SIIA, 2012).

Lo mencionado permite anticipar una tendencia positiva en el volumen de producción nacional de maíz, los que según las proyecciones del PEA (Plan Estratégico Agroalimentario) 2010-2020 alcanzarían a un total de 45,9 millones de toneladas en el año 2020, con un incremento de 24,9 millones de toneladas con respecto a la temporada 2011-2012.

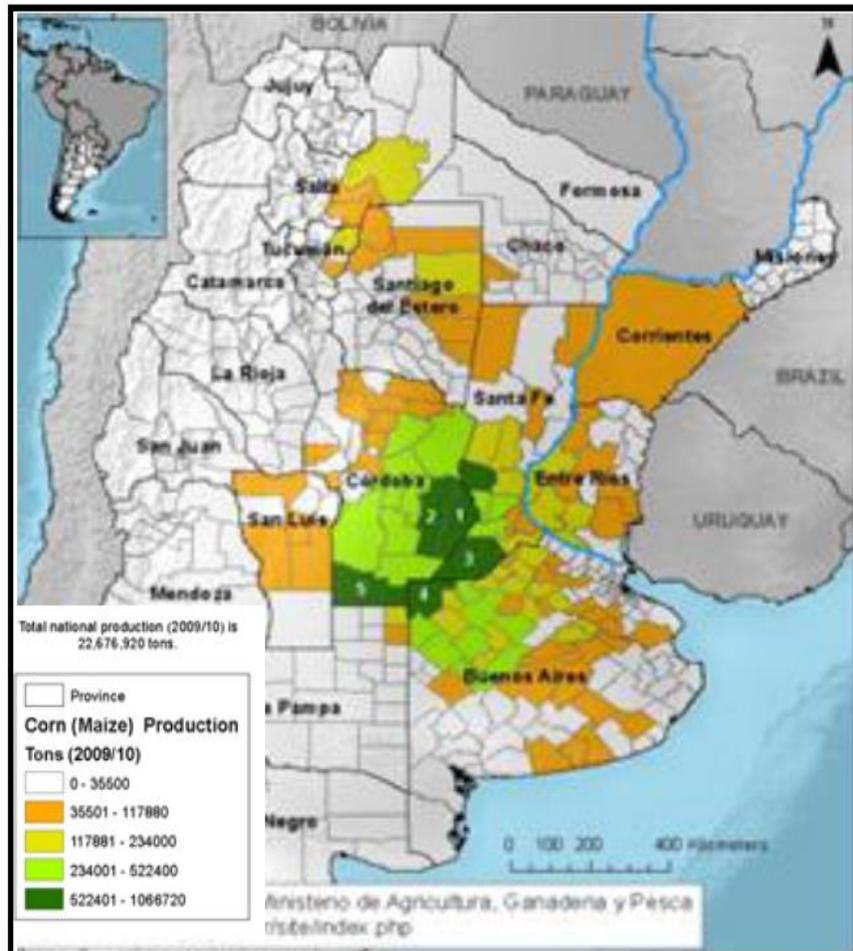


Figura 1. Áreas de producción de maíz en Argentina (CRA, 2013).

El Mal de Río Cuarto en maíz

El cultivo de maíz es afectado por diversos patógenos que causan distintas enfermedades, entre las que se puede mencionar el Mal de Río Cuarto (MRC). La ocurrencia de

ésta, así como su magnitud en la naturaleza depende de la importancia de la interacción del vector con el patógeno, el hospedante y el ambiente, como se puede observar en la Figura 2 (Redinbaugh y Pratt, 2009).



Figura 2. Tetraedro vector hospedante virus-ambiente de la enfermedad Mal de Río Cuarto (Redinbaugh y Pratt, 2009).

El virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) es el agente causal del MRC, enfermedad viral más importante del cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en Argentina, ya que disminuye el rendimiento, la calidad y su valor económico (Nome *et al.*, 1981; Redinbaugh y Pratt, 2009). Este virus pertenece a la familia *Reoviridae*, género *Fijivirus*, es circulativo propagativo (Muñoz *et al.*, 1991) y es transmitido principalmente por el insecto *Delphacodes kuscheli* Fennah (Homoptera: *Delphacidae*), conocido como “chicharrita” (Remes Lenicov y Virla, 1993), quien lo transmite a la planta al introducir su estilete en los tejidos de conducción para alimentarse. Las poblaciones del vector están compuestas por individuos de dos formas, macrópteros (alas largas) que tienen la capacidad de volar (Figura 3) y braquípteros de alas cortas sin esta capacidad (Ornaghi *et al.*, 1993). El insecto vector desarrolla sus poblaciones infectivas en los verdeos invernales. Las formas juveniles (ninfas) y adultas de alas cortas del insecto permanecen en los verdeos invernales, mientras que las formas adultas de alas largas son las responsables de la

migración hacia los cultivos primavera-estivales, entre ellos el maíz. El desarrollo poblacional del vector, es decir la densidad poblacional, la cantidad relativa de ninfas, de braquípteros y de macrópteros, así como el ritmo de migración, varía en función de las condiciones ambientales principalmente las temperaturas y las lluvias, junto con el desarrollo de los cereales invernales (Lenardon *et al.*, 2007). Durante el invierno se pueden dar condiciones de temperatura que promuevan la movilidad de las chicharritas, con fotoperíodos menores a 13 hs, el insecto permanece en el mismo estadio. Los registros indican que las poblaciones presentan un claro patrón estacional, incrementándose desde octubre, con su pico máximo en diciembre para finalmente disminuir su población en marzo o abril (Grilli y Estallo, 2006).

Es muy importante observar las condiciones climáticas para decidir las opciones de manejo en base a los verdeos de invierno, prestando atención a cómo se desarrollan las poblaciones del insecto vector. Algunos factores abióticos pueden predisponer el cultivo a una epidemia, dentro de estos se mencionan; sequías, heladas tempranas, fertilizantes en dosis no adecuadas, vientos rasantes, planchado de suelos y fitotoxicidad por algunos herbicidas. Cualquiera de estos factores, sólo ó en combinación pueden contribuir a alargar el estadio crítico, que se extiende desde la emergencia de la plántula (coleoptile) hasta la octava hoja. Por lo tanto, se expande el período más sensible a las infecciones por los insectos transmisores y consecuentemente se arriesga a exponer al cultivo a más carga viral (Lenardon *et al.*, 2007).

Se ha informado que las poblaciones de *Delphacodes haywardi* Muir también pueden adquirir el virus y transmitirlo, tanto en condiciones experimentales como naturales (Velázquez *et al.*, 2003); así como *Pyrophagus tigrinus* puede ser vector y reservorio del MRCV en la naturaleza (Remes Lenicov y Varela, 2005).

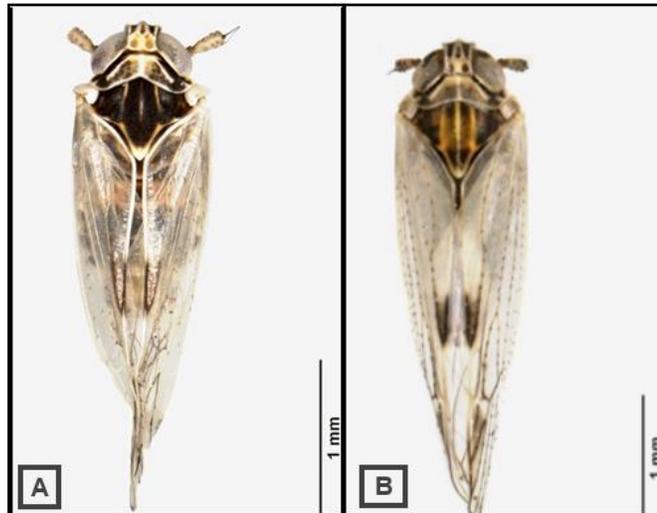


Figura 3. Insecto vector del Mal de Río Cuarto. A. *Delphacodes kuscheli* macho; B. *Delphacodes kuscheli* hembra. Extraído de SMN.

Una vez adquirido el virus, este se multiplica dentro del vector, el cual permanece infectivo durante toda su vida y se perpetúa de una estación de cultivo a otra (Di Feo *et al.*, 2010). El virus es esférico, isométrico, con un diámetro de 60 a 70 nanómetros, restringido a los tejidos floemáticos de conducción de la savia. El genoma viral consiste en 10 segmentos de RNA de doble cadena, que se denominan S1-S10 según su movilidad electroforética en gels de poliacrilamida (Del Vas, 2013).

La eficacia de transmisión del virus por el vector es muy baja (entre 0,5 y 8%), por eso alta densidad poblacional y movilidad del vector son indispensables para el desarrollo de epidemias. A mayor temperatura y menor humedad relativa se incrementa la epidemia. Las migraciones del vector son consecuencia de una elevada densidad poblacional y el deterioro del cultivo hospedante. El período entre la inoculación y la aparición de los síntomas (período de incubación) es de aproximadamente 30 días. La infección afecta principalmente a tejidos vasculares (Presello *et al.*, 2007).

Los síntomas del MRC son espigas que proliferan, disminuyen de tamaño, se deforman y en casos severos no forman granos o estos son muy escasos (Figura 4. A). Se pueden observar hojas acartuchadas, formaciones tumorales denominadas enaciones (deformaciones debidas a sobre crecimiento de tejidos) sobre las nervaduras en el envés de las hojas (Figura 4. B), las cuales son características de la enfermedad y pueden presentarse también en las brácteas de las espigas y en las vainas foliares. Otro síntoma es el enanismo (Figura 4. C); los tallos suelen achatarse y se observa un acortamiento de los entrenudos (Figura 4. D). Las panojas pueden ser

reducidas, con flores total o parcialmente ausentes. El sistema radicular se reduce y se forman cortes o lesiones necróticas. La severidad de los síntomas está relacionada con el momento de la infección. Así mismo, se puede manifestar un mosaico foliar tenue, en forma de estrías longitudinales cortadas y muerte de plantas cuando la infección se produce temprano en la estación de crecimiento o en cultivares altamente susceptibles. Cuando las infecciones son tardías, las plantas alcanzan una altura casi normal, con las hojas del tercio superior erguidas y menor desarrollo de lámina foliar (Laguna y Giménez Pecci, 2004).

