



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO - QUÍMICAS Y
NATURALES

Tesis para acceder al grado académico de Doctor
en Ciencias Biológicas

**IDENTIFICACIÓN DE QTL ASOCIADOS A RESPUESTA A MAL DE RÍO
CUARTO EN UNA COLECCIÓN DE LÍNEAS DE INTROGRESIÓN DE
TEOSINTE (*ZEA MAYS SSP. PARVIGLUMIS*)**

Lic. Maximiliano David Dallo

DIRECTOR: MSc. Miguel Angel Di Renzo

CODIRECTORA: Dra. Mónica Graciela Balzarini

Río Cuarto, abril 2.018

COMISIÓN ASESORA y JURADO

Dr. Sergio G. Alemán..... Universidad Nacional de Río Cuarto.....

Firma..... Aclaración.....

Dr. Daniel A. Presello..... Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria...

Firma..... Aclaración.....

Dr. Héctor H. Varela..... Universidad Nacional de Río Cuarto.....

Firma..... Aclaración.....

DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha Río Cuarto, 10 de diciembre de 2.018.....

Calificación.....

RECURSOS FINANCIEROS PARA LA REALIZACIÓN DE LA TESIS

Las siguientes instituciones proporcionaron los medios para la realización de la presente tesis:

- CONICET-MINCYT. Beca cofinanciada Tipo I y II.
- FONCYT-BID. Mapeo de QTL para tolerancia a mal de Río Cuarto en maíz. Director: Di Renzo, Miguel Angel. PICT-2.007-02231.
- MINCYT. Mapeo de QTL para tolerancia a mal de Río Cuarto en maíz. Director: Di Renzo, Miguel Angel. PID N°38. N°105/2.008 Ref. Res. N°000121.
- SECYT, UNRC. Mapeo de QTL para tolerancia a mal de Río Cuarto en maíz. Director: Di Renzo, Miguel Angel. Res. Rec. N°544/09. PPI 2.009/2.010.
- SECYT, UNRC. Mal de Río Cuarto en *Zea*: marcadores moleculares e interacción genotipo-ambiente. Director: Di Renzo, Miguel Angel. Res. Rec. N°249/07. PPI 2.007/2.008.

*A Mariela,
Julia y Sebastián*

AGRADECIMIENTOS

A Miguel Di Renzo y Mónica Balzarini por la dirección de la presente tesis. Mi más sincero agradecimiento por el espacio, la ayuda y la posibilidad que me brindaron.

A Sherry Flint-Garcia cuyo aporte desinteresado fue fundamental para el desarrollo del presente trabajo.

A Mercedes Ibañez y Natalia Bonamico por la guía y los incontables momentos en los que me brindaron su apoyo, ayuda y consejo. El conocimiento que me transmitieron es invaluable.

A Andrés Zambelli, Martín Grondona y Andrea Peña Malavera cuyos aportes, correcciones, sugerencias y ayuda en el análisis de datos fueron significativos en el desarrollo de este estudio.

A mis padres. Mi agradecimiento por haberme inculcado desde pequeño el valor por el esfuerzo. Mamá: el ejemplo fue tu mejor enseñanza.

A Chiquita. Tus palabras me brindaron aliento y motivación.

Al CONICET y al Ministerio de Ciencia y Tecnología del Gobierno de la Provincia de Córdoba por otorgarme la oportunidad de capacitación.

A todos aquellos que, en menor o mayor medida, me dieron la fuerza y el estímulo necesario para no bajar los brazos.

ÍNDICE

	Página
Índice de tablas	vii
Índice de figuras	viii
Resumen en español e inglés	x
CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN	1
1.1. Producción de alimentos: perspectivas futuras	1
1.2. El rol del maíz en la dieta y en la economía nacional	2
1.3. El mal de Río Cuarto (MRC)	3
1.4. Marcadores moleculares: herramientas genómicas para la detección de QTL	8
1.5. El mejoramiento genético y la importancia de la variabilidad genética	11
1.6. El teosinte como fuente de diversidad genética	15
CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS	19
2.1. Hipótesis	19
2.2. Objetivo general	19
2.3. Objetivos específicos	19
CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA	20
3.1. Material vegetal	20
3.2. Caracterización fenotípica	23
3.3. Caracterización genotípica y mapa de ligamiento	28
3.4. Análisis estadístico	31
CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN	35
4.1. Caracterización de los ambientes de evaluación	35
4.2. Predicción de los efectos aleatorios del genotipo	46
4.3. Estimación de componentes de varianza y heredabilidad	55
4.4. Análisis de la interacción genotipo-ambiente	59
4.5. Caracterización genotípica y mapa de ligamiento	63
4.6. Análisis de QTL: análisis por marcador individual	78
4.7. Alcances y perspectivas futuras	103
CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES	108
REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS	109

ÍNDICE DE TABLAS

Tabla		Página
1	Descripción de las poblaciones BC4S2 y BC4DH.	22
2	Test de comparación de medias para ISE en los ambientes LA11, LA12 y RC11.	45
3	Efectos aleatorios del genotipo para ISE en genotipos evaluados en los ambientes LA11, LA12 y RC11.	50
4	Efectos aleatorios del genotipo para REN en genotipos evaluados en los ambientes LA11 y RC11.	52
5	Coeficientes de correlación entre los BLUP del ISE y REN para los ambientes LA11, LA12 y RC11.	55
6	Estimación de los componentes de varianza y de la heredabilidad en LA11 para ISE.	55
7	Estimación de los componentes de varianza y de la heredabilidad en RC11 para REN.	56
8	Estadística descriptiva de los datos de marcadores SNP.	64
9	Descripción genotípica de la colección de líneas de introgresión.	64
10	Descripción de los valores faltantes para datos de marcadores SNP.	65
11	Caracterización de los grupos de ligamiento en función de los marcadores SNP.	66
12	Número de recombinaciones dobles en NIL con al menos un evento doble recombinante.	71
13	Descripción genotípica de las NIL.	72
14	Valores críticos del estadístico F para distintos niveles de significación.	81
15	Nombre, posición, proporción de la varianza fenotípica explicada y valor del estadístico F en SNP asociados a ISE y REN.	82
16	Clasificación fenotípica entre el desempeño del genotipo y la presencia de SNP asociados significativamente o no a ISE.	90
17	Anotación funcional de secuencias de marcadores moleculares asociados significativamente a ISE y REN.	99

ÍNDICE DE FIGURAS

Figura		Página
1	Esquema con el desarrollo de la colección de líneas de introgresión (LI).	22
2	Ubicación de los campos experimentales.	23
3	Unidades fisiográficas del área de estudio.	25
4	Transmisión controlada del virus del mal de Río Cuarto.	26
5	Sintomatología del virus del mal de Río Cuarto.	28
6	Esquema representativo de la tecnología de genotipado Golden-Gate®.	30
7	Registros meteorológicos de los ambientes LA11, LA12 y RC11.	36
8	Gráficos de cajas (box-plot) para los caracteres ISE y REN en tres ambientes de evaluación: LA11, LA12 y RC11.	38
9	Gráficos de sectores para las distintas categorías del carácter grado de severidad de la enfermedad en cada uno de los ambientes de estudio: LA11, LA12 y RC11.	38
10	Distribución de frecuencias relativas para el carácter ISE en los ambientes LA11, LA12 y RC11.	39
11	Distribución de frecuencias relativas para el carácter REN en los ambientes LA11 y RC11.	40
12	Diagramas de dispersión para ISE e incidencia del grado de severidad de la enfermedad en el testigo susceptible (B73) en los ambientes LA11, LA12 y RC11.	42
13	Mapa de calor o heatmap para ISE obtenido de la evaluación de 41 genotipos en los ambientes LA11, LA12 y RC11.	43
14	Residuos del carácter ISE representados considerando el diseño de filas por columnas de los ensayos de los ambientes LA11, LA12 y RC11.	43
15	Variograma de los residuos del carácter ISE considerando el diseño espacial de filas por columnas de los ambientes LA11, LA12 y RC11.	44
16	Histograma, gráfico Q-Q y diagramas de dispersión de los residuos estudentizados del carácter ISE en los ambientes LA11, LA12 y RC11.	46
17	Histograma, gráfico Q-Q y diagramas de dispersión de los residuos estudentizados del carácter REN en los ambientes LA11 y RC11.	48
18	BLUP para el carácter ISE en 41 genotipos evaluadas en los ambientes LA11, LA12 y RC11.	49
19	BLUP para el carácter REN en 41 genotipos evaluados en los ambientes LA11 y RC11.	52
20	BLUP para ISE y REN obtenido de la evaluación de 41 genotipos en los ambientes LA11 y RC11.	53
21	Diagramas de dispersión de los caracteres ISE y REN derivados de la evaluación de 41 genotipos en los ambientes LA11, LA12 y RC11.	54
22	Gráfico de puntos para ISE de 41 genotipos evaluados en los ambientes LA11, LA12 y RC11.	60
23	Biplot GGE para ISE derivado de la evaluación de 41 genotipos en los ambientes LA11, LA12 y RC11.	62
24	Biplot GGE con los vectores de los ambientes LA11, LA12 y RC11.	63

Figura		Página
25	Datos genotípicos faltantes por isolínea, marcador y cromosoma.	65
26	Mapa de ligamiento de la colección de líneas de introgresión.	67
27	Mapa de ligamiento de la colección de líneas de introgresión.	70
28	Posición y la cobertura de los marcadores SNP analizados.	70
29	Genotipo gráfico de las isolíneas con eventos de recombinación doble en los cromosomas 3, 5 y 6.	71
30	Genotipo gráfico de la colección de LI obtenido de la información genotípica de 560 marcadores SNP.	73
31	Análisis de estructura de la colección de líneas de introgresión suponiendo dos y tres poblaciones.	78
32	Gráfico biplot obtenido del análisis de componentes principales de 40 NIL caracterizadas con 560 SNP.	78
33	Distribución del estadístico F para los caracteres ISE y REN.	81
34	Distribución del estadístico F en función de la asociación entre el BLUP para ISE y el genotipo de 554 marcadores SNP.	84
35	Distribución del coeficiente de determinación (R^2) de la asociación entre el BLUP para ISE y el genotipo de 554 marcadores SNP.	85
36	Distribución del estadístico F en función de la asociación entre el BLUP para REN y el genotipo de 554 marcadores SNP.	85
37	Distribución del coeficiente de determinación (R^2) de la asociación entre el BLUP para REN y el genotipo de 554 marcadores SNP.	86
38	Gráfico de puntos del BLUP para ISE y REN de los ambientes LA11 y RC11, respectivamente, en función del genotipo de los marcadores PZA00525-17, PZA03198-3, PZA02081-1, PZA02680-1, PZA02471-5, PZA02727-1 y PZA02665-2.	87
39	Izquierda: genotipo gráfico obtenido de la información genotípica de los SNP de los cromosomas 2 y 3. Derecha: distribución del estadístico F en función de la asociación entre el BLUP para ISE y el genotipo de los SNP de los cromosomas 2 y 3.	89
40	Izquierda: genotipo gráfico obtenido de la información genotípica de los SNP de los cromosomas 2 y 3. Derecha: distribución del estadístico F en función de la asociación entre el BLUP para REN y el genotipo de los SNP de los cromosomas 2 y 3.	96

RESUMEN

Las enfermedades causadas por virus son responsables de pérdidas en la producción agrícola. El mal de Río Cuarto (MRC) es una virosis de impacto en la producción de maíz en Argentina. La domesticación de las especies cultivadas ha dado lugar a una mayor productividad, pero también a una reducción de la variabilidad genética para la búsqueda de genes de resistencia. El teosinte, fuente de germoplasma silvestre, ha sido usado para incremento del rendimiento como para tolerancia a factores de estrés biótico. El objetivo del presente estudio fue identificar *loci* de caracteres cuantitativos (QTL) asociados a tolerancia a MRC en teosinte (*Zea mays* spp. *parviglumis*). El material de estudio fueron 40 líneas cuasi-isogénicas o *near isogenic lines* (NIL) derivadas del cruzamiento entre la accesión PI 384071 de teosinte, tolerante a MRC y la línea elite de maíz B73, susceptible a la enfermedad. La caracterización fenotípica de las NIL se realizó bajo condiciones de transmisión controlada en áreas donde la enfermedad es endémica. La tolerancia a MRC se evaluó utilizando caracteres como altura, estado de la panoja, características de las hojas del tercio superior de la planta, presencia y tipo de enaciones, estado de los entrenudos, características de la espiga presente en el primer nudo. La tolerancia de las NIL se determinó por medio de un índice de severidad de enfermedad (ISE). También se registró el rendimiento en grano (REN). La caracterización genotípica fue realizada con 768 marcadores polimórficos de nucleótido único o *single nucleotide polymorphism* (SNP). El efecto del genotipo para los caracteres ISE y REN se obtuvo a partir del cálculo del mejor predictor lineal insesgado (BLUP). La identificación de QTL se realizó mediante análisis por marcador individual. Se determinó asociación significativa ($p < 0,01$) entre 10 y 23 SNP (ubicados en los cromosomas 2 y 3) y los caracteres REN e ISE, respectivamente. Las regiones cromosómicas detectadas coinciden o se localizan en cercanías de QTL reportados en colecciones de germoplasma locales. Los QTL detectados en la colección de líneas de introgresión de teosinte, ausentes en el germoplasma de maíz, constituyen nuevos *loci* potencialmente útiles para su uso en mejoramiento genético para tolerancia a MRC.

Palabras clave: mal de Río Cuarto, *loci* de caracteres cuantitativos, teosinte, líneas cuasi-isogénicas, polimorfismo de nucleótido único.

ABSTRACT

Identification of QTL associated with mal de Río Cuarto disease response in an introgression library of teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*).

Viral diseases are responsible for losses in agricultural production. Mal de Río Cuarto (MRC) disease is a virosis that impacts maize production in Argentina. Crop domestication has led to increase productivity, but also to constrain genetic variability to search resistance genes. Teosinte, a source of wild germplasm, has been used to increase yield as well as tolerance to biotic stress factors. The goal of this study was to identify quantitative trait *loci* (QTL) associated with MRC disease tolerance in teosinte (*Zea mays* spp. *parviglumis*). The plant material was 40 near isogenic lines (NIL) derived from the cross between the accession of teosinte PI 384071, tolerant to MRC disease and the elite line of maize B73, susceptible to the disease. The phenotypic characterization of NIL was done under controlled infection in endemic disease areas. MRC disease resistance was evaluated by measuring plant height, tassel type, characteristics of upper third leaves, presence and type of enations, superior internodes and characteristics of first node ear. The resistance of each NIL to MRC was determined by means of a disease severity index (DSI). Grain yield (YLD) was also measured. The genotypic characterization was done with 768 single nucleotide polymorphic markers (SNP). The genotypic effect for DSI and YLD was estimated by calculating the best unbiased linear predictor (BLUP). The identification of QTL was carried out by single marker analysis. The analysis determined significant association ($p < 0.01$) between 10 and 23 SNP (located on chromosomes 2 and 3) and the variation observed in YLD and DSI. The chromosome regions detected were located near QTL previously reported in local germplasm collections. The QTL detected in the introgression library of teosinte, absent in maize germplasm, constitute new potentially useful *loci* for breeding for MRC tolerance.

Key words: mal de Río Cuarto, quantitative trait *loci*, teosinte, near isogenic lines, single nucleotide polymorphism.

Although man does not cause variability and cannot even prevent it, he can select, preserve, and accumulate the variations given to him by the hand of nature almost in any way that he chooses; and thus he can certainly produce a great result.

Charles Darwin

CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

1.1. Producción de alimentos: perspectivas futuras

Desde mediados del siglo XX la población mundial experimenta un crecimiento vertiginoso. De acuerdo con las últimas proyecciones de la Organización de las Naciones Unidas se estima que la población mundial será de 8.500 millones en el año 2.025 y de 10.000 millones en el 2.050. Este crecimiento, junto con una mejora en la calidad de vida, genera un incremento en la demanda de alimentos lo que inexorablemente requiere de una mayor producción agrícola. Para sostener esta demanda se estima que habrá que aumentar en un 50 % la producción alimentaria para el año 2.025 y particularmente la de cereales en un 41 % con lo cual deberá aumentar el rendimiento de las áreas sembradas. No obstante, este aumento de la producción, dentro de un esquema de agricultura sustentable que tienda a disminuir la intervención antrópica, deberá ser producto de roturar un 5,5 % más de suelos vírgenes. Esto deberá estar asociado a la utilización de menor cantidad de agroquímicos, la conservación de la capa vegetal de los suelos y la reducción en el consumo de combustibles fósiles. Por ello, si no se generan planes de mediano y largo plazo que permitan alcanzar esas premisas, este panorama malthusiano de progresión geométrica de la población y aritmética de los recursos alimenticios impondrá un cuello de botella en la alimentación de la población (Sasson, 2.000; Raven, 2.014).

La mecanización de la producción agrícola junto con la utilización de agroquímicos y el mejoramiento genético vegetal han sido, simultáneamente, los factores de impacto tecnológico más importantes en la producción de alimentos. Los dos primeros, dado que requieren de una gran inversión de capital, han beneficiado a las economías más desarrolladas (Onwude *et al.*, 2.016; Popp *et al.*, 2.013). El mejoramiento genético vegetal es una tecnología que, si bien requiere un alto grado de conocimiento, ha sido adoptada tanto por los países desarrollados como por aquellos en vías de desarrollo (Sasson, 2.000).

Diversos factores bióticos y abióticos de estrés, así como condiciones de postcosecha desfavorables, dan lugar a significativas pérdidas en la producción agrícola. Por esta razón, no sólo son necesarias variedades de alto rendimiento y estabilidad de rendimiento a través de los dis-

tintos ambientes sino también mejores formas de manejo que permitan aumentar la productividad y la estabilidad de los cultivos. Las estrategias de mejoramiento genético deberían enfocarse en:

- El incremento del rendimiento potencial de los cultivos a través de los procedimientos convencionales de mejoramiento y selección; en el rediseño del ideotipo de cultivo necesario para alcanzar un mayor índice de cosecha; en la explotación de la heterosis,
- La ampliación del fondo de genes mediante la hibridación intra e interespecífica,
- La modificación de los procesos fisiológicos. Particularmente, la estabilidad del rendimiento debe aumentar a través de la incorporación de resistencia múltiple a insectos y enfermedades y mediante la búsqueda de tolerancia a factores de estrés abiótico (Sasson, 2.000).

1.2. El rol del maíz en la dieta y en la economía nacional

El maíz (*Zea mays* L.) es un alimento básico de la dieta de numerosas culturas. Aunque su ingesta aporta cantidades significativas de nutrientes su valor alimenticio varía en relación a su forma de consumo. Una dieta en base a granos enteros constituye un buen aporte de energía, fibra, lípidos con alto contenido de ácidos grasos esenciales, vitaminas liposolubles e hidrosolubles, carotenoides, tocoferoles no provitamínicos, fitoesteroles, rafinosa, potasio y un bajo aporte de sodio (Olivera Carrión, 2.006; Nuss y Tanumihardjo, 2.010).

La Argentina constituye un actor destacado en la producción mundial de alimentos. Nuestro país es el quinto productor mundial de maíz con casi el 4 % de la producción total. Se estima que la producción de maíz para la campaña 2.018 - 2.019 será de 41.000.000 t, con un área cosechada de 5.000.000 ha y un rendimiento de 8,2 t/ha (*United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service*, 2.018). El principal destino de la producción de grano de la Argentina es la exportación. Entre el 60 y el 70 % de la producción de maíz de la última década se destinó al mercado internacional. Estas proyecciones ubicarían a la Argentina como el segundo exportador mundial. La provincia de Córdoba aporta en promedio el 33,5 % de la producción nacional de maíz lo cual la distingue como la provincia más productiva (Bolsa de Comercio de Rosario, Dirección de Informaciones y Estudios Económicos, 2.017). Los departamentos Río Cuarto, Marcos Juárez, General Roca y Juárez Celman contribuyen con los mayores

volúmenes de producción dentro de la provincia. De acuerdo con el Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Provincia de Córdoba la producción de dichos departamentos para el período 2.000 - 2.013 fue, en promedio, de 1,3 (21 %), 0,8 (13 %), 0,5 (8 %) y 0,3 (5 %) millones de toneladas, respectivamente. Se estima que para la campaña 2.018 - 2.019 la superficie de maíz aumente 3,5 % respecto al ciclo anterior. De concretarse dicha estimación, se establecería un récord de 2.359.600 ha sembradas. De esta manera, considerando la superficie de siembra, los departamentos que más crecerán serán Río Cuarto (5,1 %), San Justo (2,8 %) y General Roca (1,6 %) (Bolsa de Cereales de Córdoba, Departamento de Información Agroeconómica, 2.018).

Por otra parte, el maíz ocupa un rol preponderante en el mercado interno con un incremento acelerado y sostenido de su consumo. Este aumento de la demanda viene de la producción vacuna, lechera, porcina y aviar, donde constituye la materia prima para la transformación en proteínas, y de las industrias de molienda húmeda y seca (Gear, 2.006).

El estrés hídrico, el mal de Río Cuarto, los insectos barrenadores y las royas son los principales factores limitantes de la producción de acuerdo con distintas encuestas llevadas a cabo por el INTA. Entre estos factores, el MRC se destaca como uno de los más importantes no sólo en la producción de grano sino también en el desarrollo de líneas endocriadas (Eyhérbide, 2.006). El cultivo de maíz puede disminuir sustancialmente sus rendimientos anuales en función de la intensidad de la enfermedad.

1.3. El mal de Río Cuarto (MRC)

Las enfermedades causadas por virus en plantas representan un factor limitante para la producción de alimentos (Redinbaugh y Pratt, 2.008). El MRC constituye la virosis más importante del cultivo de maíz en la Argentina (Ornaghi *et al.*, 2.011). La introducción a fines de la década de 1960 de los primeros híbridos comerciales de germoplasma dentado desplazó paulatinamente a los cultivares de tipo duro o flint derivados de materiales flint americanos y de materiales introducidos por inmigrantes del norte de Italia. La aparición de la enfermedad coincidió con la importación de estos materiales (March *et al.*, 1.998; Rossi, 2.007). El primer registro de su detección data de 1966 en cultivos situados en la zona de Paso del Durazno en el departamento Río Cuarto (<http://www.sruralrc.org/>). Sin embargo, fue a principios de la década de 1980 cuando se describió la sintomatología de la enfermedad y se determinó la etiología de la misma

(Lenardón *et al.*, 1.999). Endémica del departamento Río Cuarto, al sur de la provincia de Córdoba, actualmente su área de difusión ocupa toda el área maicera de la Argentina alcanzando las provincias de Córdoba, San Luis, Mendoza, Río Negro, La Pampa, Buenos Aires, Entre Ríos, Santa Fe, Salta, Jujuy, Uruguay y sur de Brasil (Ornaghi *et al.*, 1.999a; Morata *et al.*, 2.003). Distintos relevamientos espacio-temporales de la enfermedad indican que prácticamente en toda área o región con cultivos de maíz de la Argentina se han detectado casos de MRC (<http://agro.uba.ar/>).

El agente causal de la enfermedad es un virus, el Mal de Río Cuarto Virus (MRCV), perteneciente al género *Fijivirus* de la familia Reoviridae (Nome *et al.*, 1.981; Attoui *et al.*, 2.011). Aunque originalmente fue descrito como una variante del MRDV, el estudio filogenético basado en el análisis y secuenciación de los segmentos S4 y S8 del genoma del MRCV determinó que podría considerarse como una nueva especie del género *Fijivirus*. Este virus forma una partícula icosaédrica, de 50 a 70 nm de diámetro, con una doble cubierta proteica la cuál presenta espinas cortas en cada uno de los 12 vértices de la superficie del icosaedro (Attoui *et al.*, 2.011). Su genoma está formado por 10 segmentos lineales, denominados S1-S10, de ARN doble cadena cuyos tamaños oscilan entre 4,5 y 1,8 kpb (Mongelli, 2.010). La replicación del MRCV ocurre en las células del floema de plantas de maíz, trigo y otras gramíneas, así como en las células del insecto vector de la enfermedad (Distéfano *et al.*, 2.003). El estudio de las alteraciones citopatológicas producidas por el MRCV en maíz determinó la presencia de viroplasmos, conteniendo partículas virales completas e incompletas y material fibrilar, en el citoplasma de las células infectadas. Además, en el floema se observaron viroplasmos junto con partículas dispersas. Por otro lado, en las células de la vaina se encontraron viriones mientras que en las de las enaciones se detectó la presencia de partículas formando arreglos cristalinos. Por último, se observaron anomalías en los cloroplastos de las células infectadas (Arneodo *et al.*, 2.002a; Maroniche *et al.*, 2.012).

El MRCV, al igual que todos los reovirus conocidos, necesita para su transmisión de la presencia de un insecto vector que en su caso es *Delphacodes kuscheli* Fennah (Homoptera: Delphacidae), denominado comúnmente “chicharrita” (Lenardón *et al.*, 1.999; Argüello Caro *et al.*, 2.013). Su relación con MRCV es de tipo persistente - propagativa (Rodríguez Pardina *et al.*, 1.998; Arneodo *et al.*, 2.002b; Milne *et al.*, 2.005). El interés epidemiológico de este tipo de

relación propia de los reovirus radica en que el insecto actúa simultáneamente como vector del virus y como reservorio. Cultivos anuales invernales como avena (*Avena sativa* L.), cebada (*Hordeum vulgare* L.), centeno (*Secale cereale* L.), triticale (*Triticum aestivum* L. × *Secale cereale* L.) y trigo (*Triticum aestivum* L.) (Boito y Ornaghi, 2.008), cultivos de ciclo primavera - estival y malezas anuales primavera - estivales y perennes (Nome *et al.*, 1.981; Marinelli, *et al.*, 1.988; March *et al.*, 1.998) constituyen fuentes naturales del virus y hospedantes del insecto vector. De esta manera, aunque el MRCV no ocasiona pérdidas de importancia económica en dichos cereales, estos desempeñan un rol fundamental en la epidemiología de la virosis (Descamps y Sánchez Chopa, 2.012).

El insecto adquiere el MRCV al alimentarse de los fotoasimilados transportados por el floema de plantas hospederas infectadas (Descamps y Sánchez Chopa, 2.012). El virus, en estado de latencia en el interior del vector, se replica y mueve a distintos órganos alcanzando finalmente las glándulas salivales para ser luego transmitido. La transmisión de la enfermedad está asociada positivamente con la carga viral del insecto (Argüello Caro *et al.*, 2.013). Las condiciones ambientales favorables al cultivo de avena permiten un notable incremento de la densidad poblacional de *D. kuscheli*. La alta densidad y/o la inestabilidad del hábitat causan la consiguiente migración de las formas macrópteras coincidiendo esta dispersión con las etapas iniciales del desarrollo del maíz (March *et al.*, 1.998; Ornaghi *et al.*, 2.011).

Los factores bióticos como el virus, el insecto vector, los reservorios alternativos del virus, los genotipos de maíz susceptibles y el hombre y los abióticos como las condiciones ambientales, confluyen e interactúan estimulando, o no, el desarrollo de una epifitía (March *et al.*, 1.998). Severas pérdidas ocurren cuando coinciden simultáneamente abundantes reservorios del virus, alta densidad del insecto vector y variedades o genotipos susceptibles en estados fenológicos juveniles (Conti, 1.984). La enfermedad ocasiona diferentes síntomas en función del estado fenológico de la planta en el que se produce la transmisión del virus por el insecto vector, del genotipo de maíz y de las condiciones ambientales en las que se desarrolla el cultivo. Infecciones en el estado de coleoptile resultan en plantas enanas, inferiores a los 30 cm de altura y que suelen morir prematuramente como consecuencia de una necrosis apical descendente. Infecciones posteriores a este estado originan plantas de distintas alturas que manifiestan síntomas de diferente intensidad, desde el enanismo total, con las hojas del tercio superior recortadas o reducidas a la

vaina foliar, tallos achatados con entrenudos cortos, panojas atrofiadas, espigas múltiples y sin granos, hasta plantas asintomáticas con la exclusiva presencia de enaciones en las nervaduras del envés de las hojas debido a una proliferación anormal de las células de los tejidos vasculares. Las enaciones son un síntoma característico causado por los reovirus en los hospedantes que infectan. La dimensión y el número de las mismas varían en función del momento de la infección y del genotipo del cultivar pudiéndose ver desde muy pequeñas, en forma de rosario, hasta excrecencias observables a simple vista (March *et al.*, 1.998; Maroniche *et al.*, 2.010) Además, diversos factores de estrés abiótico como el planchado del suelo, déficit hídrico, vientos cálidos y fuertes y efectos de herbicidas y fertilizantes en dosis no adecuadas (que ocurren con posterioridad a la siembra y durante la emergencia y las primeras dos semanas) acentúan la intensidad de la sintomatología (March *et al.*, 1.998; Lenardón *et al.*, 1.999).

La incidencia de la virosis en el área donde la enfermedad es endémica ha sido variable y alcanzó niveles de epidemia sólo algunos años (March *et al.*, 1.993). En el ciclo 1.996 - 1.997 la enfermedad presentó una alta severidad afectando 300.000 ha ubicadas en distintas zonas del área maicera, causando daños en cultivares susceptibles que ocasionaron pérdidas de rendimiento de hasta el 70 %. Esta importante disminución de la producción fue debida a la amplia zona de ocurrencia de la virosis y a su impacto sobre los rendimientos, lo que implicó una pérdida económica de aproximadamente U\$S 120 millones (Lenardón *et al.*, 1.998). Por otro lado, en la campaña 2.006 - 2.007, se detectaron numerosos lotes de maíz afectados por MRC que presentaron pérdidas parciales en el sur de Santa Fe, norte, centro-este y sudeste de Buenos Aires y este de Córdoba y pérdidas parciales a totales en la región donde MRC es endémica. Según datos del Ministerio de Agricultura y Ganadería de la Provincia de Córdoba el impacto directo de la epidemia sobre la producción de la citada campaña, sólo para el área donde la enfermedad constituye un endemismo, ha sido estimado en U\$S 70 millones (Lenardón *et al.*, 2.007; Ornaghi *et al.*, 2.011). Es importante tener en cuenta que esta estimación de las pérdidas se realiza sobre la base de plantas severamente afectadas sin incluir plantas ligeramente enfermas. Esto llevaría a subestimar las pérdidas producidas por la enfermedad debido a que las plantas con síntomas leves o muy leves también presentan una disminución en la producción. Por otra parte, si bien la disminución de la producción de granos es muy importante, las pérdidas de maíz como forraje para ensilado también constituyen un problema para los sistemas ganaderos de la región (March *et al.*, 1.998).

La adopción de una estrategia que procure mitigar las condiciones favorables para el desarrollo de la enfermedad, la caracterización del vector involucrado y la disminución de la cantidad de inóculo es la base para el manejo eficiente de cualquier enfermedad. Una estrategia efectiva para disminuir la presión del inóculo son las siembras tempranas realizadas entre el mes de septiembre y la primera quincena de octubre. La misma se fundamenta en que los picos poblacionales de *D. kuscheli* se presentan entre mediados de noviembre y mediados de diciembre aproximadamente. Esta estrategia de escape altera el tiempo de exposición del cultivo al patógeno. Otra metodología es el desarrollo de modelos de pronóstico de siembra y de presiembra para el área donde MRC es endémica. Estos sistemas se desarrollan en base a estudios de fluctuación poblacional del insecto vector y la combinación de variables climáticas (Remes Lenicov *et al.*, 1.999; Ornaghi *et al.*, 2.011). Otra alternativa es el manejo de reservorios naturales del MRCV los cuáles podrían mantener a la población del vector a un nivel muy bajo, disminuyendo de esta forma el riesgo de un brote regional (Grilli, 2.008). Además, la utilización de diferentes insecticidas del grupo de los piretroides contribuye a disminuir la incidencia de la virosis (March *et al.*, 1.998).

Si bien el control de insectos plagas mediante agroquímicos ha demostrado su utilidad tanto en la producción de alimentos como en la salud pública, su uso irracional ha originado una serie de limitaciones tecnológicas y biológicas tales como los altos costos de producción, la creciente resistencia adquirida por las plagas, la alteración del control natural, el resurgimiento de plagas secundarias, la destrucción de la fauna silvestre, la eliminación de insectos polinizadores y la contaminación ambiental. El modo más eficaz de controlar enfermedades en cultivos extensivos es mediante la utilización de resistencia genética. En efecto, para disminuir la intensidad de enfermedades como el MRC y lograr el incremento y estabilidad en la producción del cultivo, el uso de germoplasma tolerante combinado con un manejo integrado, constituye una estrategia económica y ambientalmente sustentable (March *et al.*, 1.998; Di Renzo *et al.*, 2.002; Luan *et al.*, 2.012).

1.4. Marcadores moleculares: herramientas genómicas para la detección de QTL

El desarrollo del concepto de ligamiento y la evolución de la tecnología de marcadores moleculares permitieron, en el ámbito del mejoramiento genético vegetal, la detección y localización de diferentes regiones cromosómicas asociadas con la expresión de caracteres cuantitativos de interés agronómico. La premisa subyacente al mapeo de dichas regiones, denominadas *loci* de caracteres cuantitativos (QTL), consiste en que la segregación de un marcador molecular es utilizada para detectar y estimar el efecto de poligenes involucrados en la manifestación del carácter (Michelmore *et al.*, 1.991). Es decir, los QTL pueden ser localizados mediante ligamiento a *loci* de marcadores moleculares cuyos genotipos son fáciles de distinguir y clasificar. De esta manera, si un QTL se encuentra ligado genéticamente a un locus marcador, los individuos con distintos genotipos (alelos) tendrán diferentes valores medios del carácter cuantitativo (Liu, 1.998; Mackay *et al.*, 2.009; Singh y Singh, 2.015). Los marcadores moleculares ligados a un QTL de interés permiten aumentar la eficiencia del mejoramiento a través de la selección indirecta e incrementar la capacidad de seleccionar grupos de genes de resistencia favoreciendo su acumulación (Asíns, 2.002; Yamamoto *et al.*, 2.016). El advenimiento de los marcadores moleculares, junto con la disminución progresiva del costo de uso, facilitó el mapeo y la caracterización de QTL de interés agronómico. Además, los marcadores moleculares son selectivamente neutros, polimórficos y no se encuentran afectados por factores ambientales y/o del estadio de desarrollo de la planta (Schuster y Cruz, 2.008; Heffner *et al.*, 2.010).

La disponibilidad de técnicas de genotipado de alto rendimiento (*high-throughput genotyping*) permite ensayar una gran cantidad de marcadores tipo SNP lo que permite el análisis detallado de QTL distribuidos a lo largo de todo el genoma. Los polimorfismos de nucleótido único o SNP son variaciones que ocurren de manera natural y que afectan a un solo nucleótido. Los SNP son la forma más común de variación genética entre distintos individuos y se estima que en plantas la frecuencia de ocurrencia es del orden de un SNP cada 100 - 300 pb (Hyten *et al.*, 2.008; Xu, 2.010). Estos marcadores pueden ubicarse en regiones codificantes, no codificantes así como en regiones intergénicas a distintas frecuencias dependiendo de la región cromosómica. Además, pueden clasificarse, de acuerdo con el nucleótido involucrado, como derivados de procesos de sustitución nucleotídica: transición (C/T o G/A) o transversión (C/G, A/T, C/A o T/G) (Xu, 2.010). Algunos autores excluyen a las inserciones y deleciones de nucleótidos

dentro de los SNPs (Mohler y Singrun, 2.004). Sin embargo, otros consideran como SNP a los cambios en dos nucleótidos o inserciones y deleciones pequeñas del orden de unos pocos nucleótidos (Angaji, 2.009).

Las propiedades que distinguen a un marcador ideal son: alto nivel de polimorfismo, codominancia, distinción clara de sus variantes alélicas, distribución uniforme en el genoma, selección neutra, fácil detección, bajo costo y alta repetibilidad (Xu, 2.010). Además, su número no debe ser limitante. Los SNP, en comparación con otros marcadores moleculares, están densa y uniformemente distribuidos a lo largo del genoma. Además, los métodos de detección pueden ser fácilmente automatizados permitiendo analizar un gran número de SNP en un gran número de muestras a un bajo costo (Hyten *et al.*, 2.008; Parma *et al.*, 2.011). Esta característica hace a los SNP marcadores de alto rendimiento. Asimismo, la automatización del genotipado utilizando SNPs presenta menores tasas de error. Por otro lado, las principales desventajas de los SNP son el bajo número de alelos normalmente presentes (dos) lo que determina un menor contenido de información polimórfica. A pesar de esto, el gran número de SNP disponibles y su bajo costo de análisis compensan las desventajas mencionadas (Giolo *et al.*, 2.011). Las crecientes evidencias sugieren que un mapa con un alto nivel de saturación ofrece numerosas ventajas, entre ellas un mayor poder para detectar ligamiento y una localización más precisa de QTL para distintos caracteres (Evans y Cardon, 2.004).

La precisión en la detección de un QTL depende de la magnitud de su efecto sobre el carácter objeto de estudio, del tamaño de la población segregante evaluada, de la frecuencia de recombinación entre el marcador y el QTL, así como de la heredabilidad del carácter analizado. Evidentemente, cuanto mayor es el efecto, el tamaño de la población y la heredabilidad, y más próximo se encuentre el marcador del QTL más fácil será su detección (Schuster y Cruz, 2.008; Xu, 2.010; Singh y Singh, 2.015).

