



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 EN MAÍZ PARA LOS CARACTERES
INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD MAL DE RÍO
CUARTO”**

Alumno: DRVAR, Heidi

DNI: 34.762.749

Director: BONAMICO, Natalia Cecilia

Co-Director: DI RENZO, Miguel Ángel

Río Cuarto – Córdoba

Mayo de 2015



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE AGRONOMÍA Y VETERINARIA

CERTIFICADO DE APROBACIÓN

Título del Trabajo Final:

“MAPEO DE QTL EN MAIZ PARA LOS CARACTERES INCIDENCIA Y SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD MAL DE RÍO CUARTO”

Autor: DRVAR, Heidi

DNI: 34.762749

Director: BONAMICO, Natalia Cecilia

Co-Director: DI RENZO, Miguel Ángel

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

Fecha de presentación: ____ / ____ / ____

Secretario Académico

DEDICATORIA Y AGRADECIMIENTOS

Agradezco a mis padres Victoria y Carlos, por haberme dado la posibilidad de acceder a un título universitario, brindándome todo su apoyo, cariño y fuerzas para llevar adelante esta carrera.

A mi hermano Federico, por ser un ejemplo de voluntad y esfuerzo, quien me demostró que todo se puede lograr si uno se lo propone y que “un tropezón no es caída”.

A mi compañero de vida Alejandro, por estar siempre a mi lado, apoyándome y compartiendo esta maravillosa carrera.

A ellos les dedico este título obtenido y muy especialmente a mi papá que ya no está físicamente pero que creyó siempre en mi.

Finalmente les agradezco a los integrantes de Cátedra de Mejoramiento Genético Natalia y Miguel, por haberme dado la posibilidad de llevar adelante este proyecto con ellos y transmitirme tanto conocimiento.

INDICE

	Pág.
AGRADECIMIENTOS	I
RESÚMEN	II
SUMMARY	III
INTRODUCCIÓN	1
Características e importancia del maíz	1
Virosis mal de Río Cuarto	2
Marcadores genéticos y loci de caracteres cuantitativos	6
HIPÓTESIS	8
OBJETIVOS	8
MATERIALES Y MÉTODOS	9
Material vegetal	9
Ensayo de campo	9
Análisis estadístico	10
Análisis fenotípico	10
Análisis genético	11
Identificación de loci ligados a INC y SEV de la enfermedad MRC	12
RESULTADOS Y DISCUSIÓN	13
Evaluación de las familias F _{2,3} de maíz frente al Mal de Río Cuarto	13
Heredabilidad en sentido amplio	15
Análisis con SSR y mapa de ligamiento	17
CONCLUSIONES	19
BIBLIOGRAFÍA	20

ÍNDICE DE CUADROS

Cuadro 1. Especies hospedantes del Mal de Río Cuarto Virus (MRCV).	4
Cuadro 2. Grados de severidad y sintomatología de la enfermedad Mal de Río Cuarto.	10
Cuadro 3. Estimación de las medias de las variables incidencia (INC) y severidad (SEV) de la enfermedad Mal de Río Cuarto, en las líneas parentales (LP116 y B 73) y en las 208 familias $F_{2:3}$ evaluadas en ambientes individuales y a través de ambientes.	14
Cuadro 4. Estimación de los componentes de varianza, heredabilidad en sentido amplio e intervalos de confianza de la incidencia (INC) y la severidad (SEV) de la enfermedad Mal de Río Cuarto en 208 familias $F_{2:3}$ evaluadas en ambientes individuales y a través de tres ambientes en donde la enfermedad es endémica.	16
Cuadro 5. Parámetros estimados asociados con QTL para incidencia (INC) y severidad (SEV) de la enfermedad Mal de Río Cuarto en 208 familias $F_{2:3}$ derivadas del cruzamiento entre B73 \times LP116 en tres ambientes.	18
Cuadro 6. Parámetros estimados asociados con QTL para incidencia (INC) y severidad (SEV) de la enfermedad Mal de Río Cuarto, en 208 familias $F_{2:3}$ derivadas del cruzamiento entre B73 \times LP116 a través de tres ambientes.	18

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Evolución del consumo, producción y stock de maíz en el mundo.	1
Figura 2. Distribución de áreas principales y secundarias sembradas con maíz en Argentina.	2
Figura 3. Tetraedro vector-virus-hospedante-ambiente de la enfermedad Mal de Río Cuarto.	3
Figura 4. A. <i>Delphacodes kuscheli</i> hembra, B. <i>Delphacodes kuscheli</i> macho.	4
Figura 5. Síntomas de la enfermedad Mal de Río Cuarto.	5
Figura 6. Distribución de la variable INC de las familias F _{2:3} derivadas del cruzamiento entre el parental tolerante (LP116) y del parental susceptible (B73). Evaluación realizada en La Aguada durante las campañas 2010-11 y 2011-12 y en Río Cuarto durante la campaña 2010-11.	14
Figura 7. Distribución de la variable SEV de las familias F _{2:3} derivadas del cruzamiento entre el parental tolerante (LP116) y del parental susceptible (B73). Evaluación realizada en La Aguada durante las campañas 2010-11 y 2011-12 y en Río Cuarto durante la campaña 2010-11.	15

INTRODUCCIÓN

Características e importancia del maíz

El maíz es una gramínea anual, con vainas foliares que se superponen y con láminas alternas anchas. Posee espigas (inflorescencias femeninas) 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).

El maíz es el cereal con mayor volumen de producción en el mundo, superando la producción del trigo y del arroz. En las últimas campañas agrícolas el cultivo muestra una caída de la relación stock/consumo (Figura 1), dado principalmente por el recorte de la oferta de EE.UU. para el comercio mundial.

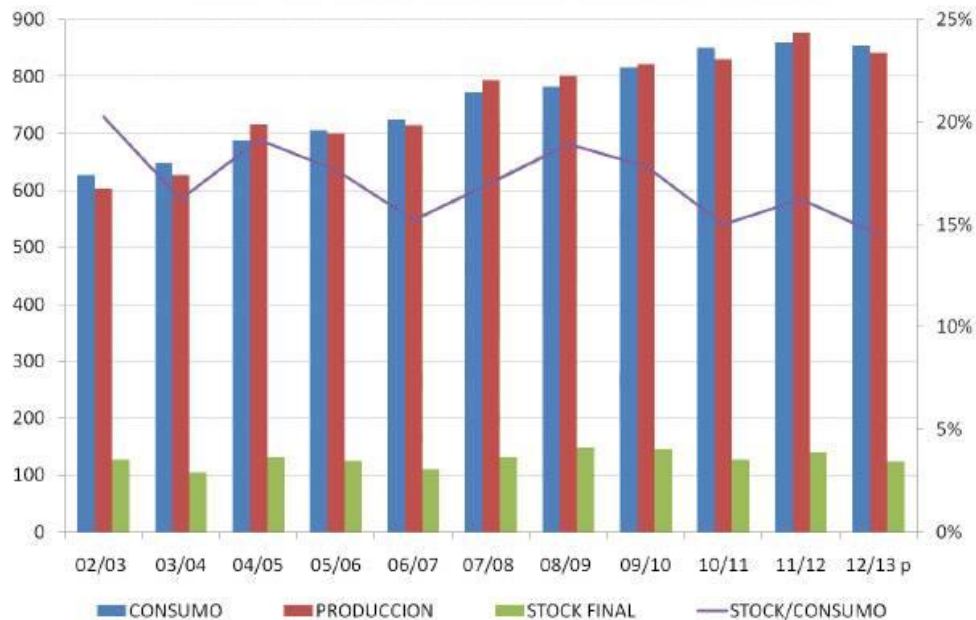


Figura 1. Evolución del consumo, producción y stock de maíz en el mundo (Futuro y Opciones, 2012)

El maíz es en Argentina el cereal de cosecha gruesa con mayor superficie sembrada (Figura 2), y el departamento Río Cuarto en la provincia de Córdoba se encuentra dentro de las principales áreas productoras (www.intagro.com/mapas/arg_maiz.asp, 2013).