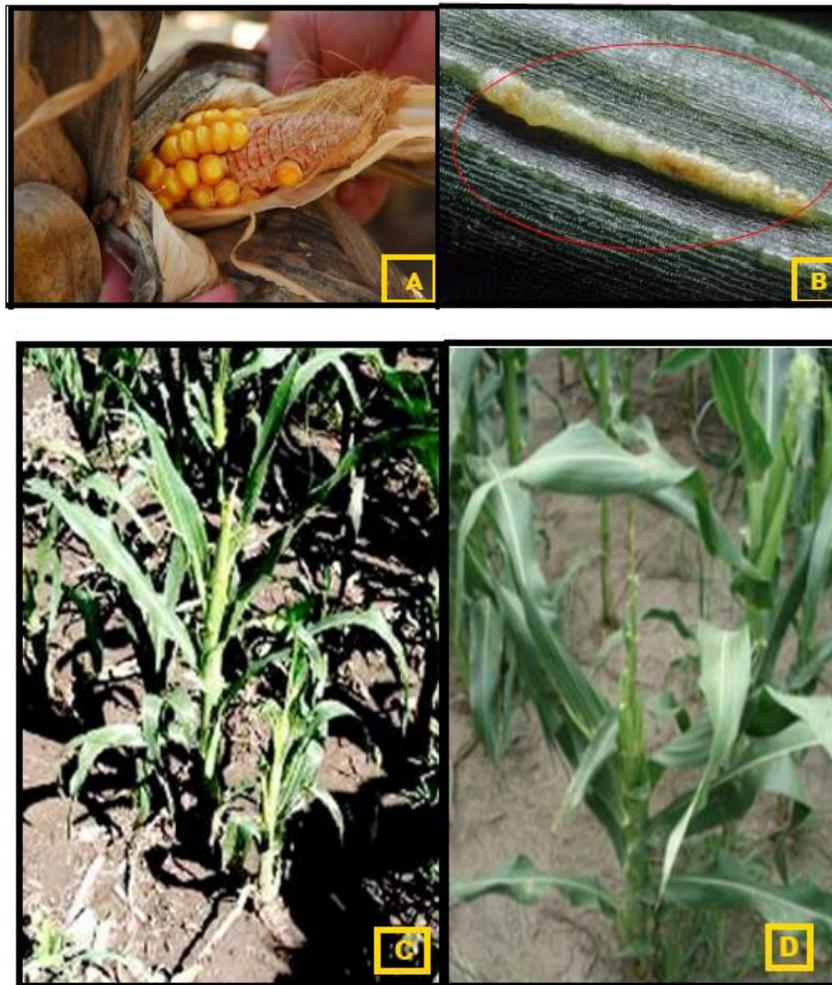


Figura 4. Síntomas característicos de la enfermedad Mal de Río Cuarto. A. Espiga reducida con pocos granos. B. Nervadura con presencia de enaciones. C. Enanismo. D. Tallo achatado y acortamiento de los entrenudos.

El MRCV es capaz de infectar otros cultivos, se ha detectado en un amplio rango de gramíneas hospedantes, de las cuales las más importantes desde el punto de vista epidemiológico son el trigo (*Triticum aestivum* L.), la avena (*Avena sativa* L.), la cebada (*Hordeum vulgare* L.), el centeno (*Secale cereale* L.), varias malezas y pasturas estivales (Cuadro 1). Aunque el virus no causa daños de importancia en los cereales de invierno, éstos cumplen un rol clave en el ciclo de la enfermedad al actuar como hospedantes de *D. kuscheli* y constituir una importante fuente de inóculo para la transmisión al maíz (Laguna y Giménez Pecci, 2004).

Cuadro 1. Gramíneas hospedantes alternativas del virus del Mal de Río Cuarto y del vector *Delphacodes kuscheli*.

Especies cultivadas		Especies forrajeras y malezas	
<i>Avena sativa</i>	Avena	<i>Bromus unioloides</i>	Cebadilla pampeana
<i>Triticum aestivum</i>	Trigo	<i>Digitaria sanguinalis</i>	Pata de gallina
<i>Sorghum vulgare</i>	Sorgo	<i>Setaria verticillata</i>	Cola de zorro
<i>Panicum milliaceum</i>	Mijo	<i>Cenchrus echinatus</i>	Cadillo
<i>Setaria italica</i>	Moha	<i>Cynodon dactylon</i>	Gramón
<i>Secale cereale</i>	Centeno	<i>Echinochloa colona</i>	Pasto overito
<i>Triticum aestivum x Secale cereale</i>	Triticale	<i>Echinochloa crusgalli</i>	Capín arroz
<i>Triticum sp. x Secale sp. x Thinopyrum</i>	Tricepiro	<i>Eleusine indica</i>	Píe de gallina
<i>Hordeum vulgare</i>	Cebada	<i>Sorghum halepense</i>	Sorgo de alepo
<i>Chloris gayana</i>	Gramma rhodes	<i>Cyperus rotundus</i>	Cebollín
<i>Panicum maximun</i>	Gatton panic	<i>Arundo donax</i>	Caña de castilla
<i>Eragrostis curvula</i>	Pasto llorón	<i>Eragrostis virescens</i>	Gramilla de huerta
<i>Panicum coloratun</i>	Panicum	<i>Cenchrus pauciflorus</i>	Roseta
		<i>Eleusine tristachya</i>	Pasto ruso
		<i>Bromus brevis</i>	Cebadilla criolla
		<i>Stipa tenuissima</i>	Paja blanca

La presencia de una enfermedad en una zona, de modo permanente, lleva a calificarla de endémica en esa área. En este caso, la zona comprendida por el sur de Córdoba, noreste de San Luis, oeste de Buenos Aires y norte de La Pampa, está sujeta a epidemias recurrentes. A partir de su detección en 1967, esta enfermedad se ha manifestado con diferentes grados de incidencia y severidad en todas las campañas agrícolas en el departamento de Río Cuarto, provincia de Córdoba. En la campaña agrícola 1976-1977 se observó MRC por primera vez en gran cantidad de lotes de maíz, en algunos fue tan severa que causó pérdidas de hasta 80%. Desde entonces, la enfermedad se ha extendido gradualmente con un grado de incidencia del 1,5% por año. En la campaña agrícola 1981-1982 se observó la primera epidemia ocasionada por esta enfermedad en

el departamento Río Cuarto, la que causó pérdidas de más de 55.000 ha de las 360.000 ha sembradas. La infección más importante ocurrió durante la campaña 1996-1997, con 300.000 ha dañadas y pérdidas estimadas en 120 millones de dólares (Lenardon *et al.*, 1998). Presello *et al.* (2007) informaron durante la campaña 2006-2007 que la enfermedad se expandió, pudiéndose detectar cultivos con síntomas en casi todas las zonas maiceras. La principal diferencia es que en las zonas centro, norte y sur de Buenos Aires, este de Córdoba y centro y sur de Santa Fe la virulencia fue mucho menor que la epidemia ocurrida 10 años atrás, siendo muy difícil detectar plantas afectadas en los cultivos de maíz de esas zonas (Figura 5). A la menor producción de grano se le debe agregar la reducción en la producción de materia verde para silaje y en el volumen de rastrojo, los cuales constituyen una importante reserva forrajera invernal en los sistemas agrícola-ganaderos del sur de la provincia de Córdoba (Lenardon *et al.*, 1999).

La enfermedad afecta al resto del cinturón maicero con epidemias esporádicas de menores niveles de incidencia. Estudios de monitoreos de la enfermedad permitieron comprobar que en la actualidad el virus está presente en cultivos de maíz en las provincias de Jujuy, Salta, Tucumán, Catamarca, Chaco, Corrientes, Entre Ríos, Misiones, Formosa, Santiago del Estero, La Rioja, Santa Fe, Buenos Aires, Córdoba, Mendoza, San Juan, La Pampa y San Luis (Laguna y Giménez Pecci, 2004).

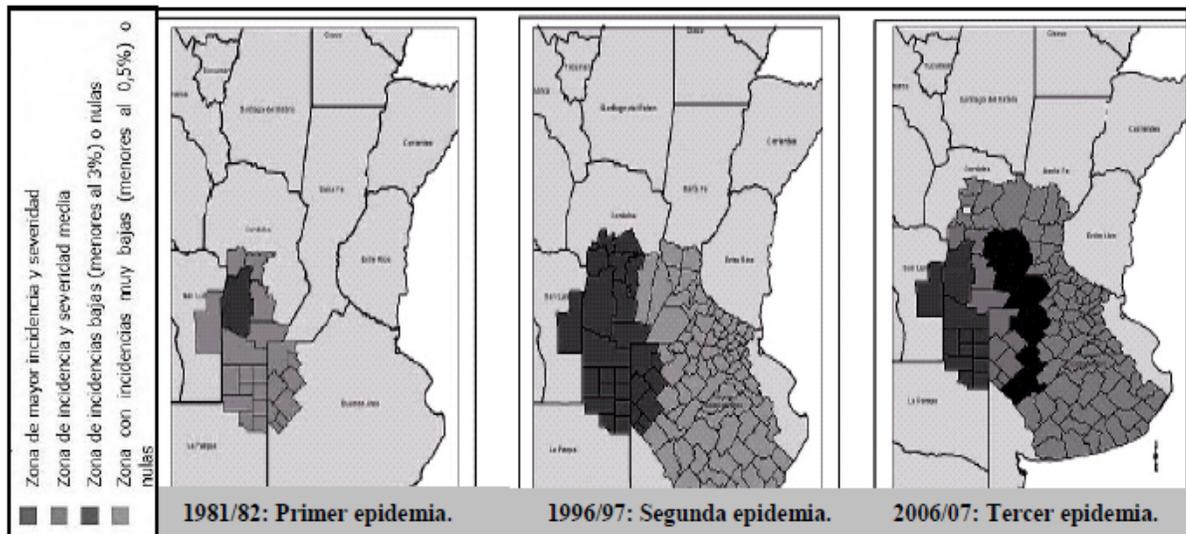


Figura 5. Áreas afectadas por grandes epidemias del Mal de Río Cuarto en las campañas agrícolas 1981/82, 1996/97 y 2006/07. Extraído del informe del Departamento técnico de Pioneer Argentina.