Muchos caracteres de importancia agronómica y económica como el rendimiento, el contenido de proteínas de la semilla, la calidad y la resistencia a diferentes estreses bióticos y abióticos presentan herencia poligénica. En maíz, la tolerancia a MRC es considerado un carácter de tipo cuantitativo, controlado por varios *loci*, con valores de heredabilidad moderados de 0,44 a 0,56 (Di Renzo *et al.*, 2.002). El mapeo de la tolerancia a MRC en poblaciones F_{2:3} permitió identificar dos QTL ubicados en los cromosomas 1 y 8 los cuales explicaron el 36,2 % de la

varianza fenotípica observada (Di Renzo *et al.*, 2.004). Además, los efectos genéticos fueron de tipo aditivo y de dominancia parcial (Presello *et al.*, 1.995; Di Renzo *et al.*, 2.004; Di Renzo y Bonamico, 2.013). Bonamico *et al.* (2.012), en trabajos realizados con una población de mapeo F_{2:6} de similar fondo genético al del anterior estudio, identificaron cuatro QTL sobre los cromosomas 1 (bins 1.01 y 1.06), 4 (bin 4.08) y 10 (bin 10.02) cada uno explicando entre el 8 y el 14 % de la varianza fenotípica total. Dichos QTL podrían estar involucrados en distintos mecanismos de tolerancia a MRC. Otros análisis identificaron siete *loci* de marcadores microsatélites ligados a QTL ubicados en tres grupos de ligamiento, que conferirían tolerancia a MRC (Mayor, 2.001). Por su parte, Kreff *et al.* (2.006) localizaron diferentes QTL relacionados a los síntomas de la enfermedad y a la altura de la planta, tanto en el brazo corto como en el brazo largo del cromosoma 1 y en los cromosomas 4, 8 y 10. Estos resultados, dentro de un esquema de selección asistida por marcadores moleculares, pueden ser útiles para el desarrollo de programas eficientes de mejoramiento para tolerancia a MRC.

La base del mejoramiento genético vegetal es la selección de plantas con los caracteres deseados. La selección de genotipos superiores implica la evaluación visual de sus características agronómicas o la resistencia a estrés biótico o abiótico así como pruebas de laboratorio para calidad u otras características. La utilización de las nuevas y crecientes herramientas biotecnológicas, complementa y potencia el trabajo de los mejoradores en la selección de los genotipos de interés, y surgen como consecuencia de la magnitud y complejidad de los métodos de selección en los programas de mejoramiento, y el número y tamaño de las poblaciones a analizar. Por otro lado, diversos estudios de análisis de QTL han proporcionado una enorme cantidad de asociaciones entre marcadores moleculares y caracteres cuantitativos. Por esta razón, el uso de marcadores moleculares permite aumentar la eficiencia y precisión de los programas convencionales de mejoramiento genético a través de la selección asistida por marcadores moleculares (MAS) (Collard y Mackill, 2.008; Yang *et al.*, 2.015; Bassi *et al.*, 2.016).

Las principales ventajas de la MAS sobre la selección fenotípica convencional es que la evaluación es más sencilla permitiendo ahorrar tiempo, recursos y esfuerzo en los ensayos a campo. Otra ventaja es que los marcadores pueden ser utilizados para la selección fuera de estación lo que permite adelantar generaciones en un programa de mejoramiento. Además, la selección puede llevarse a cabo en el estadio de plántula lo cual es muy útil en caracteres que se

manifiestan en estadios posteriores del desarrollo. De esta forma, los genotipos no deseados pueden ser eliminados tempranamente y por lo tanto el número total de líneas a evaluar en el campo es más reducido. Por último, las plantas individuales pueden ser seleccionadas en base a su genotipo, lo cual es ventajoso para caracteres de baja heredabilidad. Estas ventajas pueden ser utilizadas por los mejoradores para acelerar el proceso de mejoramiento de un cultivo (Guimarães *et al.*, 2.007). Es posible clasificar la MAS en cinco grandes áreas: evaluación asistida por marcadores de materiales destinados a mejoramiento (identificación de cultivares/evaluación de pureza varietal, evaluación de la diversidad genética y selección parental, estudio de la heterosis e identificación de regiones genómicas bajo selección); programas de retrocruza asistida por marcadores moleculares; piramidación de genes; selección en generaciones tempranas mediada por marcadores moleculares y selección asistida por marcadores en combinación con evaluación fenotípica (Collard y Mackill, 2.008).

1.5. El mejoramiento genético y la importancia de la variabilidad genética

La ganancia genética derivada del mejoramiento es función de la variabilidad genética y de la eficiencia de la selección lograda por el mejorador. Mientras que las estrategias de selección pueden determinar la proporción de la ganancia genética, la variabilidad y el número de recombinantes generados determinan la ganancia potencial posible de obtener con una selección óptima (Bernardo, 2.010).

En definitiva, el principal objetivo de los programas de mejoramiento genético es aumentar la frecuencia de combinaciones alélicas favorables. En maíz, esta característica es común a todos los aspectos relacionados con su mejoramiento, por ejemplo en la introducción y posterior adaptación de germoplasma exótico, en la selección y mejora de los recursos fitogenéticos dentro de un banco de germoplasma, en la selección por pedigrí para el desarrollo de líneas puras mejoradas, en los programas de retrocruzas y de conversión de líneas para la incorporación de alelos y/o combinaciones alélicas favorables en líneas elite.

La domesticación de las especies cultivadas ha dado lugar a una mayor productividad, pero así también, a una reducción de la base genética (Zamir, 2.001; Zoratti *et al.*, 2.015). A medida que la base genética de un cultivo se torna más homogénea, disminuyen las posibilidades de incrementar los rendimientos y aumentan los riesgos de pérdidas por estrés biótico y abiótico

(Hammer y Teklu, 2.008; Fu, 2.015). Por el contrario, la base genética de un cultivo debería aumentar para poder enfrentar estos problemas o amenazas futuras, satisfacer la demanda de calidad de grano y posibilitar futuros progresos en la mejora del rendimiento. De esta manera e independientemente de la eficiencia de los métodos de mejoramiento, la variabilidad genética juega un rol crucial en la determinación del progreso genético en cualquier programa de mejoramiento (Eyhéabide, 2.004; Keneni *et al.*, 2.012). Muchas especies cultivadas contienen sólo una pequeña fracción de la variación genética presente en sus parientes silvestres. Por esta razón, el uso de germoplasma exótico es muy importante como fuente de variación genética perdida durante la domesticación (Zamir, 2.001; Flint-Garcia, 2.013). Sin embargo, aunque hay acuerdo en cuanto a la existencia de gran variabilidad, su grado de utilización es muy reducido. Una de las explicaciones es la insuficiencia de los registros genéticos ya que al no disponer de un conocimiento acabado del mérito genético del germoplasma exótico se dificulta su caracterización y posterior aprovechamiento. Otra limitante es que las fuentes de germoplasma exótico muestran un pobre comportamiento agronómico en relación a los cultivares comerciales o materiales avanzados de programas de mejoramiento requiriéndose muchos años de mejoramiento para alcanzar niveles competitivos (Eyhéabide, 2.004; Sharma *et al.*, 2.013).

Una estrategia más eficiente que el mejoramiento o el uso directo de estos materiales es su aprovechamiento como reservorios de genes útiles para transferencia a variedades comerciales. Muchos caracteres presentes en poblaciones silvestres están ausentes o poco representados en las formas cultivadas de *Z. mays*. El germoplasma silvestre ha coexistido con plagas y patógenos a una escala de tiempo evolutiva. Como consecuencia, ha desarrollado resistencia a diversas plagas y enfermedades. Además, en el transcurso de su historia evolutiva ha colonizado diversos nichos ecológicos. Por esta razón, el germoplasma silvestre posee un amplio rango adaptativo, ausente en cultivares debido al cuello de botella producido por la domesticación. El uso de germoplasma exótico como fuente potencial para la introgresión de nuevos alelos tiene como objeto incrementar la variabilidad en caracteres de herencia cualitativa y cuantitativa. El término exótico presenta un sentido amplio que incluye germoplasma no mejorado así como pobremente adaptado a una región (Eyhéabide, 2.004; Hallauer y Carena, 2.009). Los beneficios a largo plazo de ampliar la base genética de un cultivo han llevado a los mejoradores a introgresar o incorporar germoplasma con adaptación a ambientes tropicales y subtropicales en materiales de clima templado y viceversa (Eyhéabide, 2.004).

El hecho de que los recursos genéticos silvestres puedan contribuir al mejoramiento genético de los cultivos ha llevado a la creación de grandes bancos de germoplasma. Sin embargo, el uso de estos recursos en programas de mejoramiento es un proceso largo y complicado que pocas veces es exitoso. Además, cuando fue posible explotarlo, ha sido como fuente de caracteres simples y muy pocas veces de caracteres complejos. La transferencia de caracteres desde germoplasma pobremente adaptado a líneas elite requiere de muchas retrocruzas y de un proceso de selección eficiente. Los problemas que surgen al cruzar especies silvestres y cultivadas incluyen incompatibilidad entre ambas especies, esterilidad en los híbridos F₁, inviabilidad o infertilidad en los descendientes de híbridos, baja recombinación entre los cromosomas de ambas especies y arrastre por ligamiento. De esta forma, una solución sería diseñar herramientas que nos permitan utilizar rápidamente el potencial genético existente en estos materiales. Esto podría lograrse mediante el desarrollo de líneas de introgresión que faciliten la detección rápida de caracteres presentes en genomas silvestres (Zamir, 2.001).

Una colección de líneas de introgresión (LI) es una familia de líneas cuasi-isogénicas o *near isogenic lines* (NIL) cada una de las cuales presenta un único y definido segmento cromosómico, derivado de una fuente de germoplasma no adaptado, sobre un fondo genético de una línea elite. Así, el genoma silvestre estará representado en su totalidad por el conjunto de líneas de introgresión. Estas líneas, además de aumentar la tasa de introgresión, pueden ser utilizadas directamente en mejoramiento proporcionando una herramienta eficaz para la detección y mapeo de caracteres de interés agronómico. Por esta razón, las NIL son utilizadas principalmente para verificar QTL previamente detectados en diferentes poblaciones de mapeo y para mapear, verificar e introgresar simultáneamente QTL en líneas elite. Aunque el poder de detección de un QTL puede ser mayor en una población de líneas endocriadas recombinantes (RIL, *recombinant inbred lines*), las NIL proporcionan un buen punto de partida para una mejor estimación de los efectos de múltiples QTL. Además, el uso de NIL podría reducir el número de generaciones de retrocruzas requeridas para la incorporación de QTL favorables en líneas elite debido a que constituyen una fuente donadora limpia (Szalma *et al.*, 2.007; Schmalenbach *et al.*, 2.011; Arbelaez *et al.*, 2.015). Según Zamir (2.001) las ventajas de la LI en comparación con otras poblaciones de mapeo son las siguientes:

- Cada NIL dentro de una LI difiere, tanto de la línea élite como de otra NIL, por el segmento cromosómico introgresado. Este tipo de líneas reducen los problemas de esterilidad asociados a otras poblaciones de mapeo derivadas de híbridos interespecíficos.
- Los efectos epistáticos derivados de la interacción con otras regiones del genoma silvestre están suprimidos debido a que toda la variación fenotípica está asociada con el segmento introgresado. Como resultado, se incrementa la capacidad de identificar efectos fenotípicos pequeños.
- Aquellas NIL que contienen un QTL de interés pueden cruzarse con el objeto de dilucidar no sólo los efectos fenotípicos resultantes de la interacción entre distintos QTL sino también para una mejor comprensión de la naturaleza de la epistasia.
- Cada NIL puede cruzarse con distintos probadores con el fin de investigar los efectos de la heterosis e identificar regiones heteróticas.
- Dependiendo del tamaño del segmento introgresado, los QTL pueden ser asignados a intervalos más pequeños. Además, estas líneas pueden utilizarse para superar los efectos del arrastre por ligamiento.
- Constituye un material de evaluación fácil y rápida. Además, puede evaluarse varias veces y utilizarse en el mapeo de distintos tipos de caracteres (bióticos, abióticos, relacionados con el rendimiento o con perfiles metabólicos).
- Proporcionan el material de partida óptimo para el mapeo fino de caracteres.
- Representa una fuente potencial de variación genética que podría ser utilizada para aumentar la base genética de un programa de mejoramiento genético.

Por otra parte, la aplicación de la metodología de paso mínimo de introgresión o *minimum introgression path* en la construcción de la colección de NIL permite reducir el número de líneas que colectivamente cubren el genoma del parental donante disminuyendo de esta manera el nivel de redundancia de la información genética aportada por la línea donadora del carácter (Paterson, 2006).

1.6. El teosinte como fuente de diversidad genética

El término teosinte representa un nombre común utilizado para designar a un grupo de especies del género *Zea* nativas de México y Centroamérica. Sobre la base de las relaciones filogenéticas entre especies y también sobre evidencia molecular, *Zea* fue dividido en dos secciones: *Luxuriantes* y *Zea*. La primera sección contiene cuatro especies: *Z. diploperennis*, *Z. perennis*, *Z. luxurians* y *Z. nicaraguensis* y la última sólo una especie, *Z. mays*, la cual se subdivide en cuatro subespecies: ssp. *parviglumis*, ssp. *mexicana*, ssp. *huehuetenangensis* y ssp. *mays*. (Doebley, 1.990; Molina *et al.*, 2.004; Warburton *et al.*, 2.011).

El maíz al igual que todas las demás especies del género *Zea* (con excepción de *Z. perennis*) es un organismo diploide con $2n = 20$ cromosomas. No obstante su naturaleza diploide, evidencias derivadas del análisis citogenético del género *Zea* sugieren que el número básico de este género es $x = 5$. Por esta razón, distintos autores postulan que el maíz y las especies silvestres relacionadas con $2n = 20$ son alotetraploides crípticos que se habrían originado a partir de cruzamientos entre especies diploides, $2n = 10$, posiblemente extintas (Molina y Naranjo, 1.987; Molina, 2.011). El tratamiento de células premeióticas de *Z. mays*, *Z. perennis*, *Z. diploperennis* y sus híbridos con soluciones de colchicina estimuló el apareamiento de cromosomas homeólogos induciendo la aparición de tetravalentes en maíz, *Z. perennis* e híbridos interespecíficos (Molina, 2.011). Los teosintes presentan, en general, cromosomas más grandes que los del maíz cultivado (Wusirika *et al.*, 2.011). Sin embargo, el análisis comparativo de los cromosomas de especies $2n = 20$ (*Z. mays*, *Z. mexicana*, *Z. parviglumis*, *Z. luxurians* y *Z. diploperennis*) y especies $2n = 40$ (*Z. perennis*) permitió determinar que, a excepción del cromosoma 5, la longitud relativa y la relación entre los brazos de los cromosomas del maíz y los teosintes con $2n = 20$ son semejantes. Además, el maíz carece de *knobs* o son subterminales medianos mientras que los teosintes generalmente presentan *knobs* terminales pequeños, medianos o grandes (Molina, 2.011). Desde el punto de vista morfológico el maíz y el teosinte son similares. Sus principales diferencias radican en la capacidad de ramificación del teosinte y en el tamaño de la inflorescencia femenina. Esta desarrolla una espiga de menor tamaño que la del maíz y sus semillas, en un número de 5 a 10, forman una hilera. Las semillas están recubiertas por una vaina dura y, una vez alcanzada la madurez, se desprenden del raquis de la espiga lo cual facilita su dispersión.

Algunas especies de teosintes son muy distintas genéticamente del maíz. Sin embargo, una especie de teosinte, comúnmente denominada Balsas teosinte o *Zea mays* ssp. *parviglumis* (en adelante *parviglumis*), está genéticamente muy emparentada con el maíz. Aunque existe controversia derivada de estudios citogenéticos acerca de su origen (Poggio *et al.*, 2.005) las evidencias genéticas obtenidas del uso de marcadores moleculares, filogenéticas y arqueológicas señalan que esta especie de teosinte es el ancestro directo del maíz. Se estima que su domesticación ocurrió en el sudoeste de México, alrededor de 9000 AP, donde dicha especie de teosinte es endémica (Doebley, 2.004; van Heerwaarden *et al.*, 2.011; Warburton *et al.*, 2.011).

Las distintas investigaciones orientadas a dilucidar la domesticación del maíz concluyen que dos QTL implicados en este proceso controlan las diferencias en la morfología y en la estructura de la inflorescencia de maíz y de *parviglumis*. *Teosinte branched1 (tb1)* un QTL de efecto mayor involucrado en la regulación transcripcional de genes implicados en el ciclo celular, reprime el crecimiento de los meristemas axilares y de las ramificaciones laterales. Los distintos patrones de expresión de *tb1* en maíz y teosinte permiten controlar las diferencias de dominancia apical observadas en ambas subespecies. Por otro lado, *teosinte glume architecture1 (tga1)* otro QTL que codifica un regulador de la transcripción, está implicado en el control del desarrollo de la gluma, una cubierta protectora que rodea la semilla de teosinte. La diferencia de función entre los alelos de *tga1* en maíz y teosinte es el resultado del cambio de un sólo aminoácido (Doebley, 2.004; Wusirika *et al.*, 2.011).

En distintas regiones de México y Centroamérica los teosintes son considerados malezas debido a su coexistencia con el cultivo de maíz. Dadas sus estrechas relaciones genéticas y filogenéticas el maíz puede, de manera natural, hibridar con el teosinte habiéndose evidenciado una alta tasa de flujo génico entre distintas especies de teosinte, especialmente *parviglumis*, y razas locales de maíz (Warburton *et al.*, 2.011). Los teosintes contienen un alto nivel de diversidad genética siendo la contribución de Balsas teosinte al acervo genético del maíz muy significativa. Warburton y colaboradores (2.011) estimaron que más del 10 % de la diversidad genética en distintas razas locales de maíz derivan del genoma de *parviglumis*. Este flujo de genes puede, por un lado, erosionar la diversidad genética presente en poblaciones naturales de *parviglumis* pero, por otro, la introgresión de genes desde *parviglumis* amplía la base genética de las varie-

dades cultivadas. Por esta razón, los teosintes representan una importante fuente de germoplasma para el mejoramiento genético del maíz ya sea para el incremento del rendimiento y de la calidad nutricional, como para tolerancia o resistencia a diversos factores de estrés biótico o abiótico. Existen en la literatura científica diversos ejemplos del uso de teosintes con fines de mejora: la utilización de *Z. perennis* y *Z. diploperennis* tanto para la introgresión de alelos favorables para el incremento del rendimiento y del valor nutricional, respectivamente, como también para la transferencia de alelos para ciclo de vida perenne y la utilización de *Z. nicaraguensis* para la introducción de alelos que confieren tolerancia al anegamiento (Mano y Omori, 2.013; Wusirika *et al.*, 2.011).

Hasta la fecha, los trabajos de investigación orientados a explorar la variabilidad genética presente en teosintes para tolerancia o resistencia a enfermedades han sido escasos. De estos, la mayoría de los trabajos publicados hacen referencia a la búsqueda de resistencia para hongos fitopatógenos. Ott (2.009) trabajando con un conjunto de NIL derivadas del retrocruzamiento entre cinco accesiones de *parviglumis* y una línea elite de maíz (B73) identificó diversas aislíneas tolerantes a tizón foliar (*Exserohilum turcicum*). Por el contrario, la búsqueda de resistencia a enfermedades de origen viral no arrojó resultados. Nault y colaboradores (1.982), trabajando con seis especies de teosinte, encontraron germoplasma con distinto grado de comportamiento frente a las razas A y B del virus del mosaico del enanismo del maíz, al virus del enanismo clorótico del maíz, al virus del moteado clorótico del maíz, al virus del bandeado del maíz y al virus del rayado del maíz. Además, estudios realizados por March y Ornaghi (1.993) permitieron evaluar la respuesta de distintas especies de teosintes al virus causal del MRC. Los resultados de estos estudios permitieron identificar materiales de *Z. diploperennis* y *Z. perennis*, con buen comportamiento frente a la enfermedad.

El uso potencial de los teosintes en el mejoramiento del cultivo de maíz ha sido evaluado desde 1950 (Aylor *et al.*, 2.005). Sin embargo, no han sido extensivamente utilizados con esta finalidad (Fukunaga *et al.*, 2.005) y solo excepcionalmente se ha recurrido a esta fuente de germoplasma (Cohen y Galinat, 1.984; Mano *et al.*, 2.005). Existen diversos factores que explican el uso limitado de estos materiales. El primero de ellos es la dificultad en la obtención del híbrido interespecífico. Esto surge a raíz de las distintas barreras precigóticas que operan a este nivel

dificultando la obtención del híbrido. Superada esta limitante, el segundo factor es la baja viabilidad y fertilidad del híbrido interespecífico. En este nivel operan distintas barreras postcigóticas que previenen la generación de descendencia. Por último, la escasa utilización de esta fuente de germoplasma se debe al efecto de arrastre por ligamiento de caracteres deletéreos presentes en el genoma de teosinte.

Estudios de análisis de isoenzimas estiman que el maíz, durante su proceso de domesticación, perdió aproximadamente el 25 % de la diversidad genética presente en *parviglumis* (Doebly, 2.004). Por esta razón, la utilización de un conjunto de NIL, derivadas del cruzamiento y retrocruzamiento entre maíz y *parviglumis*, para la identificación de QTL asociados a tolerancia a MRC en teosintes sería una herramienta valiosa para facilitar la transferencia a materiales elite de nuevos alelos mediante hibridación introgresiva y retrocruzamiento asistido por marcadores moleculares.

CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

2.1. Hipótesis

El análisis de ligamiento entre la respuesta a mal de Río Cuarto de una colección de líneas de introgresión (LI) de *Zea mays* spp. *parviglumis* y marcadores moleculares del tipo SNP permite identificar regiones cromosómicas o QTL asociados a la tolerancia a la enfermedad en condiciones de infección controlada.

2.2. Objetivo general

Identificar QTL asociados a tolerancia a MRC en teosinte (*Zea mays* spp. *parviglumis*).

2.3. Objetivos específicos

Identificar *loci* de marcadores moleculares tipo SNP ligados a QTL para tolerancia a MRC en una colección de líneas de introgresión (LI) de *Zea mays* spp. *parviglumis* bajo condiciones de transmisión controlada.

Cuantificar los efectos de los *loci* detectados estimando la proporción de la variabilidad genética explicada por estas regiones de interés.

CAPÍTULO 3: METODOLOGÍA

3.1. Material vegetal

El análisis se desarrolló utilizando un conjunto de 40 líneas cuasi-isogénicas o *near isogenic lines* (NIL) derivadas del cruzamiento entre la accesión PI 384071 de *Zea mays* spp. *parviglumis*, tolerante a mal de Río Cuarto (MRC) y la línea elite de maíz B73, susceptible a la enfermedad. La decisión de utilizar estos materiales estuvo acompañada por la evaluación previa del comportamiento de los parentales B73 y *Zea mays* spp. *parviglumis* (March y Ornaghi, 1.993) frente a la enfermedad. La colección de líneas de introgresión (LI) fue provista por la Dra. Sherry Flint-Garcia del USDA-ARS, Universidad de Missouri, Columbia, EE.UU. (Liu *et al.*, 2.016).

Las NIL utilizadas en este estudio se originaron a partir de ciclos repetidos de retrocruzamiento y selección genotípica mediante selección asistida por marcadores moleculares (MAS) (Figura 1). Estos ciclos permitieron la introgresión de un grupo de *loci*, provenientes del parental donante PI 384071, sobre un fondo genético común derivado de un parental recurrente (B73). De este modo la colección de LI está constituida por un grupo de NIL que, en conjunto, representan la mayoría o la totalidad del genoma del parental donante sobre el fondo genético del parental recurrente. Cada línea lleva uno o unos pocos segmentos cromosómicos distintos que, ordenadas utilizando la información genética derivada del análisis con marcadores moleculares, representan una secuencia continua de introgresiones las cuales cubren la mayoría o la totalidad de la información genética del genotipo donante (Ott, 2.009).

La línea materna, B73, fue cruzada con polen de la accesión de teosinte PI 384071 obtenida del NCRPIS (*North Central Regional Plant Introduction Station*), EE.UU. Dicha accesión de teosinte, de polinización libre, representa una colección realizada en cercanías de la localidad de Arcelia, estado de Guerrero, México (18° 20' N; 100° 19' W). El polen de una única planta F₁ fue utilizado para polinizar nuevamente la línea B73 generando, de esta manera, la primera generación de retrocruza (BC₁). El retrocruzamiento continuó vía descendiente de semilla individual o *single seed descent* hasta la obtención de la cuarta generación de retrocruza (BC₄). Luego de dos generaciones de autofecundación (BC₄S₂), las semillas de cada familia BC₄S₂ se

incrementaron mediante cruzamiento entre hermanos (Figura 1). Se estima que en esta generación de retrocruza cada línea contendría, en promedio, un 3 % de alelos provenientes de *Zea mays* spp. *parviglumis* y un 97 % de alelos provenientes de B73. De este modo cada línea representaría una muestra aleatoria del contenido genómico del parental donante. Además de la endocria por autofecundación, el conjunto de familias BC₄ derivadas de la accesión PI 384071 fue endocriada utilizando la tecnología de dobles haploides (DH) (Figura 1). Así, las plantas BC₄ derivadas de dicha accesión fueron polinizadas con una línea inductora de haploidía resultando haploide el 10 a 15 % de la progenie. Las semillas, identificadas mediante un marcador fenotípico, fueron germinadas y expuestas a un agente inductor de la duplicación cromosómica resultando en diploides completamente homocigotas. De esta manera, se obtuvieron 92 y 93 NIL de las poblaciones BC₄S₂ y BC₄DH, respectivamente (Liu *et al.*, 2.016).

El motivo de utilizar NIL con una proporción significativa del fondo genético de la línea B73 radica en la búsqueda de genes de resistencia de materiales silvestres capaces de manifestarse en un fondo genético de maíz domesticado y ampliamente utilizado en programas de mejoramiento de maíz templado. Los QTL o genes de resistencia que se identifiquen podrán ser eventualmente transferidos a otros fondos genéticos de maíz cultivado, minimizando las penalidades en el rendimiento o la adaptación derivadas de la introgresión de grandes porciones del genoma silvestre. Esta característica permite que los genotipos portadores de estos QTL puedan potencialmente utilizarse como fuente donadora de resistencia en programas de mejoramiento comerciales.

Las poblaciones BC₄S₂ y BC₄DH fueron caracterizadas genotípicamente. El análisis con marcadores moleculares permitió identificar las regiones genómicas introgresadas en cada casi-isolínea (Tabla 1). Las NIL que presentaban regiones repetidas fueron descartadas vía paso mínimo de introgresión o *minimum introgression path* con el objeto de disminuir el nivel de redundancia de la información genética proveniente del parental donante en la colección de LI. De esta manera, el número final de líneas que constituyeron la colección de LI fue de 40: 25 NIL procedentes de la población BC₄S₂ y 15 NIL procedentes de la población BC₄DH. Las NIL derivadas de la población BC₄S₂ recibieron el código Z009 a Z074 mientras que aquellas derivadas de la población BC₄DH recibieron el código Z507 a Z594 (Figura 1). Estas NIL represen-

tan aproximadamente el 90 % del genoma de *Zea mays* spp. *parviglumis* (Flint-Garcia, comunicación personal) teniendo fijada cada una de ellas diferentes regiones del genoma de teosinte. La información derivada de la caracterización genotípica de las NIL fue provista por la Dra. Sherry Flint-Garcia.

Tabla 1. Descripción de las poblaciones BC₄S₂ y BC₄DH.

Generación	N° NIL	N° Int.*	Teo. (%)*	Het. (%)*	Hom. (%)*	Cobertura*
BC ₄ S ₂	92	2,3	4,1	2,6	1,5	3,3
BC ₄ DH	93	2,1	1,9	0,1	1,8	1,6

Ref.: *Promedio, Int.: introgresiones.

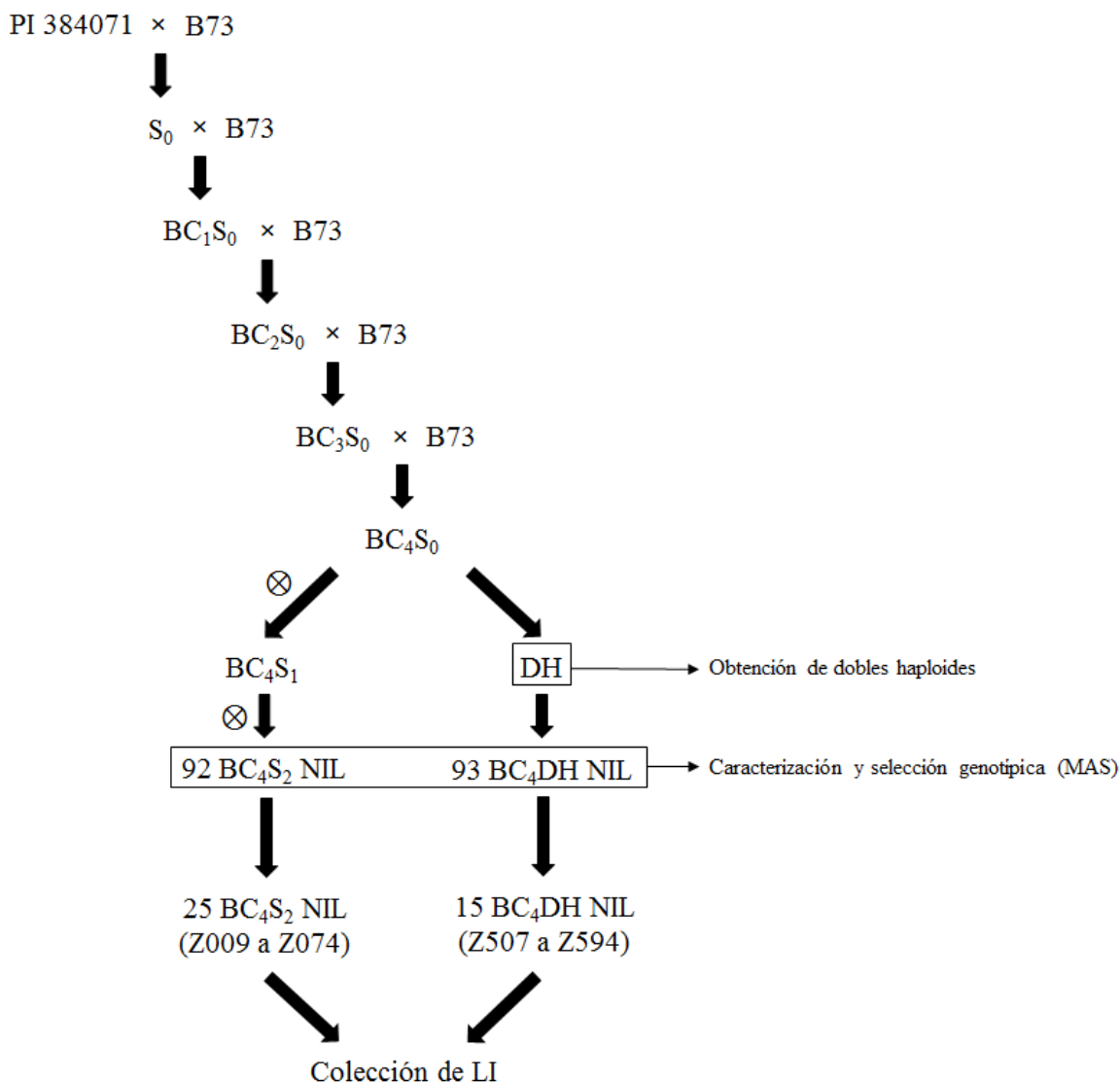


Figura 1. Esquema con el desarrollo de la colección de líneas de introgresión (LI). Las progenies de las poblaciones BC₄S₂ y BC₄DH fueron seleccionadas mediante selección asistida por marcadores moleculares (MAS).

3.2. Caracterización fenotípica

El comportamiento de las NIL frente al virus del mal de Río Cuarto fue registrado en los campos experimentales de la Universidad Nacional de Río Cuarto situados en las localidades de Río Cuarto (campo experimental CAMDOCEX, 33° 06' 16.08" S; 64° 17' 54.55" W) y de La Aguada (campo experimental Pozo del Carril, 32° 58' 17.25" S; 64° 38' 58.43" W (Figura 2).

Dichas localidades se ubican al este y noroeste, respectivamente, del departamento Río Cuarto, al sudoeste de la provincia de Córdoba. El clima que caracteriza el área es de tipo mesotermal, subhúmedo. El régimen térmico es de tipo templado continental con una temperatura promedio anual de 16,3°C con un máximo promedio para el mes más cálido (enero) de 23,5°C y un mínimo promedio para el mes más frío (julio) de 9,0°C. El patrón de precipitaciones en la región, tanto en cantidad como en ocurrencia, es uniforme presentando una distribución estacional que se ajusta a un régimen monzónico. De acuerdo con esto, los períodos que comprenden los meses de diciembre a enero y junio a julio son los que alcanzan los mayores y menores registros pluviométricos, respectivamente (Degioanni *et al.*, 2.008).

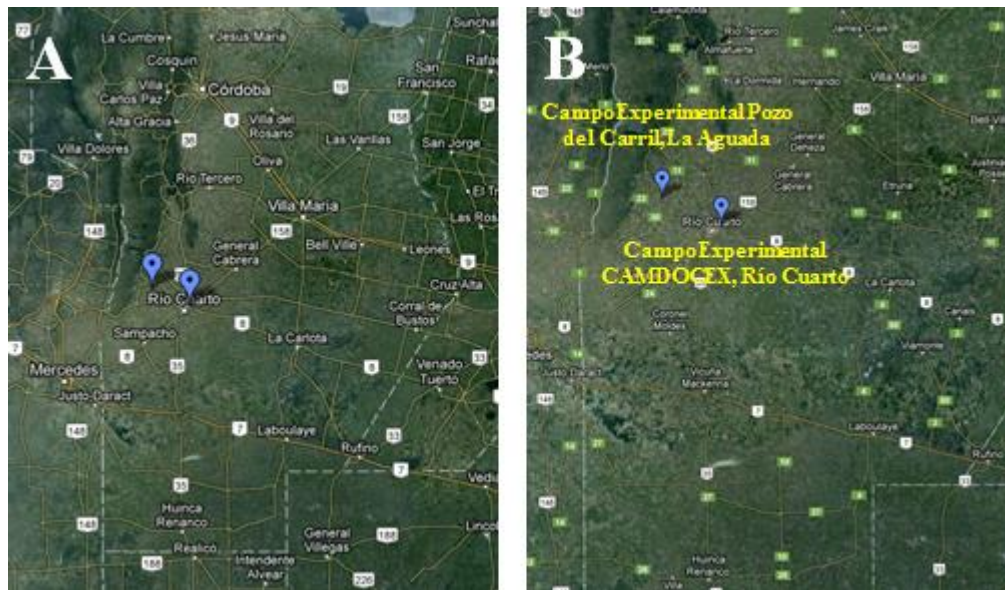


Figura 2. Ubicación de los campos experimentales. A: Provincia de Córdoba; B: Departamento Río Cuarto; C: Campo Experimental Pozo del Carril, La Aguada; D: Campo Experimental CAMDOCEX, Río Cuarto.



Figura 2 (continuación).

Las sierras de Comechingones, hacia el noroeste, y las llanuras del centro-sur y este definen la fisiografía del departamento Río Cuarto. La zona de pedemonte, ubicada al centro, separa dichas unidades geomorfológicas. El sector de llanura, predominantemente de origen eólico, está conformado por sedimentos loésicos con predominio de arenas de tamaño fino y muy fino. De acuerdo con las condiciones del relieve las localidades de Río Cuarto y La Aguada pertenecen a los tipos de llanura plana y ondulada, respectivamente (Figura 3). La llanura plana, caracterizada por un relieve normal, presenta gradientes de pendientes entre 1 y 3 %. Los suelos predominantes son bien drenados, de textura franca arenosa muy fina y elevada susceptibilidad a erosión hídrica. El subgrupo de suelos predominante en el campo experimental CAMDOCEX es el haplustol típico. Por otra parte, la llanura ondulada presenta un relieve normal que varía

desde fuertemente ondulado al oeste, en cercanías al sector de sierras y pedemonte (con gradientes de pendientes entre 3 y 10 %), a ondulado hacia el sur y este (con gradientes de pendiente promedio del 3 %). Los suelos predominantes de esta unidad son bien drenados, de textura franca arenosa muy fina, de bajo contenido de materia orgánica y con elevada susceptibilidad a erosión hídrica. El subgrupo de suelo predominante en el campo experimental Pozo del Carril es el hapludol típico (Degioanni *et al.*, 2.008).

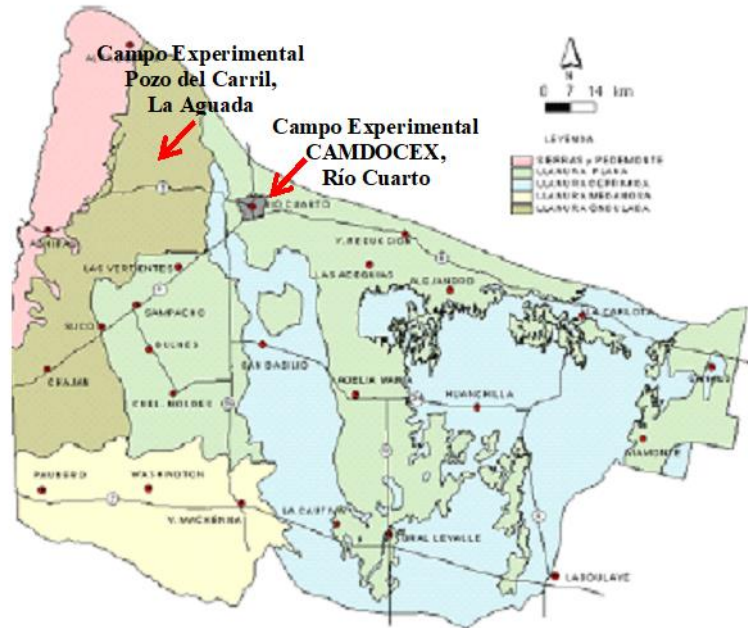


Figura 3. Unidades fisiográficas del área de estudio (Degioanni *et al.*, 2.008).