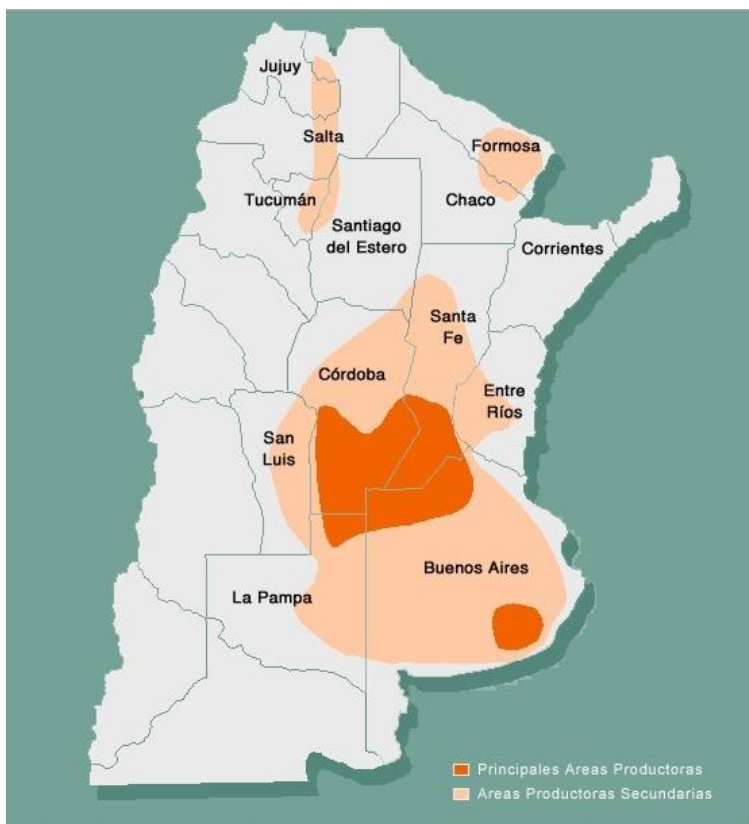


Figura 2. Distribución de áreas principales y secundarias sembradas con maíz en Argentina (INTA 2013).

En Argentina se registró una producción de 24 millones de toneladas en la campaña 2013/2014 y se estiman 2 millones más para la campaña 2014/2015 y que las exportaciones suban también 2 millones de toneladas y alcancen las 16 millones de toneladas (USDA, 2014). En cuanto a la provincia de Córdoba la superficie sembrada fue de 2 millones de ha, la superficie cosechada fue de 1.677.00 ha; con una producción de 11,8 millones de toneladas con un rendimiento medio de $7.060 \text{ kg}\cdot\text{ha}^{-1}$ (SIIA, 2014).

Virosis Mal de Río Cuarto

Entre las adversidades de origen biótico que afectan al cultivo de maíz con mayor impacto sobre los rendimientos en la República Argentina se encuentra la enfermedad virósica denominada Mal de Río Cuarto (MRC) (Redinbaugh *et al.*, 2009). La enfermedad fue detectada a fines de la década del '60 en cultivos ubicados en el departamento Río Cuarto al sur de Córdoba, área donde la enfermedad es endémica, conjuntamente con la introducción de los primeros híbridos comerciales de maíz. La enfermedad se presenta principalmente en el departamento Río Cuarto, siendo las áreas rurales de Chaján, Sampacho y Suco las más afectadas (March *et al.*, 1995). La ocurrencia del

MRC, así como su magnitud en la naturaleza depende de la importancia de la interacción del vector (chicharrita) con el patógeno (virus), el hospedante (maíz) y el ambiente (Figura 3).

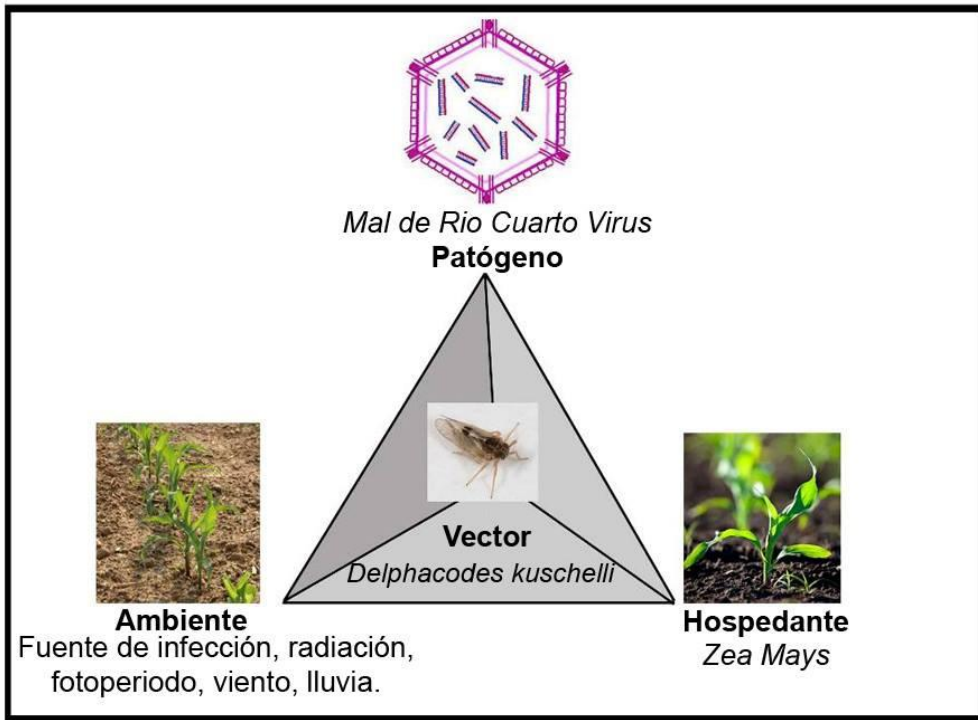


Figura 3. Tetraedro vector-virus-hospedante-ambiente de la enfermedad Mal de Río Cuarto.

Mal de Río Cuarto Virus (MRCV) es el agente causal del MRC, familia *Reoviridae*, género *Fijivirus*, y es transmitido en forma circulativa-propagativa (Muñoz *et al.*, 1991), principalmente por el insecto *Delphacodes kuscheli* Fennah (Homoptera: *Delphacidae*) conocido como “chicharrita” (Remes Lenicov y Virla, 1993). El comportamiento del virus dentro del vector, es de gran interés epidemiológico ya que este es un reservorio natural del mismo y por lo tanto la población de macrópteros migrantes, adaptadas a ambientes inestables (Ornaghi *et al.*, 1999), constituye el potencial inóculo que definirá las epidemias de la enfermedad (Lenardon *et al.*, 1985; Remes Lenicov *et al.*, 1985; Di Renzo *et al.*, 2004).

Las poblaciones del vector están compuestas por individuos de dos formas macrópteros (alas largas) que tienen la capacidad de volar (Figura 4), y de formas braquípteros (alas cortas) sin esta capacidad (Ornaghi *et al.*, 1993).