Para la virosis Mal de Río Cuarto (MRC), las siembras tempranas (Ornaghi *et al.*, 2011), para evitar la coincidencia con los picos poblacionales de los vectores, y el uso de insecticidas sistémicos a las semillas, para proteger a las plántulas de maíz en las primeras etapas de su crecimiento, período de mayor susceptibilidad (March *et al.*, 2002), son las dos estrategias de manejo generalmente utilizadas, pero el modo más eficaz de controlar enfermedades virósicas en cultivos extensivos es por medio de la incorporación de tolerancia genética en el vegetal (Di Renzo *et al.*, 2002, 2004; Redinbaugh y Pratt, 2009; Bonamico *et al.*, 2012). En la actualidad se dispone de materiales con buen comportamiento frente al MRC (Presello y Céliz, 1996) pero muchas veces no asociados a materiales con buenos rendimientos. Los genotipos tolerantes al MRC presentan una barrera a la multiplicación del patógeno, acumulando una menor cantidad de partículas virales (Morata *et al.*, 2003).

Marcadores moleculares y loci de caracteres cuantitativos (QTL)

Los caracteres de interés agronómicos, como la tolerancia genética al MRC, en general son de herencia cuantitativa, condicionados por la variación de varios *loci* genéticos individuales conocidos con el nombre de poligenes o QTL (quantitative trait *loci*) (Tanksley, 1993). Estimaciones de interacción genotipo×ambiente significativa y valores moderados de heredabilidad han sido informados para tolerancia al MRC, indicando que los genotipos son poco estables frente a diferentes condiciones (Di Renzo *et al.*, 2002; Bonamico *et al.*, 2012).

El mejoramiento de plantas es un área dinámica de las ciencias aplicadas. Los programas de mejoramiento genético apoyan la selección en características de interés agronómico y económico. La selección asistida por marcadores moleculares (MAS), es un proceso de selección indirecta basado en la existencia de *co-segregación* entre marcadores y un gen determinado. Su eficiencia depende de la distancia entre el marcador y el gen, y de la contribución de ese gen al fenotipo (Martínez *et al.*, 2010). La MAS utiliza marcadores ligados a QTL para identificar genotipos superiores, es propuesta y utilizada ampliamente como herramienta para minimizar efectos ambientales y acumular genes de tolerancia (Lucas, 2010). Los marcadores moleculares constituyen una valiosa herramienta biotecnológica que permite medir el efecto de genes individuales e identificar segmentos cromosómicos que determinan caracteres de interés (Michelmore *et al.*, 1991). Un marcador molecular (MM) es un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma (punto de referencia) cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La secuencia puede pertenecer a regiones codificantes (genes) o sin

función conocida (Martínez *et al.*, 2010). Los MM son utilizados en la construcción de mapas de ligamiento, introducción de caracteres, selección asistida, identificación de cultivares, protección de variedades y certificación de pureza genética, así como en el uso, manejo y conservación de germoplasma (Bruno *et al.*, 2008).

Los MM pueden ser clasificados desde el punto de vista técnico en tres grupos:

1) basados en hibridación del ADN, como el polimorfismo en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y el número variable de secuencias repetidas en tándem (VNTR);

2) basados en amplificación del ADN por reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR), como el polimorfismo de ADN amplificado al azar (RAPD) y las secuencias simples repetidas o microsatélites (SSR);

3) basados en restricción y amplificación, como polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados (AFLP).

En los últimos años se ha puesto especial énfasis en marcadores altamente polimórficos que permiten obtener información de diferentes alelos de un mismo *locus*, como son los microsatélites (Bruno, 2009). En maíz los marcadores tipo microsatélites (SSR) que son codominantes, altamente polimórficos y multialélicos, han sido identificados en gran número (Qi-Lun *et al.*, 2008) y la secuencia de los iniciadores necesarios para su amplificación mediante PCR está disponible públicamente en la base de datos de maíz de la Universidad de Missouri (sitio web <http://www.agronmissouri.edu/ssr.html>).

Numerosos trabajos han identificado QTL para resistencia a virus mediante el uso de microsatélites (SSR) (Ingvarlsen *et al.*, 2010). La eficiencia para manipular QTL depende de su identificación y ubicación precisa así como de la consistencia en diferentes generaciones, fondos genéticos y ambientes (Rafalski, 2002). Trabajos realizados con una población de mapeo $F_{2,3}$, de diferente fondo genético al del presente estudio, indicaron dos posibles QTL en los grupos de ligamiento 1 y 8 (Di Renzo *et al.*, 2004). Resultados obtenidos con una población $F_{2,3}$ de mapeo de un cruzamiento biparental diferente al utilizado por Di Renzo *et al.* (2004), identificaron QTL relacionados a los síntomas de la enfermedad en los cromosomas 1, 4, 8 y 10 (Kreff *et al.*, 2006). Bonamico *et al.* (2010), mediante un método de análisis multivariado utilizando una población de líneas endocriadas recombinantes, sugieren la presencia de un grupo reducido de SSR asociados significativamente con síntomas del MRC.

Dada la existencia de diversos síntomas, que se manifiestan en grados diversos y con distinta incidencia en las poblaciones bajo selección, se ha propuesto el cálculo de índices de

tolerancia como el índice de severidad de enfermedad (ISE) (Grau *et al.*, 1982). El mapeo de QTL para caracteres asociados a cada uno de los síntomas del MRC (Bonamico, 2010) y para los caracteres incidencia y severidad (Bonamico *et al.*, 2012) permite inferir que el mapeo de un carácter sintético o matemáticamente construido a partir de la combinación de estas dimensiones de análisis constituye una alternativa para la selección de genotipos tolerantes al MRC. El ISE constituye una media de la severidad de la reacción al MRCV clasificada según la expresión simultánea de los síntomas característicos, ponderada por la incidencia de los distintos grados de severidad en un conjunto de plantas del genotipo (Di Renzo *et al.*, 2004). La identificación de QTL asociado con el ISE y su validación con QTL mapeados para tolerancia al MRC en maíz es crucial para poder desarrollar estrategias efectivas de mejoramiento genético. El ISE resulta ser una variable recomendable para mapear QTL para reacción a la infección del MRCV, debido a que en éste se considera tanto la severidad como la incidencia de la enfermedad (Bonamico *et al.*, 2013). Estudios de validación revelaron que pocos QTL pueden ser comunes entre diferentes generaciones de poblaciones de mapeo y entre ambientes de evaluación de una misma generación (Melchinger *et al.*, 1998).

Las mejoras al mapeo por intervalo propuestas por Jansen y Stam (1994) y Zeng (1994) combinan la regresión múltiple y el mapeo por intervalo simple. La estrategia llamada mapeo por intervalo compuesto (CIM) mejora la precisión y el poder del análisis de los QTL al introducir marcadores como cofactores (covariables) para controlar la variación genética debido a la segregación de QTL en otras partes del genoma (Di Renzo y Bonamico, 2013). Al utilizar este método, Di Renzo *et al.* (2004) identificaron dos QTL ubicados en el cromosoma 1 (*bin* 1.03) y 8 (*bin* 8.03/4), que explicaron simultáneamente 36,2 % de la variación fenotípica en la reacción al MRCV. Mediante el método de mapeo por intervalo compuesto, Bonamico *et al.* (2012) informaron la existencia de cuatro QTL que explicaron entre el 6 y el 14 % de la variación fenotípica en la reacción al MRCV, la cual fue estimada por medio de las variables incidencia y severidad de enfermedad.

HIPÓTESIS

Conocer el ligamiento entre genes de caracteres cuantitativos (tolerancia al MRC) y genes de caracteres cualitativos (marcadores moleculares) permite realizar selección indirecta y manipular segmentos cromosómicos que determinan caracteres cuantitativos como si fueran genes de herencia mendeliana.

OBJETIVOS

General:

Identificar *loci* SSR asociados al índice de severidad de enfermedad (ISE), carácter multidimensional que estima la reacción al MRCV en una población $F_{2,3}$ de maíz.

Específicos:

1. Evaluar una población de familias $F_{2,3}$ de maíz por su reacción a la infección del MRCV, mediante un estimador multidimensional (ISE).
2. Caracterizar el fenotipo molecular de las F_2 con marcadores SSR.
3. Identificar asociaciones entre el carácter ISE, estimador de la reacción de las familias $F_{2,3}$ a la infección del MRCV y el fenotipo molecular observado en las F_2 que les dieron origen.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material Vegetal

El material parental que dio origen a la población de mapeo $F_{2:3}$ está constituido por dos líneas endocriadas, una susceptible a la virosis MRC (B73, perteneciente al grupo heterótico Iowa Stiff Stalk Synthetic) y otra tolerante (LP116, desarrollada en INTA Pergamino). En la campaña agrícola 2009-2010, plantas F_2 derivadas de dos espigas F_1 provenientes del cruzamiento entre B73 y LP116, fueron autofecundadas lo cual permitió obtener 208 familias $F_{2:3}$. De cada planta F_2 se obtuvieron muestras de hojas para la extracción de ADN.

Ensayo de campo

Las familias $F_{2:3}$ se sembraron durante la campaña 2011-2012 en el área en donde la enfermedad es endémica (La Aguada), en un DBCA con dos repeticiones, para evaluar el comportamiento fenotípico frente a la virosis. Se dispone de datos del comportamiento fenotípico frente al MRC de las familias $F_{2:3}$, obtenidos en la campaña agrícola 2010-2011 para Río Cuarto (campo experimental CAMDOCEX, 33° 06' 16.08" S; 64° 17' 54.55" O) y La Aguada (campo experimental Pozo del Carril, 32° 58' 17.25" S; 64° 38' 58.43" O). El ensayo fue establecido en un lote cuyo cultivo antecesor invernal fue avena. Las labores de presiembra se realizaron en forma convencional y la siembra se efectuó en forma manual en surcos marcados a 0,70 m en forma mecánica. Además se realizó en los tres casos transmisión controlada con el insecto vector, para lo cual luego de sembrar las semillas (Figura 6.A), cada surco fue cubierto con túneles de malla fina (Figura 6.B) y cuando las plantas alcanzaron el estado de coleoptile se sometieron durante 72 hs a transmisiones controladas mediante macrópteros del insecto vector provenientes de cultivos de avena en pastoreo (Figura 6.C). La población del insecto vector fue distribuida regularmente a lo largo de todo el túnel donde se introdujeron aproximadamente 7 insectos adultos por plántula. Los ensayos fueron realizados con todas las prácticas de manejo que permiten obtener un alto número de plantas; en sucesivos momentos se realizó control de malezas (Figura 6.D).

Para el análisis estadístico de los datos cada combinación año-localidad se consideró como un ambiente.