El estudio se condujo con un diseño en bloques completos al azar con dos repeticiones bajo condiciones de transmisión controlada (7 insectos por planta). Las fechas de siembra se establecieron estimando alcanzar, tanto el pico poblacional del insecto vector como el estado de coleoptile de las plantas. La siembra se efectuó manualmente a una profundidad de 2,5 cm y a una distancia de 25 cm entre plantas y 70 cm entre surcos. La fecha de siembra en el ambiente LA11 se realizó a mediados de noviembre de 2.010 en La Aguada, en el ambiente RC11 a fines de noviembre de 2.010 en Río Cuarto y en el ambiente LA12 a fines de noviembre de 2.011 en La Aguada. Después de la siembra se dispuso un túnel de red malla fina cubriendo la totalidad de los surcos, con el objeto de realizar la transmisión con insectos vectores colocados en su interior (Figura 4 E). La transmisión controlada se realizó en estado de coleoptile. Se utilizaron poblaciones naturales del vector recolectadas con redes de arrastre en cultivos de avena en donde

MRC es endémica (Figuras 4 A, B, C y D). La avena, es uno de los principales hospedantes de *D. kuscheli* y constituye un factor importante en la formación de epifitias. La recolección de los insectos se realizó una vez detectado el pico poblacional.

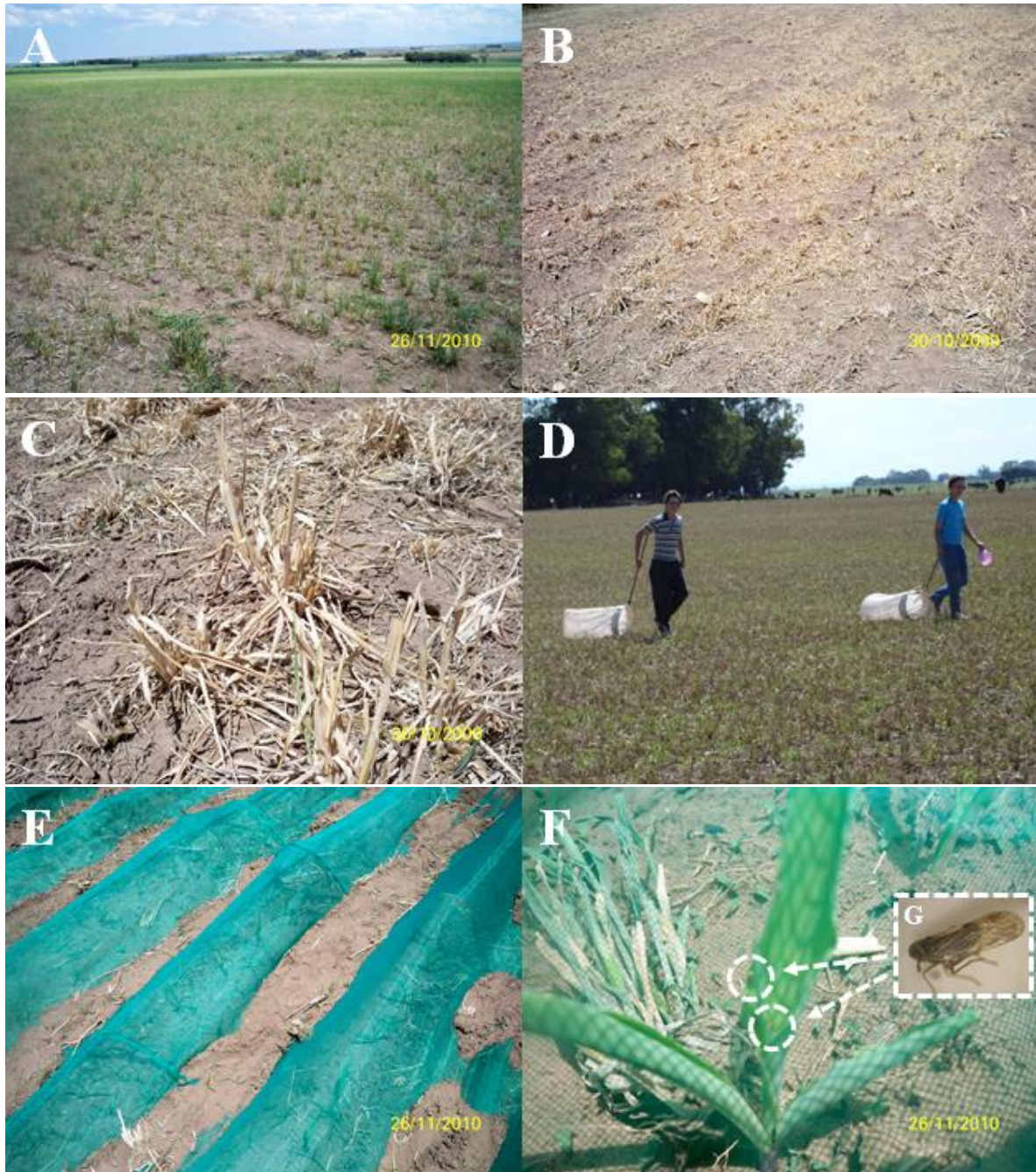


Figura 4. Transmisión controlada del virus del mal de Río Cuarto. A y B: lotes de avena en sobrepastoreo en la localidad de La Aguada; C: plantas de avena sobrepastoreada; D: recolección de “chicharritas” (*D. kuscheli*) en un campo de avena sobrepastoreada mediante la utilización de redes de arrastre; E: túneles en el ensayo de evaluación de NIL. En el interior se observan las plántulas en desarrollo; F: insectos vectores de la enfermedad de MRC sobre la superficie de la hoja de una planta (interior de la circunferencia); G: “chicharrita” (*D. kuscheli*).

En el momento de madurez de la inflorescencia masculina se registraron de cada planta individual variables fenotípicas como altura (distancia medida en cm desde el nivel del suelo al extremo distal de la panoja), estado de la panoja (normal, ausente, flores en extremos del eje central y ramificaciones laterales, flores en eje central y menos del 50 % en ramificaciones laterales, sin flores, sin flores en extremos del eje central y ramificaciones laterales, flores sólo en el eje central), características de las hojas del tercio superior de la planta: largo (normal o reducida a la vaina foliar), ancho (normal o angosta) y borde (normal o rasgado), presencia y tipo de enaciones (ausentes, tenues, nervaduras engrosadas, callos) y estado de los entrenudos (normales o acortados). Una vez alcanzada la madurez fisiológica se determinaron las características de la espiga presente en el primer nudo: forma (normal o curva), llenado (vacía, un tercio granada, dos tercios granada, toda granada) y cantidad (ninguna, una, espigas múltiples) (Figura 5). El grado de severidad se determinó según una escala (Ornaghi *et al.*, 1.999b) que agrupa a las plantas en cuatro grados (0: planta asintomática, 1: presencia de enaciones; 2: enaciones + espiga curva; 3: enaciones + enanismo + espiga pequeña, múltiple, sin granos), y se calculó la tolerancia de las NIL por medio de un índice de severidad de enfermedad (ISE) calculado según la incidencia y la severidad de la enfermedad según Grau *et al.* (1.982) a través de la siguiente fórmula:

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

Además de los caracteres mencionados se registró el rendimiento en grano (REN) de cada NIL expresado en Kg/ha. Aunque se aplicaron herbicidas –metolacloro (S-metolacloro), atrazina (2 cloro- α -etilamino-6-isopropilamino-s-triazina) y glifosato (N-fosfometil-glicina)– durante la preemergencia del cultivo, el mantenimiento y control de malezas en la parcela, durante la postemergencia y el desarrollo del cultivo, se realizó en forma manual para evitar efectos secundarios derivados de la aplicación de agroquímicos.

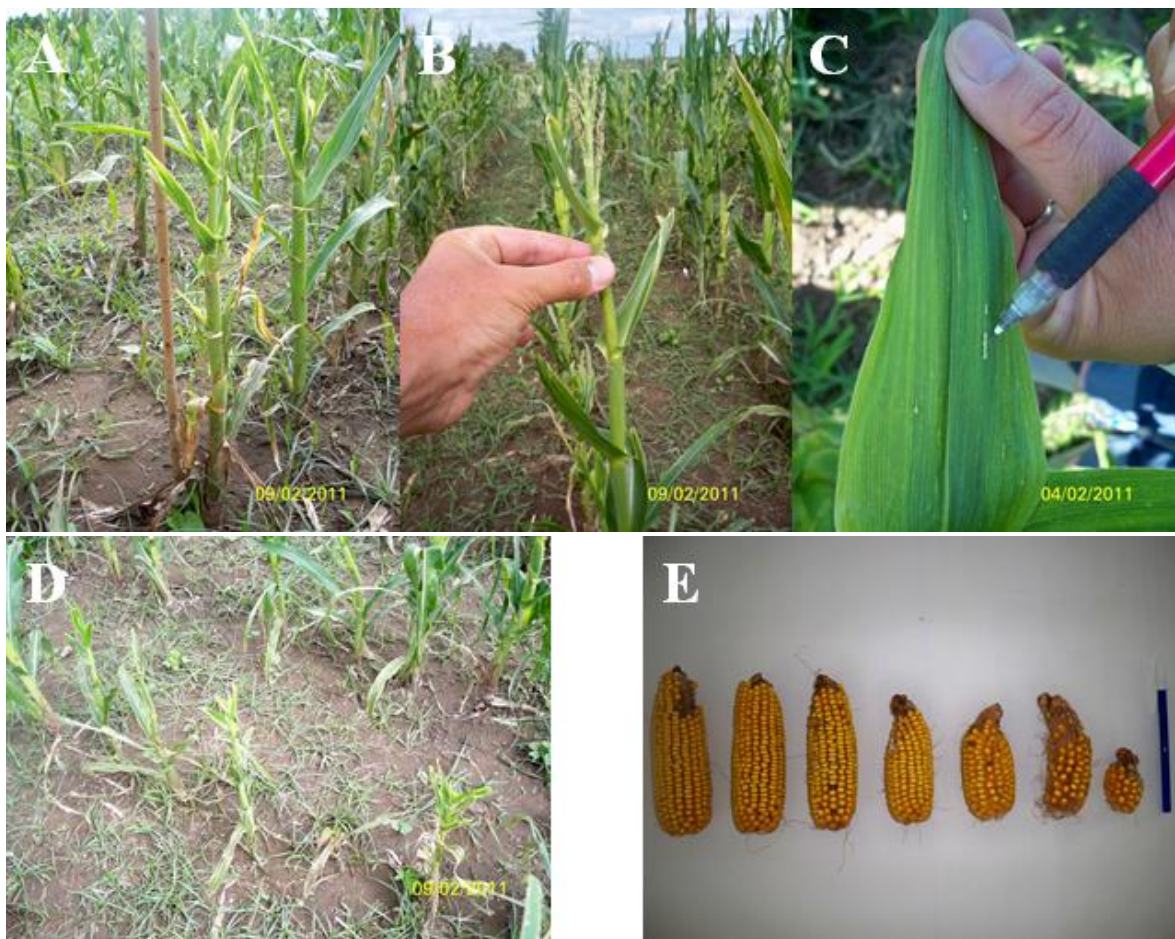


Figura 5. Sintomatología del virus del mal de Río Cuarto. A: evaluación de la altura. Planta sin panoja con los entrenudos acortados y hojas deformadas; B: planta con panoja sin flores y hojas deformadas; C: presencia de enaciones en forma de callo en el envés de la hoja; D: imagen de una NIL con los síntomas de la enfermedad; E: espigas de NIL sanas y afectadas por MRC (de izquierda a derecha, las cuatro últimas espigas).

3.3 Caracterización genotípica y mapa de ligamiento

La caracterización genotípica se realizó a partir de muestras de tejido foliar cosechadas de diez plantas de cada isolínea. El ADN genómico total se extrajo mediante el kit Qiagen 96 Plant Kit. Los genotipos fueron caracterizados utilizando la tecnología Illumina GoldenGate con un chip Illumina de 768 SNP. Se seleccionaron 728 marcadores entre un total de 1106 SNP utilizados en la caracterización de una población de mapeo asociativo anidado o *nested association mapping* (NAM) (McMullen *et al.*, 2.009) tomando como criterio el polimorfismo entre la línea B73 y la accesión de teosinte (Liu *et al.*, 2.016). La tecnología de caracterización genotípica Illumina GoldenGate permite el análisis simultáneo de un gran número de marcadores SNP (hasta 1536) mediante una única reacción de hibridación molecular altamente específica. Una

de las características más sobresalientes del análisis es que la caracterización genotípica se realiza directamente sobre la secuencia blanco sin una amplificación previa reduciendo el tiempo y los volúmenes de reactivo necesarios.

En el ensayo Illumina GoldenGate la activación de la muestra de ADN se realiza mediante la unión a un complejo oligonucleótido/biotina/estreptavidina específico que hibrida con cada uno de los *loci* SNP de interés (Figura 6). Cada complejo consiste en una combinación de tres oligonucleótidos: dos de ellos (denominados *allele-specific oligonucleotide*; ASO) hibridan diferencialmente reconociendo cada una de las dos variantes alélicas de cada locus SNP. Un tercer oligonucleótido (denominado *locus-specific oligonucleotide*; LSO), hibrida en una región de entre 1 a 20 pb del sitio de unión de los ASO. Las secuencias de los oligonucleótidos contienen regiones de complementariedad genómica y sitios de unión a cebadores de PCR. Además, el LSO contiene una secuencia única sonda específica. Durante el proceso de hibridación, los oligonucleótidos hibridan con la muestra de ADN unida al complejo biotina/estreptavidina. Luego de la hibridación se realizan varios lavados. Estos lavados eliminan tanto los oligonucleótidos en exceso como aquellos con hibridaciones inespecíficas. La extensión de la secuencia del ASO, mediante una DNA polimerasa altamente específica, y el posterior ligamiento de la secuencia al LSO, permite unir la información genotípica del marcador SNP con la secuencia sonda específica del LSO (Shen *et al.*, 2.005).

Esta unión conforma un molde para PCR que utiliza cebadores universales P1, P2, y P3. Los cebadores P1 y P2 están marcados con fluorocromos Cy3 y Cy5, respectivamente. Luego de la amplificación, los productos de PCR marcados con los distintos fluorocromos hibridan con una región complementaria a la secuencia sonda específica. Los productos de la hibridación marcados con un tipo particular de fluorocromo son capturados por un lector de fluorescencia que permite corresponder la información del fluorocromo con la información genotípica del marcador SNP.

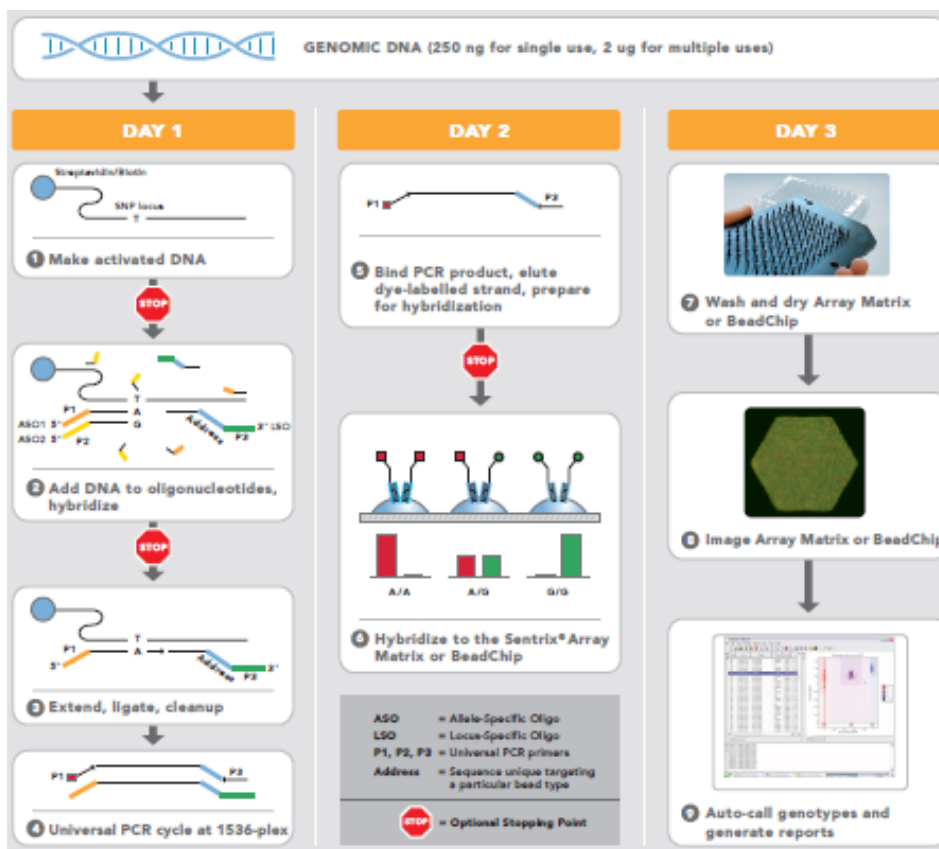


Figura 6. Esquema representativo de la tecnología de genotipado GoldenGate® (<https://www.illumina.com/>).

Las poblaciones BC₄ utilizadas para la creación de la colección de LI no permiten la construcción del mapa de ligamiento debido al bajo número de líneas con introgresiones superpuestas en una región dada. De esta manera, no es posible determinar el orden de los marcadores y estimar con precisión las distancias genéticas. Por esta razón, se utilizó el mapa genético de una población NAM (McMullen *et al.*, 2009) para asignar el orden y la posición de los marcadores (Liu *et al.*, 2016). Sobre esta base se construyó gráficamente el mapa genético de la colección de LI y de este modo se estimó las regiones de teosinte introgresadas para lo cual se utilizó con el programa MapChart (Voorrips, 2002).

La disponibilidad de un mapa genético de alta densidad de marcadores y el análisis de la estructura genética constituyen la base para desarrollar los estudios de asociación utilizando la población de LI: dado que las distintas NIL que la constituyen poseen distinto grado de relación genética, la disponibilidad de una caracterización genotípica precisa nos permitió evaluar la estructura y así evitar falsas asociaciones entre un determinado marcador y el fenotipo de interés (Pritchard *et al.*, 2000a). Los análisis para determinar la estructura genética subyacente en la

colección de LI se realizaron utilizando el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2.000b). Los parámetros que se utilizaron en el análisis tuvieron en cuenta una matriz de 40 genotipos y 560 marcadores moleculares y 100.000 periodos de *burn-in* asumiendo la presencia de dos y tres poblaciones. Además, utilizando la misma matriz se realizó un análisis de componentes principales. El número de componentes principales significativas se determinó mediante la prueba estadística basada en la distribución de Tracy-Widom (Patterson *et al.*, 2.006).

3.4. Análisis estadístico

Los caracteres fenotípicos índice de severidad de la enfermedad (ISE) y rendimiento en grano (REN) fueron analizados en cada ambiente de evaluación por separado. Con este propósito, se ajustó para ISE un modelo mixto para un diseño con dos factores de control, bloques y columnas anidadas dentro de cada bloque. El efecto del genotipo, al igual que los efectos de bloque y columna, fueron declarados como aleatorios. La formulación del modelo fue la siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \gamma_k(\beta_j) + e_{ijk} \text{ con}$$

$$\alpha_i \sim N(0, \sigma_\alpha^2)$$

$$\beta_j \sim N(0, \sigma_\beta^2)$$

$$\gamma_k \sim N(0, \sigma_\gamma^2)$$

$$e_{ijk} \sim N(0, \sigma_e^2)$$

donde y_{ijk} representa el ISE en el genotipo i de la repetición j de la columna k , μ es la media general, α_i el efecto aleatorio del genotipo i , β_j el efecto aleatorio del bloque j , $\gamma_k(\beta_j)$ el efecto aleatorio de la columna k dentro del bloque j y e_{ijk} los términos de error aleatorio asociados a las observaciones y_{ijk} . Por su parte, la formulación del modelo para REN fue la siguiente:

$$y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \rho x_{ij} + e_{ij} \text{ con}$$

$$\alpha_i \sim N(0, \sigma_\alpha^2)$$

$$\beta_j \sim N(0, \sigma_\beta^2)$$

$$e_{ij} \sim N(0, \sigma_e^2)$$

donde y_{ij} representa el REN en el genotipo i de la repetición j , μ es la media general, α_i el efecto aleatorio del genotipo i , β_j el efecto aleatorio del bloque j , ρ el parámetro desconocido que representa las tasa de cambio en y frente al cambio unitario de x ; x_{ij} la variable regresora o covariable ISE y e_{ij} los términos de error aleatorio asociados a las observaciones y_{ij} . Las medidas utilizadas para determinar el ajuste de un modelo fueron el Criterio de Información de Akaike (AIC), el Criterio de Información Bayesiano (BIC) y la prueba de cociente de verosimilitud. El modelo seleccionado en cada ambiente fue aquel de mejor ajuste, es decir, el de menor AIC y menor BIC. El ajuste de dichos modelos permitió estimar los componentes de varianza asociados con los efectos aleatorios. La heredabilidad para el ISE y el REN fue estimada en cada ambiente de evaluación de acuerdo con la siguiente expresión (Cullis *et al.*, 2.006):

$$H^2 = 1 - \frac{a_{tt}}{2\sigma_V^2}$$

donde H^2 representa la heredabilidad en sentido amplio, a_{tt} la varianza del error de estimación de la diferencia de medias apareadas entre NIL y σ_V^2 el componente de varianza asociado al efecto de las NIL.

Finalmente, se obtuvieron los predictores de los efectos del genotipo. El mejor predictor lineal insesgado (BLUP) de efectos aleatorios es el predictor usual de efectos aleatorios en el marco de los modelos mixtos. El BLUP, por sus propiedades, minimiza el error cuadrático medio de la predicción dentro del conjunto de predictores lineales e insesgados (Balzarini, 2.006).

Dentro del marco de los modelos mixtos los supuestos sobre los elementos de los vectores de efectos aleatorios (u) y e no exigen independencia sino que se asume que existe una matriz G , $q \times q$, de varianza y covarianza de los efectos aleatorios y una matriz R , $n \times n$, de varianza y covarianza de los términos de error en e . Usualmente la esperanza de los efectos aleatorios y de los términos de error se suponen iguales a cero como así también la covarianza entre elementos del vector u y e .

Es decir,

$$E \begin{pmatrix} u \\ e \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} 0 \\ 0 \end{pmatrix}, \text{Var} \begin{pmatrix} u \\ e \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} G & 0 \\ 0 & R \end{pmatrix}$$

Cuando se asume que $y \sim N$, la función de densidad de queda completamente determinada por:

$$y: (X\beta, V) = (X\beta, ZGZ' + R)$$

Los supuestos clásicos de independencia y homogeneidad de varianzas para los términos aleatorios del modelo lineal general se relajan en el contexto de los modelos lineales mixtos. La inclusión de efectos aleatorios produce observaciones correlacionadas. De esta manera, tanto la estructura de correlaciones como la presencia de varianzas heterogéneas pueden ser especificadas a través de la modelación de las matrices de covarianza G y R (Balzarini, 2.006).

El BLUP es una regresión hacia la media general basada en los componentes de varianza y covarianza asociados a los efectos aleatorios del modelo. El predictor de efectos aleatorios tiene la forma:

$$u = GZ'V^{-1}(y - X\beta)$$

El BLUP se distribuye normalmente con matriz de covarianza igual a:

$$\text{Var}(u) = GZ' \left(V^{-1} - V^{-1}X \left(\sum_1^n X'V^{-1}X \right) X'V^{-1} \right) ZG$$

De esta forma, se estimaron los BLUP para ISE y REN por ambiente a fin de establecer un ranking de genotipos para tolerancia a MRC y rendimiento en cada ambiente de evaluación, respectivamente. Dichos análisis fueron realizados utilizando el método de máxima verosimilitud restringida (REML) del programa estadístico asreml-r v3.0 (Butler, 2.009).

La asociación entre el BLUP de los caracteres ISE y REN y cada marcador molecular se evaluó mediante un análisis por marcador individual o *single marker analysis* utilizando un análisis de varianza (ANOVA) a una vía de clasificación en cada ambiente de evaluación. De esta manera, la ecuación del modelo estadístico fue el siguiente:

$$y_{ik} = \mu + \alpha_i + e_{ik}$$

donde y_{ik} representa el BLUP para ISE o REN en el k-ésimo individuo del genotipo i , μ representa la media general, α_i el efecto del genotipo i y e_{ik} el error aleatorio asociado a la observación ik .

Dado que $\alpha = (1 - 2r)a$, donde r es la tasa de recombinación entre el marcador y el QTL y a es el efecto de aditividad del QTL (en el caso de que haya un único QTL por cromosoma), no es posible estimar la posición del QTL. Sin embargo, es probable que el QTL se encuentre cerca del marcador con el valor de F más alto (Grondona, 2.001). De esta forma, los valores del estadístico F de cada test fueron graficados con el objeto de determinar la posición de un posible QTL. La elección apropiada del nivel de significación respecto al cual una región del genoma está asociada al carácter de interés disminuye la probabilidad de falsos positivos. Churchill y Doerge (1.994) propusieron estimar empíricamente el umbral de significación para la detección de un QTL generando distintas muestras a partir de los datos mediante permutaciones de los valores del carácter respecto a los genotipos de los marcadores. Se declara la presencia de un QTL si el valor del estadístico observado excede un umbral determinado. De esta forma, se utilizó un test de permutación con 1000 permutaciones y un nivel de significación de 0,01 para definir el valor crítico de F a partir del cual se declaró significativo un SNP. La proporción de la varianza fenotípica explicada por un marcador significativo se determinó por el valor del coeficiente de determinación (R^2). La varianza fenotípica total fue determinada mediante un modelo de regresión lineal múltiple. Los marcadores con el mayor valor de R^2 de cada cromosoma o región cromosómica, significativamente asociados a los BLUP de ISE y REN, constituyeron los términos del modelo. Los análisis ANOVA y test de permutaciones fueron realizados utilizando el programa R-3.3.1 para Windows (R Core Team, 2.016).

Las secuencias de los oligonucleótidos específicos de los SNP estadísticamente significativos fueron analizadas utilizando el algoritmo BLAST (Basic Local Alignment Search Tool, Goodstein *et al.*, 2.012). Se realizó el análisis de homología de secuencia entre estos y el genoma de *Zea mays* (*Zea mays ssp mays*) utilizando los parámetros de análisis por defecto. El objeto de este análisis fue determinar si los marcadores asociados a ISE y REN se encuentran en genes que pudieran tener alguna vinculación funcional con dichos caracteres.

CAPÍTULO 4: RESULTADOS Y DISCUSIÓN

4.1. Caracterización de los ambientes de evaluación

Los sistemas de pronóstico de siembra y presiembra basados en variables dependientes del clima, del huésped o del patógeno son una importante herramienta para el control y manejo de enfermedades (March *et al.*, 1.995). El modelo desarrollado por March y colaboradores (1.995) utiliza una serie de variables climáticas para el pronóstico de la intensidad del mal de Río Cuarto. Dicho modelo considera las temperaturas máximas promedio y las precipitaciones totales de los meses de junio, julio y agosto como pronosticadores significativos de la intensidad de la enfermedad. De esta manera, el registro de variables climáticas predictoras tales como la temperatura máxima promedio y la precipitación total para los meses de junio, julio y agosto permitió pronosticar una alta intensidad de la enfermedad en los distintos ambientes de estudio (Figura 7).

Este pronóstico, sumado al monitoreo semanal de las poblaciones de *D. kuscheli* en lotes de avena cercanos a las parcelas destinadas a los ensayos (Figura 4), posibilitó estimar una alta densidad de insectos vectores para la realización de las transmisiones controladas lo que se comprobó experimentalmente observándose que la densidad de delfácidos en los diferentes ambientes fue alta. Sin embargo, los niveles de transmisión alcanzados fueron variables. Este aspecto se refleja en la amplia dispersión de los caracteres índice de severidad de la enfermedad (ISE) y rendimiento (REN) evaluados en los distintos ambientes de expresión (Figuras 8a y b).

El análisis del grado de severidad de la enfermedad en cada ambiente de ensayo permitió establecer las proporciones de los distintos grados que conforman el carácter (Figura 9). Así, se observó una notable similitud entre los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11) y La Aguada, campaña 2.012 (LA12) los que manifestaron una marcada diferencia respecto a Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11). LA11 y LA12 resultaron los ambientes más severos en cuanto a la expresión de la enfermedad debido a la preponderancia de plantas con grado de severidad 3. En consecuencia, las medias del carácter ISE en LA11 y LA12 fueron mayores que la correspondiente a RC11. Dicho carácter presentó, particularmente en LA12, una amplia dispersión (Figura 8a). En el testigo susceptible a mal de Río Cuarto (MRC) las medias para ISE en LA11 y LA12 fueron similares, aunque en este último se observó una gran dispersión de la variable.

Por el contrario, en RC11 la media fue considerablemente baja en relación a los demás ambientes (Figura 8a). Por otra parte, la media del carácter REN en RC11 fue mayor que la correspondiente a LA11. Este carácter presentó una amplia dispersión en el ambiente RC11 tanto en el testigo susceptible como en la colección de NIL (Figura 8b). Cabe señalar que no fue posible evaluar el carácter REN en el ambiente LA12 debido a que el número de granos por espiga fue notablemente bajo. Es necesario destacar que *Zea mays* spp. *parviglumis* no fue utilizada como control resistente a MRC. El teosinte, a diferencia de B73, no constituye un genotipo estable ya que por su carácter silvestre segrega para distintos *loci*. En dicha especie cada genotipo constituye un evento genético único. Por esta razón, se decidió no utilizar el teosinte como control resistente debido a que ningún individuo representaría al genotipo que dio lugar a la colección de líneas de introgresión.

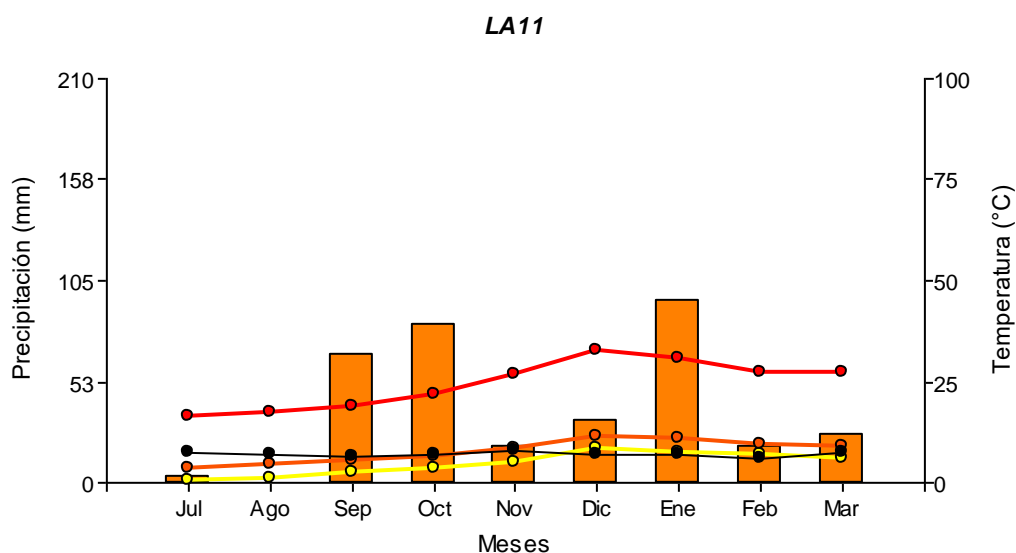


Figura 7. Registros meteorológicos de los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11). Referencias: Precip.: precipitaciones; T° Máx.: temperatura máxima; T° Mín.: temperatura mínima; T° Med.: temperatura media; Amp.Ter.: amplitud térmica.

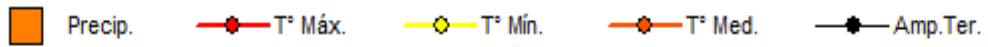
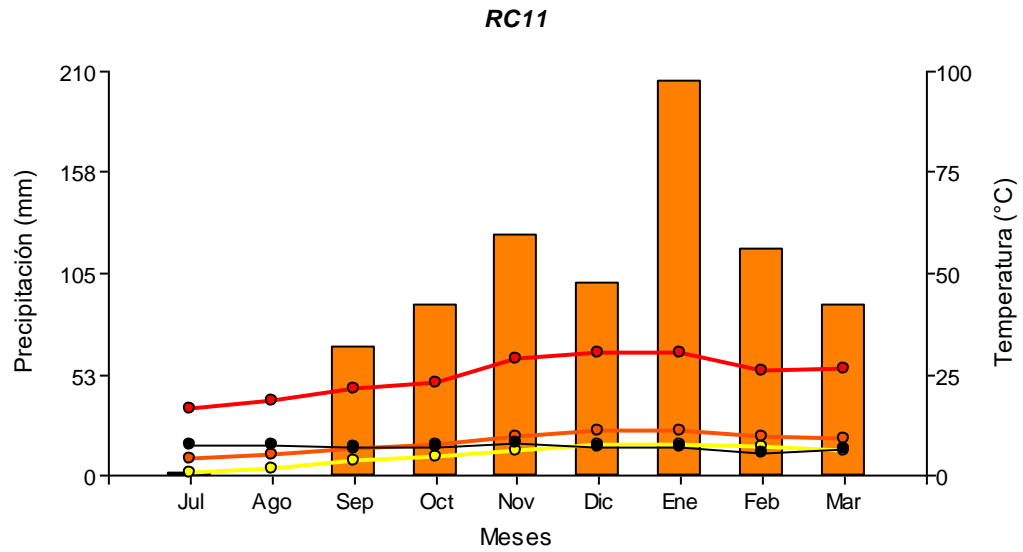
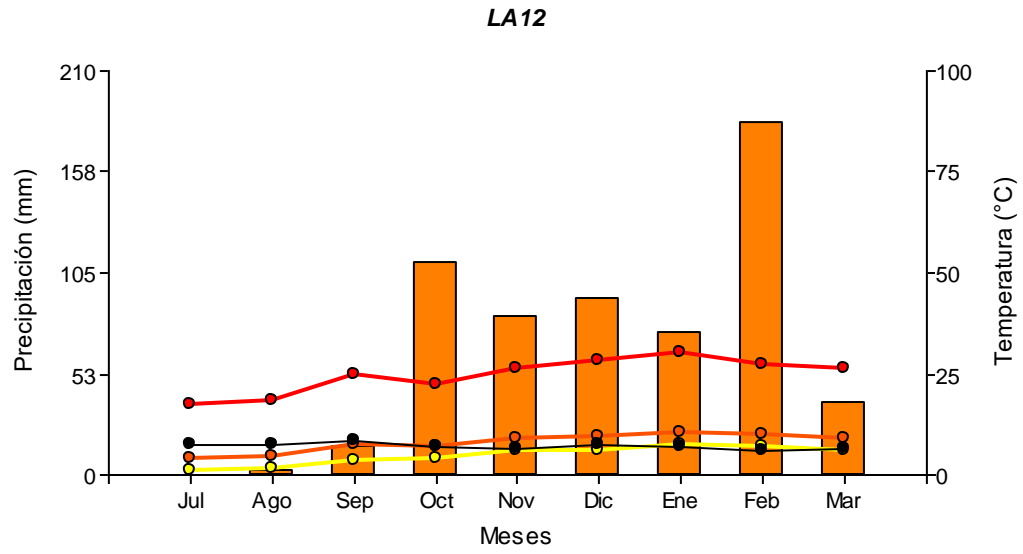


Figura 7 (continuación).