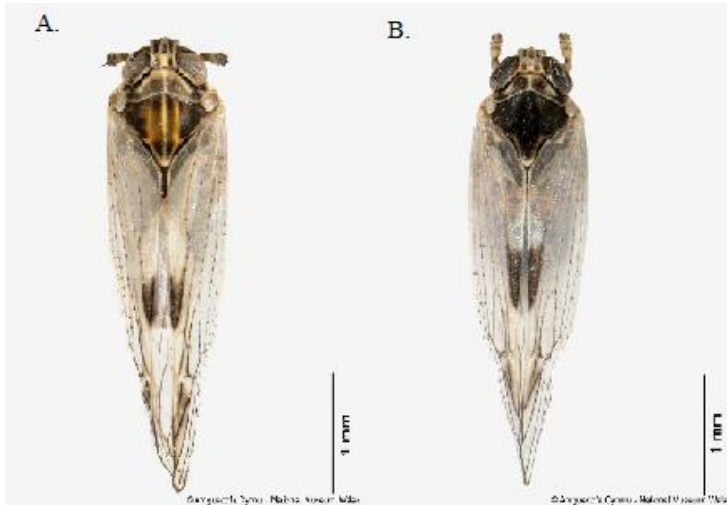


Figura 4. A. *Delphacodes kuscheli* hembra, B. *Delphacodes kuscheli* macho (Natural Museum Wales, 2015)

El MRCV es capaz de infectar otros cultivos, se detectó 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 (Cuadro 1). Cuando las malezas y gramíneas cultivadas invernales comienzan su senescencia las chicharritas migran a los cultivos próximos de maíz durante etapas tempranas del cultivo (Ornaghi *et al.*, 1993; Rodríguez Pardina *et al.*, 1998; Laguna *et al.*, 2002; Boito y Ornaghi, 2008).

Cuadro 1. Especies hospedantes del MRCV.

Especies forrajeras y malezas		Especies cultivadas cereales	
<i>Bromus unioloides</i>	Cebadilla criolla	<i>Avena sativa</i>	Avena
<i>Digitaria sanguinalis</i>	Pata de gallina	<i>Triticum aestivum</i>	Trigo
<i>Setaria verticillata</i>	Cola de zorro	<i>Sorghum vulgare</i>	Sorgo
<i>Cynodon dactylon</i>	Gramón	<i>Panicum millaceum</i>	Mijo
<i>Echinochloa colorum</i>	Pasto colorado	<i>setaria italica</i>	Moha de Hungría
<i>Eleusine indica</i>	Gramma carraspera	<i>Secale cereale</i>	Centeno
<i>Sorghum alepense</i>	Sorgo de alepo	<i>Triticum aestivum x Secale cereale</i>	Triticale
<i>Arundo donax</i>	Caña de castilla	<i>Triticum sp. x Agropirum sp.x Secale sp</i>	Tricepirum
<i>Eragrostis virescens</i>	Pasto volador	<i>Hordeum vulgare</i>	Cebada
<i>Cenchrus pauciflorus</i>	Roseta	<i>Chloris gayana</i>	Gramma rhodes
<i>Eleusine indica</i>	Pasto cuaresma	<i>Panicum maximum</i>	Gatton panic
<i>Bromus brevis</i>	Cebadilla pampeana	<i>Eragrostis curvula</i>	Pasto llorón
<i>Setaria cordobensis</i>	Cola de zorro	<i>Panicum coloratum</i>	Panicum
<i>Stipa tenuissima</i>	Paja blanca		
<i>Poa ligularis</i>	Pasto hilo		
<i>Cynodon hirsutus</i>	Gramilla		

Cuando la infección ocurre en estado de coleoptile, las plantas de maíz afectadas no superan los 30 cm de altura. Otros síntomas son tallos achatados con entrenudos cortos, hojas del tercio superior reducidas a la vaina foliar, panojas atrofiadas y mazorcas múltiples y sin granos (Abdala *et al.*, 1997). En las plantas afectadas se forman enaciones en el envés de las hojas sobre las nervaduras, que pueden estar presentes también en vainas, brácteas y en tallo (Figura 5). Los síntomas de esta virosis dependen del estado fenológico de la planta al adquirir el virus, del genotipo y de las condiciones ambientales en las que se desarrolla el cultivo. A mayor desarrollo de la planta en el momento de la infección, los síntomas son más leves y menores serán los daños causados (March *et al.*, 1998).

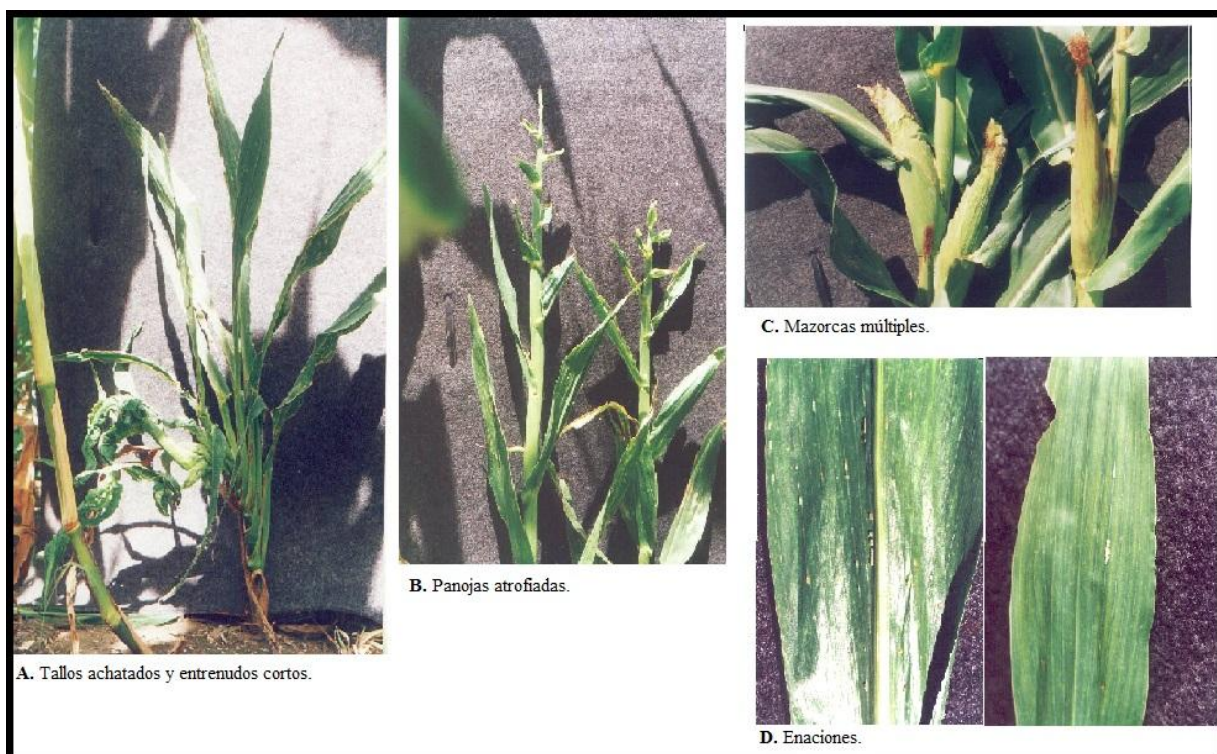


Figura 5. Síntomas de la enfermedad Mal de Río Cuarto.

El MRC causa graves pérdidas económicas, debido principalmente a su alta incidencia, la cual se refiere al porcentaje de plantas que presentan síntomas y a la severidad, la cual refleja la gravedad de éstos en las plantas afectadas.