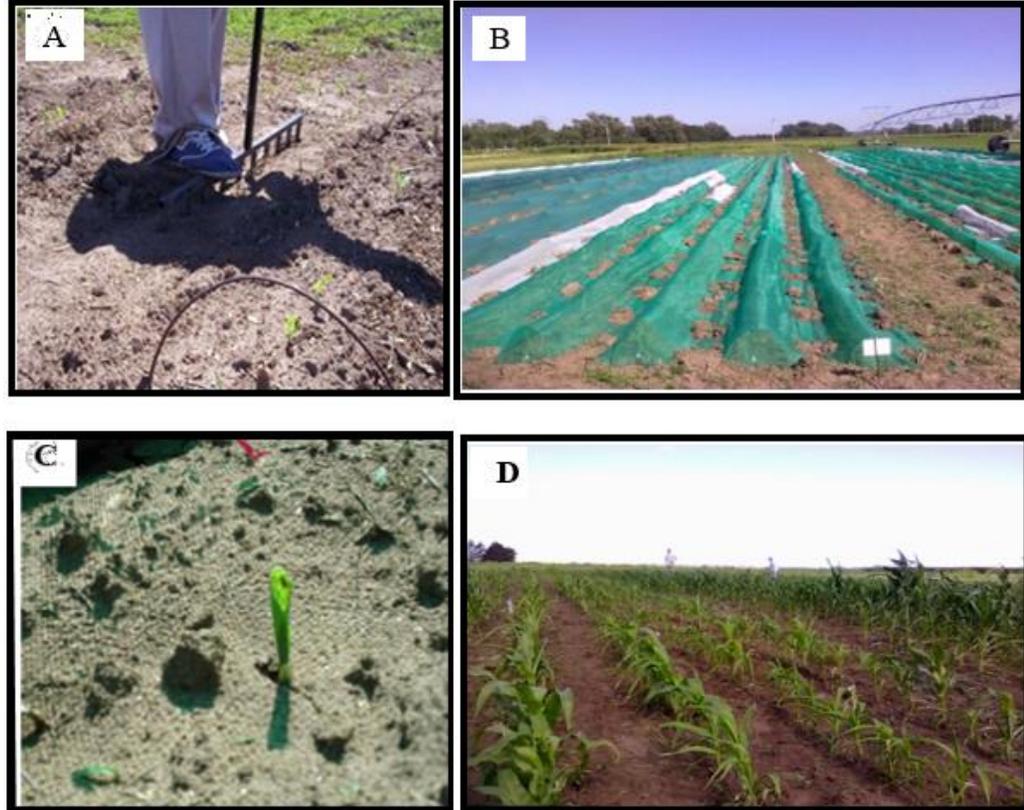


Figura 6. A. Marcación de surco de forma manual para posterior siembra de maíz. B. Colocación del insecto vector en túneles de malla fina para realizar infecciones controladas al maíz. C. Chicharrita posada sobre coleoptile de maíz dentro del túnel de malla fina. D. Vista del ensayo con familias $F_{2:3}$ en la localidad de La Aguada.

Para la evaluación del comportamiento fenotípico de las familias $F_{2:3}$ frente al MRC se registraron caracteres fenotípicos como altura de planta, presencia y tipo de enaciones, presencia de hojas rasgadas en el tercio superior, ancho y largo de las hojas del tercio superior, características de la panoja y características de la espiga. A cada planta se le asignó un grado según la escala propuesta por Ornaghi *et al.* (1999), la cual agrupa a las plantas en cuatro grados de severidad (Cuadro 2). Una medida global de la reacción a la infección del MRCV de cada familia $F_{2:3}$ se estimó mediante un índice de severidad de enfermedad (ISE) calculado según Grau *et al.* (1982) y Di Renzo *et al.* (2002):

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

donde “grado_i” es el grado de severidad de cada planta evaluada según la escala antes descrita y “nº total de plantas” es el número total de plantas evaluadas en cada parcela.

Cuadro 2. Grados de severidad y sintomatología de la enfermedad Mal de Río Cuarto de acuerdo a la escala propuesta por Ornaghi *et al.* (1999).

Grado	Descripción de la planta	Sintomatología
0	Asintomática 	sin síntomas
1	Con síntomas leves 	Enaciones, con o sin disminución de altura
2	Con síntomas severos 	Enaciones, reducción del tamaño de la panoja, lamina foliares atrofiadas en el tercio superior y espigas generalmente curvas y pequeñas
3	Con síntomas muy severos 	Enaciones, producción de granos por espiga escasa o nula, espigas pequeñas, múltiples y sin granos

Análisis estadístico

Análisis fenotípico

Los supuestos del ANAVA (análisis de varianza) que implican errores independientes, normalmente distribuidos y con varianzas homogéneas para todas las observaciones de las variables medidas en la población segregante $F_{2,3}$, para cada ambiente y a través de ambientes donde la enfermedad es endémica se probaron mediante los estadísticos de Shapiro-Wilks y Test de Levene, usando PROC UNIVARIATE de SAS versión 6.12 (SAS Institute, 1997). El nivel de significancia usado fue $\alpha = 0,05$.

Los análisis de varianza fueron realizados para el ISE del MRC en 208 familias $F_{2,3}$ en ambientes individuales sobre la base del siguiente modelo estadístico:

$$y_{ij} = \mu + G_i + B_j + \varepsilon_{ij}$$

donde y_{ij} es la observación de la respuesta del i -ésimo genotipo en el j -ésimo bloque; μ es la media general, G_i es el efecto del i -ésimo genotipo, B_j es el efecto del j -ésimo bloque y ε_{ij} es el término de error aleatorio asociado a la ij -ésima observación.

La herencia de la tolerancia al MRC para la variable fenotípica ISE se estimó también usando un modelo que incluyó los efectos genéticos, ambientales y la interacción genotipo \times ambiente. El efecto ambiental fue definido como la combinación año-localidad y todos los efectos contemplados en el modelo fueron considerados aleatorios. La observación fenotípica y_{ijk} del genotipo i , en el ambiente j y en el bloque k se modeló según la ecuación:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + E_j + B(E)_{k(j)} + (GE)_{ij} + \varepsilon_{ijk}$$

donde μ es la media general del carácter fenotípico; G_i es el efecto medio del genotipo i ; E_j es el efecto medio del ambiente j ; $B(E)_{k(j)}$ es el efecto medio del bloque k dentro del ambiente j ; $(GE)_{ij}$ es el efecto de interacción entre el genotipo i y el ambiente j ; y ε_{ijk} es el efecto residual. La distribución empírica de los residuos, la homogeneidad de la varianza y la aditividad del modelo se probó con las pruebas pertinentes. Los componentes de varianza estimados mediante el método REML (Littell *et al.*, 2006) usando PROC MIXED de SAS permitieron calcular la heredabilidad (h^2) para cada carácter acorde a Hallauer y Miranda (1981) según las siguientes fórmulas:

para cada ambiente:

$$h^2 = \sigma^2_G / (\sigma^2_G + (\sigma^2_\varepsilon / r))$$

y a través de ambientes:

$$h^2 = \sigma^2_G / (\sigma^2_G + (\sigma^2_{GE} / a) + (\sigma^2_\varepsilon / ra))$$

donde σ^2_G , σ^2_{GE} , σ^2_ε son varianzas genotípicas, de la interacción genotipo×ambiente y del error residual, respectivamente; r es el número de repeticiones, y a es el número de ambientes. Para determinar la precisión de la h^2 estimada, se calculó un intervalo de confianza (IC) de 95% usando la distribución F según Knapp *et al.* (1985).

Análisis molecular

El ADN de las F_2 se extrajo a partir de tejido foliar liofilizado proveniente de plantas de maíz crecidas en invernáculo, según el método propuesto por Saghai-Marooif *et al.* (1984). La caracterización molecular de las familias F_2 se realizó con iniciadores SSR polimórficos entre las líneas parentales B73 y LP116 pertenecientes a un sólo grupo de ligamiento de maíz, el cromosoma 1, teniendo en cuenta antecedentes del grupo de trabajo referidos a identificación de marcadores asociados con tolerancia al MRC (Di Renzo *et al.*, 2004; Bonamico *et al.*, 2012; Bonamico *et al.*, 2013). Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa de alta resolución y el revelado fue con bromuro de etidio. Una vez concluida las electroforesis, los geles fueron expuestos en un transiluminador de luz ultravioleta y fotografiados para la documentación final.

Para la identificación de posibles asociaciones entre el fenotipo molecular obtenido con marcadores moleculares tipo microsatélites en las F_2 , y el ISE de las familias $F_{2.3}$ se procedió a realizar un mapa genético y luego un análisis de mapeo por intervalo simple y compuesto.

Mapa genético

El mapa de ligamiento se realizó con los marcadores SSR pertenecientes al cromosoma 1, que resultaron polimórficos entre las líneas parentales. Para evaluar el ligamiento entre marcadores se estimaron las frecuencias de recombinación entre *loci* a través de un análisis multipunto. Las frecuencias de recombinación se transformaron en distancias (cM) según la función de mapeo de Haldane (1919) mediante Mapmaker/Exp. versión 3.0 (Lander *et al.*,

1987). Los marcadores fueron considerados ligados si el valor del estadístico LOD (“ \log_{10} of the likelihood of odds”), que es función de la probabilidad de ligamiento respecto al no ligamiento, es mayor que un umbral y la distancia de ligamiento es menor a un valor límite. Posteriormente se calculó el orden de los marcadores. La prueba Chi-cuadrado se realizó para evaluar la distorsión en la segregación de cada SSR polimórfico, ya que la precisión en la estimación de la posición de los posibles QTL declina cuando los marcadores exhiben distorsión significativa en la segregación mendeliana (Cardinal *et al.*, 2001).