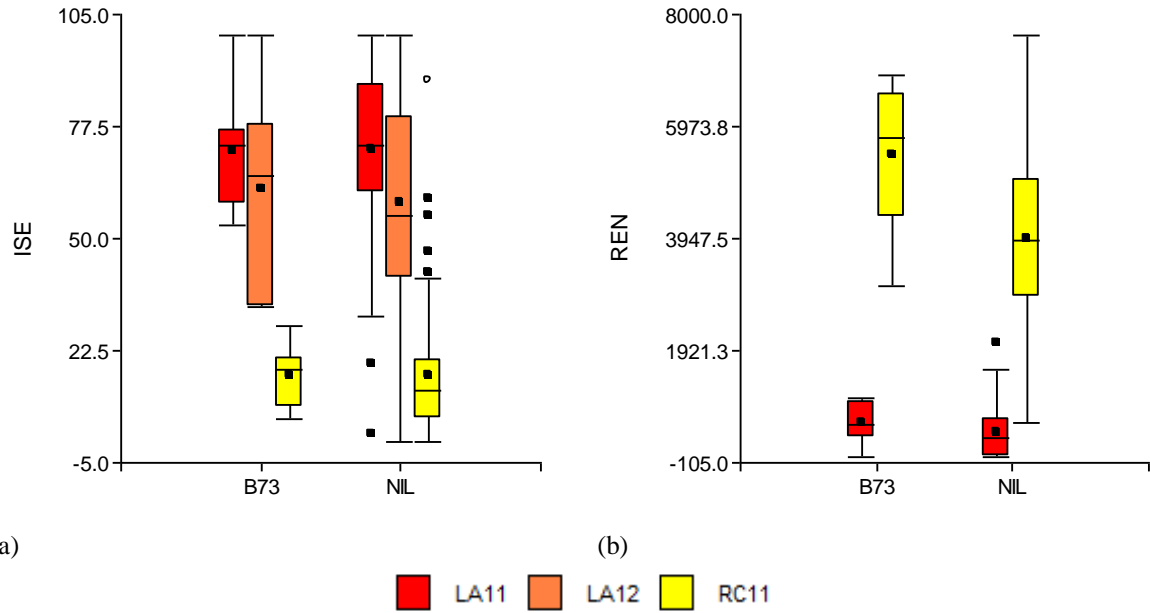


Figura 8. Gráficos de cajas (box-plot) para los caracteres índice de severidad de la enfermedad (ISE) (a) y rendimiento (REN) (b) en tres ambientes de evaluación: La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

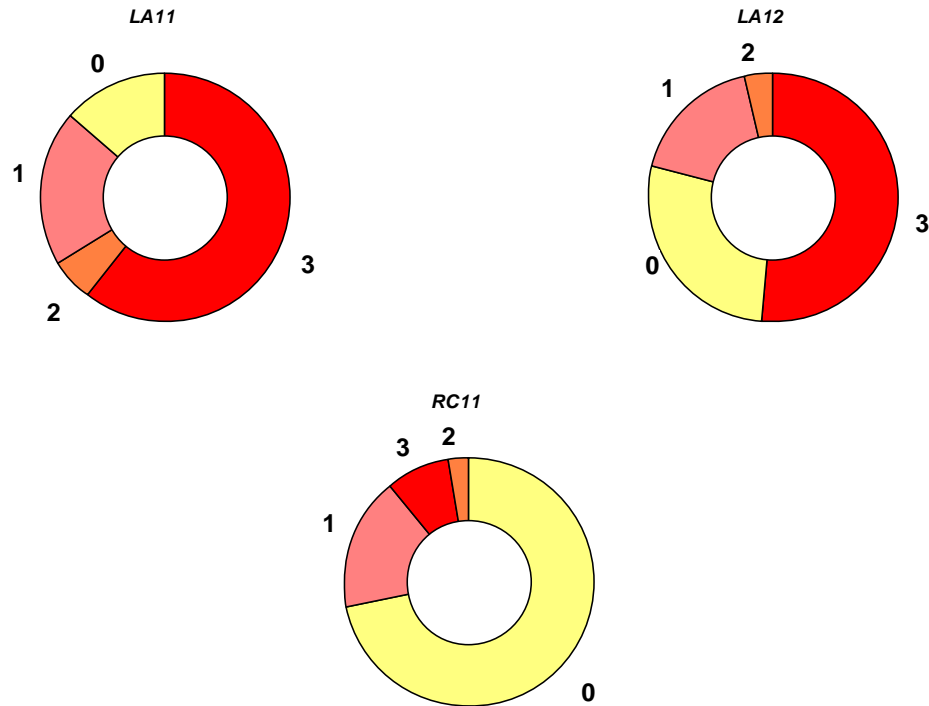


Figura 9. Gráficos de sectores para las distintas categorías del carácter grado de severidad de la enfermedad en cada uno de los ambientes de estudio: La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11). Referencias: 0: planta asintomática; 1: presencia de enaciones; 2: presencia de enaciones y espiga curva; 3: presencia de enaciones, enanismo, espiga pequeña, múltiple y sin granos.

Las Figuras 10 y 11 presentan las distribuciones de frecuencias relativas de los caracteres ISE y REN en los ambientes LA11, LA12 y RC11. Al considerar la distribución de frecuencias para el carácter ISE se observó que algunos genotipos mostraron un valor medio inferior al parental susceptible. En los ambientes LA11 y RC11 la distribución fue continua, de tipo unimodal y asimétrica, con desplazamientos hacia ambos extremos mientras que en LA12 la distribución de frecuencias fue cercana a la normal, con un desplazamiento hacia valores altos de ISE. Por su parte, la distribución de frecuencias para el carácter REN en el ambiente LA11 también mostró ser continua, unimodal y asimétrica con desplazamiento hacia valores bajos de REN. Por el contrario, en RC11 la distribución fue cercana a la normal. Al igual que para ISE algunas NIL presentaron valores medios inferiores a B73. Efectos genéticos, ambientales o errores de tipo experimental explicarían el comportamiento transgresivo de ambos caracteres (Di Renzo y Bonamico, 2013). Las distribuciones de frecuencias sugieren que el ISE y el REN presentan herencia poligénica. Los efectos genéticos (aditivo y no aditivo) y ambiental contribuyen en la expresión de los caracteres cuantitativos. Como veremos en la próxima sección, el desplazamiento de la distribución de frecuencias hacia uno u otro extremo refleja no solo el efecto del genotipo sino también del ambiente manifestado en la variación de la efectividad de la transmisión de la enfermedad en los distintos ambientes.

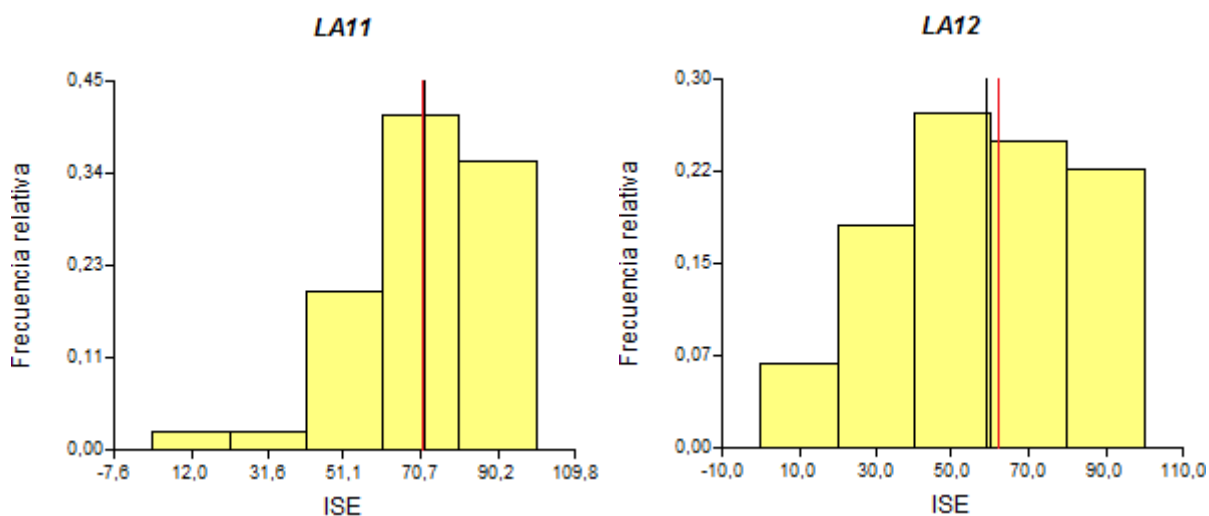


Figura 10. Distribución de frecuencias relativas para el carácter índice de severidad de la enfermedad (ISE) en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11). La línea vertical roja representa el ISE del parental susceptible (B73) y la línea vertical negra la media de dicho carácter.

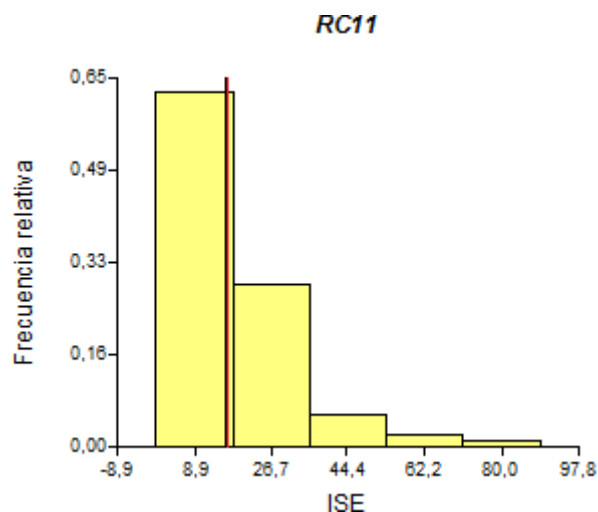


Figura 10 (continuación).

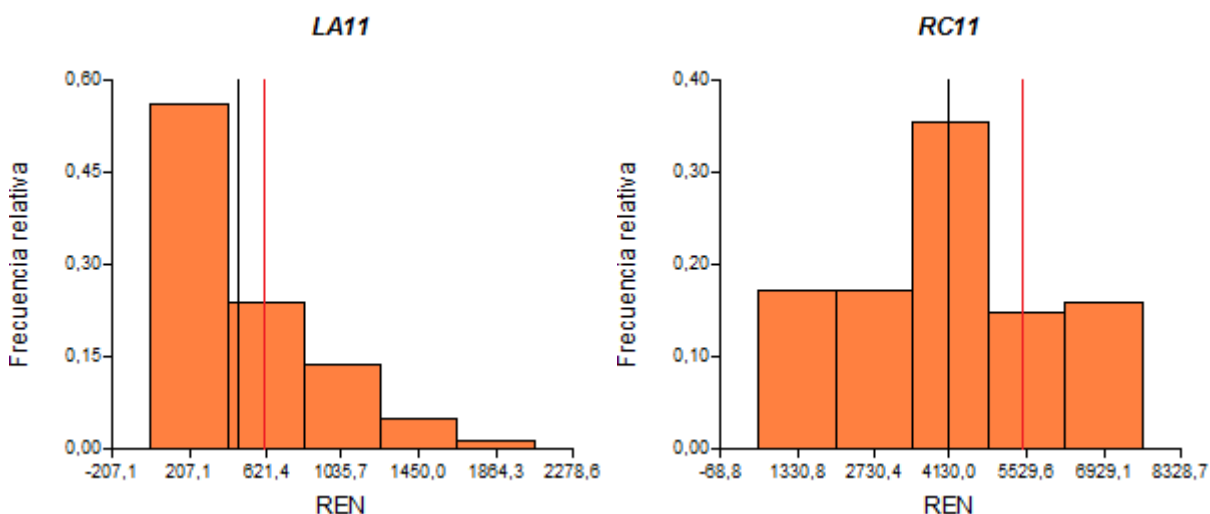


Figura 11. Distribución de frecuencias relativas para el carácter rendimiento (REN) en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11). La línea vertical roja representa el REN del parental susceptible (B73) y la línea vertical negra la media de dicho carácter.

La cuantificación de partículas virales es fundamental para el estudio de los mecanismos de resistencia en plantas. Dada la imposibilidad de establecer la carga viral en planta individual, se recurrió a medidas indirectas que permitieran determinar la transmisión de la enfermedad. El análisis espacial del ISE en las parcelas destinadas a los ensayos permitió evaluar la efectividad de las transmisiones controladas en los distintos ambientes. Este análisis mostró que la magnitud de los componentes de varianza de la columna para ISE en LA11 y LA12 fue mayor que la de los componentes de bloque. Por el contrario, la magnitud de la componente de varianza de la columna en RC11 fue nula. Esto se corresponde con la disposición de los túneles de malla fina cuyo fin fue permitir la transmisión del virus del MRC con insectos vectores. Al considerar el

valor del ISE en el control susceptible, B73, en cada columna o túnel es posible establecer un ranking donde los ambientes LA11 y LA12 presentaron, alternativamente, los valores más altos. El ambiente RC11 apareció relegado con los valores más bajos de ISE en todas las columnas (Figura 12a). Cabe señalar que, a excepción de la columna 8, la incidencia de B73 en el ambiente RC11 fue inferior al 50 %. Por el contrario, en LA11 y LA12 fue superior al 75 % en la mayoría de las columnas (Figura 12b). El análisis conjunto del ISE en el testigo susceptible y en la colección de NIL en cada columna permitió determinar que en RC11 la colección de NIL no fue ajena a la baja expresión de la enfermedad observada en el testigo susceptible. Así, es posible afirmar que la transmisión de la enfermedad en este ambiente no fue óptima. Por su parte, en algunas columnas de los ambientes LA11 y LA12 la baja expresión de la enfermedad que mostró B73 se reflejó en la colección de NIL (Figura 12a). También, en ciertas columnas el ISE correspondiente al testigo susceptible fue menor que el promedio observado en la colección de isolíneas. La ocurrencia de escapes o la baja presión de inóculo permitirían explicar la fluctuación en la expresión de la enfermedad. Estos hechos denotan que, al igual que en el ambiente RC11, la transmisión de la enfermedad en algunas columnas no fue óptima.

El mapa de calor o *heatmap* brinda otra perspectiva acerca de la efectividad de la transmisión en los distintos ambientes de evaluación (Figura 13). Las diferentes intensidades de color sugieren que LA12 presentó un patrón de variación espacial en la expresión de la enfermedad dado que algunas columnas mostraron distinta intensidad. Así, es posible observar que la columna dos de este ambiente presentó menor intensidad de color lo cual sugeriría una baja presión de inóculo y la consiguiente baja transmisión de la enfermedad. Además, LA12 es un mosaico heterogéneo de gran diversidad de colores. Este aspecto se relaciona con la dispersión del carácter ISE observada en este ambiente (Figura 8a). Por el contrario, teniendo en consideración las distintas tonalidades, los ensayos de los ambientes LA11 y RC11 resultaron más homogéneos aunque la expresión de la enfermedad en LA11 fue mayor que en RC11. De esta manera, este ambiente mostró baja intensidad de color lo cual refleja los valores bajos de ISE observados en este ambiente. El gráfico de los residuos del carácter ISE, considerando el diseño de filas por columnas, no permite distinguir estas tendencias dentro de ensayos (Figura 14). Los modelos propuestos para los distintos ambientes permiten capturar, en distinto grado, la variabilidad de la componente estructural determinada por el diseño de filas y columnas. El variograma de los residuos del carácter ISE permite representar la efectividad de estos modelos para capturar la

variabilidad espacial. Este aspecto resulta evidente al considerar el variograma para los residuos del carácter ISE derivados de la modelación de la variabilidad espacial presente en LA12 donde el modelo propuesto captura la totalidad de la variabilidad de la componente estructural derivada del diseño de filas y, fundamentalmente, columnas (Figura 15). Por último, el análisis de comparación de medias derivado del ajuste de un modelo mixto permitió determinar que en los ambientes LA11 y RC11 las medias para el ISE de las columnas tres y ocho, respectivamente, fueron significativamente distintas de las demás. Además, en LA12 las medias para el ISE de las columnas tres, cuatro, seis y ocho fueron significativamente distintas del resto (Tabla 2). En resumen, estos resultados así como los derivados de análisis previos sugieren que los ambientes LA11, LA12 y RC11 presentaron un patrón espacial de expresión de la enfermedad.

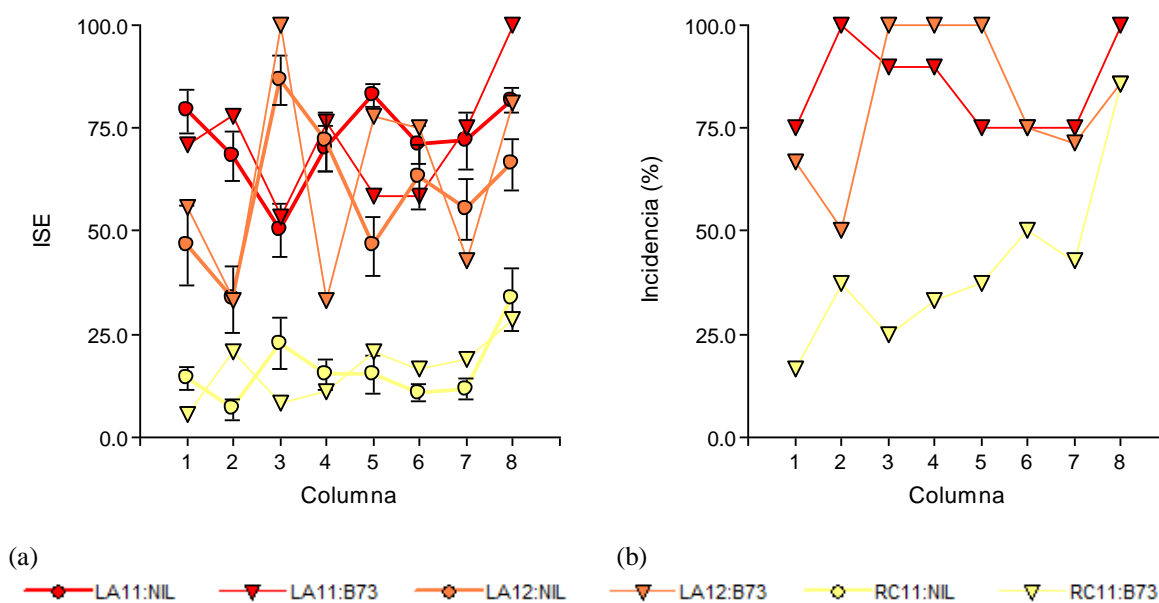


Figura 12. Diagramas de dispersión para índice de severidad de la enfermedad (ISE) (a) e incidencia del grado de severidad de la enfermedad (b) en el testigo susceptible (B73) en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

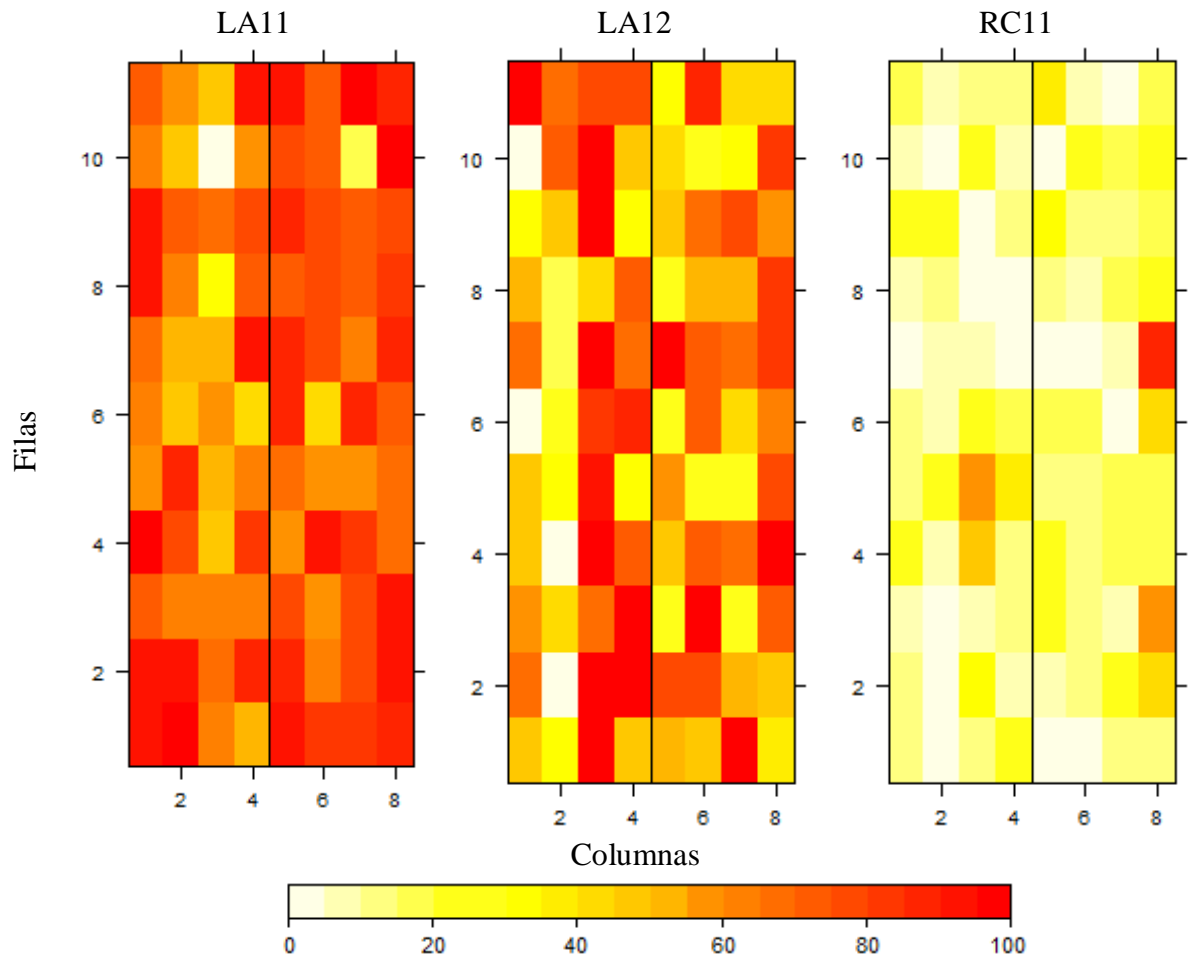


Figura 13. Mapa de calor o *heatmap* para el carácter índice de severidad de la enfermedad (ISE) obtenido de la evaluación de 41 genotipos en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

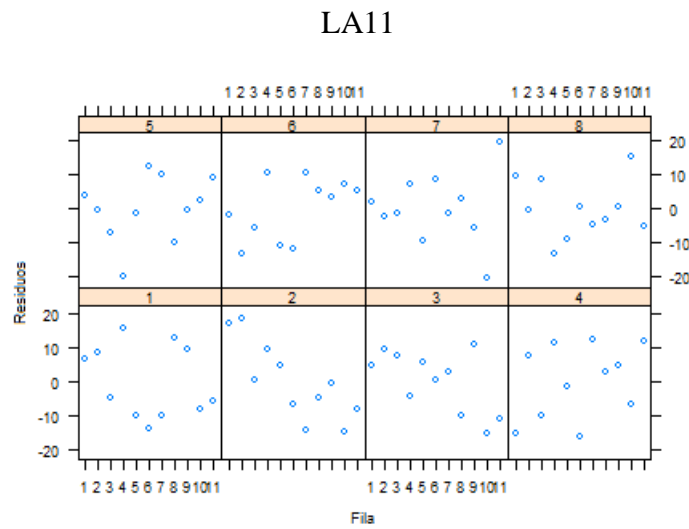
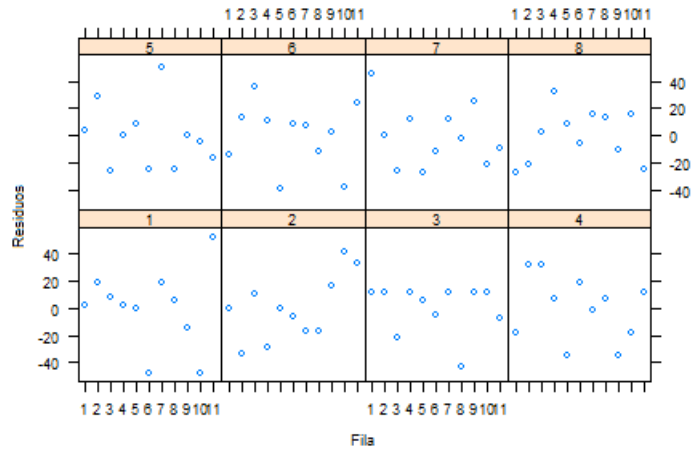


Figura 14. Residuos del carácter índice de severidad de la enfermedad (ISE) representados considerando el diseño de filas por columnas de los ensayos de los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

LA12



RC11

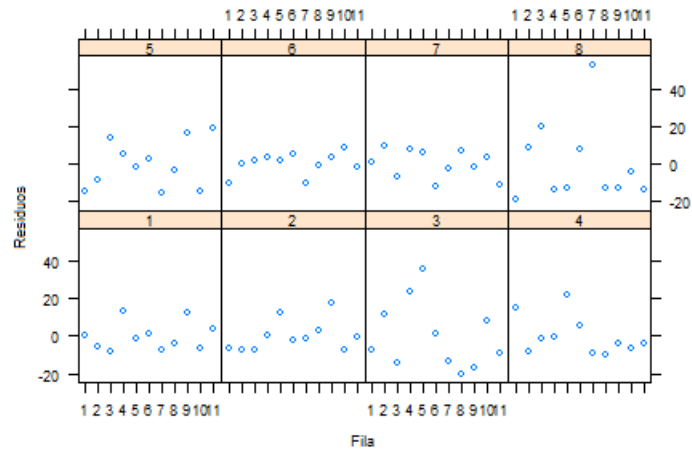


Figura 14 (continuación).

LA11

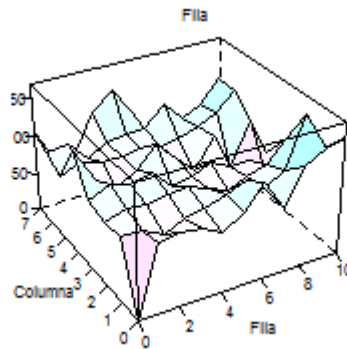
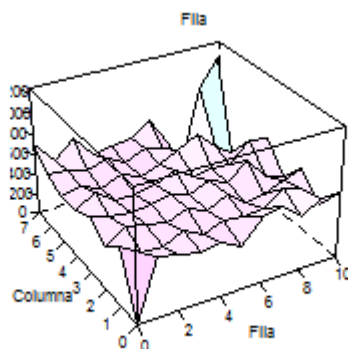


Figura 15. Variograma de los residuos del carácter índice de severidad de la enfermedad (ISE) considerando el diseño espacial de filas por columnas de los ambientes La Aguada, campaña 2011 (LA11); La Aguada, campaña 2012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2011 (RC11).

LA12



RC11

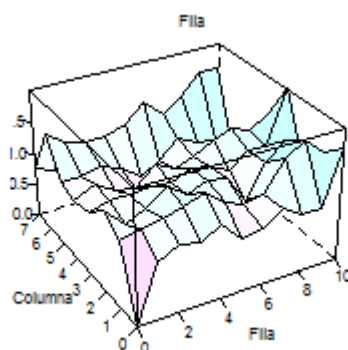


Figura 15 (continuación).

Tabla 2. Test de comparación de medias (DGC) para el carácter índice de severidad de la enfermedad (ISE) en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11), La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

Medias ajustadas y errores estándares para Ambiente/Bloque/Columna

DGC (Alfa=0,05)

Procedimiento de corrección de p-valores: no

Ambiente	Bloque	Columna	Media	E.E.	
LA12	1	3	88,51	8,09	A
LA11	2	8	85,05	6,16	A
LA11	2	5	80,35	6,17	A
LA11	1	1	78,18	6,17	A
LA11	1	4	72,62	6,16	A
LA11	2	7	70,74	6,16	A
LA11	2	6	69,45	6,17	A
LA12	1	4	68,86	8,09	A
LA11	1	2	68,81	6,17	A
LA12	2	8	67,95	8,09	A
LA12	2	6	64,88	8,09	A

Tabla 2 (continuación).

Ambiente	Bloque	Columna	Media	E.E.	
LA12	2	7	52,45	8,09	B
LA12	2	5	49,92	8,09	B
LA11	1	3	49,09	6,16	B
LA12	1	1	45,81	8,09	B
LA12	1	2	33,89	8,09	B
RC11	2	8	33,70	5,75	B
RC11	1	3	21,23	5,75	C
RC11	2	5	14,20	5,75	C
RC11	1	1	14,20	5,75	C
RC11	1	4	13,43	5,75	C
RC11	2	6	12,22	5,75	C
RC11	2	7	11,99	5,75	C
RC11	1	2	8,86	5,75	C

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p \leq 0,05$). Ref.: Amb.: ambiente; Bloq.: bloque; Col.: columna.

4.2. Predicción de los efectos aleatorios del genotipo

El ajuste de un modelo lineal mixto para ISE y REN en cada ambiente de expresión permitió modelar la variabilidad asociada a dichos caracteres. El histograma y el gráfico Q-Q de los residuos estudentizados permitieron corroborar que, a excepción del carácter ISE en el ambiente RC11, los residuos para ISE y REN presentaron distribución normal (Figuras 16 y 17).

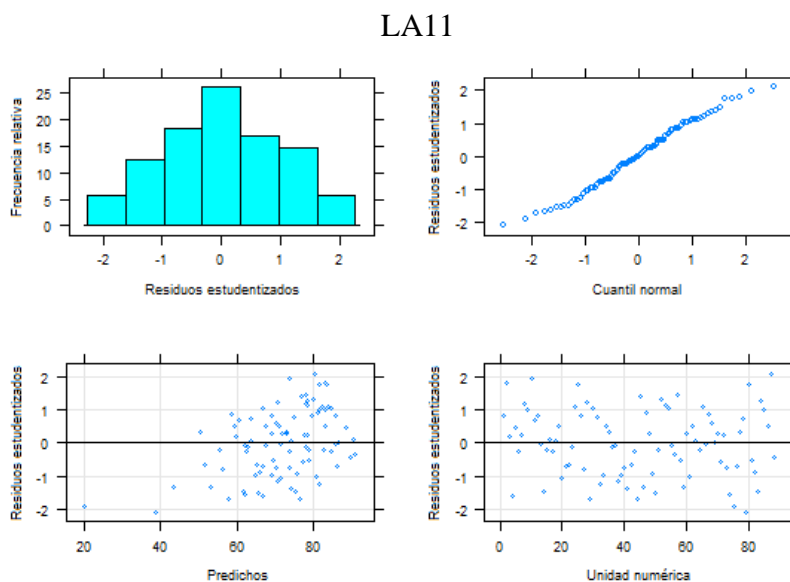
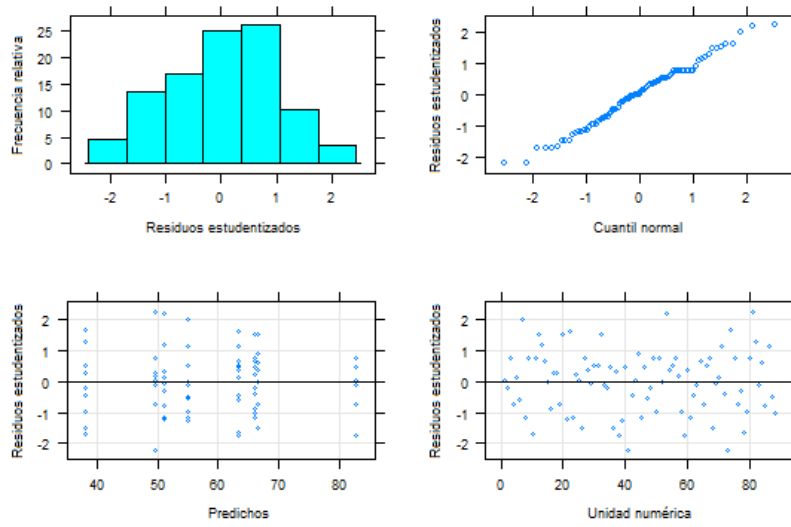


Figura 16. Histograma, gráfico Q-Q y diagramas de dispersión de los residuos estudentizados del carácter índice de severidad de la enfermedad (ISE) en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

LA12



RC11

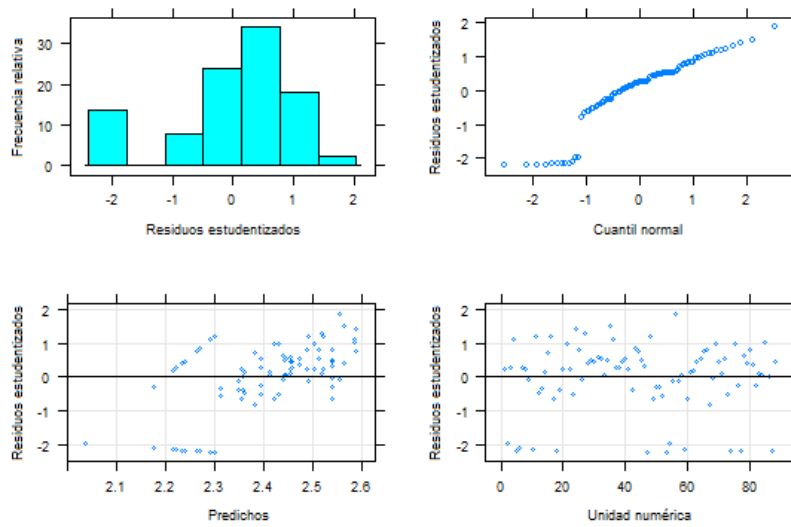
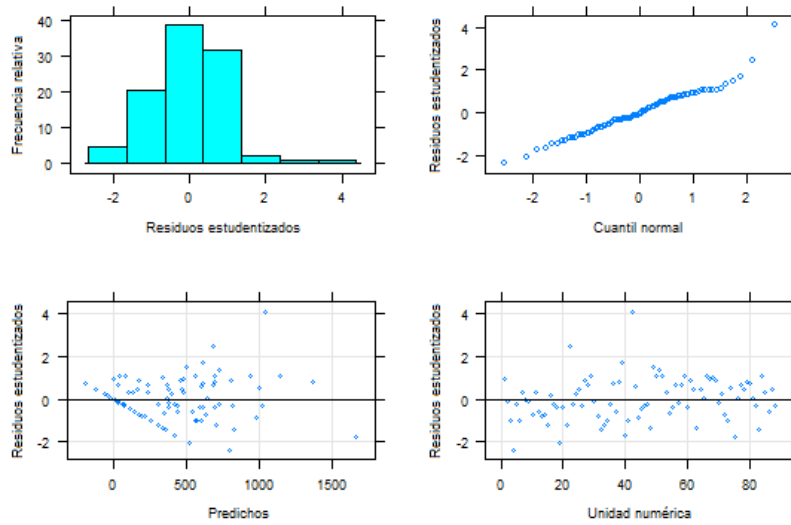


Figura 16 (continuación).

LA11



RC11

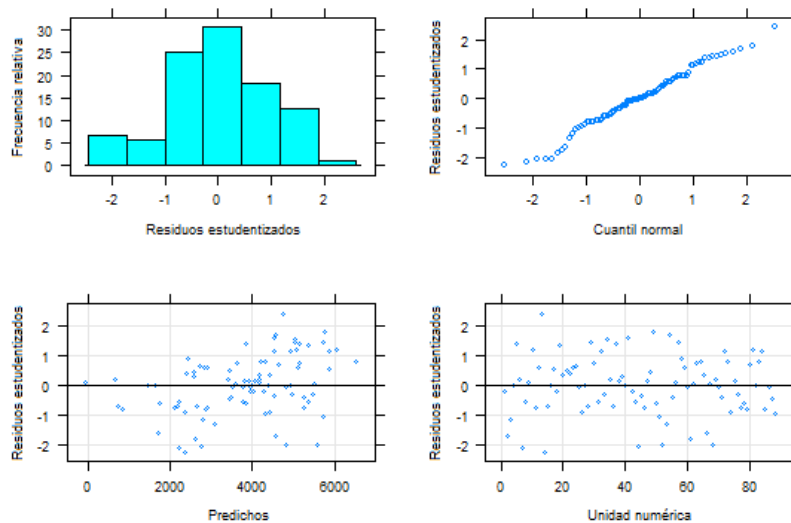


Figura 17. Histograma, gráfico Q-Q y diagramas de dispersión de los residuos estudentizados del carácter rendimiento (REN) en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

La predicción genética del efecto de las NIL para los caracteres ISE y REN a través del BLUP se muestra en las Tablas 4 y 5, respectivamente. De acuerdo con los valores de BLUP se estableció un ranking de genotipos por ambiente. De esta manera, fue posible ver que, en general, las isolíneas presentaron un comportamiento diferente dependiendo del ambiente de evaluación. El análisis por ambiente permitió observar que en LA11 los BLUP para ISE presentaron una gran desviación respecto de la media, variando entre -36,02 (Z536) y 13,78 (Z560) (Figura 18). Las NIL Z536, Z058 y Z545 fueron los genotipos con los valores más bajos de BLUP en dicho ambiente. Además, en dieciocho isolíneas los valores del predictor fueron inferiores a la

media del carácter (Tabla 3). Es importante destacar que las NIL con los valores más bajos de BLUP para ISE, Z536 y Z058, presentan introgresiones que cubren idénticas regiones de los cromosomas 2 y 3 (Figura 30). Por su parte, en LA12 los BLUP para ISE no mostraron desviación respecto de la media del carácter. Los genotipos con los predictores más bajos en este ambiente fueron Z058, Z042 y Z071. También, veintidós aislóneas registraron valores de BLUP menores a la media del ISE. En cambio, en RC11, diecisiete NIL presentaron valores inferiores a la media del carácter ISE siendo Z050, Z054 y Z058 los genotipos con los BLUP más bajos. Al igual que en LA12, los BLUP para ISE no mostraron desviación respecto de la media del carácter (Figura 18). Quince genotipos mostraron la misma tendencia en LA11, LA12 y RC11. Entre ellos, los predictores de las NIL Z042, Z050, Z054, Z058, Z059 y Z536 fueron inferiores a la media del ISE en sendos ambientes (Tabla 3). La NIL Z058 presentó uno de los menores valores de BLUP en cada uno de los ambientes considerados. De esta forma, el 63 % de los genotipos, incluyendo B73, presentaron un comportamiento diferencial dependiendo del ambiente. Al tomar como referencia el valor del predictor en el testigo susceptible, once aislóneas presentaron valores de BLUP menores que el correspondiente a B73 en todos los ambientes (Tabla 3). Cabe añadir que la correlación entre los BLUP para ISE en los distintos ambientes de expresión fue baja y, a excepción de LA12 y RC11, no significativa (Tabla 5).