En general, la escala de severidad permite relacionar mejor con pérdidas ocasionadas por la enfermedad. En el MRC la incidencia de la enfermedad depende de la cantidad de chicharritas presentes en el cultivo de maíz, por lo que cuanto mayor sea el número de individuos, mayor será la probabilidad de que más plantas sean picadas e infectadas. La severidad está relacionada además,

con el momento en que las plantas son infectadas por el virus transmitido por el insecto vector. El carácter incidencia está asociado con mecanismos genéticos de tolerancia al insecto vector mientras que el carácter severidad lo está con mecanismos de tolerancia al virus (Bonamico, 2012; Borghi, 2012; Dintinger, *et al.*, 2005).

Las siembras tempranas (Ornaghi *et al.*, 2011) para evitar el pico poblacional de vectores del MRC y el uso de insecticidas sistémicos aplicados 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 para contrarrestar los efectos de la virosis Mal de Río Cuarto.

En cultivos extensivos, el modo más eficaz de controlar enfermedades producidas por patógenos como los virus, es por medio de la utilización de resistencia genética. Algunos autores sugieren que la tolerancia a este virus se comporta como un carácter cuantitativo controlado por efectos genéticos aditivos y epistáticos (Presello 1993; Presello *et al.*, 1995). Debido al costo de las prácticas culturales para reducir las pérdidas causadas por virulencias como el cambio de la fecha de siembra y el control químico, la incorporación de la resistencia en maíz se considera la estrategia más eficiente de control para el manejo de la enfermedades (Bonamico *et al.*, 2012; Hao *et al.*, 2014).

Marcadores genéticos y loci de caracteres cuantitativos

La resistencia genética a diferentes virus se identificó en poblaciones de maíz en diferentes ambientes utilizando distintas técnicas de detección y diferentes *loci* de resistencia se identificaron en todos los cromosomas del maíz (Zambrano *et al.*, 2014).

Las tecnologías de análisis molecular de la variabilidad del ADN permiten determinar puntos de referencia en los cromosomas, técnicamente denominados “*marcadores moleculares*”. Un marcador molecular (MM) es un segmento de ADN con una ubicación específica en un cromosoma cuya herencia puede seguirse en individuos de una población. La función de un marcador molecular por lo general es desconocida y cuando se verifica su comportamiento de acuerdo con las leyes básicas de herencia Mendeliana, se define al mismo como un marcador genético (Grattapaglia y Ferreira, 1998). 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 (Feliù, 2013).

La Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura (FAO) remarcó los avances logrados en biología molecular y en bioinformática y las ventajas de la integración de herramientas biotecnológicas con metodologías de mejoramiento tradicional

apoyando el uso de la selección asistida por marcadores (MAS) en los programas de mejoramiento genético (Ruane y Sonnino, 2007). La MAS utiliza marcadores ligados a QTL para identificar genotipos superiores, ésta es propuesta y utilizada ampliamente como herramienta para minimizar efectos ambientales y acumular genes de tolerancia (Lucas, 2010).

El mapeo de QTL busca identificar asociaciones entre polimorfismos a nivel del ADN con cambios en la expresión fenotípica de los caracteres, por medio de modelos estadísticos adecuados. Existen diferentes tipos de marcadores moleculares que pueden ser usados en el mapeo de QTL. La llegada de las técnicas modernas de biología molecular, tales como la utilización de enzimas de restricción y el desarrollo del proceso de amplificación en cadena mediante una ADN polimerasa, permitieron el surgimiento de los marcadores moleculares de ADN, caracteres cualitativos. Estos son ampliamente usados por su abundancia, por la ausencia de influencia ambiental y porque permiten detectar polimorfismo genético directamente a nivel del ADN con lo cual se obtiene y acumula gran número de información sobre la estructura del genoma.

Entre los marcadores de ADN podemos mencionar los que están basados en restricción o corte con enzimas e hibridación del ADN como los polimorfismos en la longitud de los fragmentos de restricción (RFLP) y los VNTR o minisatélites (número variable de secuencias repetidas en tándem), los que están basados en productos de reacción en cadena de la ADN polimerasa (PCR) como los RAPD (polimorfismos de ADN amplificados al azar) y los SSR o microsatélites (secuencias simples repetidas) y los que se basan en restricción y amplificación como los AFLP (polimorfismos en la longitud de fragmentos amplificados).

Los marcadores SSR son secuencias repetidas de ADN ampliamente distribuidas en el genoma, de herencia codominante y altamente polimórficas (Yao *et al.*, 2008). En plantas los sitios de microsatélites están ampliamente distribuidos con una frecuencia de uno cada 50 mil pares de bases (Grattapaglia y Ferreira, 1998). Los SSR proveen una buena resolución para estudios de diversidad y para interpretar la estructura genética de las poblaciones. La cantidad de microsatélites identificados en maíz y la secuencia de los iniciadores necesarios para su amplificación mediante PCR son de disponibilidad pública (Maize Genetics Cooperation, Stock Center. Maize Genetics and Genomics Database (MaizeGDB)).

El mapeo de QTL para caracteres asociados a síntomas del MRC (Bonamico, 2010) y para las variables incidencia y severidad (Bonamico *et al.*, 2012), así como de un carácter sintético o matemáticamente construido a partir de la combinación de estas dimensiones de análisis (Bonamico *et al.*, 2013) constituye una alternativa para la selección de genotipos tolerantes al MRC.

HIPÓTESIS

Existe ligamiento entre loci de caracteres cualitativos (marcadores moleculares) y loci de caracteres cuantitativos (incidencia y severidad de la enfermedad MRC).

OBJETIVOS

General:

Identificar SSR asociados a las variables incidencia y severidad de la enfermedad MRC, 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 los caracteres incidencia (INC) y severidad (SEV) de la enfermedad Mal de Río Cuarto.
2. Caracterizar el fenotipo molecular de las F_2 con marcadores SSR.
3. Identificar asociaciones entre el fenotipo (INC y SEV del MRC) de las familias $F_{2:3}$ y el fenotipo molecular observado en las F_2 que les dieron origen.
4. Analizar la consistencia de las regiones genómicas asociadas con la reacción al MRCV identificadas en distintos fondos genéticos, ambientes, y generaciones, así como con diferentes métodos de análisis.

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 2009/10, plantas F_2 derivadas de dos espigas F_1 provenientes del cruzamiento entre B73 y LP116, fueron autofecundadas para obtener 208 familias $F_{2,3}$. De cada planta F_2 se obtuvieron muestras de hojas para la extracción de ADN.


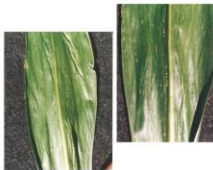


Ensayo de campo

Las familias $F_{2,3}$ se sembraron durante la campaña 2011/12 en la zona 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 a MRCV de las familias $F_{2,3}$, obtenidos en la campaña agrícola 2010/11 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). Cada combinación año-localidad fue considerada un ambiente diferente. El estudio se llevó a cabo utilizando un diseño en bloques completos al azar con dos repeticiones de cada familia $F_{2,3}$. Los ensayos fueron establecidos en lotes cuyo cultivo antecesor invernal fue avena. Las labores de presembrado se realizaron en forma convencional y la siembra se efectuó en forma manual en surcos a 0,70 m. La transmisión se realizó en forma controlada con poblaciones naturales del insecto vector recolectadas de lotes de avena. Los insectos se colocaron bajo túneles de malla fina cuando las plántulas estaban en estado de coleoptile, 6-8 días posteriores a la siembra.