Mapeo por intervalo simple (SIM) y compuesto (CIM)

Para identificar la posición de posibles QTL para el ISE, así como para poder estimar los efectos genéticos, se utilizó el programa Plabqtl versión 1.0 (Utz y Melchinger, 1996), el cual emplea el mapeo por intervalo mediante la técnica de regresión múltiple (Haley y Knott, 1992). El valor medio, para cada familia $F_{2:3}$, del carácter fenotípico evaluado, se utilizó como variable dependiente. Los análisis se realizaron por ambiente y a través de ambientes. Se empleó el método de mapeo por intervalo simple (SIM) (Modelo III, Zeng, 1994) y el método de mapeo por intervalo compuesto (CIM) (Modelo II, Zeng, 1994). En el CIM se utilizaron marcadores moleculares como cofactores en el modelo de análisis, seleccionados por regresión *stepwise* (Jansen y Stam, 1994; Zeng, 1994). El mínimo LOD para declarar la presencia de un QTL fue fijado en 2,5. La posición del QTL fue asignada al punto del intervalo donde el valor de LOD sea máximo. La variación fenotípica total explicada por los QTL detectados se estimó a través de un modelo de regresión múltiple.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Fenotípicos

Caracterización de los ambientes de evaluación

La evaluación de genotipos de maíz por su comportamiento frente al MRC mediante transmisión controlada es compleja debido a la dimensión que adquieren los ensayos de campo. En el caso de que la selección dependa sólo de la transmisión natural es posible que una baja incidencia de la enfermedad con ausencia de síntomas suficientemente severos así como una elevada incidencia y severidad, ocurrentes de manera aleatoria en distintos años, dificulten la realización exitosa de trabajos de identificación de factores genéticos que contribuyan a la tolerancia (Bonamico, 2010).

Se decidió establecer los ensayos de evaluación en las localidades de Río Cuarto y La Aguada debido a que se encuentran en el área de mayor incidencia de la enfermedad MRC. El Cuadro 3 muestra la expresión fenotípica media y el error estándar del índice de severidad de enfermedad en los tres ambientes de evaluación y a través de ambientes para los parentales, línea tolerante LP116 y línea susceptible B73, y para las familias $F_{2:3}$ derivadas. La línea parental LP116 no manifestó síntomas de enfermedad en ninguno de los tres ambientes; en cambio la línea parental B73 manifestó síntomas tanto en ambientes individuales como a través de estos ($p < 0,05$).

En La Aguada 2010-2011, La Aguada 2011-2012 y a través de ambientes el valor de ISE medio de las familias $F_{2:3}$ mostró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con los valores medios del ISE de los parentales, algunas de ellas presentaron valores medios fenotípicos que excedieron a la media de la línea B73, lo que indicaría segregación transgresiva en la reacción al MRC. Es posible que esta moderada segregación transgresiva se deba tanto a efectos genéticos como a efectos ambientales o de errores experimentales (Di Renzo *et al.*, 2002; Bonamico *et al.*, 2012). En trabajos previos realizados con generaciones tempranas $F_{2:3}$ con otra fuente de cruzamiento biparental, se observó una situación similar respecto al tipo de segregación (Di Renzo *et al.*, 2002; Bonamico *et al.*, 2013).

Las medias del ISE en las familias $F_{2:3}$ no difirieron significativamente respecto a la línea LP116 en Río Cuarto 2010-2011, al contrario de lo observado en el ISE en La Aguada 2010-2011, La Aguada 2011-2012 y a través de ambientes donde las medias entre las familias $F_{2:3}$ y los padres difirieron significativamente.

Morata *et al.* (2003) encontraron en dos localidades con alta presión de enfermedad que el grado medio de severidad del MRC en genotipos experimentales no difirió estadísticamente del valor medio de los genotipos tolerantes. Sin embargo, en la evaluación del MRC referida como grado medio de severidad, diferencias estadísticamente no significativas pueden implicar diferencias agronómicas de gran importancia.

La variable ISE, calculada según la incidencia y la severidad de los síntomas observados, presentó una distribución normal a través de ambientes (Figura 7). El valor de ISE del parental tolerante LP116 fue próximo a 0, mientras que el del parental susceptible B73 fue moderado. Las familias F_{2:3} mostraron, a través de ambientes, un valor intermedio de ISE (39,10).

Cuadro 3. Estimación de las medias del índice de severidad de enfermedad (ISE) del Mal de Río Cuarto y demás variables evaluadas en las líneas parentales (LP116 y B73) y en las 208 familias F_{2:3}, en ambientes individuales y a través de ambientes en donde la enfermedad es endémica.

Variable	Genotipo	Ambiente			
		Río Cuarto 2010-2011	La Aguada 2010-2011	La Aguada 2011-2012	A través de ambientes
ISE	LP116	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a	0,00 ± 0,00 a
	B73	55,67 ± 7,67 b	93,67 ± 0,34 b	87,0 ± 2,0 b	74,67 ± 11,41 b
	F _{2:3}	24,89 ± 1,06 a	43,08 ± 1,50 c	49,35 ± 1,89 c	39,10 ± 1,48 c
LSD		27,35	24,47	26,10	15,82

± 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.

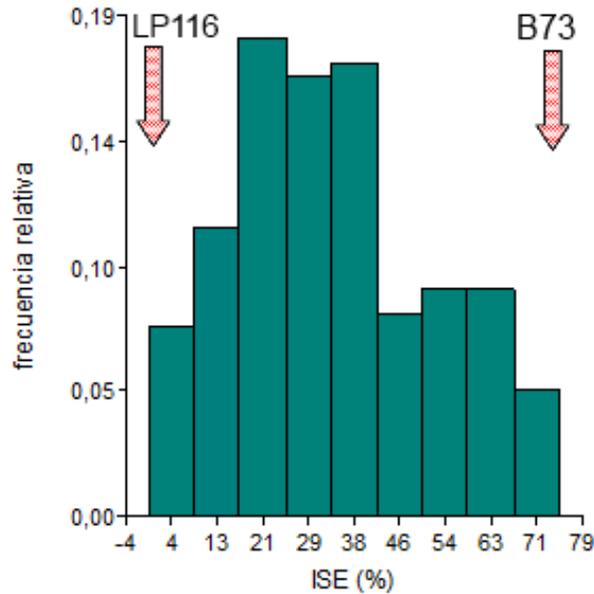


Figura 7. Distribución del índice de severidad de enfermedad (ISE) de las familias $F_{2,3}$ a través de tres ambientes del área en donde la enfermedad Mal de Río Cuarto es endémica. El comportamiento medio del parental tolerante (LP116) y del parental susceptible (B73) está indicado.

Heredabilidad

En el Cuadro 4 se observan las estimaciones de los componentes de varianza, heredabilidad en sentido amplio (H) e intervalos de confianza (IC) del índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC en 208 familias $F_{2,3}$, en ambientes individuales y a través de tres ambientes del área en donde la enfermedad es endémica. Los estimadores de la interacción genotipo×ambiente fueron altamente significativos ($p=0,0019$) para el ISE, lo cual indica una baja consistencia en la respuesta de las familias a través de estos. Los estimadores de los componentes de varianza genotípica fueron altamente significativos ($p<0,0001$) en Río Cuarto 2010-2011, en La Aguada 2010-2011, en La Aguada 2011-2012 y a través de ambientes.

La heredabilidad de la variable ISE exhibió un valor moderado en ambientes individuales y a través de estos. Para Río Cuarto el valor estimado ($H= 0,57$) apenas superó al obtenido en La Aguada 2010-2011 ($H= 0,56$) donde los componentes de varianza genotípica y ambiental estimados fueron mayores; en La Aguada 2011-2012 el valor estimado ($H= 0,70$) superó tanto a Río Cuarto como a La Aguada 2010-2011. El valor de heredabilidad estimado a

través de los tres ambientes fue 0,42, siendo moderadamente superior al calculado en base a tres ambientes por Di Renzo *et al.* (2002) y Bonamico (2012) encontró para seis ambientes individuales valores similares en el parámetro mencionado. La heredabilidad fue estimada en sentido amplio ya que está basada en las diferencias entre familias $F_{2:3}$ segregantes, quienes manifiestan diferencias genéticas aditivas y no aditivas (Di Renzo *et al.*, 2004; Bonamico *et al.*, 2013). Los intervalos de confianza con un rango de 42 a 77%, fueron consistentes en cada uno de los ambientes, así como a través de ambientes.

En un estudio con una población $F_{2:3}$ segregante la posibilidad de que ocurran mecanismos de escape es mayor, debido a la variabilidad en el desarrollo de las plantas al momento de la transmisión (Borghi, 2012). La respuesta de las familias a través de ambientes fue poco consistente, como lo muestra la significativa interacción genotipo×ambiente. Los distintos factores, tanto bióticos como abióticos, podrían explicar la preponderancia de la componente ambiental y de la interacción genotipo×ambiente observada en el Cuadro 4.

El estrés producto de la sequía, la caída de granizo y el ataque de insectos en el ambiente La Aguada 2011-2012 durante los primeros estadios de desarrollo del cultivo, así como las distintas fechas de siembra y registros pluviométricos de los ambientes podrían haber sido causante de la mayor expresión de enfermedad en este.

La significativa interacción genotipo×ambiente y la moderada heredabilidad estimada indican que la selección para producir incrementos de tolerancia al MRC en maíz requiere la evaluación de germoplasma en diferentes años y localidades tal como fue mencionado en estudios previos (Di Renzo *et al.*, 2002; Borghi, 2012; Bonamico *et al.*, 2013).

Cuadro 4. Estimación de los componentes de varianza, heredabilidad en sentido amplio (H) e intervalos de confianza (IC) del índice de severidad de enfermedad (ISE) del Mal de Río Cuarto en 208 familias F_{2:3}, en ambientes individuales y a través de tres ambientes en donde la enfermedad es endémica.

Variable: ISE	Ambiente			
	La Aguada 2010-2011	Río Cuarto 2010-2011	La Aguada 2011-2012	A través de ambientes
Componente de varianza				
σ_g^2	358,31 ± 68,78	183,84 ± 34,59	806,36 ± 117,37	146,24 ± 35,28
σ_a^2	558,90 ± 55,20	278,66 ± 27,39	681,89 ± 66,87	506,60 ± 28,87
σ_{ga}^2	-	-		303,34 ± 41,52
Heredabilidad				
<i>H</i>	0,56 ¹	0,57 ¹	0,70 ¹	0,42 ²
IC 90%	0,42 - 0,67	0,43 - 0,67	0,61 - 0,77	0,27 - 0,54
Amplitud relativa ³ (%)	24,50	24,00	16,50	27,20

± Error estándar.

¹ $H = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_a^2 / r)$; r = n° de repeticiones.

² $H = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_{ga}^2 / a + \sigma_a^2 / ra)$; r = n° de repeticiones; a = n° de ambientes; σ_g^2 = varianza genotípica; σ_a^2 = varianza ambiental y σ_{ga}^2 = varianza de la interacción genotipo × ambiente.

³ Amplitud relativa expresada como la relación (%) del intervalo de confianza (IC) con respecto a la heredabilidad estimada (*H*).