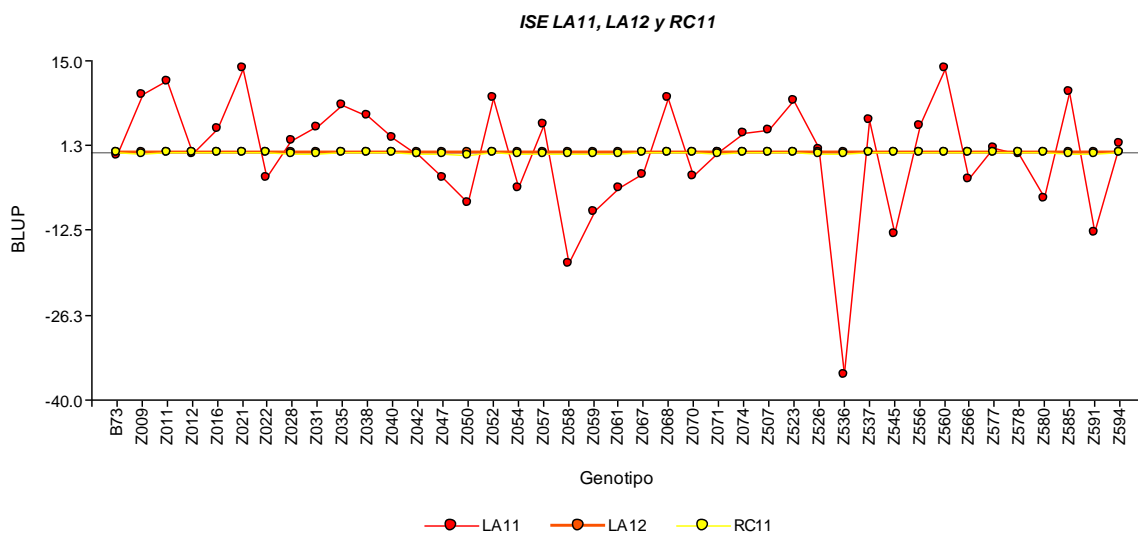


Figura 18. Mejor predictor lineal insesgado (BLUP) para el carácter índice de severidad de la enfermedad (ISE) en 41 genotipos evaluadas en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

Tabla 3. Efectos aleatorios del genotipo para el carácter índice de severidad de la enfermedad (ISE) en 41 genotipos evaluados en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11), La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

Ranking	LA11		LA12		RC11	
	NIL	BLUP	NIL	BLUP	NIL	BLUP
1	Z536	-36,02	Z058	-3,03 ⁻⁵	Z050	-3,55 ⁻¹
2	Z058	-17,97	Z042	-2,96 ⁻⁵	Z054	-2,16 ⁻¹
3	Z545	-13,00	Z071	-2,82 ⁻⁵	Z058	-1,77 ⁻¹
4	Z591	-12,81	Z009	-2,63 ⁻⁵	Z591	-1,70 ⁻¹
5	Z059	-9,40	Z059	-2,62 ⁻⁵	Z059	-1,58 ⁻¹
6	Z050	-8,03	Z523	-2,57 ⁻⁵	Z042	-1,53 ⁻¹
7	Z580	-7,36	Z050	-1,85 ⁻⁵	Z047	-1,53 ⁻¹
8	Z061	-5,76	Z028	-1,72 ⁻⁵	Z009	-1,29 ⁻¹
9	Z054	-5,69	Z035	-1,63 ⁻⁵	Z585	-1,22 ⁻¹
10	Z566	-4,16	Z054	-1,59 ⁻⁵	Z061	-1,00 ⁻¹
11	Z022	-4,06	Z022	-1,58 ⁻⁵	Z057	-9,29 ⁻²
12	Z047	-4,02	Z566	-1,17 ⁻⁵	Z031	-8,03 ⁻²
13	Z070	-3,84	Z038	-1,15 ⁻⁵	Z536	-4,45 ⁻²
14	Z067	-3,42	Z585	-1,15 ⁻⁵	Z028	-3,85 ⁻²
15	B73	-0,49	Z577	-1,04 ⁻⁵	Z526	-3,56 ⁻²
16	Z042	-0,20	Z556	-9,76 ⁻⁶	Z071	-3,06 ⁻²
17	Z578	-0,13	Z016	-8,53 ⁻⁶	Z016	-1,03 ⁻²
18	Z012	-0,03	Z031	-7,98 ⁻⁶	Z021	3,92 ⁻⁴
19	Z071	0,09	Z578	-3,34 ⁻⁶	Z507	3,92 ⁻⁴
20	Z526	0,57	Z526	-2,27 ⁻⁶	Z545	2,70 ⁻³
21	Z577	0,87	Z040	-2,93 ⁻⁷	Z523	1,97 ⁻²
22	Z594	1,55	Z536	-2,66 ⁻⁷	Z068	2,96 ⁻²
23	Z028	2,06	Z560	4,20 ⁻⁶	Z038	3,84 ⁻²
24	Z040	2,50	Z052	4,23 ⁻⁶	Z560	4,72 ⁻²
25	Z074	3,34	Z580	7,93 ⁻⁶	Z011	5,04 ⁻²
26	Z507	3,70	Z067	9,40 ⁻⁶	Z580	5,24 ⁻²
27	Z016	3,93	Z012	1,17 ⁻⁵	Z594	6,18 ⁻²
28	Z031	4,19	Z507	1,19 ⁻⁵	Z577	6,36 ⁻²
29	Z556	4,42	Z057	1,22 ⁻⁵	Z537	6,55 ⁻²
30	Z057	4,56	Z047	1,24 ⁻⁵	Z022	8,19 ⁻²
31	Z537	5,51	Z061	1,34 ⁻⁵	Z556	9,52 ⁻²
32	Z038	6,21	Z070	1,43 ⁻⁵	Z052	9,81 ⁻²
33	Z035	7,74	B73	1,61 ⁻⁵	Z012	1,12 ⁻¹
34	Z523	8,61	Z011	1,75 ⁻⁵	Z566	1,21 ⁻¹
35	Z068	9,03	Z591	1,98 ⁻⁵	Z070	1,25 ⁻¹
36	Z052	9,05	Z074	2,07 ⁻⁵	Z035	1,28 ⁻¹
37	Z009	9,42	Z537	2,10 ⁻⁵	B73	1,48 ⁻¹

Tabla 3 (continuación).

Ranking	LA11		LA12		RC11	
	NIL	BLUP	NIL	BLUP	NIL	BLUP
38	Z585	9,95	Z545	2,65 ⁻⁵	Z067	1,64 ⁻¹
39	Z011	11,62	Z021	3,11 ⁻⁵	Z040	1,72 ⁻¹
40	Z021	13,69	Z594	3,52 ⁻⁵	Z074	1,93 ⁻¹
41	Z560	13,78	Z068	3,78 ⁻⁵	Z578	1,97 ⁻¹

Ref.: NIL: líneas cuasi-isogénicas; BLUP: mejor predictor lineal insesgado.

Al igual que el ISE, el ranking de genotipos para el carácter REN varió dependiendo del ambiente de expresión. Los predictores para el carácter REN no mostraron dispersión en el ambiente LA11. Por el contrario, en RC11 los BLUP mostraron una gran desviación respecto de la media variando entre -1776,29 (Z591) y 2231,56 (Z545) (Figura 19). El análisis de los predictores por ambiente permitió clasificar a Z058, B73 y Z054 como los genotipos de mayor BLUP en LA11. Por su parte, en RC11 los genotipos de mayor BLUP fueron Z545, Z052 y B73 (Tabla 4). Veinte y veintiuna isolíneas fueron superiores a la media del carácter en LA11 y RC11, respectivamente. Además, trece genotipos, entre los que se destaca B73, con valores de BLUP superiores a la media del REN fueron comunes a ambos ambientes. Entre ellos, Z058 presentó uno de los mayores, sino el mayor, valor de BLUP en LA11 y RC11. De esta manera, los valores de BLUP en el 37 % de los genotipos fueron inconsistentes en los distintos ambientes de expresión. Al considerar el predictor del testigo susceptible como valor de referencia, sólo una y dos isolíneas presentaron valores de BLUP mayores que el correspondiente a B73 en LA11 y RC11, respectivamente (Tabla 4). Sin embargo, cabe señalar que el hecho que B73 sea altamente susceptible a MRC no implica que al considerar el rendimiento el desempeño de dicho genotipo sea el mismo que en ausencia de enfermedad. Por lo tanto, dado que se desconoce su performance en ausencia de enfermedad, es posible que B73 no sea una línea de referencia adecuada para establecer comparaciones relativas entre el rendimiento de dicho genotipo respecto al de las isolíneas en ambos ambientes. Cabe señalar que la correlación entre los BLUP para REN entre LA11 y RC11 fue positiva baja y significativa (Tabla 5). Por su parte, la pendiente del gráfico de dispersión para los caracteres ISE y REN en LA11, RC11 y al considerar un tercer ambiente de evaluación, LA12, fue de signo negativo (Figura 21). Sin embargo, la correlación entre los BLUP para los caracteres ISE y REN fue nula (LA11) o baja (RC11) y, en ambos casos, no significativa (Tabla 5, Figura 20).

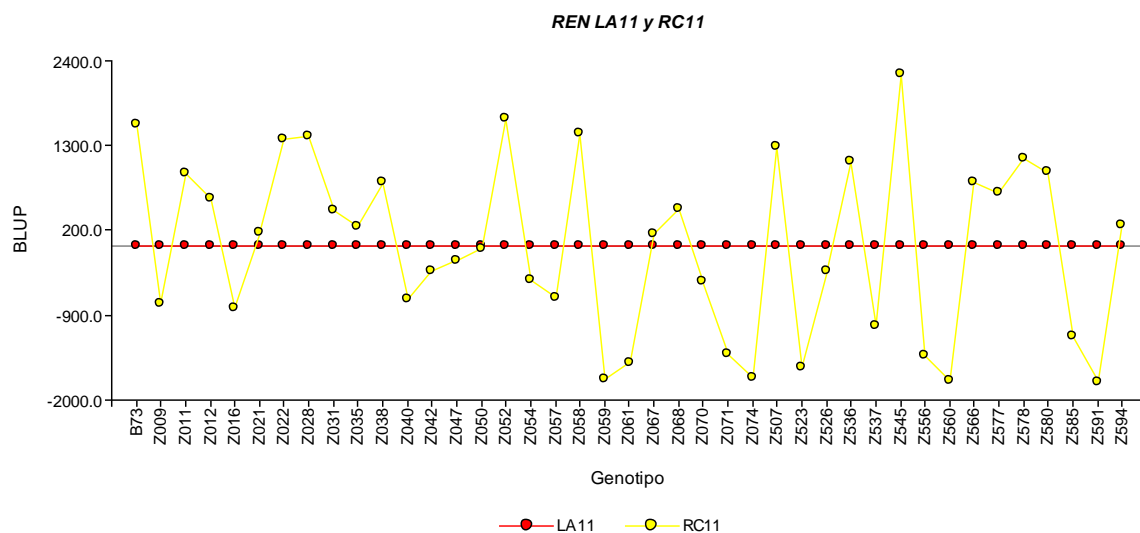


Figura 19. Mejor predictor lineal insesgado (BLUP) para el carácter rendimiento (REN) en 41 genotipos evaluados en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

Tabla 4. Efectos aleatorios del genotipo para el carácter rendimiento (REN) en 41 genotipos evaluados en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

Ranking	LA11		RC11	
	NIL	BLUP	NIL	BLUP
1	Z058	3,97 ⁻⁴	Z545	2231,56
2	B73	3,30 ⁻⁴	Z052	1642,66
3	Z054	2,16 ⁻⁴	B73	1574,62
4	Z594	1,94 ⁻⁴	Z058	1453,50
5	Z052	1,83 ⁻⁴	Z028	1414,77
6	Z061	1,49 ⁻⁴	Z022	1381,35
7	Z578	1,23 ⁻⁴	Z507	1279,58
8	Z040	1,22 ⁻⁴	Z578	1130,11
9	Z580	1,09 ⁻⁴	Z536	1089,53
10	Z585	1,00 ⁻⁴	Z580	966,91
11	Z028	9,64 ⁻⁵	Z011	932,06
12	Z035	8,22 ⁻⁵	Z038	825,22
13	Z016	7,68 ⁻⁵	Z566	818,74
14	Z591	7,28 ⁻⁵	Z577	698,51
15	Z011	7,04 ⁻⁵	Z012	613,96
16	Z022	4,32 ⁻⁵	Z068	475,87
17	Z057	4,28 ⁻⁵	Z031	458,25
18	Z038	3,57 ⁻⁵	Z594	259,52
19	Z577	1,12 ⁻⁵	Z035	239,18
20	Z012	1,97 ⁻⁶	Z021	179,20
21	Z526	-1,54 ⁻⁵	Z067	157,47

Tabla 4 (continuación).

Ranking	LA11		RC11	
	NIL	BLUP	NIL	BLUP
22	Z070	-3,66 ⁻⁵	Z050	-41,36
23	Z523	-4,40 ⁻⁵	Z047	-188,72
24	Z566	-7,08 ⁻⁵	Z526	-320,00
25	Z042	-7,95 ⁻⁵	Z042	-327,43
26	Z507	-7,98 ⁻⁵	Z054	-452,34
27	Z009	-8,03 ⁻⁵	Z070	-455,42
28	Z068	-8,95 ⁻⁵	Z057	-678,58
29	Z536	-9,22 ⁻⁵	Z040	-701,49
30	Z031	-9,62 ⁻⁵	Z009	-753,08
31	Z067	-9,62 ⁻⁵	Z016	-802,88
32	Z050	-9,81 ⁻⁵	Z537	-1042,17
33	Z537	-1,05 ⁻⁴	Z585	-1171,51
34	Z560	-1,19 ⁻⁴	Z071	-1408,71
35	Z021	-1,21 ⁻⁴	Z556	-1421,06
36	Z556	-1,48 ⁻⁴	Z061	-1516,98
37	Z071	-1,55 ⁻⁴	Z523	-1586,84
38	Z059	-1,92 ⁻⁴	Z074	-1707,93
39	Z545	-2,35 ⁻⁴	Z059	-1722,25
40	Z074	-2,43 ⁻⁴	Z560	-1747,55
41	Z047	-2,60 ⁻⁴	Z591	-1776,29

Ref.: NIL: líneas cuasi-isogénicas; BLUP: mejor predictor lineal insesgado.

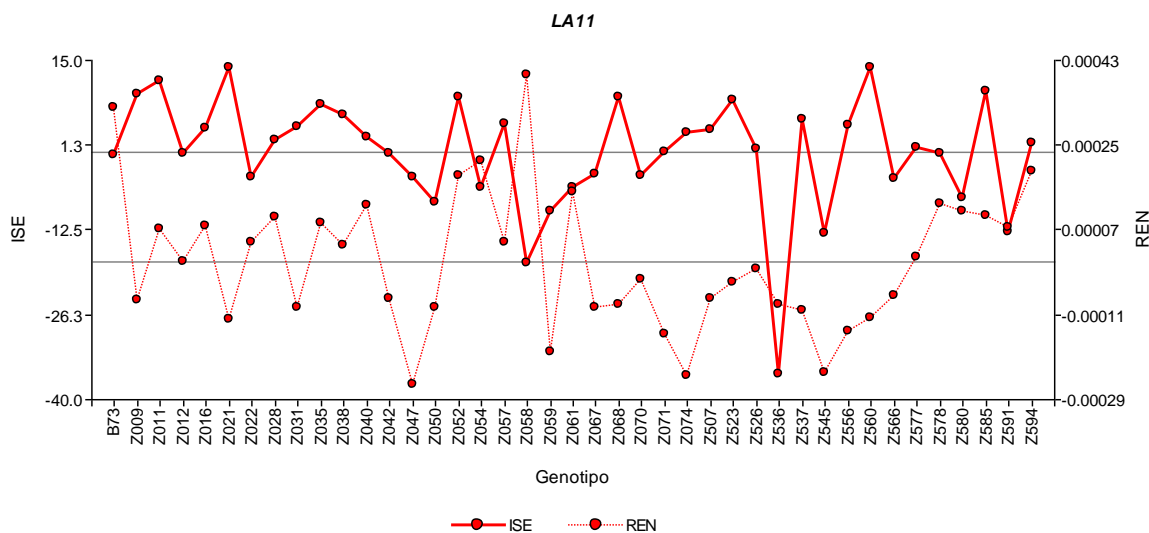


Figura 20. Mejor predictor lineal insesgado (BLUP) para índice de severidad de la enfermedad (ISE) y rendimiento (REN) obtenido de la evaluación de 41 genotipos en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

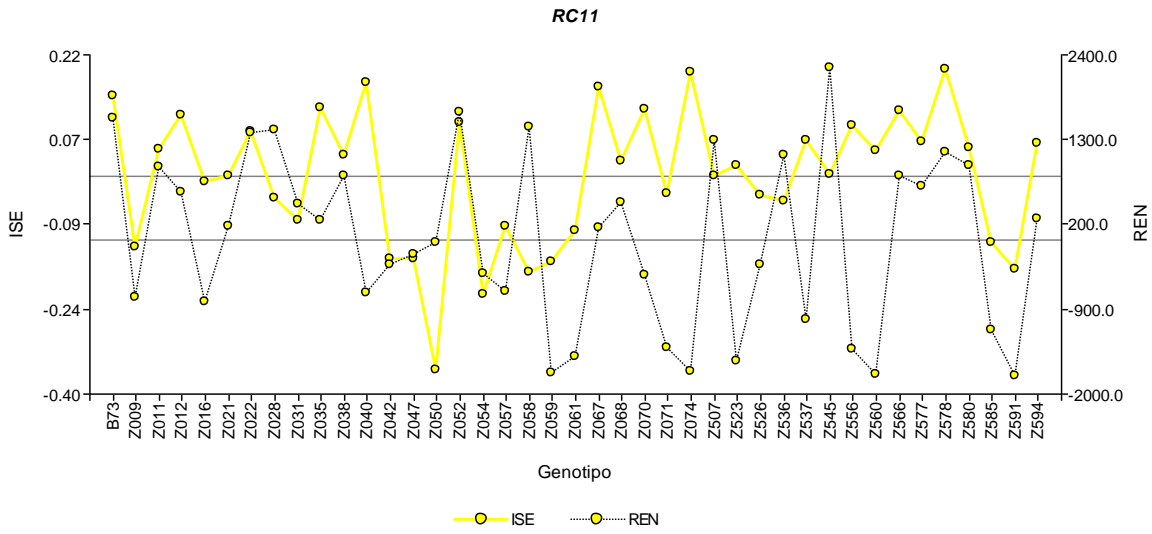


Figura 20 (continuación).

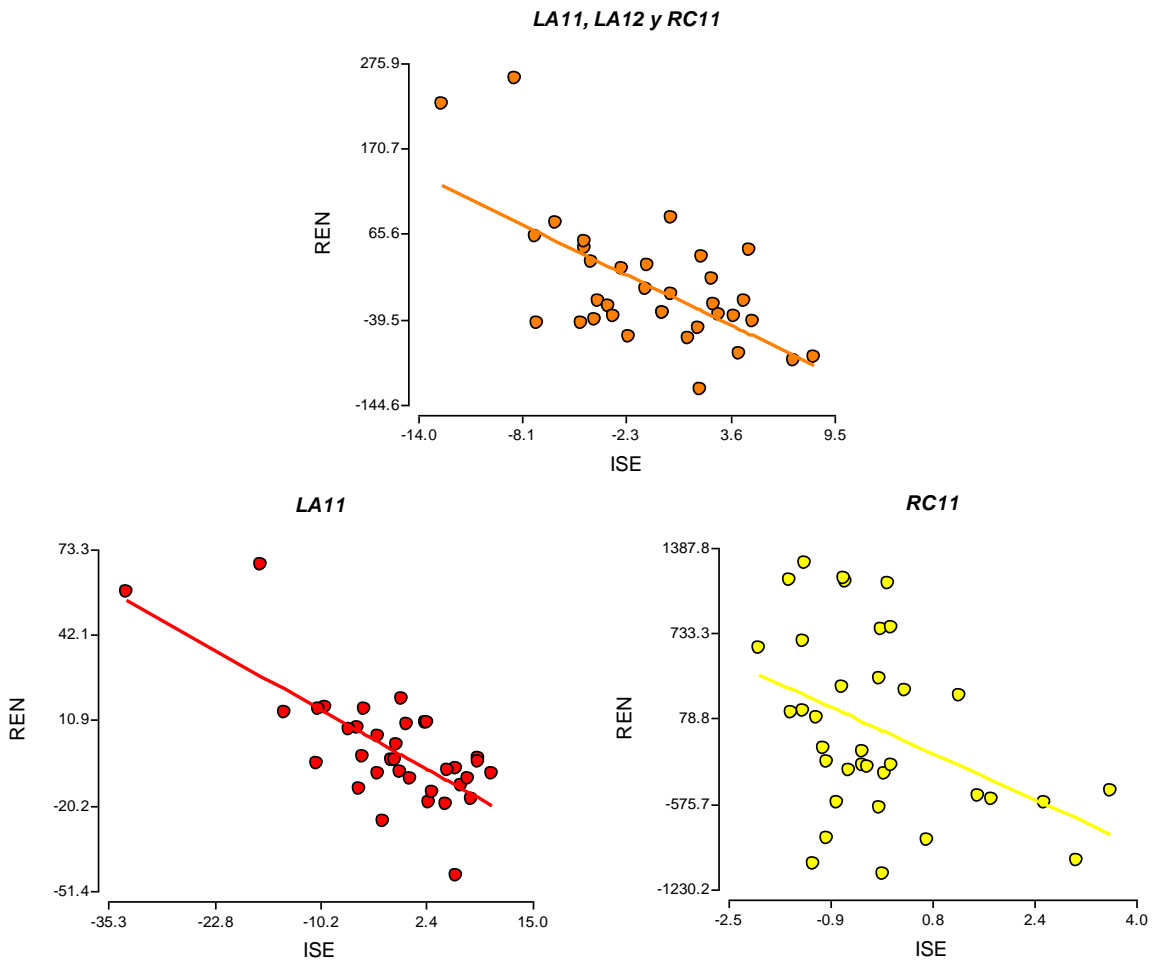


Figura 21. Diagramas de dispersión de los caracteres índice de severidad de la enfermedad (ISE) y rendimiento (REN) derivados de la evaluación de 41 genotipos en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

Tabla 5. Coeficientes de correlación entre los predictores del índice de severidad de la enfermedad (ISE) y el rendimiento (REN) para los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11), La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

Carácter	Ambiente 1	Ambiente 2	n	Pearson	p-valor
ISE	LA11	LA12	41	0,11	0,5082
	LA11	RC11	41	0,30	0,0607
	LA12	RC11	41	0,35	0,0243
REN	LA11	RC11	41	0,31	0,0475
ISE vs. REN	LA11	LA11	41	-0,05	0,7454
	RC11	RC11	41	0,22	0,1743

Ref.: LA11: La Aguada, campaña 2.011; LA12: La Aguada, campaña 2.012; RC11: Río Cuarto, campaña 2.011.

4.3. Estimación de componentes de varianza y heredabilidad

El ajuste de un modelo lineal mixto en el análisis por ambiente permitió observar importante variabilidad de ISE y REN en algunos ambientes. En cambio, en otros ambientes la magnitud de la componente residual para ISE y REN fue similar a la magnitud de la componente genética (LA11 y RC11). De este modo, la componente de varianza genética para ISE en LA11 representó, aproximadamente, el 44 % de la variabilidad observada. Por lo tanto, la heredabilidad del carácter ISE en dicho ambiente fue alta (Tabla 6). Por el contrario, en LA12 y RC11 la componente de varianza genética sugiere heredabilidad de carácter nula. Por su parte, los componentes de varianza genética para REN variaron sustancialmente entre LA11 y RC11 (0 al 55 % de la variabilidad total, respectivamente). En efecto, la heredabilidad del carácter REN en los ambientes LA11 y RC11 fue nula y alta, respectivamente (Tabla 7).

Tabla 6. Estimación de los componentes de varianza y de la heredabilidad en LA11 para índice de severidad de la enfermedad (ISE) en una colección de 40 NIL.

Parámetro	Componente
σ^2_{β}	626,5
$\sigma^2_{y(\beta)}$	3260,4
σ^2_{α}	18583,1
σ^2_e	20200,9
CV%	16,6
H ²	63,8

Tabla 7. Estimación de los componentes de varianza y de la heredabilidad en RC11 para rendimiento (REN) en una colección de 40 NIL.

Parámetro	Componente
σ^2_{β}	0,0
σ^2_{α}	3,4
σ^2_e	2,8
CV%	33,9
H ²	68,9

Considerando otros estudios cuyo procedimiento de inoculación es el mismo que el utilizado en el presente trabajo es posible observar que la magnitud de la componente de varianza del ambiente constituyó la principal componente de variación. Los resultados de análisis realizados en líneas endocriadas recombinantes (RIL) derivados del cruzamiento entre una línea *flint* (BLS14), resistente a MRC, y otra *dent* (Mo17), susceptible, fueron similares a los aquí obtenidos (Bonamico, 2.010). Sin embargo, a diferencia del presente estudio, la componente de la interacción genotipo-ambiente (GE) fue considerablemente mayor que la componente genética: 41 y 6 % de la variabilidad total, respectivamente. Así, aunque el valor de la heredabilidad para el índice de severidad de la enfermedad en aquellos ensayos cuyo procedimiento de transmisión se realizó de manera controlada fue moderado, el valor de heredabilidad combinando todos los ambientes mostró un valor bajo dada la importancia del efecto del ambiente y de la interacción GE en la expresión del carácter (Bonamico, 2.010; Bonamico *et al.*, 2.012). Por su parte, Borghi (2.012) observó que en materiales de generación temprana derivados del cruzamiento entre la línea LP116, tipo *flint* resistente a MRC, y la línea B73, susceptible a la enfermedad, la componente de varianza genética para índice de severidad de la enfermedad fue, en orden de magnitud, la segunda componente de variación luego de la componente de varianza ambiental relegando a la componente de interacción GE. Al igual que en el estudio anterior, la heredabilidad para ISE fue moderada ya sea en ambientes individuales o combinados.

La heredabilidad es una propiedad del carácter, la población, el ambiente y la forma de registro del fenotipo (Falconer y Mackay, 1.996). La transmisión de la enfermedad, en caracteres con QTL de efecto aditivo, implica un incremento de la heredabilidad derivada, principalmente, de la primacía de la componente de varianza genética. Este hecho es el resultado de la transcripción de un grupo de genes involucrados en la expresión del carácter. Así, la heredabilidad de la biomasa aérea y la fecha de floración en *Mimulus guttatus* fue mayor en plantas afectadas por

el virus del mosaico del pepino (CMV) que en plantas sanas (Carr *et al.*, 2.006). Además, la transmisión efectiva de la enfermedad reduce la componente de varianza del ambiente resultando en un incremento de la heredabilidad.

El éxito en la transmisión de una enfermedad virósica mediada por un vector depende del estadio de desarrollo de la planta, de la densidad del vector y del tiempo de inoculación del virus (Wang *et al.*, 2.006). La combinación de alta presión de inóculo, alta densidad del insecto vector y genotipos susceptibles a MRC en estados fenológicos juveniles promueven pérdidas elevadas del rendimiento (Di Renzo y Bonamico, 2.013, March *et al.*, 1.998).

En general, la transmisión del MRCV en ensayos de caracterización de genotipos para resistencia a MRC se realiza de modo natural. La inoculación natural resulta ventajosa para la evaluación de gran cantidad de materiales. No obstante, la confirmación de los resultados obtenidos requiere varios años como consecuencia de la variación en la incidencia y la severidad de la enfermedad a través del tiempo derivada de la fluctuación poblacional del insecto vector, los reservorios naturales del virus y las condiciones climáticas (Wang *et al.*, 2.006). La transmisión de la enfermedad mediante la utilización de túneles para el confinamiento del vector es una metodología muy útil ya que permite incrementar la densidad de delfácidos por unidad de área. Esta metodología aumenta la frecuencia de encuentro entre la planta y el insecto vector incrementando la probabilidad de inoculación del virus. No obstante, la efectividad de dicho procedimiento depende, fundamentalmente, de la densidad o proporción de insectos portadores del virus. Wang y colaboradores (2.006) determinaron el efecto de la densidad del vector en la tasa de transmisión del virus del enanismo estriado de negro del arroz, un virus del género *Fijivirus* causante del enanismo rugoso del maíz en China (Zhang *et al.*, 2.008). De esta manera, utilizando de diez a quince insectos por planta la incidencia de la enfermedad fue del 100 %, aproximadamente. Por el contrario, la incidencia fue moderada cuando la transmisión se realizó utilizando entre tres a cinco insectos por planta. De este modo, al ponderar el número de delfácidos por plántula utilizados para la transmisión de la enfermedad en el presente estudio lleva a considerar que dicha presión de inóculo no haya sido adecuada para lograr un resultado reproducible. Este panorama permitiría suponer la ocurrencia de escapes lo cual explicaría la heterogeneidad espacial observada en los distintos ambientes, principalmente en LA12 (Figura 13). Por

lo tanto, dicha presión de inóculo no habría sido óptima para transmitir la enfermedad debido a la prevalencia de componentes no genéticas (Tabla 6).

Mediante la implementación de una metodología de inoculación compleja que combinó la transmisión natural y controlada del virus del enanismo estriado de negro del arroz, Luan y colaboradores (2012) lograron una mayor efectividad en la transmisión de la enfermedad incrementando la densidad del insecto vector por unidad de área y reduciendo el efecto del ambiente. De este modo, determinaron que en una población de RIL derivadas del cruzamiento entre las líneas 90110 y Ye478, resistente y susceptible a la enfermedad, respectivamente, la componente de varianza genotípica fue la principal componente de variación. Dicha componente fue considerablemente mayor que las componentes de varianzas del ambiente y de la interacción GE. Así, la heredabilidad en sentido amplio para el índice de severidad de la enfermedad fue ostensiblemente alta.

Distintos factores, bióticos y abióticos, podrían explicar la preponderancia de la componente ambiental en el análisis. Por un lado, la presencia de avena en campos aledaños y como cultivo antecesor de las parcelas destinadas a los ensayos en los ambientes LA11 y LA12 podría haber sido determinante de un mayor nivel de expresión de enfermedad observado en ellos. Además, la diferencia temporal en los procesos de transmisión de los distintos ensayos derivó que, al momento de realizarse la inoculación en el ambiente RC11, los cultivos de avena de donde se colectaron las chicharritas presentaron un estado de madurez avanzado motivando la migración de los insectos vectores. Es importante destacar también que el estrés experimentado por los insectos, derivado de su traslado a las parcelas destinadas al ensayo, se haya traducido en un alto nivel de mortandad y esto en una transmisión deficiente del MRCV. Este hecho podría haber conducido al bajo nivel de expresión observado en RC11. También, la extensión o la longitud de los túneles de malla fina constituirían una barrera física a la transmisión efectiva de la enfermedad donde la probabilidad de transmisión de plantas distantes haya sido menor respecto a plantas cercanas a la suelta de insectos recolectados con redes de arrastre. Por último, poblaciones heterogéneas del MRCV en los distintos ambientes de expresión podrían contribuir a explicar la primacía de la componente ambiental y de la interacción GE en el análisis.

Por otro lado, el estrés producto de la sequía, de la caída de granizo, de la competencia con malezas durante los primeros estadios de desarrollo del cultivo y del ataque de insectos en los ambientes LA11 y LA12 y las distintas fechas de siembra y registros pluviométricos en los diferentes ambientes podrían haber influido también en este sentido. La influencia de distintos factores de estrés abiótico puede afectar la interacción planta-patógeno y, de esta manera, modificar la expresión de la enfermedad. El estrés hídrico, a un nivel subumbral de daño irreversible, puede predisponer a la planta a ataques de patógenos (Bostock *et al.*, 2.014). En maíz, particularmente durante su emergencia, puede predisponer a las plántulas al virus del MRC (Satorre *et al.*, 2.003). Olson y colaboradores (1.990) determinaron que los efectos del estrés por sequía y de la infección por virus del mosaico del enanismo del maíz sobre distintos caracteres de la planta y espiga fueron aditivos. De esta manera, dadas las fechas de siembra y emergencia, los distintos registros pluviométricos y la diferencia en la distribución del ISE en LA11 y LA12 es factible que el estrés hídrico durante la siembra y emergencia haya sido uno de los factores contribuyentes a las diferencias observadas en el patrón de respuesta de los genotipos en uno u otro ambiente. La concurrencia de estos factores, sumado a las diferencias en la transmisión de la enfermedad, podrían haber sido las causas que dieron lugar a la heterogeneidad espacial observada dentro de ambientes y del elevado nivel de expresión en los ensayos LA11 y LA12 respecto a RC11.

La detección precisa de un QTL requiere de una evaluación fenotípica precisa. Por esta razón, la caracterización fenotípica es clave en el análisis de QTL. Dicha caracterización está estrechamente vinculada con la heredabilidad del carácter bajo estudio. La heredabilidad del carácter varía de acuerdo con la calidad de la información fenotípica (Boopathi, 2.013). De esta manera es importante destacar que la evaluación del comportamiento de los genotipos frente a MRC es compleja debido a la variedad de síntomas que, combinados, componen el grado de severidad de la enfermedad. Es interesante también subrayar que dada su complejidad dicha caracterización fenotípica impactará en el valor de heredabilidad.

4.4. Análisis de la interacción genotipo-ambiente

En general, las isolíneas presentaron un comportamiento diferencial dependiendo del ambiente de evaluación (Figura 22). Este aspecto, sumado a la baja correlación de los BLUP

para ISE entre los distintos ambientes de evaluación, revela la baja consistencia en la respuesta de las NIL a través de ambientes.

La magnitud de la interacción GE está íntimamente ligada con la magnitud del efecto del ambiente (Coutiño-Estrada and Vidal-Martínez, 2.006). El efecto marcado del ambiente y de la interacción GE lograrían la expresión diferencial de los genotipos a través de ambientes (Balzarini *et al.*, 2.005). Debido a que la interacción GE implica diversidad genotípica como respuesta adaptativa a las condiciones del ambiente, la adopción de una estrategia que involucre distintos ambientes en la selección de germoplasma posibilitaría el desarrollo de cultivares con diferentes patrones adaptativos (Coutiño-Estrada y Vidal-Martínez, 2.006; Annicchiarico, 2.007, 2.014). De esta manera, dado el impacto del ambiente y de la interacción GE en la respuesta a MRC, la selección de materiales tolerantes a la enfermedad con adaptación específica requiere de la evaluación de germoplasma en ensayos multiambientales.

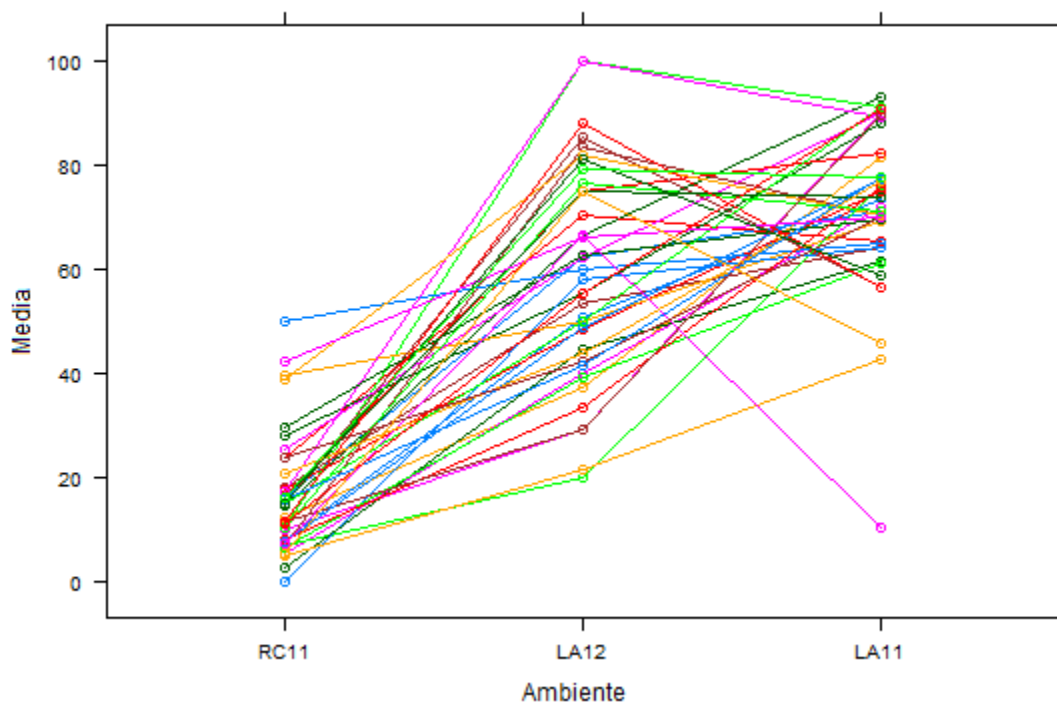


Figura 22. Gráfico de puntos para el índice de severidad de la enfermedad (ISE) de 41 genotipos evaluados en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11). El gráfico muestra interacción GE con cambio de rango.

Los modelos de regresión por sitio o SREG permiten determinar patrones de respuesta genotípica a través de ambientes (Crossa, 2.012). Estos modelos absorben el efecto del ambiente

y expresan la respuesta en función de los efectos del genotipo y de la interacción GE (Balzarini *et al.*, 2.005). Los gráficos biplot GGE (Yan *et al.*, 2.000) permiten visualizar patrones de interacción y posibilitan la identificación de mega-ambientes así como la selección de cultivares estables y de alto rendimiento (Yan *et al.*, 2.001; Balzarini *et al.*, 2.005). Por esta razón, dada la importancia del efecto del ambiente y la presencia de interacción GE, el modelo biplot GGE es el que mejor se ajusta al estudio de ensayos multiambientales.