Para la evaluación del comportamiento fenotípico de las familias $F_{2,3}$ por su reacción frente a MRCV se registraron los siguientes caracteres fenotípicos sobre 15 plantas de cada repetición: 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). Esta escala permitió cuantificar la reacción frente a MRCV por medio de dos variables, la incidencia (INC) y la severidad (SEV) de enfermedad, calculados en base al valor medio de cada familia.

La INC es la proporción de plantas que presentan síntomas y la SEV el valor medio de las plantas con síntomas (Dintinger *et al.*, 2005; Bonamico *et al.*, 2012).

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 Asintomático		Sin síntomas.
1 Con síntomas leves		Enaciones, con o sin disminución de altura.
2 Con síntomas severos		Enaciones, reducción del tamaño de la panoja, laminas 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 o sin granos.

Análisis estadístico

Análisis fenotípico

Los supuestos del análisis de varianza (ANAVA) que involucran errores independientes, normalmente distribuidos y con varianzas homogéneas para las variables medidas en la población segregante $F_{2,3}$, para cada ambiente y a través de ambientes se probaron mediante los estadísticos de Shapiro-Wilks y Test de Levene, usando el programa INFOSTAT (Di Renzo *et al.* 2014). El nivel de significancia usado fue $\alpha = 0,05$.

La herencia de la tolerancia frente a MRCV, para las variables INC y SEV, se estimaron mediante análisis independientes para cada variable fenotípica evaluada en las familias $F_{2,3}$ usando

un modelo que incluyó los efectos genéticos, ambientales y la interacción genotipo-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 un término de error aleatorio asociado a la observación y_{ijk} .

Y en cada ambiente:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + E_j + \varepsilon_{ijk}$$

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 ; y ε_{ijk} es un término de error aleatorio asociado a la observación y_{ijk} .

La heredabilidad (h^2) para cada carácter se estimó acorde a Hallauer y Miranda (1981) según las siguientes fórmulas:

- en cada ambiente:

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

- a través de ambientes:

$$h^2 = \sigma_G^2 / (\sigma_G^2 + (\sigma_{GE}^2 / e) + (\sigma^2 \varepsilon / re))$$

donde σ_G^2 , σ_E^2 , σ_{GE}^2 , $\sigma^2 \varepsilon$ son varianzas genotípicas, ambientales, de la interacción genotipo-ambiente y del residual, respectivamente; r es el número de repeticiones, y e 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 genético

El ADN de las 208 F_2 se extrajo a partir de tejido foliar según el método propuesto por Saghai-Marooft *et al.* (1984). La cantidad y calidad del ADN obtenido se evaluó en geles de agarosa (BIO-RAD) al 0,8% p/v disuelta en buffer TBE 1X, con agregado de bromuro de etidio. La caracterización molecular de las familias F_2 se realizó con iniciadores SSR polimórficos entre las líneas parentales B73 y LP116.

Los nombres, la posición del BIN y las secuencias de los marcadores SSR se encuentran en la base de datos de maíz (<http://www.maizegdb.org>). Gran parte de los SSR utilizados pertenecen a

los grupos de ligamiento en los que en estudios previos se detectaron QTL para la reacción al MRCV (Bonamico, 2004; Di Renzo *et al.*, 2004; Kreff *et al.*, 2006; Bonamico *et al.*, 2012; Feliù, 2013). La PCR se realizó en un termociclador BIOMETRA UNO-Thermoblock con un volumen final de 20 µl compuesto por: ADN; buffer de reacción; Cl₂Mg; iniciadores SSR; dNTPs; enzima Taq ADN polimerasa y agua (HPLC). El producto de amplificación por PCR fue separado en geles de agarosa Metaphor y revelado con bromuro de etido. La base genética del polimorfismo detectado se basa en la variabilidad del número de repeticiones en tándem y, consecuentemente, en el tamaño del microsatélite amplificado entre distintos genotipos o individuos. La presencia-ausencia de bandas se codificó en forma binaria (1/0).

Identificación de loci ligados a INC y SEV de la enfermedad MRC

Para evaluar el ligamiento entre marcadores y realizar un mapa de ligamiento se estimaron las frecuencias de recombinación entre *loci*. Dichas frecuencias se transformaron en distancias (cM) mediante el programa MAPMAKER/Exp. 3.0 (Lander *et al.*, 1987). Los marcadores están ligados si el valor del estadístico LOD (\log_{10} of the likelihood of odds), que equivale al \log_{10} de la expresión de verosimilitud del cociente probabilidad de ligamiento/probabilidad de independencia, es mayor que un umbral (LOD = 3.0) y la distancia de ligamiento es menor a un valor límite (40 cM). Los SSR con distorsión en la segregación se incluyeron en el mapa según criterios analizados en trabajos de maíz que mencionan la presencia de regiones que favorecen la distorsión en la segregación debidas a factores de tipo gametofíticos (Yao *et al.*, 2008).

La presencia de un posible QTL y la estimación de los efectos genéticos, se realizó mediante el método de mapeo por intervalo simple (SIM) y compuesto (CIM), con el programa PLABQTL 1.0 (Utz y Melchinger, 1995). El valor de INC y de SEV del MRC fue utilizado como variable dependiente. El LOD mínimo fijado para identificar la presencia de un posible QTL fue 2,5 y la posición del QTL fue asignada en donde el valor del LOD fue máximo. La variación fenotípica total explicada por los posibles QTL detectados se estimó por medio de un modelo de regresión múltiple. El LOD total y la variación fenotípica parcial explicada por cada QTL teniendo en cuenta la presencia de otros posibles QTL se calculó a partir de este modelo. Los QTL detectados fueron evaluados por la presencia de interacción QTL-ambiente.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Evaluación de las familias $F_{2,3}$ de maíz frente al Mal de Río Cuarto

Los ensayos de campo para evaluar numerosos genotipos de maíz por su reacción frente al MRC, resultan de gran dimensión por lo que es poco común realizar transmisión controlada del agente causal. En condiciones de transmisión natural una baja incidencia de la enfermedad con ausencia de síntomas suficientemente severos así como una elevada incidencia y severidad, ocurren aleatoriamente en distintos años, y dificultan los trabajos de identificación de factores genéticos que contribuyen a la tolerancia a la enfermedad (Bonamico, 2010). En el presente estudio los ensayos de evaluación a campo fueron establecidos próximos a Río Cuarto y a La Aguada, área en donde la enfermedad MRC es endémica y la transmisión fue controlada.

En el Cuadro 3 se presentan la media y el error estándar de las variables INC y SEV correspondientes a la población de 208 familias $F_{2,3}$ y a las líneas parentales, LP116 y B73, en los ambientes individuales y a través de ambientes. Para la variable INC, tanto en los tres ambientes como en la evaluación a través de ambientes se detectaron diferencias estadísticamente significativas entre las medias de las familias $F_{2,3}$ y ambos parentales. En cuanto al valor de SEV medio en las familias $F_{2,3}$ mostró diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,05$) con los valores medios de SEV del parental susceptible, a excepción del ambiente La Aguada 2011-12. Algunas familias $F_{2,3}$ presentaron valores medios fenotípicos que excedieron 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 a efectos genéticos así como a efectos ambientales o a errores experimentales (Di Renzo *et al.*, 2002; Bonamico, 2004; Bonamico *et al.*, 2013). La recesividad parcial de la tolerancia al MRC hace suponer que una importante proporción de la varianza genética para la reacción al MRC es atribuible a componentes no aditivos (dominancia, sobredominancia y/o epistasis). Borghi (2012) y Feliù (2013) indicaron, para la reacción a MRC, la presencia de efectos genéticos prevalentemente no aditivos en la expresión del carácter índice de severidad de enfermedad, aunque también detectó en menor proporción acción génica aditiva.