Genotípicos

Análisis con SSR y mapa de ligamiento

De los 20 SSR, nueve resultaron polimórficos y once monomórficos (Cuadro 5). Con el programa Mapmaker/exp se calcularon las distancias en cM entre los SSR seleccionados

mediante la función de Haldane y luego con el programa Mapchart se obtuvo el gráfico del mapa de ligamiento para los nueve SSR polimórficos (Figura 8).

La prueba Chi-cuadrado para la hipótesis de bondad de ajuste de las frecuencias génicas observadas respecto a las esperadas no se apartaron significativamente según proporciones mendelianas para las familias $F_{2,3}$. La precisión de la estimación de la posición de los posibles QTL declina cuando los marcadores exhiben distorsión en la segregación ya que resulta en estimaciones sesgadas de las frecuencias de recombinación (Cardinal *et al.*, 2001).

Cuadro 5. Fenotipo molecular de las líneas parentales (B73 y LP116) de los 20 marcadores SSR que revelaron bandas nítidas bajo el programa de amplificación por PCR ensayado.

SSR (bin)	F
umc 1177 (1.01)	M
bnlg 1179 (1.01)	P
bnlg 1014 (1.01)	M
bnlg 1007 (1.02)	P
bnlg 1866 (1.03)	P
bnlg 439 (1.03)	M
umc 1021 (1.03)	P
umc 1044 (1.03)	P
umc 1169 (1.04)	P
bnlg 1016 (1.04)	M
umc 1515 (1.05)	M
bnlg 1598 (1.06)	P
bnlg 2057 (1.06)	P
bnlg 1025 (1.07)	P
bnlg 1643 (1.08)	M
phi 055 (1.09)	M
bnlg 1720 (1.09)	M
bnlg 1597 (1.10)	M
bnlg 1055 (1.11)	M
bnlg 2123 (1.11)	M

F = Fenotipo molecular de las líneas parentales (B73 y LP116); M= monomórfico, P= polimórfico.

Detección de QTL

Con los nueve SSR polimórficos que fueron utilizados en el análisis con el programa Mapmaker/exp, la longitud del genoma fue de 353,8 cM y el intervalo promedio entre marcadores fue de 27,21 cM (Figura 8), el cual coincide con el máximo de 50 cM definido por Darvasi y Soller (1994).

El análisis de QTL por ambiente permitió identificar dos regiones asociadas con el ISE ubicadas en los bins 1.03 y 1.07. Las mismas fueron detectadas por CIM y por SIM (Cuadro 6). Numerosas investigaciones describen la existencia de regiones cromosómicas en las que los *loci* de resistencia a patógenos se agrupan en *cluster* sobre algunos cromosomas en lugar de estar distribuidos al azar (Di Renzo y Bonamico, 2013). Para la reacción al MRCV los resultados obtenidos con diferentes poblaciones de mapeo, diferentes fondos genéticos y métodos de análisis estadísticos, sugirieron que los QTL asociados con la tolerancia a la enfermedad MRC en la mayoría de los ambientes de evaluación, están ubicados en los cromosomas 1, 3, 4, 6, 8 y 10. Un aspecto importante en el uso de QTL para realizar selección asistida es la coherencia de las posiciones de los QTL en diferentes poblaciones de mapeo. Salvi (2013), Bonamico (2010), Kreff *et al.* (2006) y Di Renzo *et al.* (2004) informan QTL y SSR asociados significativamente a tolerancia al MRC en el cromosoma 1 en la posición 1.03. Salvi (2013) identificó tres QTL, éstos se localizaron en los bin 1.01, 1.02 y 1.04. Bonamico (2010), informa en el bin 1.03 un QTL próximo a los marcadores bnlg1866 y umc1021 y un SSR (phi095) mediante CIM y ANOVA, respectivamente. Di Renzo *et al.* (2004) indicaron en la misma posición un QTL en el intervalo entre los SSR bnlg1866-phi095 y el SSR significativo bnlg439; y Kreff *et al.* (2006), usando un fondo genético diferente a los mencionados y al del presente estudio, identificaron la localización de regiones genómicas con efectos significativos sobre tolerancia a la enfermedad MRC en los cromosomas 1, 4, 8 y 10, entre las que señalan un QTL en los bins 1.02-1.03 en el intervalo entre los SSR umc1627-bnlg1007. El QTL identificado por Borghi (2012) entre los SSR umc1021-bnlg1866 permitió validar la posición del bin 1.03 informada por el resto de los autores como significativa, lo que sugiere una región genómica asociada con la tolerancia al MRC.

Cuadro 6. Parámetros asociados con QTL para el índice de severidad (ISE) del Mal de Río Cuarto en 208 familias F_{2:3} derivadas del cruzamiento entre B73 × LP116 y evaluadas en ambientes individuales en donde la enfermedad es endémica.

Variable	Posición QTL ¹	Ambiente ²	LOD ³	Aditividad	R ²
ISE	1.03 (bnlg 1866)	LA2010-11	5,10b	-0,49	10,8
	1.03 (umc1021)	RC2010-11	3,96ab	-0,12	8,5
	1.07 (bnlg1025)	LA2010-11	4,12ab	-0,35	8,8

¹Localización cromosómica: bin y marcador SSR más próximo.

²Combinaciones localidad-año, LA2010-11: La Aguada 2010-11; RC2010-11: Río Cuarto 2010-11; LA2011-12:La Aguada 2011-12

³LOD score, letras a y b que acompañan al valor de LOD indican mapeo por intervalo simple (SIM) y compuesto (CIM), respectivamente.

R²: proporción (%) de la variación fenotípica explicada.

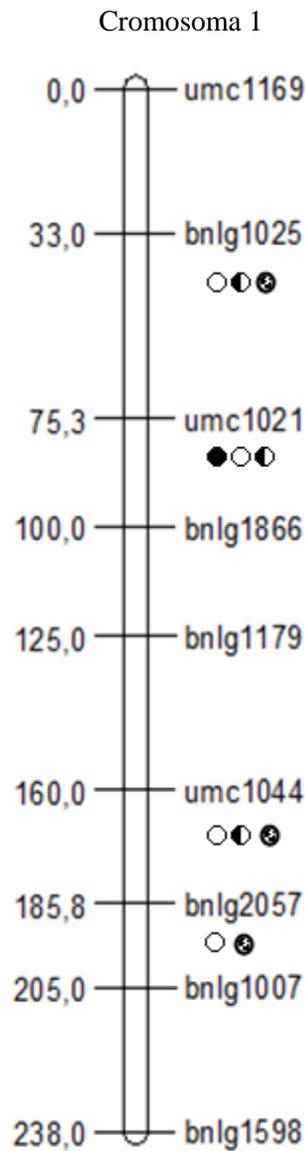


Figura 8. Mapa de ligamiento construido con nueve SSR. El mapa tiene una longitud de 353,8 cM y un intervalo promedio entre marcadores de 27,21 cM. La posición de QTL para el índice de severidad de enfermedad (ISE) del MRC está indicada. ● Río Cuarto 2010-2011 ○ La Aguada 2010-2011 ⊕ La Aguada 2011-2012 ◐ A través de ambientes.

Al trabajar con un fondo genético diferente al del presente estudio, Bonamico (2010) y Bonamico *et al.* (2012), informaron QTL y SSR asociados significativamente a la tolerancia al MRC en el bin 1.06 mediante los métodos CIM, ANOVA y análisis discriminante. De igual modo Salvi (2013) indicó que el marcador SSR umc1177 ubicado en el bin 1.01 se mostró

significativamente asociado con grado de severidad de enfermedad y con el resto de los caracteres relacionados a síntomas del MRC. Bonamico *et al.* (2013) señalaron que uno de los QTL con mayor efecto sobre el ISE se identificó en el cromosoma 1 (bin 1.03), este QTL fue significativo de manera consistente en la mayoría de los ambientes de evaluación del estudio mencionado.

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 variancia fenotípica explicada por los posibles QTL detectados en este estudio. Los QTL validados en este estudio en los bins 1.03 y 1.07 pueden resultar de gran utilidad en programas de mejoramiento para la enfermedad MRC en maíz, en los que se utilicen cruzamientos para la obtención de híbridos. El efecto genético aditivo de los QTL identificados (Cuadro 6), por el valor negativo de su signo, indica que el alelo favorable que contribuye a reducir el valor del ISE proviene del parental tolerante LP116. No obstante, en numerosos trabajos de mapeo de QTL para tolerancia a virosis en plantas se ha informado que los alelos favorables provienen de ambos progenitores (Carson *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008), es decir que el progenitor susceptible también puede aportar alelos favorables que aumentan la tolerancia como es la situación indicada por Di Renzo *et al.* (2004), Bonamico *et al.* (2012) y Borghi (2012).

El análisis de QTL a través de ambientes (Cuadro 7) presentó regiones asociadas a la variable evaluada con $LOD > 2,5$ localizadas en el cromosoma 1 (bins 1.03 y 1.07). Dos QTL fueron identificados con el método CIM, en el cuál se utilizaron ocho cofactores para la variable ISE. Uno de los dos QTL también fue identificado con el método SIM. Arroyo (2008) comparó los métodos SF-ANOVA, SIM y CIM y señaló al igual que Zeng (1993), que el SIM tiende a presentar mayores valores de LOD con el inconveniente de detectar falsos positivos, así como sobrestimar efectos, sobre todo cuando hay más de un QTL en la región del genoma. Salvi (2013) informó que el modelo CIM, presenta menores tasas de falsos positivos y mejores estimaciones de efectos y de posición de posibles QTL que el modelo SIM. El CIM muestra alta resolución en la localización de QTL, mayor a la del SIM y SF-ANOVA y es más informativo dado que también permite inferir sobre el efecto de otros marcadores o cofactores que podrían estar ligados.

Bonamico *et al.* (2012) así como Di Renzo y Bonamico (2013) informaron que bajo los dos métodos de análisis al identificar QTL con las mismas estimaciones de posición, el LOD *score* máximo y la variación fenotípica (R^2) explicada por cada QTL siempre fue mayor con

SIM. El uso de cofactores mejoró notablemente el poder de detección de QTL, debido a que no se sobreestiman los valores de LOD y R^2 .