La Figura 23 presenta el biplot GGE obtenido a partir de la evaluación de la colección de líneas de introgresión en tres ambientes. Dicho biplot se modeló utilizando la media del carácter ISE. De esta manera fue posible observar que, en total, las dos primeras componentes principales (CP) del biplot explicaron el 85,5 % de la variación debida a la interacción GGE. En el gráfico se observa que los genotipos ubicados en el vértice del polígono constituyeron las isolíneas de comportamiento extremo, de mayor respuesta a MRC. En cambio, aunque de menor respuesta, las NIL encerradas dentro del polígono fueron más estables en los distintos ambientes de expresión. El trazado de rectas que cruzan el origen, perpendiculares a los lados del polígono, permitió dividir el plano en sectores. Los ambientes, representados como vectores, quedaron incluidos en distintos sectores del polígono. Los genotipos ubicados en el vértice de un sector del polígono tuvieron los menores valores de ISE en el o los ambientes comprendidos dentro de ese mismo sector. De este modo, la isolínea Z536 presentó el menor ISE promedio en el ambiente LA11. Por su parte, los genotipos Z058 y Z042 registraron los menores ISE promedio en los sectores que incluyeron a los ambientes RC11 y LA12, respectivamente. En coincidencia con dicho biplot, solo una isolínea de las citadas con anterioridad, Z536, presentó el menor BLUP para ISE en el mismo ambiente dónde constituyó un genotipo vértice (Tabla 3). Considerando desempeño y estabilidad, Z058 fue la isolínea más cercana al genotipo ideal, esto es, el genotipo de menor ISE y mayor estabilidad. En cambio, Z536 y Z042 presentaron adaptación a ambientes específicos: LA11 y LA12, respectivamente, aunque el comportamiento de Z042 fue más estable (CP2 cercana a cero). Por el contrario, los genotipos vértice cuyos sectores no incluyeron ambiente alguno, es decir, de posición opuesta a los ambientes de evaluación, tuvieron los mayores ISE promedio. De esta forma, Z068 tuvo el mayor ISE promedio en los ambientes LA11, LA12 y RC11. El genotipo Z021 le siguió en orden de magnitud dentro de este sector aunque, por su cercanía en el biplot, ambas NIL presentaron comportamientos similares. Este aspecto se refleja en los altos valores de BLUP observados para ellas (Tabla 3).

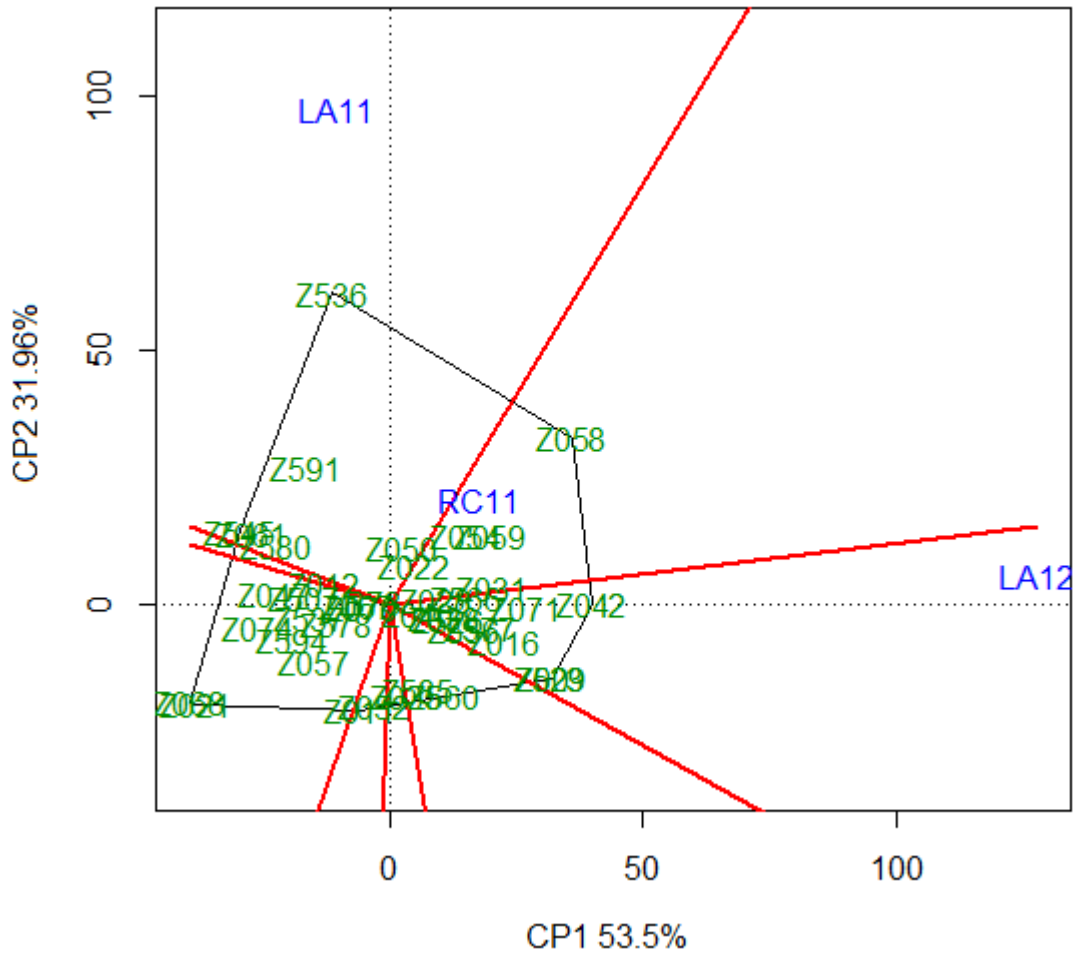


Figura 23. Biplot GGE para el índice de severidad de la enfermedad (ISE) derivado de la evaluación de 41 genotipos en los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11).

Los vectores trazados en el biplot permiten considerar distintas propiedades de los ambientes. La longitud de un vector es una medida de la habilidad discriminadora de un ambiente. De este modo, la habilidad discriminadora de los ambientes LA11 y LA12 fue considerablemente mayor que RC11 (Figura 24). El ambiente RC11 no permitió diferenciar el comportamiento de las distintas isolíneas. La baja habilidad discriminadora de RC11 es el resultado de una baja expresión de la enfermedad lo cual a su vez se refleja en el mapa de calor donde la intensidad de color de RC11 fue baja (Figura 13). Por otra parte, el coseno del ángulo formado por los vectores de dos ambientes permite inferir acerca de la correlación entre los mismos. Así, se observó que la correlación entre los ambientes LA11 y LA12 fue baja o nula. Sin embargo, la correlación entre cada uno de estos ambientes y RC11 fue moderada y positiva. Al considerar la correlación entre los valores de BLUP para ISE entre los ambientes LA11 y LA12 y entre

estos y RC11 fue posible establecer cierta correspondencia con lo observado en el biplot GGE (Tabla 5).

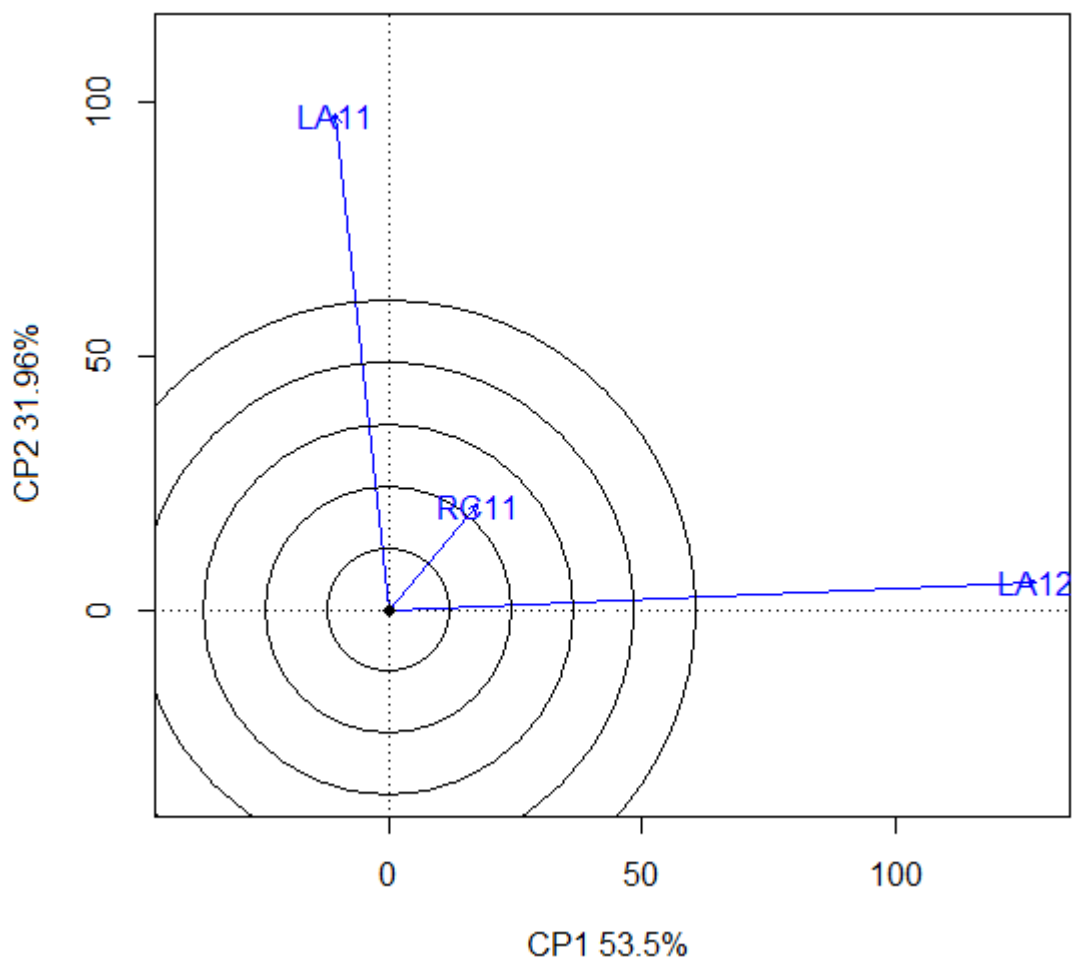


Figura 24. Biplot GGE con los vectores de los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11); La Aguada, campaña 2.012 (LA12) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11). El coseno del ángulo que forman dos vectores permite inferir acerca de la correlación entre los ambientes en cuestión. El biplot no contiene la representación de los genotipos.

4.5. Caracterización genotípica y mapa de ligamiento

La información genotípica derivada del análisis de 728 marcadores moleculares reveló que 554 SNP (76,1 %) fueron polimórficos. Además, ninguna NIL presentó el mismo perfil genético (Tabla 8).

Tabla 8. Estadística descriptiva de los datos de marcadores SNP.

Resumen	Casos
NIL	40
NIL duplicadas	0
Número de SNP	728
SNP monomórficos (%)	23,9
SNP polimórficos (%)	76,1

El análisis permitió determinar que el 94,65 y 4,65 % de los alelos de la colección de líneas de introgresión derivaron de la línea B73 y de *Zea mays* spp. *parviglumis*, respectivamente (Tabla 9). La frecuencia alélica esperada de una población en su cuarta generación de retrocruza (BC₄) es 96,87 % de alelos provenientes del parental recurrente y 3,13 % de alelos procedentes del parental donante. Se observa entonces que la frecuencia alélica en la colección de líneas de introgresión es similar a la esperada aunque ligeramente desviada hacia la contribución del parental donante en detrimento de la contribución del recurrente. La desviación de la frecuencia alélica esperada puede ser el resultado del efecto de error de muestreo debido a que la colección de NIL del presente estudio es una muestra de una población de isolíneas. Por otra parte, los datos faltantes representaron menos del 1 % del total de datos analizados (Figura 25). Siete marcadores, entre ellos PZA02823.1, PZA00525-17, PZA03255.1, PZA00801.1, PZA01680-3, PZA03235.1 y PHM4341-42, presentaron más del 10 % de datos faltantes (Tabla 10). Sin embargo, ningún genotipo registró más del 10 % de los mismos. El genotipo con la mayor proporción de datos faltantes fue Z011 (6,9 %) (Figura 25).

Tabla 9. Descripción genotípica de la colección de líneas de introgresión.

Cr	BB	AA	AB	NA
%				
1	3,0	95,2	1,3	0,5
2	5,5	92,3	1,3	0,9
3	4,0	91,4	3,9	0,7
4	4,4	93,1	1,9	0,7
5	3,2	92,8	3,3	0,8
6	4,9	91,6	3,3	0,2
7	2,5	95,6	1,1	0,8
8	2,9	95,6	1,1	0,4

Tabla 9 (continuación).

Cr	BB	AA	AB	NA
	%			
9	3,2	93,8	2,0	1,0
10	2,6	94,8	1,7	1,0
Total	3,6	93,6	2,1	0,7

Ref.: BB: homocigota para alelos derivados de *Zea mays* spp. *parviglumis*, AA: homocigota para alelos derivados de B73, AB: heterocigota, NA: valores faltantes.

Tabla 10. Descripción de los valores faltantes para datos de marcadores SNP.

SNP	Cr	cM	NA (%)
PZA02823.1	1	133,9	10,0
PZA00525-17	2	5,7	20,0
PZA03255.1	3	101,4	25,0
PZA00801.1	5	57,3	10,0
PZA01680-3	5	127,2	10,0
PZA03235.1	9	56,7	22,5
PHM4341-42	10	46,7	10,0

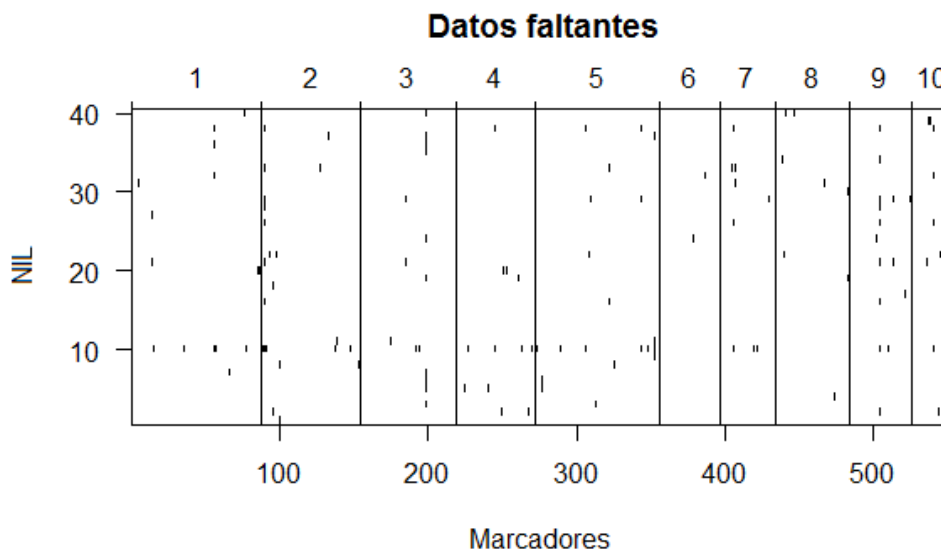


Figura 25. Datos genotípicos faltantes por aislón, marcador y cromosoma.

Las Figuras 26 y 27 presentan el mapa de ligamiento. El mapa de la colección de LI presentó una longitud total de genoma de 1395,8 cM distribuido en diez grupos de ligamiento. Cada

grupo mostró una longitud promedio de 139,6 cM con un rango que varió entre 101,9 (cromosoma 10) y 202,4 cM (cromosoma 1) (Tabla 11). El número promedio de SNP por grupo de ligamiento fue 56 con un mínimo de 30 (cromosoma 10) y un máximo de 88 SNP (cromosoma 1). Además, la distancia media entre SNP fue de 2,6 cM mientras que la media del percentil 95 de las distancias entre SNP en el genoma de la colección de LI fue de 9,9 cM.

Disponer de una densidad de marcadores óptima constituye un aspecto de gran importancia en el mapeo de QTL. En la metodología de análisis por marcador individual cuanto mayor es la distancia entre marcadores, menor es la probabilidad de detectar un QTL debido al incremento de la probabilidad de recombinación entre el marcador y el QTL. De esta manera, la magnitud del efecto de un QTL es subestimado. El desarrollo de un mapa con una alta cobertura de marcadores, es decir, a intervalos menores de 15 cM, permite minimizar dicho inconveniente (Collard *et al.*, 2.005). De esta forma, si bien es posible observar algunas brechas entre marcadores, el mapa genético presentó una cobertura aceptable (Figuras 27 y 28).

Tabla 11. Caracterización de los grupos de ligamiento en función de los marcadores SNP utilizados.

Cr	N° SNP	Longitud	Distancia	Distancia
			entre SNP*	entre SNP†
cM				
1	88	202,4	2,3	7,7
2	67	154,9	2,4	8,3
3	64	154,7	2,2	8,3
4	54	141,1	2,7	12,1
5	83	153,4	1,9	10,6
6	41	109,7	2,6	8,1
7	39	135,0	2,8	15,5
8	51	127,9	2,6	9,8
9	43	114,8	2,7	10,2
10	30	101,9	3,5	8,4
Total	560	1395,8	2,6	9,9

Ref.: *Promedio, †percentil 95.

Mapa de Ligamiento

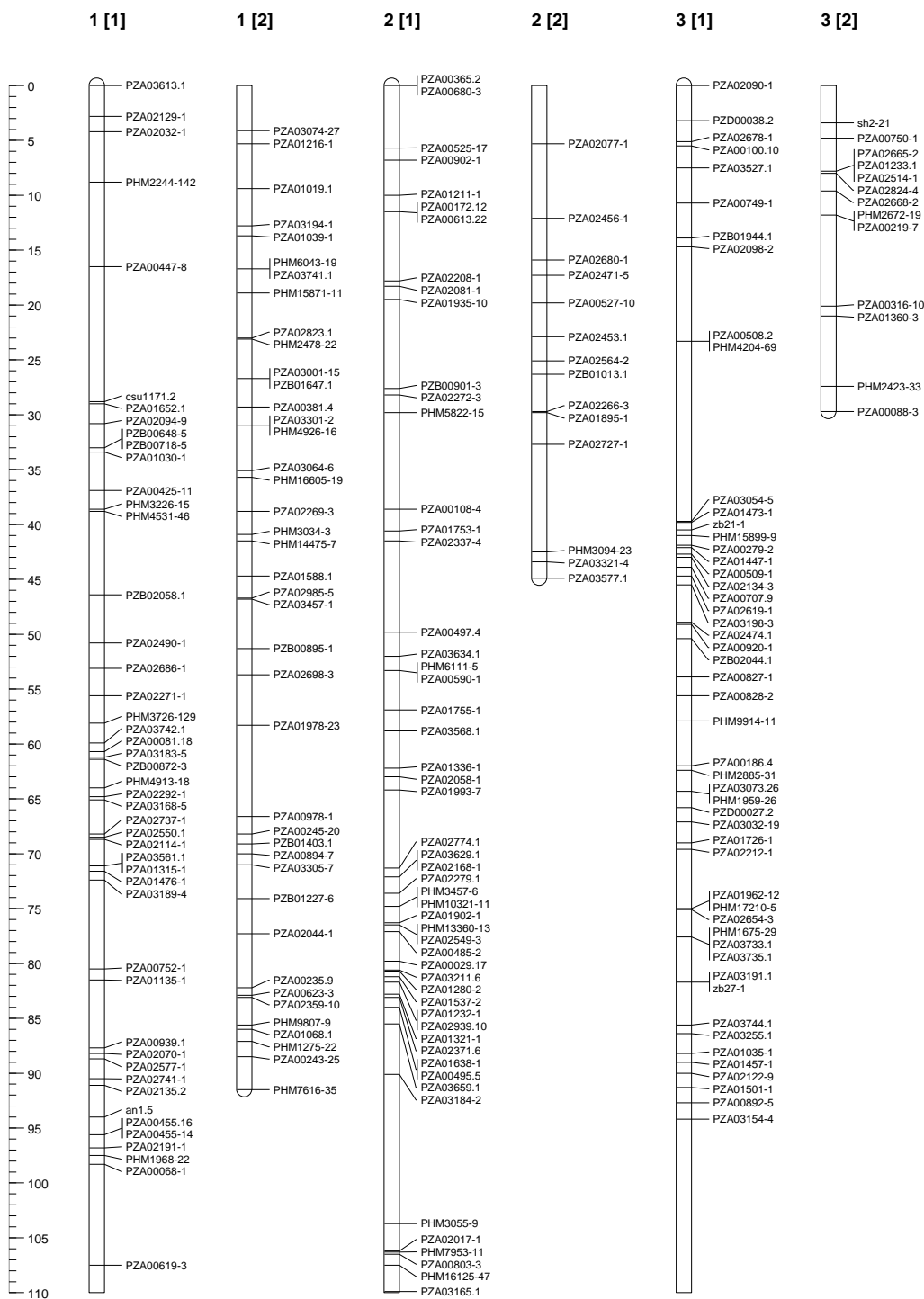


Figura 26. Mapa de ligamiento de la colección de líneas de introgresión.

Mapa de Ligamiento

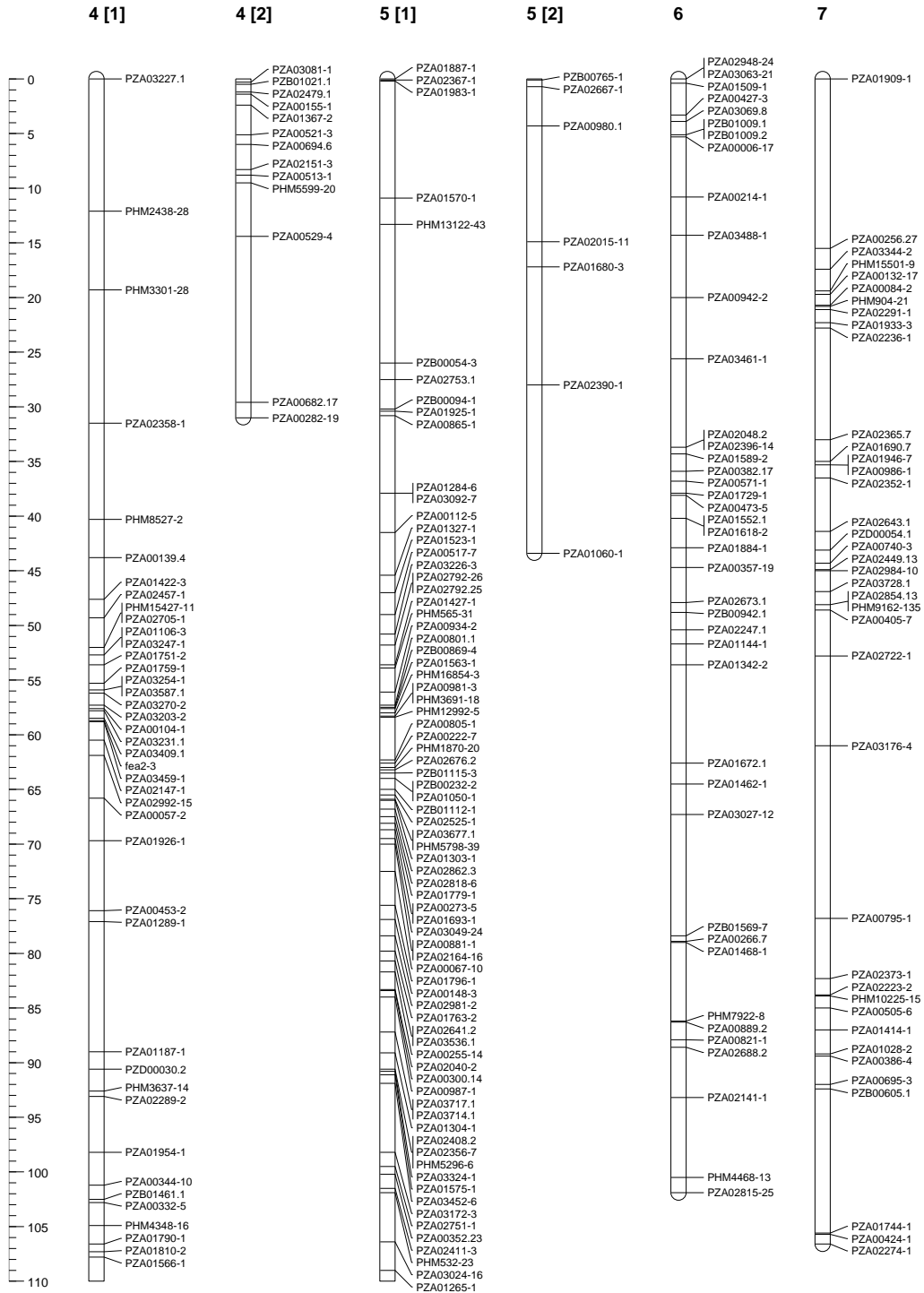


Figura 26 (continuación).

Mapa de Ligamiento

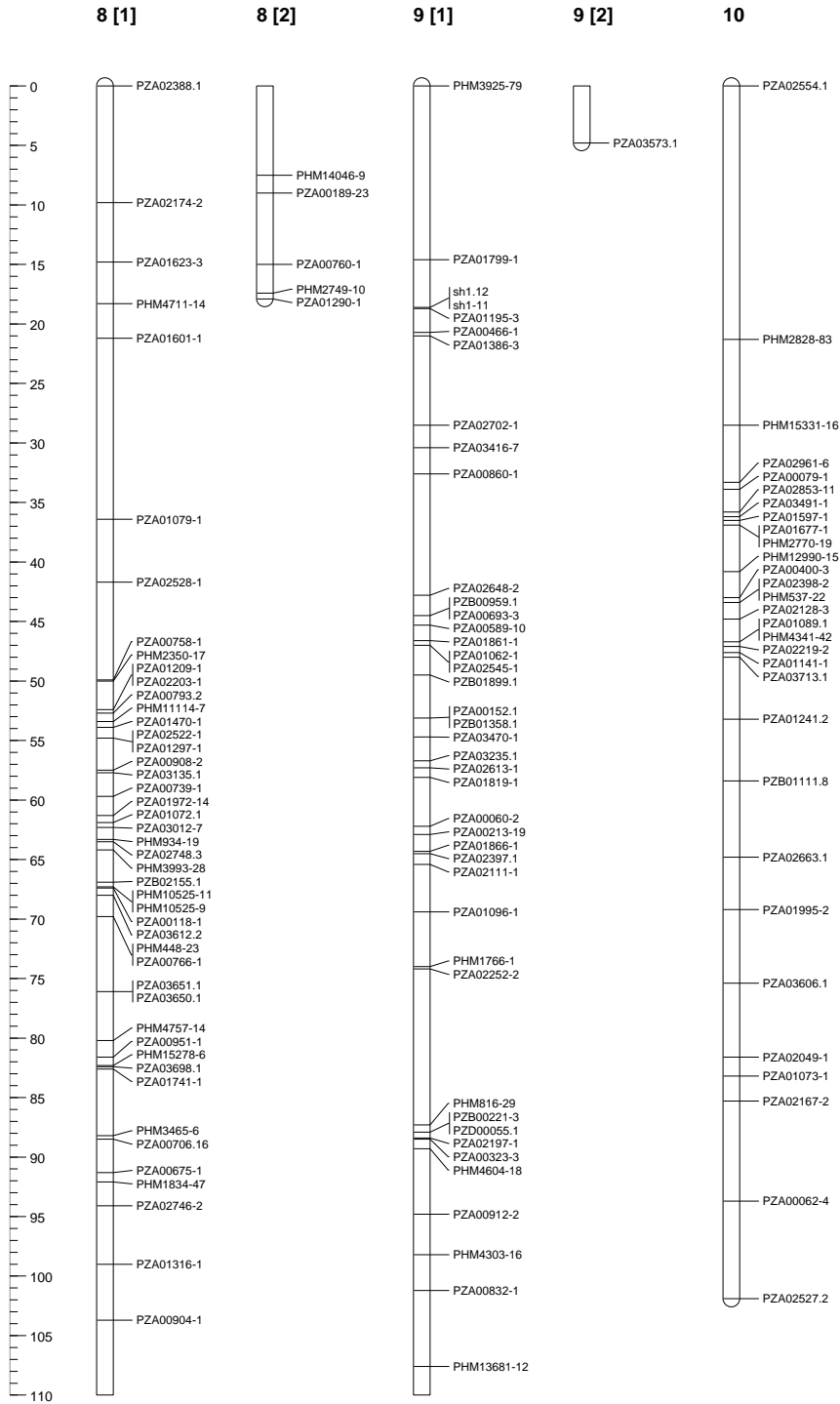


Figura 26 (continuación).

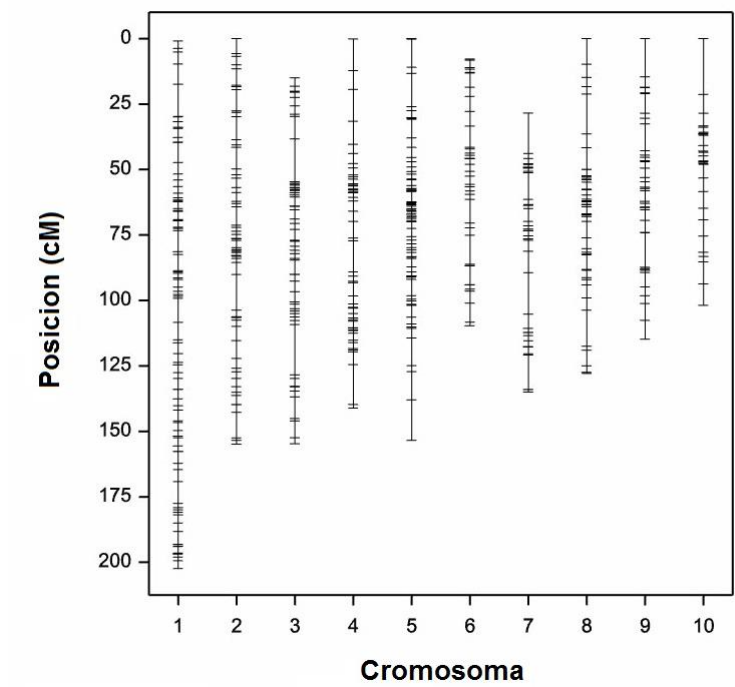


Figura 27. Mapa de ligamiento de la colección de líneas de introgresión.

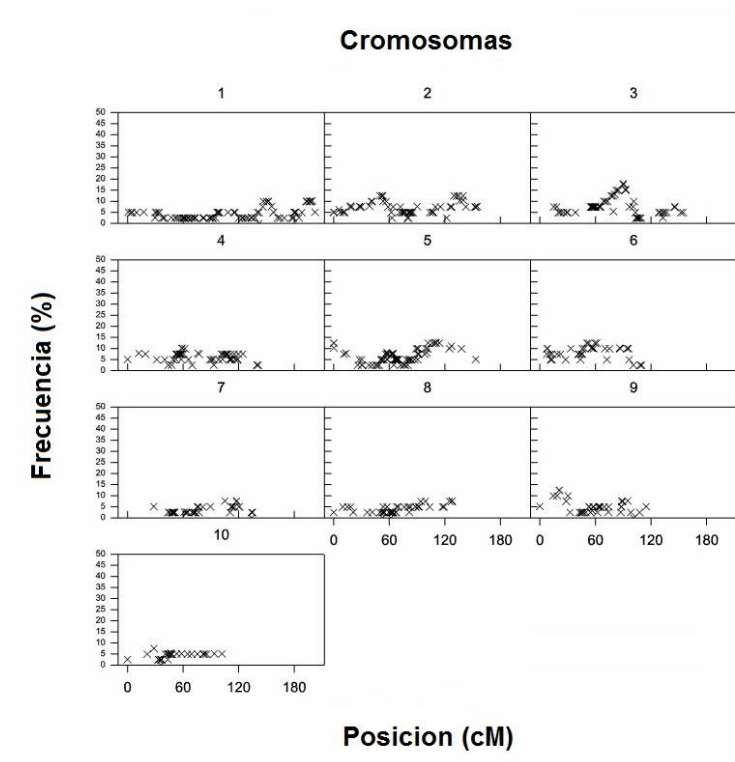


Figura 28. Posición y la cobertura de los marcadores SNP analizados.

La precisión en la detección de un QTL no sólo depende del nivel de saturación del mapa de ligamiento sino también de la calidad de la información genotípica. Los errores de genotipificación producen una distorsión en el mapa genético lo que trae consigo una reducción en la precisión de detección de un QTL. La probabilidad de ocurrencia de recombinaciones dobles en intervalos cortos es baja. Por ello, en mapas genéticos de alta densidad la detección de dichos eventos puede considerarse errores de genotipificación (Broman y Sen, 2.009). También podrían indicar problemas en el ordenamiento de los marcadores. La Tabla 12 presenta las recombinaciones dobles detectadas en la colección de LI para un LOD mayor a cinco. Las aislneas con mayor cantidad de recombinaciones dobles fueron Z507 (9) y Z054 (7). Por su parte, los cromosomas con mayor número de eventos de recombinación doble fueron, en orden creciente, los cromosomas 3 (5), 5 (7) y 6 (8) (Figura 29). De esta manera es aconsejable, en el caso de detectar un QTL en una región con un número elevado de recombinaciones dobles, revisar la información genotípica o repetir el análisis de los marcadores implicados (Broman y Sen, 2.009).

Tabla 12. Número de recombinaciones dobles en NIL con al menos un evento doble recombinante.

Cr	Z009	Z052	Z058	Z507	Z011	Z054	Z071	Z594	Z585	Total
2				4						4
3	2		2		1					5
5		1		1		3		2		7
6				2	1	4	1			8
8									2	2
9				2						2
Total	2	1	2	9	2	7	1	2	2	28

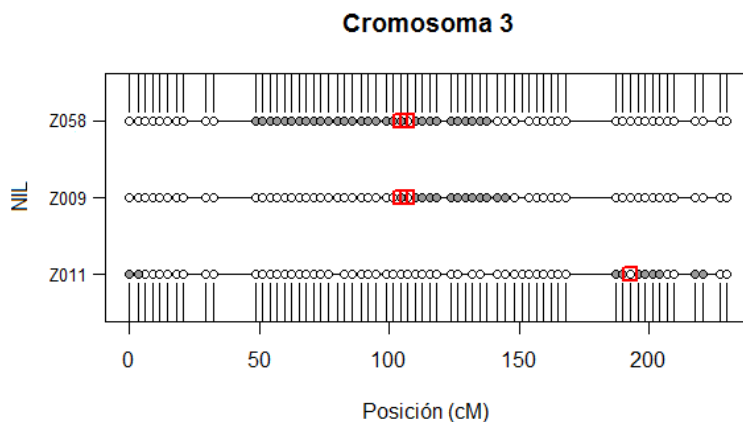


Figura 29. Genotipo gráfico de las aislneas con eventos de recombinación doble en los cromosomas 3, 5 y 6. Referencias: Círculo negro: homocigota para los alelos provenientes de *Zea mays* spp. *parviglumis*, círculo blanco: homocigota para los alelos provenientes de B73, círculo gris: heterocigota; cuadrado rojo: posible error de genotipificación.

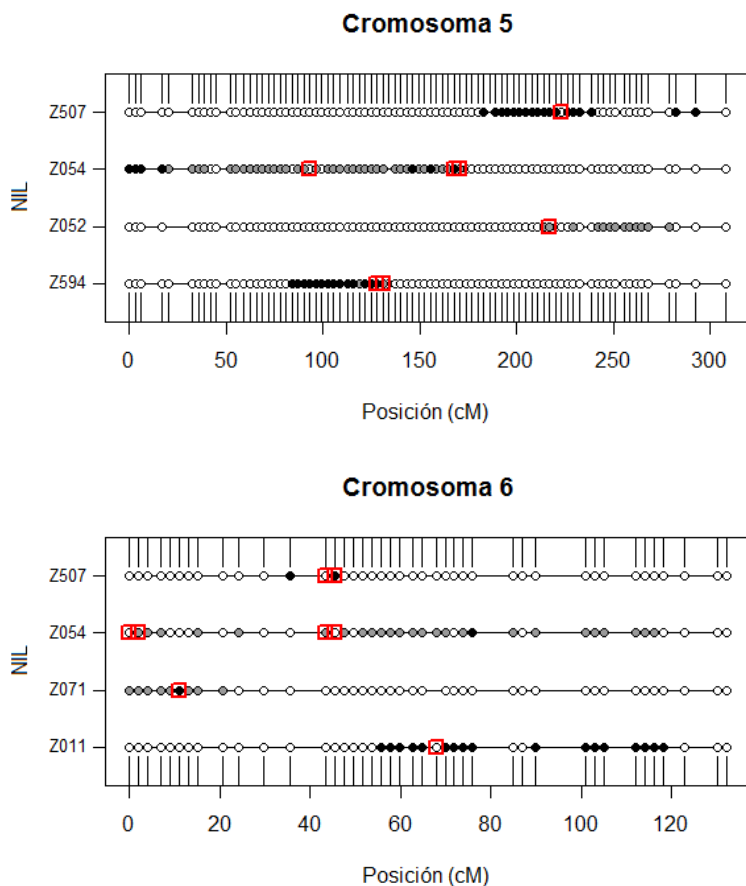


Figura 29 (continuación).