Tanto la variable INC como la variable SEV mostraron distribución normal a través de ambientes (Figuras 6 y 7).

Cuadro 3. Estimación de las medias (\pm Error estándar) de las variables INC y SEV de la enfermedad Mal de Río Cuarto, en las líneas parentales (LP116 y B 73) y en las 208 familias F_{2:3} evaluadas en ambientes individuales y a través de ambientes.

Variable	Genotipo	Ambiente			
		Río Cuarto 2010-11	La Aguada 2010-11	La Aguada 2011-12	A través de ambientes
INC	LP116	0,00 \pm 0,00	a 0,00 \pm 0,00	a 0,00 \pm 0,00	a 0,00 \pm 0,00
	B73	0,84 \pm 0,06	c 1,00 \pm 0,00	c 1,00 \pm 0,00	c 0,95 \pm 0,04
	F _{2:3}	0,47 \pm 0,02	b 0,61 \pm 0,02	b 0,58 \pm 0,02	b 0,55 \pm 0,01
	LSD	0,25	0,28	0,33	0,17
SEV	LP116	-	-	-	-
	B73	1,99 \pm 0,13	b 2,81 \pm 0,01	b 2,61 \pm 0,06	a 2,47 \pm 0,16
	F _{2:3}	1,56 \pm 0,03	a 2,09 \pm 0,04	a 2,59 \pm 0,04	a 2,06 \pm 0,02
	LSD	0,34	0,39	0,33	0,24

INC= Incidencia de la enfermedad MRC; SEV= Severidad de la enfermedad MRC
Medias seguidas por la misma letra en la columna indican diferencias no significativas con un nivel de significancia de 0,05 según prueba de LSD.

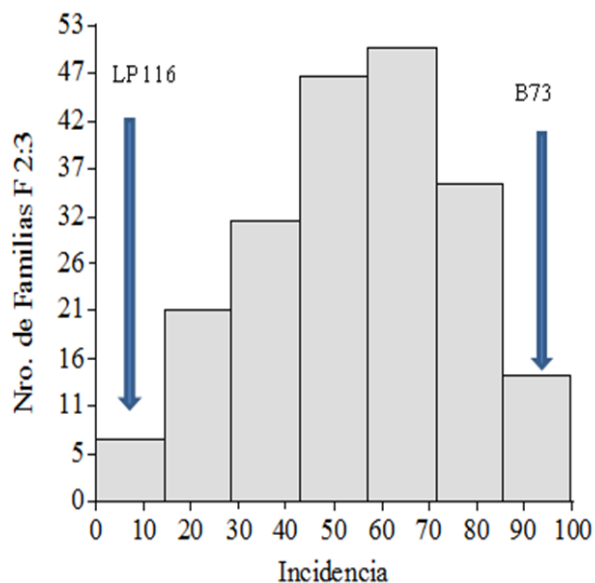


Figura 6. Distribución de la variable INC de las familias F_{2:3} derivadas del cruzamiento entre el parental tolerante (LP116) y del parental susceptible (B73). Evaluación realizada en La Aguada durante las campañas 2010-11 y 2011-12 y en Río Cuarto durante la campaña 2010-11

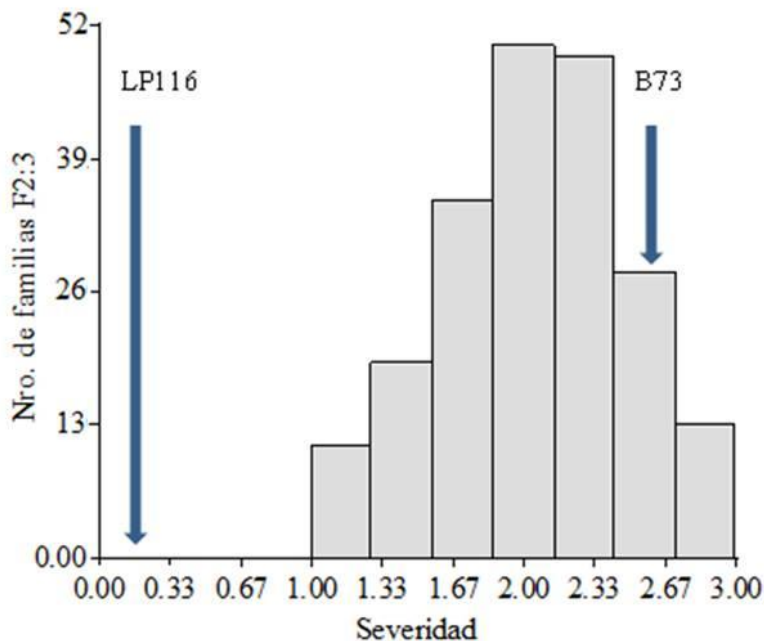


Figura 7. Distribución de la variable SEV de las familias $F_{2:3}$ derivadas del cruzamiento entre el parental tolerante (LP116) y del parental susceptible (B73). Evaluación realizada en La Aguada durante las campañas 2010-11 y 2011-12 y en Río Cuarto durante la campaña 2010-11.

Heredabilidad en sentido amplio

En el Cuadro 4 se presentan las estimaciones de los componentes de varianza, la heredabilidad en sentido amplio (H) y los intervalos de confianza (IC) de la incidencia (INC) y de la severidad (SEV) de la enfermedad MRC evaluadas 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 los componentes de varianza genotípica fueron altamente significativos ($p < 0,0001$) en ambientes individuales así como a través de ambientes. La heredabilidad fue estimada en sentido amplio ya que está basada en las diferencias entre familias segregantes $F_{2:3}$, quienes manifiestan diferencias genéticas aditivas y no aditivas (Di Renzo *et al.*, 2004; Bonamico *et al.*; 2013)

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

	Ambiente			
	La Aguada 2010-11	Río Cuarto 2010-11	La Aguada 2011-12	A través de ambientes
Variable: INC				
σ^2_g	0,058 ± 0,009	0,048 ± 0,008	0,097 ± 0,014	0,022 ± 0,005
σ^2_a	0,064 ± 0,006	0,057 ± 0,006	0,077 ± 0,008	0,066 ± 0,004
σ^2_{ga}	-	-		0,045 ± 0,006
Heredabilidad				
H	0,65 ¹	0,63 ¹	0,72 ¹	0,44 ²
IC 90%	0,534 - 0,731	0,508 - 0,715	0,626 - 0,783	0,298 - 0,558
Amplitud relativa ³ (%)	19,7	20,7	15,7	26,0
Variable: SEV				
σ^2_g	0,215 ± 0,040	0,105 ± 0,031	0,145 ± 0,031	0,043 ± 0,014
σ^2_a	0,290 ± 0,032	0,290 ± 0,033	0,220 ± 0,027	0,271 ± 0,018
σ^2_{ga}	-	-		0,102 ± 0,020
Heredabilidad				
H	0,60 ¹	0,42 ¹	0,57 ¹	0,33 ²
IC 90%	0,455 - 0,702	0,212 - 0,573	0,402 - 0,689	0,141 - 0,472
Amplitud relativa ³ (%)	24,7	36,0	28,6	33,0

± Error estándar.

¹ $H = \sigma^2_g / (\sigma^2_g + \sigma^2_a / r)$; r = n° de repeticiones.

² $H = \sigma^2_g / (\sigma^2_g + \sigma^2_{ga} / a + \sigma^2_a / ra)$; r = n° de repeticiones y a = n° de ambientes.