El efecto aditivo de los QTL encontrados para la variable ISE fue estadísticamente significativo y por su signo negativo indica que ambos, al igual que en el análisis por ambientes individuales, están asociados con alelos para tolerancia al MRC aportados por el parental tolerante LP116. Estos resultados concuerdan, en parte, con trabajos previos relacionados a la forma de herencia de la tolerancia al MRC que informan la presencia de efectos genéticos aditivos y no aditivos. Bonamico *et al.* (2013), Bonamico (2010), Di Renzo *et al.* (2004) y Kreff *et al.* (2006) informan QTL y SSR asociados significativamente a tolerancia al MRC en el cromosoma 1. Kreff *et al.* (2006) detectaron QTL (bin 1.02-03, 1.07-08, 4.05-07, 8.02-03, 10.04-05) con acciones génicas predominantemente aditivas y de dominancia parcial. Bonamico (2010) y Bonamico *et al.* (2012), trabajaron con una población de líneas endocriadas recombinantes provenientes del cruzamiento entre las líneas parentales Mo17 y BLS14, genotipos altamente homocigotas, por lo que sólo estimaron efectos genéticos de aditividad, e informan QTL (bin 1.01, 1.03, 1.04, 1.06, 4.03, 4.05, 4.07, 4.08, 6.02, 6.05, 8.03, 8.08, 10.02) ligados a tolerancia al MRC con acción génica aditiva.

Otras regiones involucradas en la expresión de los síntomas relacionados al MRC se identificaron en los cromosomas 3, 4, 6 y 8 (Kreff *et al.*, 2006). Estos resultados concuerdan con el trabajo de Pernet *et al.* (1999), que identificaron un QTL mayor en la misma región del cromosoma 1 y otros de menor efecto en el resto del genoma de maíz para la tolerancia al Maíz Streak Virus. McMullen y Simcox (1995) y Yuan *et al.* (2003) informaron de genes de tolerancia a diferentes patógenos agrupados, generalmente en las mismas regiones cromosómicas del genoma de maíz. Redinbaugh y Pratt (2009), en una revisión sobre resistencia a virus en maíz, sugieren que los genes y *loci* que confieren tolerancia a diferentes virus suelen estar agrupados sobre pocos cromosomas. Para RIL de maíz se ha informado tolerancia a otras enfermedades en los cromosomas 1, 2, 3 y 4 (Brooks, 2005). Según Pacheco *et al.* (2003), QTL relacionados a distintos síntomas del MRC mapean en los grupos de ligamiento 1, 4, 8 y 10. Estos autores además consideran que los QTL pertenecientes al cromosoma 1 indican regiones que permitirían evaluar la factibilidad de la MAS. Estos resultados son similares a los obtenidos en el presente trabajo.

La posición del bin 1.07 informada por Kreff *et al.* (2006), quienes identificaron un QTL en el intervalo entre los SSR bnlg1025-bnlg1643 con efectos significativos sobre tolerancia al MRC, también ha sido validada en este estudio, debido a que el SSR bnlg1025 forma parte del

intervalo junto a umc1021, donde se identificó un QTL para tolerancia al MRC en un fondo genético diferente al utilizado por los autores mencionados. Bonamico (2010) y Bonamico *et al.* (2012), mediante CIM, ANOVA y análisis discriminante, informan cercano al bin 1.06 validado con anterioridad, QTL y SSR asociados significativamente a la tolerancia al MRC.

Numerosas líneas de investigación buscan generar conocimientos tanto básicos como aplicados en la tolerancia a virus en plantas, orientados a solucionar de manera práctica problemas agronómicos, como por ejemplo por medio del uso de los MM en programas de mejora que incorporan la selección asistida o indirecta. Por otra parte el inminente cambio climático global, que tiene y tendrá efectos sobre los insectos vectores de virus, exige a los investigadores la identificación de tolerancia efectiva y durable en la naturaleza que permita brindar soluciones rápidas y concretas. Una estrategia puede consistir en combinar las formas de tolerancia genética natural con organismos tolerantes modificados genéticamente que surjan del conocimiento creciente de las interacciones virus-hospedante en especies modelos (Bonamico, 2010).

En el mejoramiento para tolerancia a la enfermedad MRC en maíz, el mapeo de QTL está relacionado con el uso de la selección asistida por marcadores en programas de mejora genética. Por lo tanto el QTL ubicado en el intervalo entre los microsatélites umc1021-bnlg1866 en el cromosoma 1 (bin 1.03) identificado en Río Cuarto 2010-2011, en La Aguada 2010-2011, La Aguada 2011-2012 y a través de ambientes, el cual fue caracterizado con los dos métodos de análisis, podría ser considerado como una región genómica promisorio en determinar tolerancia a la enfermedad MRC.

Cuadro 7. Parámetros asociados con QTL para el índice de severidad (ISE), del Mal de Río Cuarto en 208 familias $F_{2,3}$ derivadas del cruzamiento entre B73 \times LP116 evaluadas a través de ambientes en donde la enfermedad es endémica.

Variable	posición del QTL ¹	LOD ²	Aditividad	R ²
ISE	1.03 (umc1021)	3,10b	-0,14	6,7
	1.07 (bnlg1025)	3,59ab	-0,15	7,7

¹ Localización cromosómica: bin y marcador SSR más próximo.

² LOD score, letras a y b que acompañan al valor de LOD indican mapeo por intervalo simple (SIM) y compuesto (CIM), respectivamente.

R²: proporción (%) de la variación fenotípica explicada.

CONCLUSIONES

El MRC es una enfermedad cuya manifestación fenotípica requiere de un conjunto de condiciones ambientales, de la presencia de insectos vectores del virus del MRC y de genotipos de maíz susceptibles en determinado estado vegetativo. En este estudio todas estas condiciones se presentaron simultáneamente, lo cual permitió determinar efectivamente el comportamiento de las familias $F_{2,3}$ mediante un ISE.

La heredabilidad de la variable ISE mostró valores moderados en ambientes individuales (0,56-0,70) y moderada a través de ambientes. Los valores fueron más bajos cuando los componentes de varianza genotípica y ambiental estimados fueron mayores.

En general las regiones con efecto significativo sobre la expresión de la tolerancia al MRC coinciden con las informadas en estudios previos realizados en otros ambientes con diferentes fondos genéticos, generaciones y ambientes de evaluación.

El parental tolerante (LP116) contribuyó en la expresión de la tolerancia al MRC.

BIBLIOGRAFÍA

- ARROYO, A. 2008. Modelos mixtos en el análisis de *loci* de caracteres cuantitativos y su aplicación en mejoramiento genético vegetal. Tesis Doctoral Ciencias Agropecuarias. UNC.
- BONAMICO, N. 2010. Mapeo de QTL en líneas endocriadas recombinantes de maíz: regiones del genoma que confieren tolerancia a Mal de Río Cuarto. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. UNRC.
- BONAMICO N.C.; M.G. BALZARINI; A.T. ARROYO; M.A. IBAÑEZ; D.G. DÍAZ; J.C. SALERNO; M.A. DI RENZO. 2010. Association between microsatellites and resistance to Mal de Río Cuarto in maize by discriminate analysis. **Phyton** 79: 31-38.
- BONAMICO, N.C.; M.A. DI RENZO; M.A. IBAÑEZ; M.L. BORGHI; D.G. DÍAZ; J.C. SALERNO. 2012. QTL analysis of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize using a RIL population. **J. Agric. Sci.** (CJO doi:10.1017/S0021859611000943).
- BONAMICO N.C.; M.A. DI RENZO; M.L. BORGHI; M.A. IBAÑEZ; D.G. DÍAZ; J.C. SALERNO; M.G. BALZARINI. 2013. Mapeo de QTLs para una medida multivariada de la reacción al virus del mal de Río Cuarto. **JBAG**. 24(2).
- BORGHI, M.L. 2012. Identificación de QTL ligados a resistencia al Mal de Río Cuarto en maíz. Tesis de Maestría en Genética Vegetal. UNR - INTA.
- BROOKS T.; W. WILLIAMS; G. WINDHAM; M. WILLCOX; H. ABBAS. 2005. Quantitative trait loci contributing resistance to aflatoxin accumulation in the maize inbred Mp313E. **Crop. Sci.** 45:171-174.
- BRUNO, C.; R. MACCHIAVELLI; M. BALZARINI. 2008. Non-parametric modelling of multivariate genetic distances in the analysis of spatial population structure at fine scale. **Theor. Appl. Genet.** 117: 435-447.
- BRUNO, C. 2009. Métodos estadísticos para el análisis de datos genéticos basados en marcadores moleculares. Tesis Doctoral Ciencias Agropecuarias. UNC.

CARDINAL, A.J.; M. LEE; N. SHAROPOVA; W. WOODMANCLIKEMAN; M. LONG. 2001. Genetic mapping and analysis of quantitative trait loci for resistance to stalk tunneling by the European Corn Borer in maize. **Crop. Sci.** 41: 835–845.

CARSON M.; C. STUBER; M. SENIOR. 2004. Identification and mapping of quantitative trait loci conditioning resistance to southern leaf blight of maize caused by *Cochliobolus heterostrophus* race O. **Phytopathol** 94: 862-867.

CONFEDERACIONES RURALES ARGENTINAS (CRA). 2013. Ciclo mensual de conferencias de la tierra a la mesa. Disponible en: <http://www.cra.org.ar>. Consultado: 23 de septiembre 2013.

DARVASI A., M. SOLLER. 1994. Optimum spacing of genetic markers for determining linkage between marker loci and quantitative trait loci. **Theor. Appl. Genet.** 89: 351-357.

DEL VAS, M. 2013. Mal de Río Cuarto: Caracterización molecular del virus del maíz y de la interacción con sus hospedantes. INTA. 2-3.

DI FEO, L.; I.G. LAGUNA; E. B. BIDERBOST. 2010. Alteraciones fisiológicas asociadas a la infección con *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) y a fitotoxicidad provocada por su insecto vector (*Delphacodes kuscheli* Fennah) en trigo. **Tropical Plant Pathology**. 35 (2): 079-087.

DI RENZO, M.; N. BONAMICO; D. DÍAZ; J. SALERNO; M. IBAÑEZ; 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; 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.

DI RENZO, M.; N. BONAMICO. 2013. Mapeo de QTL para resistencia a mal de Río Cuarto en maíz. **JBAG**. 24 (2):13-18.

GEAR, J.; G. EYHERABIDE; A. ALVAREZ; G. DEPETRIS; O. CORTAMIRA; ML PORTELA; F. VARTORELLI; M. OLIVERA CARRIÓN; M. MELGAREJO; H. GODOY; G. EYHERABIDE; F. SANTINI; G. LEVITUS; S. CHULZE; G. GAGLIOSTRO; L. MORAES.