La Tabla 13 resume la información genotípica de las isolíneas incluidas en el análisis. En promedio, las NIL de la colección de LI presentaron tres introgresiones aproximadamente las cuales resultaron caracterizadas por 16 marcadores SNP. La longitud media de dichas introgresiones fue de 15,9 cM con un rango de 0,1 a 58,8 cM. Cada NIL representó, en promedio, el 4,8 % del genoma de teosinte siendo la cobertura total de 1,6 veces el genoma de *Zea mays* spp. *parviglumis*. La proporción del genoma de teosinte en NIL derivadas mediante tecnología de dobles haploides (BC₄DH) fue menor que en aquellas derivadas de autofecundación (BC₄S₂) (Figura 30).

Tabla 13. Descripción genotípica de las NIL que integran la colección de LI.

Generación	N° NIL	N° Int.*	Teo. (%)*	Het. (%)*	Hom. (%)*	Cobertura
BC ₄ S ₂	25	2,8	4,6	1,7	3,0	1,1
BC ₄ DH	15	3,5	5,0	0,1	4,9	0,5

Ref.: *Promedio, Int.: introgresiones.

La colección de LI está formada por isolíneas derivadas del cruzamiento entre un parental donante, *Zea mays* spp. *parviglumis*, con un alto nivel de heterocigosis por provenir de una población de polinización libre y un parental recurrente, la línea B73 de maíz, con un alto nivel de homocigosis producto de sucesivas autofecundaciones. Los híbridos derivados de dicho cruzamiento fueron sometidos a retrocruzamientos sucesivos. Luego de cuatro ciclos de retrocruzamientos los híbridos siguieron distintas metodologías de fijación de *loci* segregantes. De esta manera, una parte de los híbridos siguió dos ciclos de autofecundaciones sucesivas y otra parte siguió una metodología de obtención de dobles haploides. Así, las isolíneas de la colección de LI provienen de dos híbridos, uno sometido a un método de retrocruzamientos sucesivos seguido de dos ciclos de autofecundaciones y el otro a la misma metodología de retrocruzamientos sucesivos seguido de un procedimiento de obtención de dobles haploides. Por esta razón, resultó de interés inferir cualquier correlación genética entre estas líneas que permitiera determinar la existencia de una posible estructura genética.

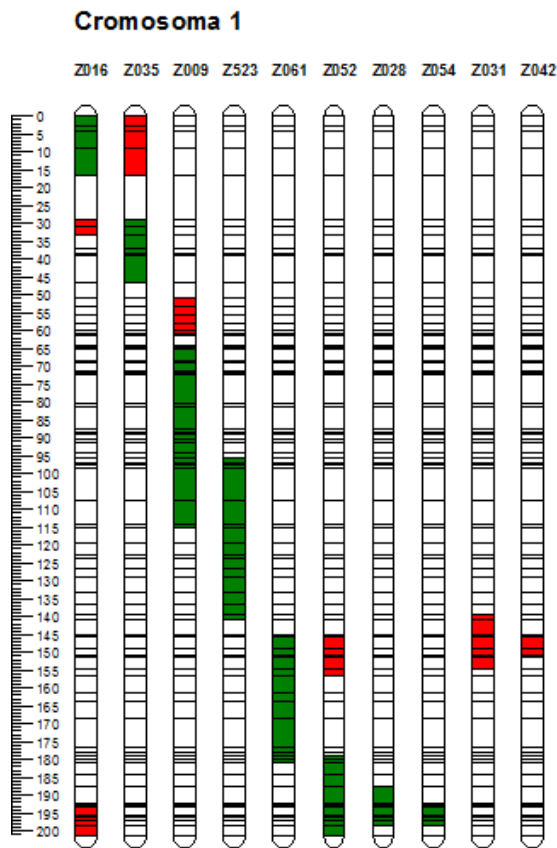
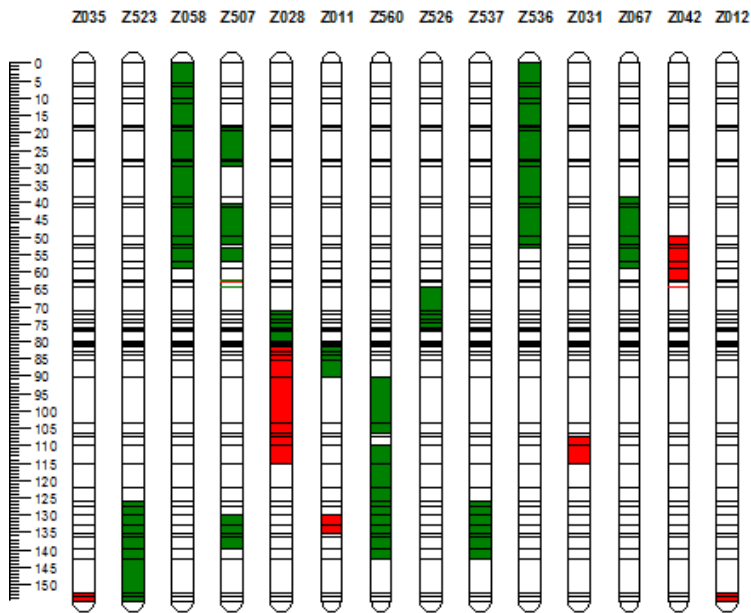


Figura 30. Genotipo gráfico de la colección de líneas de introgresión obtenido de la información genotípica de 560 marcadores SNP. La figura muestra los cromosomas de aquellas NIL con al menos un segmento cromosómico de teosinte introgresado. Referencias: Verde: homocigota para los alelos provenientes de *Zea mays* spp. *parviglumis*, blanco: homocigota para los alelos provenientes de la línea B73, rojo: heterocigota.

Cromosoma 2



Cromosoma 3

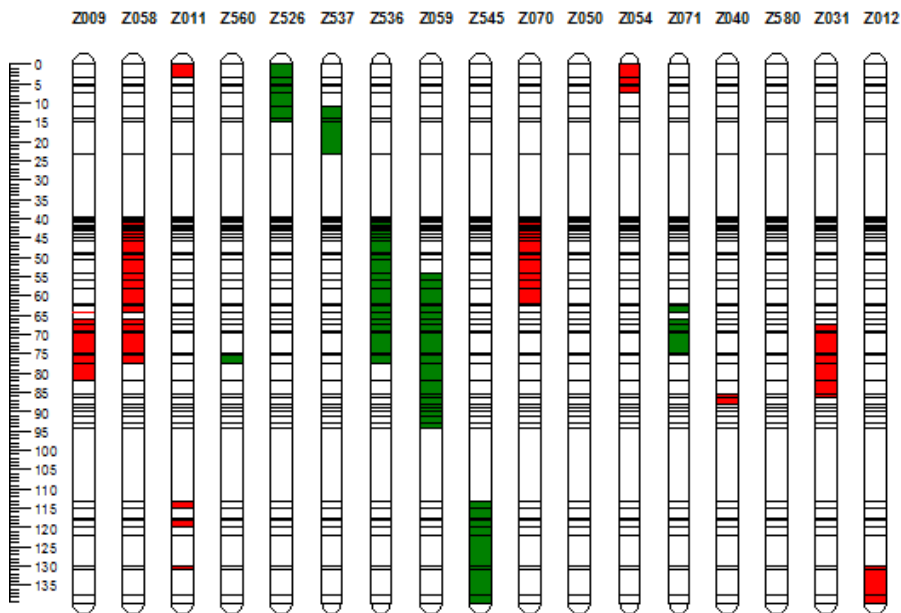
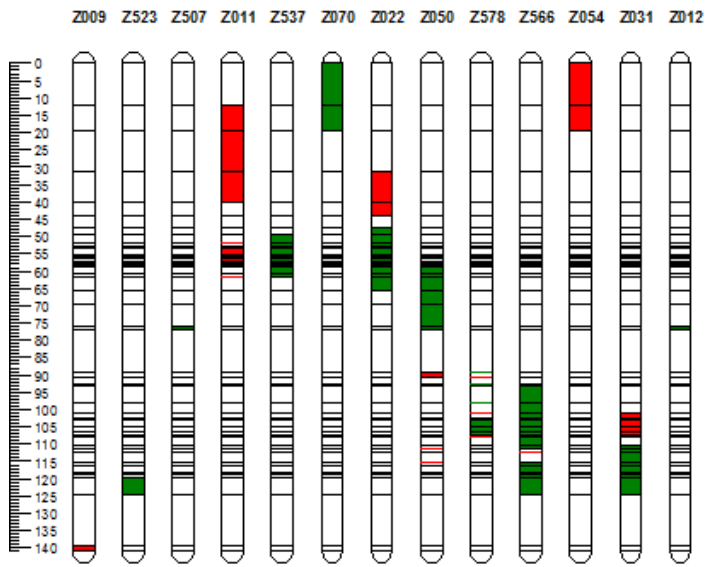


Figura 30 (continuación).

Cromosoma 4



Cromosoma 5

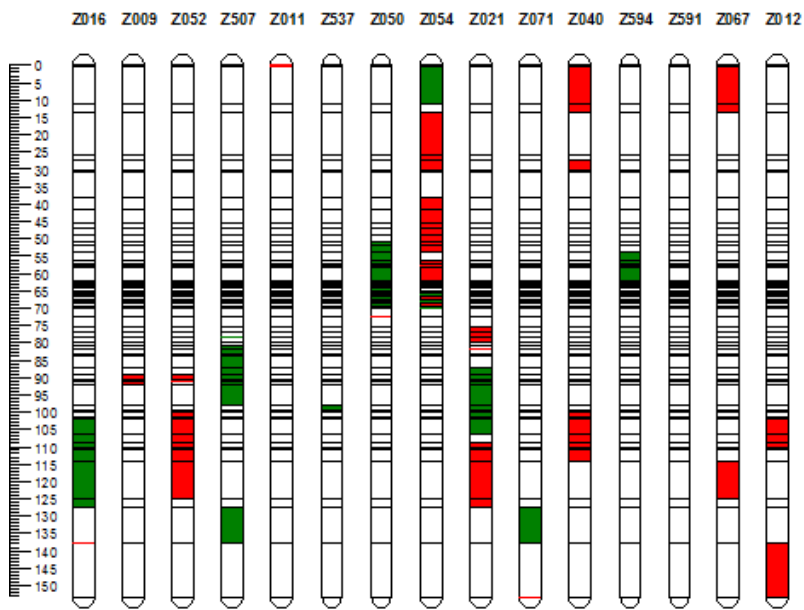
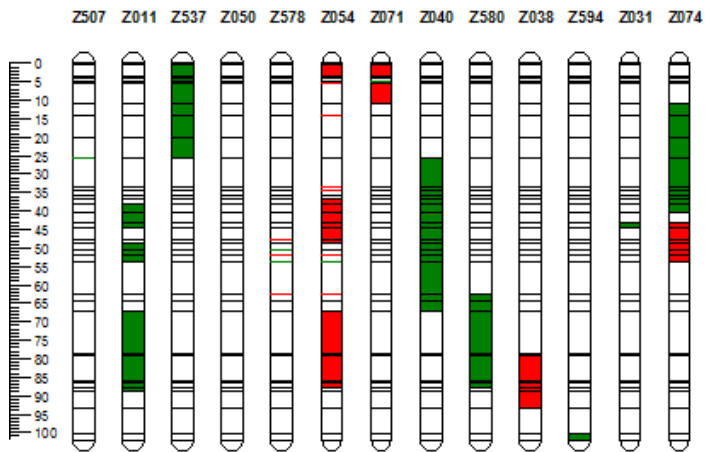
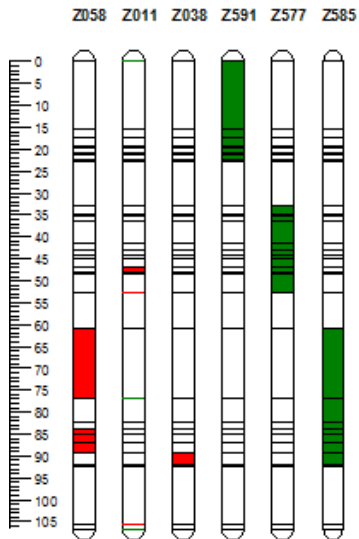


Figura 30 (continuación).

Cromosoma 6



Cromosoma 7



Cromosoma 8

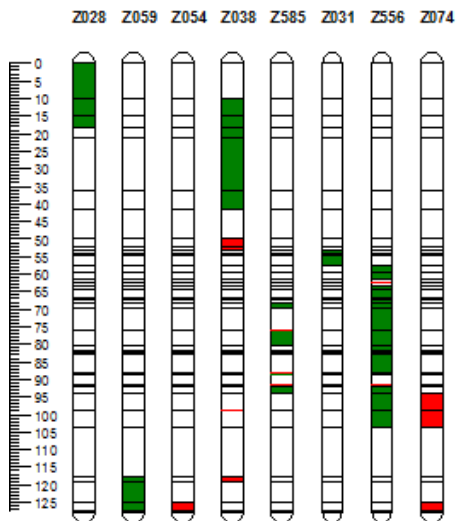


Figura 30 (continuación).

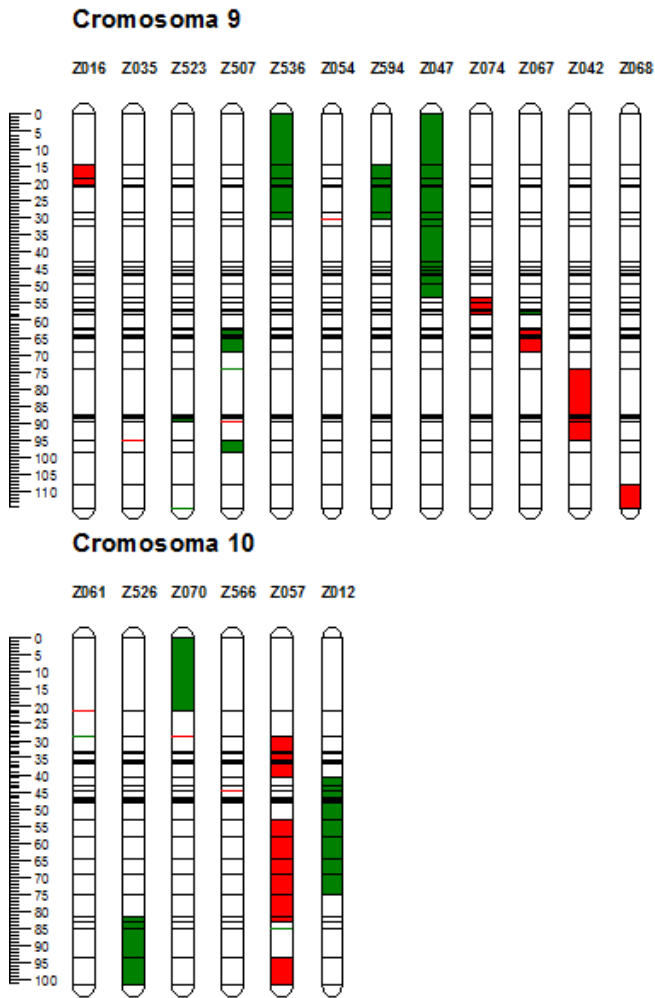


Figura 30 (continuación).

Los resultados del análisis de estructura permitieron ver que la colección de LI es genéticamente homogénea, es decir que no hay una estructura de grupos genéticos definida ya que cada línea fue asignada con alta probabilidad a un grupo y el resto de las líneas fueron asignadas al mismo grupo tanto cuando se evalúan estructuras de dos grupos (Figura 31, superior) como cuando se evalúan estructura de tres grupos (Figura 31, inferior). A partir de los resultados de la distribución Tracy-Widom se observó que sólo dos componentes fueron significativas para explicar la estructura de la población en estudio en la cual se encontró una estructura particular de un único grupo (Figura 32).

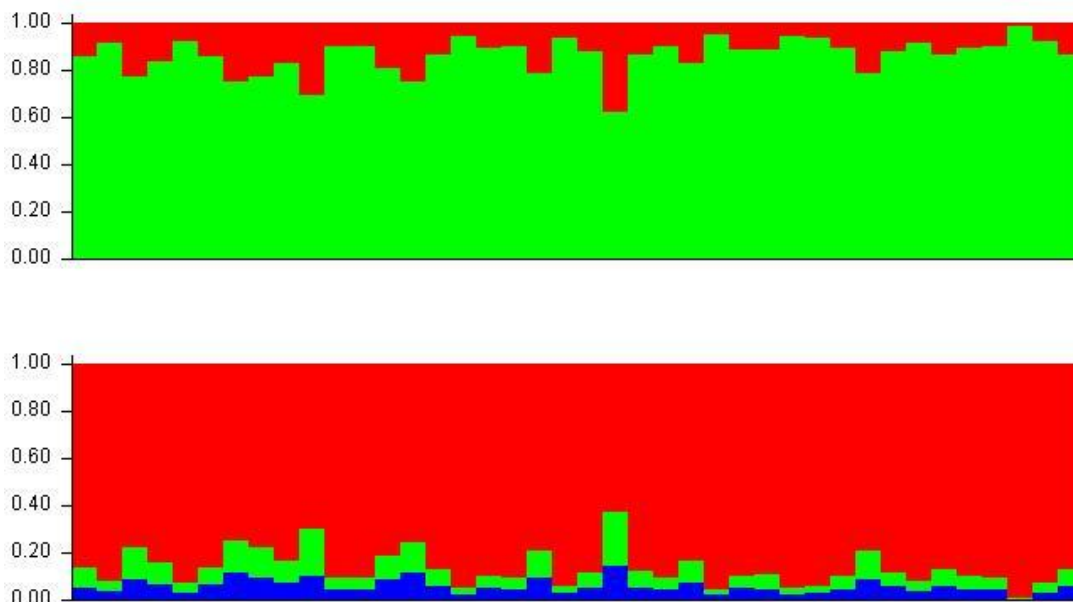


Figura 31. Análisis de estructura de la colección de líneas de introgresión suponiendo dos (rojo y verde) y tres (rojo, verde, y azul) poblaciones.

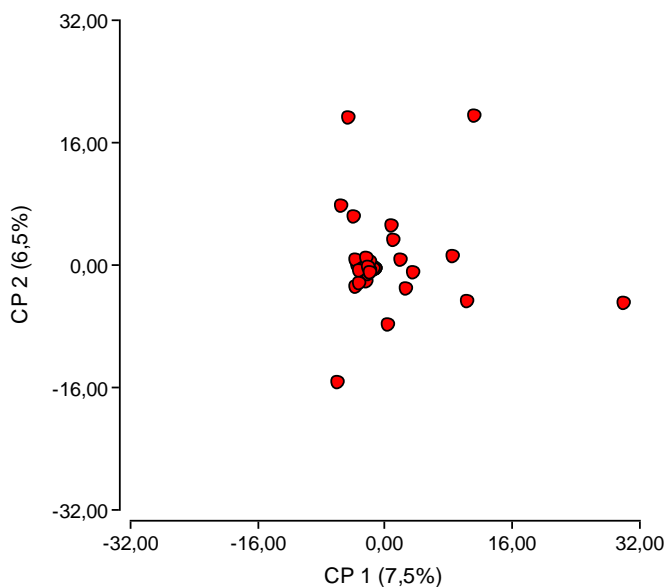


Figura 32. Gráfico biplot obtenido del análisis de componentes principales de 40 NIL caracterizadas con 560 SNP.

4.6. Análisis de QTL: análisis por marcador individual

La variación fenotípica en caracteres complejos es producto de la acción combinada del ambiente y de la acción de poligenes de efecto variable en la expresión fenotípica total. La

varianza genética total puede ser resultado de la variación alélica en muchos QTL de efecto menor o en pocos QTL de efecto mayor. La localización, el efecto, y el tipo de acción génica de los genes que controlan un carácter cuantitativo pueden ser determinados mediante el análisis de marcadores moleculares (Xu, 2.010). El conocimiento de los marcadores ligados a un QTL permite la detección de alelos específicos con un efecto determinado sobre el fenotipo.

La probabilidad de detectar un QTL depende de diversos factores. El número de QTL que controlan la expresión del carácter, la presencia de interacción epistática, el tipo y el tamaño de la población de mapeo, el nivel de saturación del mapa de ligamiento, la metodología y el umbral declarado para la detección de un QTL así como la heredabilidad del carácter afectan el poder de detección de un QTL (Singh y Singh, 2.015). La heredabilidad permite medir la proporción de la varianza fenotípica debida al efecto del genotipo. Cuanto mayor es el efecto de ambiente sobre el carácter en cuestión menor es el efecto genético y menor la probabilidad de declarar la presencia de un QTL. De este modo, la probabilidad de detectar un QTL es inversamente proporcional al efecto del ambiente sobre el carácter.

La heredabilidad de los caracteres ISE y REN difirió en relación del ambiente considerado. En LA12 la heredabilidad para ISE fue nula, el carácter no observó variabilidad genética (Tabla 6). Por lo tanto, dado que el valor de heredabilidad fue cero, no es justificable la realización del mapeo de QTL en este ambiente (Boopathi, 2.013). En relación a este ambiente cabe también considerar la heterogeneidad espacial observada en la expresión de la enfermedad. Esto, aun habiendo observado variabilidad genética, incrementaría el error experimental lo cual limitaría la precisión del análisis. Resulta evidente que la variabilidad observada en la expresión de la enfermedad es resultante del gran efecto del ambiente. Respecto al ambiente RC11, la heredabilidad del carácter ISE fue baja (Tabla 6). Aunque esto no imposibilita la realización del análisis de QTL, el efecto de un *loci* de carácter cuantitativo en un ambiente de baja heredabilidad es bajo. Esto incrementa la ocurrencia de errores de Tipo II o “falsos positivos” dificultando declarar con precisión la presencia de un QTL (van den Berg *et al.*, 2.013). Además, la transmisión de la enfermedad en este ambiente no fue óptima lo cual queda de manifiesto en el bajo valor de ISE observado en el testigo susceptible y en la colección de NIL. Por último, la heredabilidad del carácter ISE en LA11 fue alta (Tabla 6). Así, los resultados derivados del mapeo

de QTL en caracteres de alta heredabilidad son más confiables que en aquellos de baja heredabilidad (Singh y Singh, 2015). También, la expresión de la enfermedad observada en este ambiente fue, en relación a los demás, alta y homogénea. A juzgar por estos aspectos, este ambiente resulta óptimo para el mapeo de QTL asociados a expresión de la enfermedad.

En relación a la heredabilidad del carácter REN en los ambientes LA11 y RC11 la situación es inversa a lo observado para ISE en estos ambientes. La heredabilidad del carácter en LA11 fue nula (Tabla 7) con lo cual, y por las mismas razones que para LA12 en relación a ISE, no tiene sentido realizar el mapeo de QTL por no observarse variabilidad genética. En cuanto a RC11 la heredabilidad del carácter fue alta (Tabla 7). Este aspecto posibilita la realización del análisis de asociación. Sin embargo, como fue notado con anterioridad, la transmisión de la enfermedad en este ambiente falló o no fue óptima. La inclusión de la covariable ISE en el modelo para el análisis del carácter refleja la efectividad de la transmisión de la enfermedad en uno u otro ambiente. En otras palabras, el comportamiento del carácter REN en LA11 y RC11 está sujeto al comportamiento del carácter ISE en dichos ambientes. Por lo tanto, descontada la influencia de los efectos de la enfermedad sobre el rendimiento en RC11, los QTL resultantes del análisis de asociación en este ambiente podrían estar asociados al rendimiento *per se* y no al rendimiento debido a los efectos de la virosis.

El tamaño de la población y del genoma de la especie en estudio, la saturación del mapa de ligamiento, la distorsión de la segregación, la proporción de valores faltantes, el número y la magnitud del efecto de los QTL detectados son algunos de los factores que pueden influir en la distribución del estadístico del test y, de esta manera, llevar a declarar la presencia de un QTL cuando en realidad no existe (error de Tipo I) o no declarar un QTL cuando está presente (error de Tipo II) (Semagn *et al.*, 2010). La elección arbitraria del nivel de significación afecta la predicción de la tasa de falsos positivos. Las técnicas de remuestreo, en particular por permutaciones, proveen procedimientos sencillos para la determinación de los umbrales o valores críticos para los estadísticos involucrados en la determinación de QTL (Grondona, 2001). La distribución del estadístico F resultante de la permutación de la respuesta respecto a los genotipos de los marcadores permitió determinar el valor crítico a partir del cual un SNP fue declarado estadísticamente significativo (Figura 33). La Tabla 14 presenta los valores umbrales respecto

a los cuales fue posible declarar la presencia de un QTL para ISE y REN. En el presente estudio el valor crítico de F para un nivel de significación del 0,01 fue de 14,07 (ISE) y 4,64 (REN).

Tabla 14. Valores críticos o umbrales del estadístico F para distintos niveles de significación.

α	1	0,99	0,95	0,5	0,1	0,05	0,01	0,001
ISE	0,00	0,00	0,00	0,45	2,13	4,00	14,07	23,54
REN	0,00	0,00	0,03	0,78	2,39	2,77	4,64	6,89

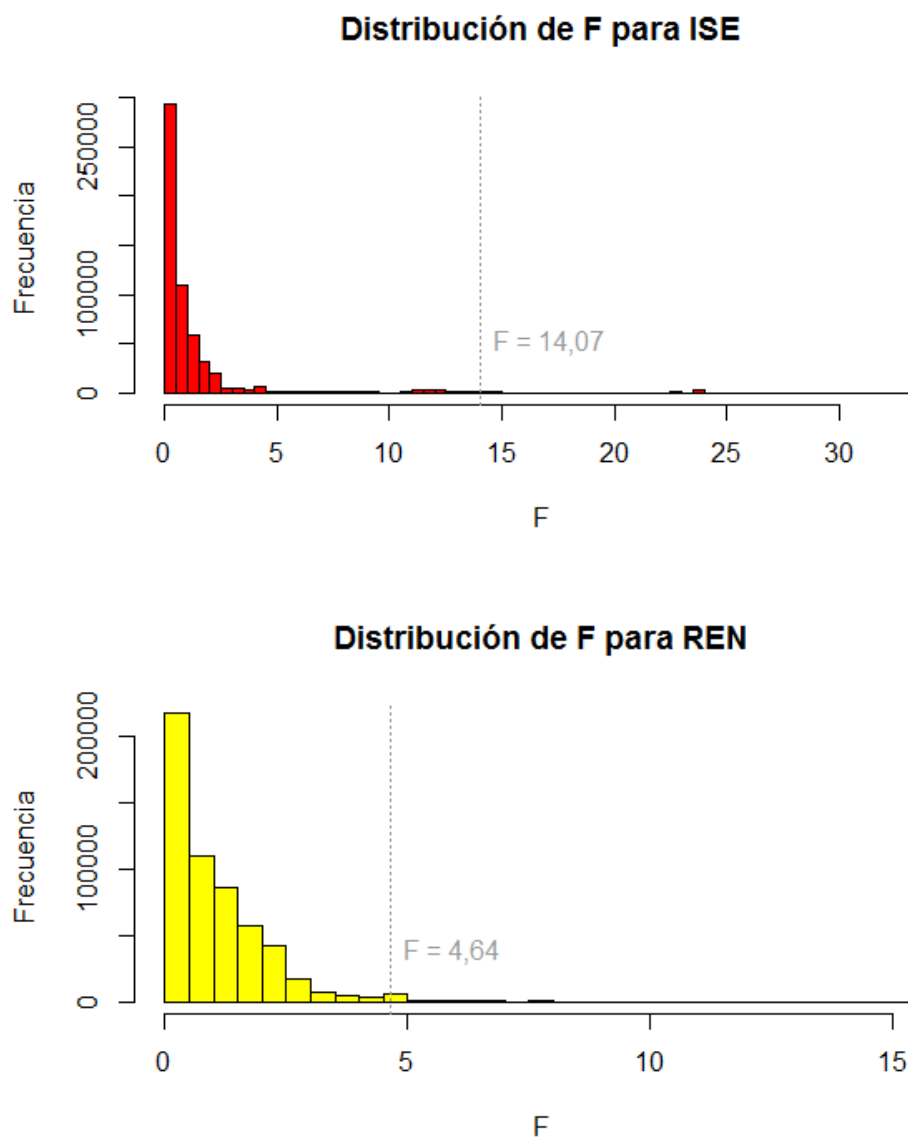


Figura 33. Distribución del estadístico F para los caracteres índice de severidad de la enfermedad (ISE) y rendimiento (REN). La línea de puntos representa el valor crítico de F para un nivel de significación del 1 %.

El análisis por marcador individual permitió detectar, en total, 27 y 47 marcadores asociados ($p < 0,05$) a REN e ISE, respectivamente. La significación estadística de la asociación entre 10 y 23 de dichos SNP respecto de la variación observada en los caracteres REN e ISE fue altamente significativa ($p < 0,01$), respectivamente (Tabla 15). Dichos marcadores se ubicaron en distintas posiciones de los cromosomas 2 y 3 (Figuras 34 y 36). Excepto 6 SNP, los marcadores asociados a ambos caracteres se presentaron agrupados en regiones o intervalos de 10 cM de longitud aproximadamente. Esta particularidad puede ser el resultado de la supresión en la formación de entrecruzamientos en regiones teloméricas o por diferencias de colinearidad (inversiones, translocaciones, secuencias repetidas) entre las regiones cromosómicas del teosinte y del maíz cultivado (Wijnker y de Jong, 2.008; Lambing *et al.*, 2.017). En general, los SNP del cromosoma dos asociados significativamente ($p < 0,01$) a ISE también estuvieron significativamente ($p < 0,05$) asociados a REN. La variación fenotípica explicada por cada SNP varió dependiendo del carácter evaluado. Individualmente, los marcadores asociados a ISE y REN explicaron, en promedio, el 45 y el 12 % de la variación fenotípica, respectivamente (Tabla 15, Figuras 35 y 37). Es interesante destacar que el SNP PZA00525-17 (cromosoma 2, posición 5,7 cM) explicó el 56 % de la variabilidad fenotípica del ISE. La varianza fenotípica total para ISE explicada por el modelo constituido por los SNP PZA00525-17 y PZA03198-3 fue del 66 %. En cuanto al carácter REN, la varianza fenotípica total explicada por el modelo constituido por los marcadores PZA02081-1, PZA02680-1, PZA02471-5, PZA02727-1 y PZA02665-2 fue del 36 % (Figura 38).

Tabla 15. Nombre, posición, proporción de la varianza fenotípica explicada y valor del estadístico F en SNP asociados con índice de severidad de la enfermedad (ISE) y rendimiento en grano (REN).

SNP	Cr	Bin	cM	ISE		REN		F	F
				R ²	F	R ²	F		
PZA00365.2	2	2.01	0,0	0,441	29,992	***	0,074	3,058	*
PZA00680-3	2	2.01	0,0	0,450	30,259	***	0,079	3,174	*
PZA00525-17	2	2.01	5,7	0,563	38,627	***	0,119	4,034	*
PZA00902-1	2	2.01	6,8	0,441	29,992	***	0,074	3,058	*
PZA01211-1	2	2.01	10,0	0,450	30,259	***	0,079	3,174	*
PZA00172.12	2	2.01	11,5	0,441	29,992	***	0,074	3,058	*
PZA00613.22	2	2.01	11,5	0,451	30,374	***	0,074	2,941	*
PZA02208-1	2	2.02	17,8	0,262	13,504	*	0,115	4,948	**
PZA02081-1	2	2.02	18,3	0,266	13,057	*	0,130	5,356	**

Tabla 15 (continuación).

SNP	Cr	Bin	ISE			REN		
			cM	R ²	F	R ²	F	
PZA01935-10	2	2.02	19,5	0,262	13,504 *	0,115	4,948 **	
PZB00901-3	2	2.02	27,6	0,270	13,680 *	0,114	4,761 **	
PZA02272-3	2	2.02	28,2	0,262	13,504 *	0,115	4,948 **	
PHM5822-15	2	2.02	29,8	0,262	13,504 *	0,115	4,948 **	
PZA00108-4	2	2.02	38,6	0,339	18,457 **	0,064	2,467	
PZA01753-1	2	2.02	40,6	0,231	11,390 *	0,098	4,124 *	
PZA02337-4	2	2.02	41,5	0,231	11,390 *	0,098	4,124 *	
PZA00497.4	2	2.02	49,8	0,223	5,572 *	0,088	2,022	
PZA03634.1	2	2.03	52,0	0,223	5,572 *	0,088	2,022	
PHM6111-5	2	2.03	53,3	0,323	9,639 *	0,050	1,178	
PZA00590-1	2	2.03	53,3	0,223	5,572 *	0,088	2,022	
PZA02680-1	2	2.06	125,9	0,080	3,321	0,135	5,907 **	
PZA02471-5	2	2.06	127,3	0,080	3,321	0,135	5,907 **	
PZA02266-3	2	2.07	139,7	0,122	5,295 *	0,018	0,705	
PZA01895-1	2	2.07	139,8	0,125	5,160 *	0,061	2,340	
PZA02727-1	2	2.07	142,7	0,080	3,321	0,135	5,907 **	
PZA03054-5	3	3.04	54,7	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PZA01473-1	3	3.04	54,8	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
zb21-1	3	3.04	55,5	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PHM15899-9	3	3.04	56,0	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PZA00279-2	3	3.04	56,9	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PZA01447-1	3	3.04	57,1	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PZA00509-1	3	3.04	57,7	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PZA02134-3	3	3.04	58,0	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PZA00707.9	3	3.04	58,9	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PZA02619-1	3	3.04	59,7	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PZA03198-3	3	3.04	60,5	0,466	16,783 **	0,039	0,734	
PZA02474.1	3	3.04	63,9	0,460	16,380 **	0,044	0,835	
PZA00920-1	3	3.04	64,1	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PZB02044.1	3	3.04	65,4	0,452	16,238 **	0,041	0,788	
PZA00827-1	3	3.05	68,9	0,401	12,396 *	0,000	0,287	
PZA00828-2	3	3.05	70,6	0,401	12,396 *	0,000	0,287	
PHM9914-11	3	3.05	72,9	0,401	12,396 *	0,000	0,287	
PZA00186.4	3	3.05	77,0	0,294	8,028 *	0,013	0,726	
PHM2885-31	3	3.05	77,4	0,294	8,028 *	0,013	0,726	
PZA03073.26	3	3.05	79,3	0,228	5,573 *	0,016	0,620	
PHM1959-26	3	3.05	79,3	0,339	17,912 **	0,004	0,158	
PZD00027.2	3	3.05	80,8	0,261	6,264 *	0,019	0,665	

Tabla 15 (continuación).

SNP	Cr	Bin	cM	ISE		REN	
				R ²	F	R ²	F
PZA03032-19	3	3.05	82,1	0,200	5,213 *	0,010	0,707
PZA01726-1	3	3.05	84,0	0,200	5,213 *	0,010	0,707
PZA02212-1	3	3.05	84,6	0,200	5,213 *	0,010	0,707
sh2-21	3	3.08	128,4	0,013	1,771	0,131	2,796 *
PZA00750-1	3	3.08	129,8	0,013	1,771	0,131	2,796 *
PZA02665-2	3	3.08	132,8	0,050	1,995	0,109	4,643 **
PZA01233.1	3	3.08	132,8	0,013	1,771	0,131	2,796 *
PZA02514-1	3	3.08	132,8	0,013	1,771	0,131	2,796 *
PZA02824-4	3	3.08	133,0	0,013	1,771	0,131	2,796 *
PZA02668-2	3	3.08	134,6	0,013	1,771	0,131	2,796 *
PZA00316-10	3	3.09	145,1	0,011	1,347	0,140	3,056 *
PZA01360-3	3	3.09	146,0	0,011	1,347	0,140	3,056 *

Ref.: Crom.: cromosoma; cM: centimorgan; R²: coeficiente de determinación; F: estadístico; ISE: índice de severidad de la enfermedad; REN: rendimiento en grano; nivel de significación: *: 0,05, **: 0,01, ***: 0,001.

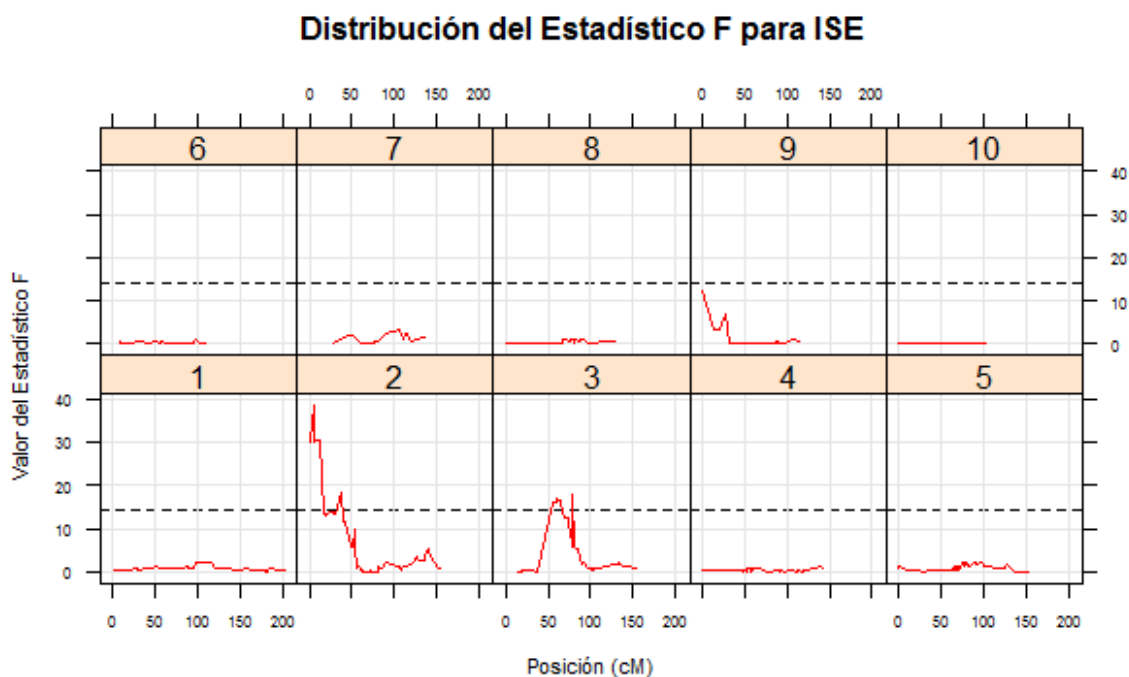


Figura 34. Distribución del estadístico F en función de la asociación entre el BLUP para el índice de severidad de la enfermedad (ISE) y el genotipo de 554 marcadores SNP. La línea de puntos representa el valor crítico de F para un nivel de significación del 1 %.