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

La heredabilidad de la variable INC mostró un valor moderado a alto en ambientes individuales y a través de estos. En la campaña 2010-11 el valor estimado fue similar para Río Cuarto y para La Aguada, en donde los componentes de varianza genotípica y ambiental fueron mayores. En La Aguada 2011-2012 el valor de la heredabilidad superó al estimado en Río Cuarto y en La Aguada 2010-2011. A través de los ambientes la heredabilidad presentó un valor moderado. En cuanto a la heredabilidad de la variable SEV, La Aguada 2010-2011 presentó valores superiores ($H=0,60$), seguido por La Aguada 2011-2012 y por último Río Cuarto 2010-2011. El valor de heredabilidad más bajo fue el observado a través de ambientes ($H=0,33$).

Los intervalos de confianza tuvieron una amplitud relativa de 16-26% para la variable INC y de 25-36% para SEV. La mayor expresión de enfermedad observada en el ambiente La Aguada 2011-2012 puede estar relacionada con el estrés por sequía, caída de granizo y ataque de insectos durante los primeros estadios de desarrollo del cultivo.

Los moderados valores de heredabilidad estimados a través de ambientes para INC y SEV están en relación directa al importante efecto de interacción genotipo-ambiente observado en la expresión de las variables, por lo 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).

Análisis con SSR y mapa de ligamiento

Numerosas investigaciones describen la existencia de regiones cromosómicas en las que los *loci* de resistencia a patógenos se agrupan en *cluster* sobre distintos cromosomas (Di Renzo y Bonamico, 2013; Zambrano *et al.*, 2014). En diferentes estudios, los cuales utilizaron distintos fondos genéticos, ambientes y generaciones de mapeo al empleado en el presente trabajo, se informan regiones con efectos significativos para la reacción al MRCV. Di Renzo *et al.* (2004) indican un QTL en el bin 1.03, en el intervalo entre los SSR bnlg1866-phi095. Bonamico (2010) identificó un QTL en la misma región, próximo a los marcadores bnlg1866 y umc1021. Ambos trabajos fueron realizados con un mismo fondo genético pero en distintas generaciones de mapeo. Kreff *et al.* (2006), usando un fondo genético diferente a los dos mencionados y al del presente estudio, identifican 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.

En el cuadro 5 se observa el análisis de QTL por ambiente que permitió identificar cuatro regiones asociadas con la variable INC ubicadas en los bins 1.03, 1.07, 8.08 y 10.04. Estas regiones presentaron un rango de LOD que varió entre 3 y 9, de las cuales tres poseen efecto aditivo negativo, lo que significa que el parental tolerante aporta los alelos que favorecen a la disminución de la expresión del carácter. El bajo porcentaje de variación fenotípica explicada en forma individual por cada QTL está en concordancia con la teoría por ser un carácter cuantitativo.

El análisis de QTL por ambiente para la variable SEV se muestra en el Cuadro 5. Aquí se pueden observar tres QTL detectados, en Río Cuarto 2010-11, uno de ellos también identificado en La Aguada 2010-11. El valor estadístico de LOD varió entre 3 y 4. La variación fenotípica explicada para SEV fue entre 7 y 9%. A excepción del bin 8.08 (phi080), el resto de las regiones identificadas mostraron un efecto aditivo negativo. Coincidentemente, tanto para INC como para SEV el efecto genético aditivo observado en la región cercana al marcador phi080 sugiere que en el bin 8.08 los alelos para disminuir el valor de ambas variables son aportados por el parental B73, susceptible a MRC. Trabajos de mapeo de QTL para tolerancia a virosis en plantas han informado que los alelos favorables provienen de ambos progenitores (Carson *et al.*, 2004; Li *et al.*, 2008).

Esto indicaría que el progenitor susceptible puede aportar alelos favorables que aumentan la tolerancia, tal como lo indican Di Renzo *et al.* (2004), Bonamico *et al.* (2012) y Borghi (2012).

Cuadro 5. Parámetros estimados asociados con QTL para incidencia (INC) y severidad (SEV) de la enfermedad Mal de Río Cuarto en 208 familias $F_{2:3}$ derivadas del cruzamiento entre B73 \times LP116 en tres ambientes.

Variable	Posición QTL ¹	Ambiente ²	LOD ³	Efecto aditivo	R ²
INC	1.03 (bnlg1866)	LA2010-11	6,78a	-0,29	14,2
	1.03 (umc1021)	RC2011-11	6,02ab	-0,07	12,6
	1.07 (bnlg1025)	LA2010-11	7,13a	-0,26	14,9
	8.08 (phi080)	RC2010-11	3,35ab	0,09	7,3
	10.04 (bnlg1074)	LA2010-11	9,08a	-0,27	18,5
SEV	1.02 (bnlg1007)	RC2010-11	3,65a	-0,59	8,8
	1.03 (umc1021)	LA2010-11	3,39ab	-0,36	8,0
	6.05 (bnlg1443)	RC2010-11	3,44b	-0,03	8,6
	8.08 (phi080)	RC2010-11	2,72a	0,27	6,7

¹ Localización cromosómica: bin y marcador SSR más próximo.

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

³ 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.

En el cuadro 6 se observan los QTL para las variables INC y SEV de la enfermedad Mal de Río Cuarto, detectados en los análisis realizados a través de ambientes. La variable INC, presentó cuatro regiones asociadas significativamente, con un rango de LOD de 3 a 5 y todas ellas con efecto aditivo negativo. La mayor proporción de variación fenotípica explicada fue 10% y la menor 6%.

Para SEV el mayor valor de LOD fue el observado en la región ubicada en el bin 1.03 (umc1021), la cual a su vez exhibió la mayor proporción (10%) de variación fenotípica explicada.

Los resultados indican posibles QTL en regiones similares a las informadas por Di Renzo *et al.* (2004), Bonamico (2004) y Bonamico *et al.* (2012); quienes evaluaron una población $F_{2:3}$ con diferente fondo genético e identificaron regiones genómicas con efectos significativos para tolerancia al MRC en los cromosomas 1 y 8.

Cuadro 6. Parámetros estimados asociados con QTL para incidencia (INC) y severidad (SEV) de la enfermedad Mal de Río Cuarto, en 208 familias $F_{2:3}$ derivadas del cruzamiento entre B73 \times LP116 a través de tres ambientes.

Variable	QTLposición ¹	LOD ²	Efecto aditivo	R ²
INC	1.03 (bnlg1866)	3,90a	-0,57	8,3
	1.07 (bnlg1025)	3,68ab	-0,49	7,9
	10.04 (bnlg1074)	2,59ab	-0,38	5,6
	10.06 (umc1045)	4,56ab	-0,53	9,7
SEV	1.03 (umc1021)	5,04a	-0,28	10,8
	1.03 (bnlg1866)	2,37ab	-0,16	5,2
	10.04 (bnlg1074)	4,04b	-0,35	8,8

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

Los estimadores de los componentes de varianza genotípica y de la interacción $G \times A$ para las variables INC y SEV fueron altamente significativos en los tres ambientes de evaluación y a través de ambientes.

Los valores de heredabilidad estimados para las variables INC y SEV fueron moderados a altos en ambientes individuales y a través de ambientes.

El análisis de QTL por ambiente permitió identificar cuatro regiones genómicas asociadas con la variable INC y tres regiones asociadas con la variable SEV.

En el análisis de QTL a través de ambientes fueron entre dos y cuatro las regiones asociadas significativamente con las variables SEV e INC.

Los QTL identificados para las variables INC y SEV involucran distintos mecanismos de resistencia. Los efectos aditivos de los QTL encontrados para las variables INC y SEV fueron estadísticamente significativos. El parental tolerante (LP116) contribuyó en la expresión de la tolerancia al MRC.