2006. Maíz y nutrición: Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. **Revista Maizar**. 2:4-21.

GRAU, C.; V. RADKE; F.L. GILLESPIE. 1982. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. **Plant Dis** 66: 506-508.

GRILLI, M.P; E. ESTALLO. 2006. Variabilidad de la forma corporal en poblaciones de *Delphacodes kuscheli* Fennah (Hemiptera: *Delphacidae*) a escala subregional. **Ecología Austral** 16:125-134.

HALDANE, J.B.S. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the loci of linked factors. **J. Genet.** 8: 299-309.

HALEY, C.S; S.A KNOTT. 1992. A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. **Heredity** 69: 315-324.

HALLAUER, A.R.; J. MIRANDA. 1981. Quantitative Genetics in Maize Breeding. Ames, IA: Iowa State University Press.

INGVARDSEN CR; Y. XING; UK. FREI; T. LÜBBERSTEDT. 2010. Genetic and physical fine mapping of Scmv2, a potyvirus resistance gene in maize. **Theor. Appl. Genet.** 120: 1621-1634.

JANSEN, R.C.; P. STAM. 1994. High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. **Genetics** 136: 1447-1455.

KNAPP, S. J.; W. STROUP; W. ROSS. 1985. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. **Crop Sci.** 25: 192-194.

KREFF, E.D; M.G. PACHECO; D.G. DÍAZ; C.G. ROBREDO; D. PUECHER; A. CÉLIZ; J.C. SALERNO. 2006. Resistance to Mal de Río Cuarto Virus in Maize: A QTL Analysis. **JBAG** 17(1): 41-50.

LAGUNA, I.; M. GIMÉNEZ PECCI. 2004. Cultivo del maíz en la Argentina. Enfermedades Causadas por Virus. **IDIA** 21: 158-162.

LANDER, E. S.; P. GREEN; J. ABRAHAMSON; A. BARLOW; M. DALY; S. LINCOLN; L. NEWBURG. 1987. Mapmaker: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. **Genomics** 1: 174–181.

LENARDON, S.L.; G.J. MARCH; S.F. NOME; J.A. ORNAGHI. 1998. Recent outbreak of "Mal de Río Cuarto" virus on corn in Argentina. **Plant Dis.** 82 (4): 448.

LENARDON, S.L.; G.J. MARCH; J.A. ORNAGHI. 1999. Virus del Mal de Río Cuarto en maíz. Enfermedades causadas por virus y fitoplasmas en cultivos extensivos intensivos. Proyecto de Investigaciones en Fitovirología. IFFIVE, INTA, JICA. Hoja **Informativa Maíz N° 2**, 10 pp.

LENARDON, S.; P. VALLOTE; J. MARCELLINO; F. GIOLITTI; S. DE BREUIL; A. SALOMÓN. 2007. Comportamiento de híbridos comerciales de maíz frente al virus del mal de Río Cuarto (MRCV) en el área endémica 2006/2007. Maíz. **Inf. Actualización Técnica N °5**: 23-34. INTA (Ed.).

LI H.; J. RIBAUT; Z. LI; J. WANG. 2008. Inclusive composite interval mapping (ICIM) for digenic epistasis of quantitative traits in biparental populations. **Theor. Appl. Genet.** 116:243-260.

LITTELL, R.C; G.A. MILLIKEN; W.W. STROUP; O. SCHABENBERGER. 2006. **SAS for Mixed Models**. Second Edition, Cary, NC: SAS Institute Inc.

LUCAS, J.A. 2010. Advances in plant disease and pest management. **J. Agric. Sci.** 149(1): 91-114.

MARCH G.J.; J.A. ORNAGHI; J. GIUGGIA; A. RAGO; S.L. LENARDON. 2002. Systemic insecticides to control *Delphacodes kuscheli*, and the "Mal de Río Cuarto" virus on maize. **Int J. Pest. Manag.** 48:127-132.

MARTÍNEZ, M.C; M. HELGUERA; A. CARRERA. 2010. **Biotecnología y Mejoramiento Vegetal**. II.P1: Cap. 5: 70-86.

McMULLEN M.; K. SIMCOX. 1995. Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. **Mol Plant-Microbe Interact.** 8: 811-815.

MELCHINGER A.; H. UTZ; C. SCHÖN. 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. **Genetics** 149: 383-403.

MICHELMORE, R.; I. PARAN; 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.

MORATA, M.M; D.A. PRESELLO; M. GONZÁLEZ; E. FRUTOS. 2003. Aptitud combinatoria entre líneas de maíz resistentes a Mal de Río cuarto. **Fitopatología Brasileira** 28: 236-244.

MUÑOZ, J; J. ORNAGHI; A. MARINELLI; C. MARTINO; G. BOITO. 1991. Detección de partículas de reovirus en glándulas salivales de *Delphacodes kuscheli* Fennah. **Actas del taller de actualización sobre Mal de Río Cuarto.** Pergamino, BsAs. pp. 97-99.

NOME, S.; S. LENARDON; B. RAJU; I. LAGUNA; S. LOWE; D. DOCAMPO. 1981. Association of retrovirus-like particles with disease of Río Cuarto of Argentina. **Phytopathol.** 101: 7-15.

ORNAGHI, J; G. BOITO; G. SANCHEZ; G. MARCH; J. BEVIACQUA. 1993. Studies on the population of *Delphacodes kuscheli* Fennah in different years and agricultural areas. **J. Gen. Breed.** 47: 227.282.

ORNAGHI, J.; G. MARCH; G. BOITO; A. MARINELLI; J. BEVIACQUA; J. GIUGGIA; S. LENARDON. 1999. Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli* vector of “Mal Río Cuarto” Virus. **Maydica** 44: 219-223.

ORNAGHI, J. A.; G. J. MARCH; R. C. MOSCHINI; M. I. MARTÍNEZ; G. T. BOITO. 2011. Predicting population level of *Delphacodes kuscheli*, vector of *Mal de Río Cuarto virus*, and climate risk in the Argentine Pampas using meteorological models. **Tropical Plant Pathology** 36 (3): 160-168.

PACHECO M.; E. KREFF; D. DÍAZ; C. ROBLEDO; J. SALERNO. 2003. Detección de factores genéticos que afectan la tolerancia al Mal de Río Cuarto en maíz. XXXII Congreso Argentino de Genética. **J. Basic Appl. Genet.** 15: 48.

PERNETT A.; D. HOISINGTON; J. FRANCO; M. ISNARD; D. JEWELL; C. JIANG; L. MARCHAND; B. REYNAUD; J. GLASZMANN; D. GONZÁLEZ DE LEON. 1999. Genetic mapping of maize streak virus resistance from the Mascarene source. I. Resistance in line D211 and stability against different virus clones. **Theor. Appl. Genet.** 99: 524-539.

PIONNER ARG. 2007. El mal de Río Cuarto en Argentina. Disponible en <http://www.pioneer.com/argentina>. Consultado: 08-08-2013.

PRESELLO, D.; A. CÉLIZ. 1996. Comportamiento de Cultivares de Maíz Bajo Infección Natural de Mal de Río Cuarto, campaña 1995/96. **Tecn. Agrop. INTA Pergamino** I: 6-8.

PRESELLO, D.; G. EYHÉRABIDE; J. IGLESIAS; R.D. LOREA. 2007. Comportamiento de cultivares en Pergamino frente a enfermedades durante la campaña 2006/2007: Roya común del maíz y virus del Mal de Río Cuarto. **II Jornadas de Actualización Técnica de Maíz**. EEA INTA Pergamino.

QI-LUN Y.; F. PING; K. KE-CHENG; P. GUANG-TANG. 2008. Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from Wuling mountain region in China. **J Genetics** 87(3): 287-291.

RAFALSKI J.A. 2002. Plant genomics: present state and a perspective on future developments. **Brief. Funct. Genomic Proteomic** 1: 80-94.

REDINBAUGH, M.; R. PRATT. 2009. Virus Resistance. In: **Handbook of Maize: Its Biology** (eds. Bennetzen J.L. y S.C. Hake). 251- 270.

REMES LENICOV, A.M.M. de; E. VIRLA. 1993. Homópteros auquenorrincos asociados al cultivo de trigo en la República Argentina. I Análisis preliminar de la importancia relativa de las especies. **Stud Neotrop Fauna E.** 28:221-222.

SAGHAI-MAROOF, M.; K. SOLIMAN; R. JORGENSEN; R. ALLARD. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA.** 81: 8014-8018.

SAGPYA. 2012. www.sagpya.gov.ar. Consultado: 04-08-2013.

SALVI, L.M. 2013. Microsatélites ligados con tolerancia a la enfermedad Mal de Río Cuarto en maíz. Trabajo Final de Grado Licenciatura en Ciencias Biológicas. UNRC.

SAS Institute. 1997. SAS/STAT *software*: changes and enhancements through release 6.12. SAS Inst, Cary, NC.

SIIA. 2012. Sistema integrado de información agropecuaria Ministerio de Agricultura Argentina. <http://old.sii.gov.ar/index.php/series-por-tema/agricultura>. Consultado: 21-09-2013.

TANKSLEY, S. 1993. Mapping polygenes. **Ann. Rev. Gen.** 27: 205-233.

UTZ, H.F.; A.E MELCHINGER. 1996. PLABQTL. A program for composite interval mapping of QTL. **J. Agric. Genomics**. Available online at: <https://www.uni-hohenheim.de/plantbreeding/software>.

VELÁZQUEZ, P.D.; J.D. ARNEODO; F.A. GUZMÁN; L.R. CONCI; G.A. TRUOL, 2003. *Delphacodes haywardi* Muir, a new natural vector of *Mal de Río Cuarto virus* in Argentina. **J. Phytopathol.** 151:669-672.

WILSON, M.R y J.A TURNER. 2010. Saltamontes, Planthopper y vectores psílidos de enfermedades de las plantas. Amgueddfa Cymru - National Museum Wales. Disponible en línea en <http://naturalhistory.museumwales.ac.uk/Vectors>. Consultado: 23 de septiembre 2013.

YUAN L.; C. DUSSLE; A. MELCHINGER; H. UTZ; T. LÜBBERSTEDT. 2003. Clustering of QTL conferring SCMV resistance in maize. **Maydica** 48:55-62.

ZENG, Z. 1993. Theoretical basis for separation of multiple linked gene effects in mapping quantitative trait loci. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA** 90: 10972-10976.

ZENG, Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait loci. **Genetics** 136: 1457-1468.