BIBLIOGRAFIA

- ABDALA G.; A. VIGLIOCCO; G. BOITO; E. LORENZO. 1997. Dwarfism in Mal de Río Cuarto disease - Histology of maize stems and endogenous gibberellin levels. **Biocell** 20: 211-220.
- BOITO G.; J. ORNAGHI. 2008. Rol de los cereales de invierno y su sistema de manejo en la dinámica poblacional de *Delphacodes kuscheli*, insecto vector del MRCV. **Agriscientia** 25: 17-26.
- BONAMICO N.C. 2004. Marcadores moleculares en *Zea mays* L. asociados a la tolerancia al Mal de Río Cuarto (MRC). Tesis de Maestría en Biotecnología. FCExFQyN. UNRC.
- 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.A. DI RENZO; M.A. IBÁÑEZ; 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. **J.B.A.G.** 24:13-18
- 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.
- 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.
- DINTINGER, J.; D. VERGER, S. CAIVEAU; A.M. RISTERUCCI; J. GILLES; F. CHIROLEU; B. COURTOIS; B. REYNAUD; 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; 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 RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. InfoStat versión 2014. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- FELIÙ P.I., 2013. *Mapeo de QTL para una medida multivariada de la reacción al virus Mal de Río Cuarto en maíz*. Tesis de Grado. Facultad de Agronomía y Veterinaria. Universidad Nacional de Río Cuarto, Río Cuarto, Argentina. 38p.
- FYO, 2012. Fyo – Especiales – Maíz. En: <http://portal.fyo.com/especiales/maiz/mapa.html>. Consultado: 15-02-2015
- GRATTAPA-GLIA, D.; FERREIRA, M.E. 1998. Introducción al uso de marcadores moleculares en el análisis genético. 2 ed. EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia, Brasil.
- GEAR, J.; G. EYHERABIDE A. ALVAREZ; G. DEPETRIS; O. CORTAMIRA; M.L. PORTELA; F. VARTORELLI; M. OLIVERA CARRIÓN; M. MELGAREJO; H. GODOY; 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
- HALLAUER, A.R.; J.B. MIRANDA. 1981. Quantitative Genetics in Maize Breeding. Ames: Iowa State University Press.
- HAO, D.; Y. CHENG; G. CHEN; H. LU; M. SHI; Z. ZHANG; X. HUANG; Y. MAO; L. XUE. 2014. Identification of significant single nucleotide polymorphisms for resistance to maize rough dwarf disease in elite maize (*Zea mays* L.) inbred lines. **Euphytica** 1-12
- 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. **J.B.A.G.** 17(1): 41-50.
- LAGUNA, G.; A.M.M. DE REMES LENICOV; E. VIRLA; A.O. AVILA; M.P. GIMÉNEZ PECCI; P. HERRERA; J. GARAY; D. PLOPER; R. MARIANI. 2002. Difusión del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz, su vector, delfácidos asociados y huéspedes alternativos en la Argentina. **Rev. Soc. Entomol. Argent.** 61: 87-97.
- LAGUNA, I.; M. GIMÉNEZ PECCI. 2004. Cultivo del maíz en la Argentina. Enfermedades Causadas por Virus. **I.D.I.A.** 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. 1999. Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli* vector of “Mal Río Cuarto” Virus. **Maydica.** 44: 219-223.
- LENARDÓN S.L., G.J. MARCH, J.E. BEVIACQUA, A. MARINELLI, J.A. ORNAGHI, E.M. ASTORGA. 1985. Diferentes épocas de siembra y cultivares de maíz como alternativa para disminuir la incidencia del Maize Rough Dwarf Virus (MRDV) agente causal del “Mal de Río Cuarto”. **I.D.I.A.** 78-83.
- 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.
- LUCAS, J.A. 2010. Advances in plant disease and pest management. **J. Agric. Sci.** 149(1): 91-114.
- LÜBBERSTEDT, T.; MELCHINGER, A.E.; SCHÖN, C.C.; UTZ, H.F.; KLEIN, D. 1997. QTL mapping in testcrosses of European flint lines of maize: I. Comparison of different testers for forage yield traits. **Crop Sci.** 37: 921-931.
- MARCH, G.J.; M. BALZARINI; J. ORNAGHI; JE BEVIACQUA; A. MARINELLI. 1995. Predictive model for "Mal de Río Cuarto" disease intensity. **Plant. Dis.** 79: 1051-1053.
- MARCH, G.J.; J.A. ORNAGHI; J.E. BEVIACQUA; S.L. LENARDON. 1998. Manual Técnico del Mal de Río Cuarto. Ed. Morgan. Argentina.
- 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.

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.

NATURAL MUSEUM WALES. 2015. Illustrate Guide to Families – Delphacidae – *Delphacodes kuscheli*. En: <http://naturalhistory.museumwales.ac.uk/vectors/browsespecies>. Consultado: 15-02-2015

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. Presello D. 1993. Herencia de la tolerancia a Mal de Río Cuarto en tres líneas endocriadas de maíz. Workshop Mal de Río Cuarto del Maiz, pp.72-73. INTA IFIVE. Córdoba. Argentina.

ORNAGHI, J.; G. MARCH; G. BOITO; A. MARINELLI; J. BEVIACQUA; J. GIUGGIA; S. LENARDÓN. 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. **Trop. Plant. pathol.**, 36/ 3:160-168.

PRESELLO, D. 1993. Herencia de la tolerancia a Mal de Río Cuarto en tres líneas endocriadas de maíz. Workshop Mal de Río Cuarto del Maiz, pp.72-73. INTA IFIVE. Córdoba. Argentina.

PRESELLO, D.; A. CELIZ; E. FRUTOS. 1995. Efectos genéticos asociados con la resistencia a la enfermedad Mal de Río Cuarto en líneas endocriadas de maíz. Proceedings of III Latin American and XVI Andean Zone of Maize Researchers Meeting. Tomo I (eds. Avila LG, LM Céspedes). Fundación Patiño S.I. Bolivia. 407-413.

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

REMES LENICOV, A.M.; A. TESON; E. DAGOBERTO; N. HUGUET. 1985. Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto en maíz. **Gac. Agrop.** V: 251-258.

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.

RODRÍGUEZ PARDINA, P.E.; M.P. GIMÉNEZ PECCI; I.G. LAGUNA; E. DAGOBERTO; G. TRUOL. 1998. Wheat: A new natural host for the Mal de Río Cuarto virus in the endemic disease area, Río Cuarto, Córdoba Province, Argentina. **Plant. Dis.** 82:149-152.

RUANE, J.; A. SONNINO. 2007. Marker-assisted selection as a tool for genetic improvement of crops livestock forestry and fish in developing countries: an overview of the issues In: Marker-Assisted Selection. (eds. Guimaraes E, J Ruane, B Scherf, A Sonnino, J Dargie). FAO.

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.

SIIA.2014. Sistema integrado de información agropecuaria Ministerio de Agricultura Argentina. <http://old.siiia.gov.ar/index.php/series-por-tema/agricultura>. Consultado: 15-02-2015

UTZ, H.; MELCHINGER, A. 1995. PLABQTL. A computer program to map QTL. Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics. University of Hohen-heim, D-70593 Stuttgart, Germany.

YAO, Q.; P. FANG; K. KANG; G. PAN. 2008. Genetic diversity based on SSR markers in maize (*Zea mays* L.) landraces from Wuling mountain region in China. **Journal of Genetics**. 87:3

ZAMBRANO, J.L.; M.W. JONES; E. BRENNER; D.M. FRANCIS; A. TOMAS; M.G. REDINBAUGH. 2014. Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus- resistant maize inbred line. **Theor. Appl. Genet.** 127:867–880