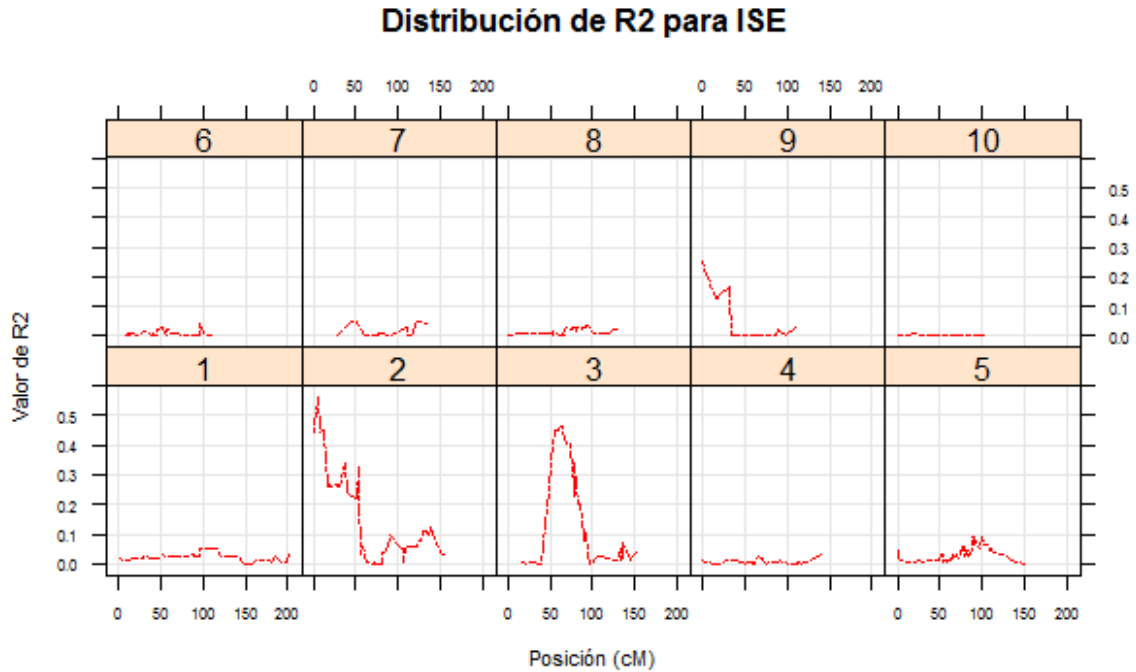


Figura 35. Distribución del coeficiente de determinación (R^2) de la asociación entre el BLUP para el índice de severidad de la enfermedad (ISE) y el genotipo de 554 marcadores SNP.

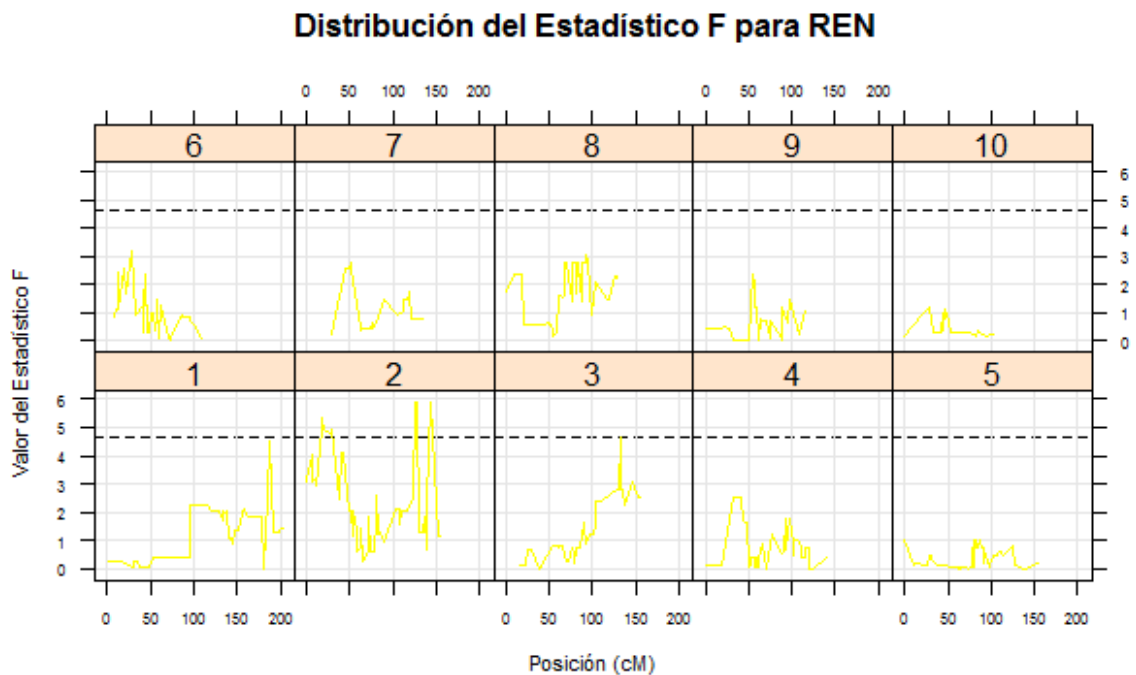


Figura 36. Distribución del estadístico F en función de la asociación entre el BLUP para el rendimiento (REN) y el genotipo de 554 marcadores SNP. La línea de puntos representa el valor crítico de F para un nivel de significación del 1 %.

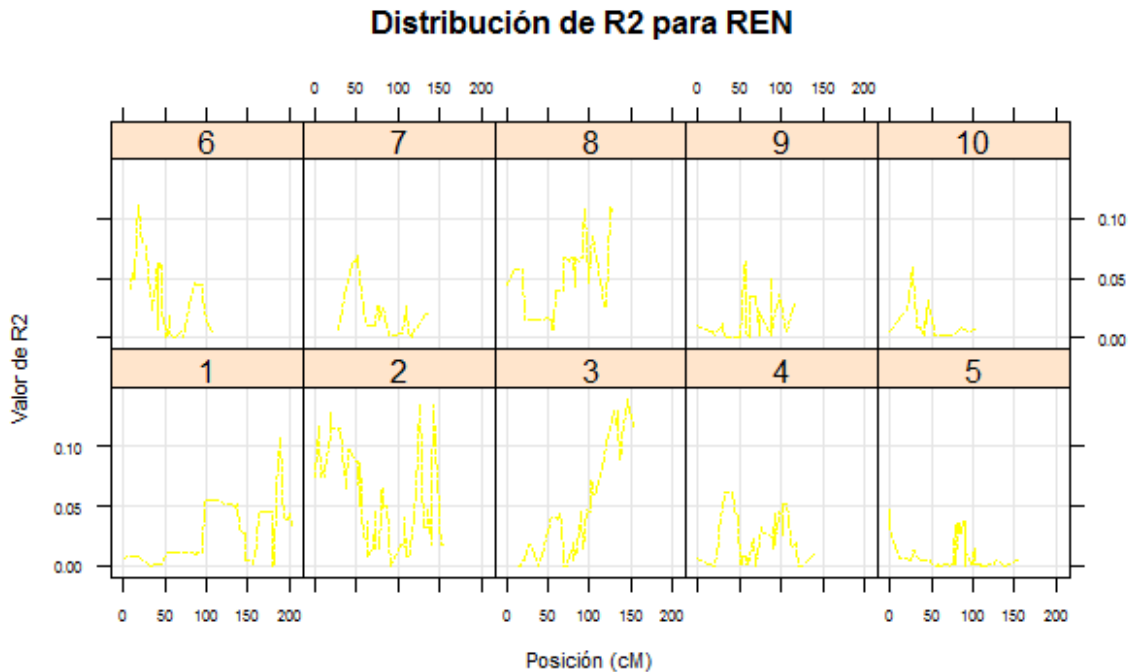


Figura 37. Distribución del coeficiente de determinación (R^2) de la asociación entre el BLUP para el rendimiento (REN) y el genotipo de 554 marcadores SNP.

El análisis por marcador individual provee un valioso marco de referencia y constituye una aproximación sencilla y preliminar para el mapeo de QTL. Además, permite incorporar covariables y es posible extender el análisis a modelos más complejos. Esta metodología considera cada marcador en forma individual dividiendo los individuos en grupos de acuerdo con el genotipo del marcador y estableciendo comparaciones de medias del carácter. La desventaja de este método es que omite del análisis a los individuos con datos genotípicos faltantes. Esto explica la apariencia serrada de la curva de distribución del estadístico F (Broman y Sen, 2.009). Además, es muy sensible a la densidad de marcadores. Es decir, cuanto mayor sea la distancia entre el QTL y el marcador menor es la probabilidad de detección. Esto se debe a la probabilidad de ocurrencia de recombinaciones entre el QTL y el marcador. Como resultado, el efecto del QTL puede ser subestimado. La saturación del genoma con marcadores a intervalos menores de 15 cM puede minimizar ambos inconvenientes (Tanksley, 1.993; Collard *et al.*, 2.005; Gronzona, 2.005). Como se mencionó, la distancia media entre marcadores fue de 2,6 cM mientras que la media del percentil 95 de las distancias entre SNP fue de 9,9 cM. Por último, otro aspecto importante de dicha metodología es que considera un QTL a la vez. Por lo tanto, no permite separar QTL ligados como así también determinar la interacción entre distintos QTL (Broman y Sen, 2.009).

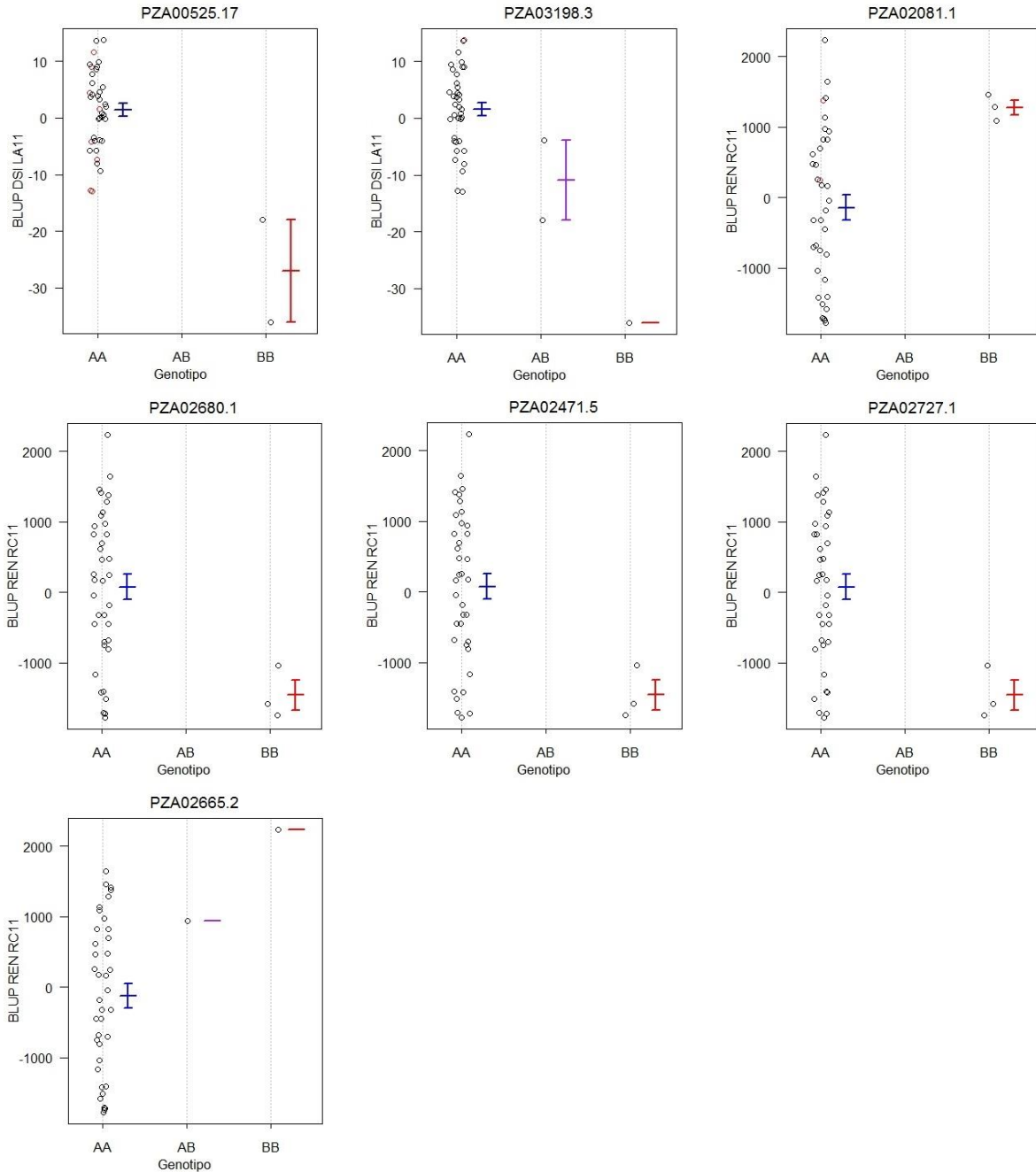


Figura 38. Gráfico de puntos del BLUP para el índice de severidad de la enfermedad (ISE) y el rendimiento (REN) de los ambientes La Aguada, campaña 2.011 (LA11) y Río Cuarto, campaña 2.011 (RC11), respectivamente, en función del genotipo de los marcadores PZA00525-17, PZA03198-3, PZA02081-1, PZA02680-1, PZA02471-5, PZA02727-1 y PZA02665-2. El punto negro representa el genotipo observado mientras que el punto rojo la imputación del genotipo para un valor genotípico faltante. Las barras verticales representan la media y el intervalo de confianza. Ref.: BB: homocigota para alelos derivados de *Zea mays* spp. *parviglumis*, AA: homocigota para alelos derivados de B73, AB: heterocigota.

Distintas NIL presentaron introgresiones que cubrieron regiones donde se observaron SNP asociados significativamente ($p < 0,01$) a ISE. Dichas aislneas, en orden creciente de valores de BLUP, fueron: Z536, Z058, Z059, Z067 y Z070. Vale destacar que Z536 y Z058 presentaron

los valores más bajos de BLUP para el carácter en cuestión. Los segmentos de teosinte introgresados en ambas isolíneas cubrieron regiones similares, en sectores coincidentes de los cromosomas 2 y 3. Además, fueron los únicos genotipos que compartieron introgresiones que cubrieron el intervalo en la posición 0,0 a 11,5 cM del cromosoma dos (*bin* 2.01). Esta región del genoma presentó SNP fuertemente asociados a ISE ($p < 0,001$) los cuales explicaron la mayor proporción de la variación fenotípica del carácter (Tabla 15, Figuras 38 y 39).

Es interesante observar además que la significación estadística de los SNP de los segmentos cromosómicos introgresados en los cromosomas 2, posición 00,0 a 53,3 cM (*bins* 2.01, 2.02 y 2.03), y 3, 54,7 a 84,6 cM (*bins* 3.04 y 3.05), haya sido variable (Tabla 15, Figura 39). Por esta razón, otras NIL (Z507 y Z071) adquieren relevancia. Es notable la *performance* de dichas isolíneas dado que habiendo compartido gran proporción de SNP estadísticamente significativos en la región el valor de BLUP para ISE haya sido alto.

La tolerancia genética a mal de Río Cuarto puede ser modificada ante una elevada cantidad de inóculo lo cual conduce a una mayor presión de enfermedad (Laguna y Pecci, 1.997). La expresión de algunos caracteres de herencia poligénica depende de un factor de riesgo que varía de forma continua. Cuando el factor de riesgo de dichos caracteres, denominados caracteres umbrales, se encuentra por debajo del umbral el genotipo expresa el fenotipo resistente. Por el contrario, cuando el factor de riesgo se encuentra por encima del umbral dicho genotipo expresa el fenotipo susceptible. En este sentido, los resultados derivados del análisis espacial del ambiente LA11 permiten advertir un patrón espacial de expresión de la enfermedad (Figuras 13 y 15). El mapa de calor de dicho ambiente muestra, particularmente en los sectores del ensayo donde se ubicaron las isolíneas Z507 y Z071, áreas cuyos genotipos presentaron valores altos de BLUP para ISE. Este patrón espacial sugeriría una alta presión de inóculo en ciertos sectores del ensayo. Este hecho junto con la presencia de SNP significativos en la región de interés insinuarían un efecto umbral de quiebre de la resistencia como resultado de la alta presión de inóculo. De esta forma, es posible que la resistencia a MRC se comporte como un carácter umbral. Aunque las referencias bibliográficas son escasas, particularmente para mal de Río Cuarto, la existencia de materiales comerciales o de generaciones avanzadas de mejoramiento que, siendo tolerantes y aun resistentes, y que de una campaña otra se comportan como susceptibles refuerzan dicha hipótesis (M. Di Renzo, comunicación personal).

Por otra parte, resulta llamativo el desempeño de las NIL Z545 y Z591 que aún sin poseer SNP significativos y, por lo tanto, un segmento genómico de teosinte introgresado en la región de interés el BLUP para ISE en ambos genotipos fue considerablemente bajo (tercera y cuarta en el ranking de genotipos, respectivamente). De esta manera, cabe la posibilidad que dichos casos constituyan escapes o falsos positivos.

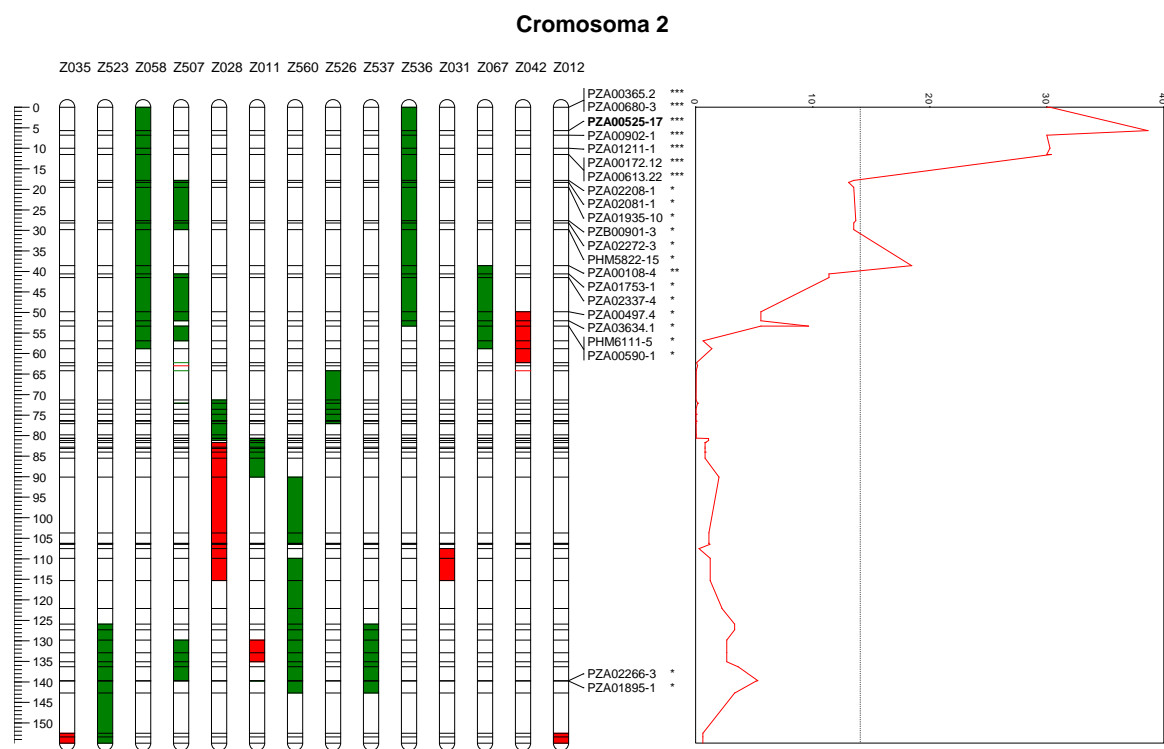


Figura 39. Izquierda: genotipo gráfico obtenido de la información genotípica de los SNP de los cromosomas 2 y 3. La figura muestra los cromosomas de aquellas NIL con al menos un segmento cromosómico de teosinte introgresado. Derecha: distribución del estadístico F en función de la asociación entre el BLUP para el índice de severidad de la enfermedad (ISE) y el genotipo de los SNP de los cromosomas 2 y 3. La línea de puntos representa el valor crítico de F para un nivel de significación del 1 %. Ref.: Verde: homocigota para alelos provenientes de *Zea mays* spp. *parviglumis*, blanco: homocigota para alelos provenientes de la línea B73, rojo: heterocigota.

Cromosoma 3

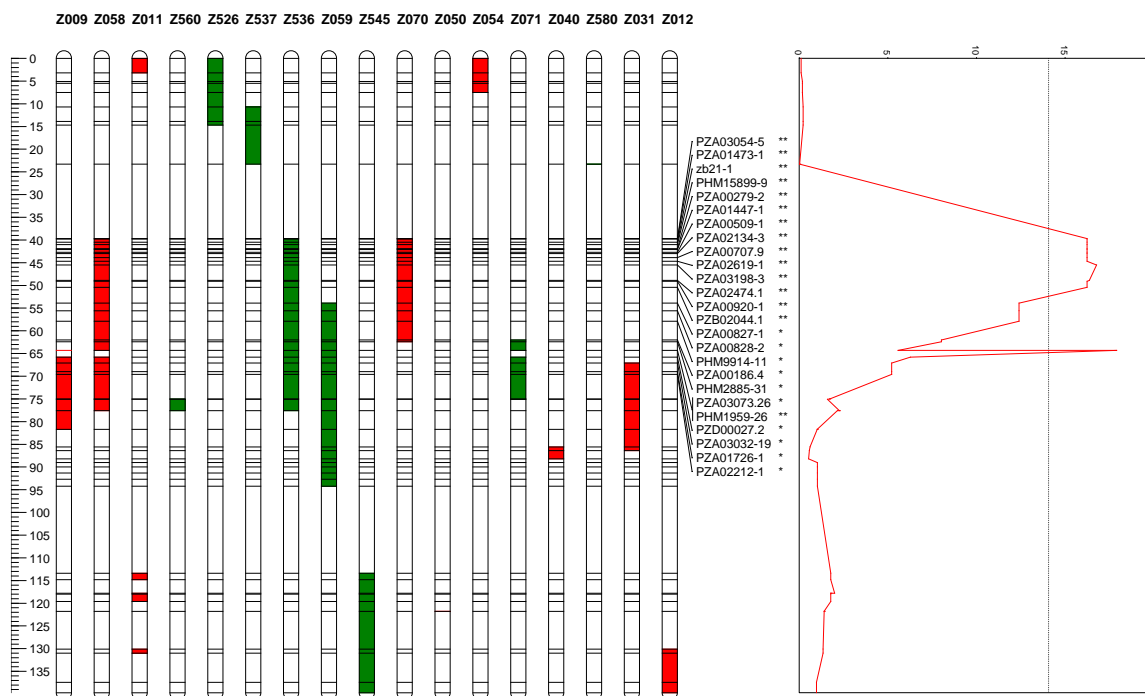


Figura 39 (continuación).

En resumen, es posible establecer distintos escenarios al considerar la relación entre la *performance* de una NIL y la presencia de marcadores SNP significativamente asociados o no al carácter ISE (Tabla 16).

Tabla 16. Clasificación fenotípica considerando la relación entre el desempeño del genotipo y la presencia de SNP asociados significativamente o no a índice de severidad de la enfermedad (ISE).

BLUP SNP	BAJO	ALTO
$p < 0,01$	RESISTENTE	EFECTO UMBRAL
$p > 0,01$	ESCAPE	SENSIBLE

La bibliografía referente al análisis de QTL para resistencia a enfermedades causadas por *Fijivirus*, particularmente mal de Río Cuarto, se acota a materiales derivados de germoplasma de maíz cultivado. La utilización de fuentes de germoplasma silvestres para la búsqueda de QTL para resistencia a enfermedades es escasa. En particular, los estudios referentes a la detección de QTL para tolerancia a *Fijivirus* en materiales derivados de teosintes son nulos.

Mediante análisis multivariado discriminante, Bonamico y colaboradores (2.010) detectaron marcadores microsátélites en los cromosomas 1 (*bins* 1.02 y 1.06), 2 (*bin* 2.06), 6 (*bin* 6.02) y 8 (*bin* 8.08) asociados con grado de severidad y con otros caracteres relacionados a síntomas de MRC en distintos ambientes dónde la enfermedad es endémica. Aunque dicha metodología no implica el mapeo de genes, los marcadores detectados podrían estar vinculados con regiones asociadas a la resistencia a MRC (Capdevielle, 2.001). Bonamico (2.010), mediante análisis por marcador individual, detectó marcadores SSR asociados significativamente a dichos caracteres en los cromosomas 1 (*bins* 1.01, 1.03, 1.04 y 1.06), 3 (*bin* 3.01), 4 (*bins* 4.03, 4.05 y 4.09), 6, (*bin* 6.00) 8 (*bins* 8.02-03-04 y 8.08) y 10 (*bins* 10.02 y 10.07). El porcentaje de la variación fenotípica explicada por cada marcador fue menor al 20 % y, en general, próximo al 10 %. De acuerdo con este trabajo, la resistencia a MRC está determinada por el efecto combinado de varios *loci* con efecto menor (Bonamico, 2.010).

Utilizando distintas poblaciones (poblaciones segregantes y un panel de líneas endocriadas de base genética amplia), estrategias de mapeo (mapeo por regresión, mapeo por intervalo simple, mapeo por intervalo compuesto y mapeo por asociación), distintos materiales del programa del mejoramiento de DuPont Pioneer (líneas templadas y tropicales resistentes tipo *flint*, líneas dentadas SSS –*Iowa Stiff Stalk Synthetic*– susceptibles, materiales relacionados a SSS, materiales no SSS, materiales tropicales) y múltiples ambientes, Kreff (2.010) detectó un QTL mayor en el brazo corto del cromosoma 2 en el intervalo 55 - 70 cM, coincidente en distintas poblaciones y asociado significativamente a MRC. Este QTL explicó entre el 27 y 41 % de la varianza fenotípica total mostrando en los distintos análisis acción génica predominantemente aditiva o de dominancia parcial. La validación de dicho QTL se realizó utilizando poblaciones de retrocruza con distintos fondos genéticos. El efecto del QTL en cuestión en las cuatro retrocruzas evaluadas fue positivo y de similar magnitud al observado en las poblaciones de mapeo previamente analizadas en este trabajo. Por último, mediante un mapeo de alta resolución, el mismo autor determinó que un fragmento único de aproximadamente 400-500 Kb localizado en el cromosoma 2, posición 65,99 cM, presenta un efecto significativo en la resistencia a MRC.

La consistencia de los resultados del presente estudio respecto de aquellos obtenidos en las investigaciones citadas sugiere que las regiones detectadas presentan un efecto promisorio sobre

el carácter de interés. Por el contrario, la existencia de regiones cromosómicas no coincidentes podría ser resultado de (Singh y Singh, 2.015):

1. El efecto del QTL y la presencia de QTL ligados,
2. El fondo genético, la interacción epistática con otras regiones cromosómicas,
3. El tipo y el tamaño de la población de mapeo,
4. La influencia del ambiente en la expresión del QTL,
5. Los errores experimentales derivados de las caracterizaciones fenotípicas y genotípicas.

Además, la escala utilizada para la evaluación fenotípica de la enfermedad podría afectar la posición de las regiones involucradas en la expresión de la misma.

Desde el punto metodológico, resulta de interés citar estudios que hayan detectado regiones con resistencia a virosis causadas por *Fijivirus* relacionados filogenéticamente con el virus del MRC. De esta manera, Luan y colaboradores (2.012), mediante análisis de segregantes agrupados y mapeo por intervalo compuesto en poblaciones F2, BC1 y RIL, detectaron cinco QTL asociados con índice de severidad de la enfermedad y con otros caracteres relacionados a síntomas del virus del enanismo estriado de negro del arroz o *rice black-streaked dwarf virus* (RBSDV). El QTL qMRD2 detectado en el cromosoma 2, *bin* 2.02, explicó entre el 11,4 y el 9.3 % de la variación de la severidad. Este QTL también explicó el 11,4 y el 13,7 % de la varianza fenotípica de los caracteres acortamiento de entrenudos superiores y enaciones, respectivamente.

Por otra parte, por medio de un análisis de asociación genómica amplia (*genome-wide association study*, GWAS), fue posible determinar en un panel de 527 líneas templadas, tropicales y subtropicales 17 *loci* asociados significativamente a índice de severidad de la enfermedad del RBSDV donde cada *loci* explicó entre el 5,4 al 7,8 % de la varianza fenotípica. El número de *loci* asociados significativamente a la enfermedad varió dependiendo del cromosoma considerado. Así, uno de dichos *loci* se ubicó en el *bin* 2.08 del cromosoma 2. Dichos *loci* colocalizaron con 15 genes candidatos asociados con resistencia a la enfermedad, de ellos 9 genes codificaban proteínas relacionadas a mecanismo de defensa de la planta y los restantes para proteínas de funciones desconocidas (Chen *et al.*, 2.015).

Utilizando un panel de 273 líneas endocriadas de germoplasma diverso, Liu y colaboradores (2.014) detectaron mediante GWAS, 73 marcadores SNP localizados en 21 *bins* asociados significativamente a resistencia al enanismo rugoso del maíz (*Maize rough dwarf disease*, MRDV) una virosis cuyo agente causal pertenece al género *Fijivirus*, familia Reoviridae. Estos *loci* explicaron entre el 2,68 al 6,18 % de la varianza fenotípica. Dos *bins*, 2.04 y 3.04, mapearon en los cromosomas 2 y 3, respectivamente. Los *bins* del cromosoma 2 se encontraron asociados con genes codificantes de proteínas con sitios de unión a ATP. Las proteínas con sitios de unión a ATP y actividad ATPasa están vinculadas a mecanismos de defensa de las plantas (Tameling *et al.*, 2.002).

Shi (2.008), utilizando una población de 179 familias F₈ caracterizadas con 74 marcadores microsatélites y analizadas por medio de mapeo por intervalo compuesto, identificó cuatro QTL en los cromosomas 1, 2, 5 y 9 asociados a resistencia a MRDV los cuales explicaron entre el 4,9 al 43,5 % de la variación fenotípica.

Distintas investigaciones sugieren que las regiones que confieren resistencia a patógenos no ocurren al azar sino formando complejos o *clusters* de *loci* de resistencia (Redinbaugh y Pratt, 2.009; Wisser *et al.*, 2.006). Tales agrupamientos podrían reflejar la existencia de grupos de genes coadaptados o *clusters* de *loci* relacionados involucrados en la defensa de la planta. También, dichos *clusters* podrían deberse a complejos de genes con efectos pleiotrópicos a múltiples enfermedades o a artefactos resultantes del análisis de mapeo (Wisser *et al.*, 2.006).

De esta forma, Wisser y colaboradores (2.006) identificaron ocho *clusters* en maíz, dos en los cromosomas 1 y 3 y uno en los cromosomas 2, 4, 5 y 10. Redinbaugh y Pratt (2.009) detectaron cuatro *clusters* en los cromosomas 1, 3, 6 y 10 los cuales alojaban QTL con resistencia múltiple a virus. Dichas regiones también presentan *loci* para resistencia a hongos y bacterias. Por su parte, Zambrano y colaboradores (2.014) caracterizaron una población de 260 líneas endocriadas recombinantes derivada del cruzamiento entre Oh1VI, una línea tipo flint con resistencia múltiple a al menos diez virus, y Oh28, una línea amarillo dentada altamente susceptible, por su comportamiento frente a seis virus filogenéticamente distintos: Mosaico del enanismo del maíz (MDMV), Mosaico de la caña de azúcar (SCMV), Mosaico estriado del trigo (WSMV), Enanismo clorótico del maíz (MCDV), Virus del rayado fino del maíz (MFSV) y Mosaico del

maíz (MMV). El análisis mediante mapeo por intervalo compuesto permitió detectar 17 QTL asociados a resistencia a dichas virosis. Quince de dichos QTL se encontraban agrupados o en *clusters* en regiones específicas de los cromosomas 2 (posiciones 21,9 y 135,3 cM), 3 (posiciones 43,3, 47,8 y 52,5 cM), 6 (posiciones 1,1, 2,1 y 3,5 cM) y 10 (posiciones 39,4 y 43,3 cM). Los QTL detectados presentaron efectos mayores y menores los cuales explicaron entre el 1 y el 79 % de la varianza fenotípica (Zambrano *et al.*, 2.014).

Un aspecto a considerar en el presente estudio es la ausencia del valor fenotípico para el carácter floración. La ausencia de dicho carácter y, por lo tanto, de su inclusión como cofactor en el análisis impactaría en la estimación del efecto y la posición de los QTL detectados. Existe suficiente evidencia de una asociación entre resistencia a enfermedad y tiempo a floración. De acuerdo con distintos estudios la correlación entre QTL para resistencia a enfermedades y tiempo a floración fue significativa (Wisser *et al.*, 2.006). Particularmente, la severidad de ciertos patógenos fue mayor luego de la anthesis de la planta. Así, el 23 % de la variabilidad para resistencia a Tizón foliar (*Southern corn leaf blight*, SCLB) en un panel de 300 líneas genéticamente diversas fue explicada por la variación observada en el tiempo de floración (Wisser *et al.*, 2.006). Esta relación puede ser resultado de la colocalización de los QTL que expresan resistencia a enfermedades y tiempo a floración. De esta manera, aunque la severidad del MRC es mayor en los primeros estadios del desarrollo de la planta, es necesario tomar con precaución los QTL detectados para ISE debido a que colocalizan con QTL asociados a floración (Chardon *et al.*, 2.004; Salvi *et al.*, 2.009).

Al igual que para ISE, distintas isolíneas presentaron introgresiones que cubrieron regiones en las que se detectaron SNP asociados significativamente ($p < 0,01$) a REN. Como se mencionó previamente, es posible que en ausencia de enfermedad B73 no sea un control adecuado para establecer comparaciones relativas entre el rendimiento de dicho genotipo respecto al de la colección de líneas de introgresión. Además, es importante destacar que la ausencia de B73 en el análisis por marcador individual (resultado de no disponer de su caracterización genotípica) no permitió determinar la existencia de regiones cromosómicas asociadas al carácter REN en dicho genotipo. De esta manera, al considerar las NIL que presentaron introgresiones con SNP asociados significativamente a REN es posible observar dos grupos de genotipos con valores altos y bajos del predictor del rendimiento (Tabla 4). En el grupo de genotipos con valores altos de

BLUP la aislínea Z545 (primera en el ranking de genotipos) presentó una introgresión con SNP significativamente asociados a REN en el cromosoma 3, posición 132,8 cM (Figura 40). Por su parte, Z052 (segunda en el ranking de genotipos) no presentó ninguna introgresión con marcadores asociados significativamente al carácter. Es posible que el desempeño de dicho genotipo haya sido resultado de la interacción epistática entre regiones de teosinte no asociadas a REN con el fondo genético de B73. Otra explicación serían errores en la caracterización fenotípica de dicha aislínea. En las NIL restantes (en orden decreciente de BLUP, Z058, Z507 y Z536) los SNP asociados a rendimiento se alojaron en introgresiones que cubrieron el extremo izquierdo del cromosoma 2 (intervalo 17,8 a 29,8 cM) (Figura 40). Por el contrario, en las NIL con valores de BLUP bajos (en orden decreciente, Z537, Z523 y Z560) los SNP asociados a REN se ubicaron en el extremo derecho del mismo cromosoma (posición 125,9 cM a 127,3 cM y 142,7 cM). De esta forma, es posible que dada la performance de dichas aislíneas las regiones en cuestión se encuentren asociadas negativamente al rendimiento (Figura 40).

El peso del grano y el número de filas de grano constituyen dos componentes importantes del rendimiento en maíz (Li *et al.*, 2.014, Liu *et al.*, 2.016b). Distintos estudios detectaron diversos QTL de efecto mayor para número de filas de grano (Doebley y Stec, 1.991, 1.993). Mediante la utilización de diez poblaciones de NIL BC₄F₂ (en total, 928 aislíneas) derivadas del cruzamiento entre B73 y diez accesiones de *parviglumis*, Liu y colaboradores (2.016a) detectaron ocho y cuatro QTL los cuales explicaron el 38,2 y el 33,7 % de la variabilidad fenotípica de los caracteres peso del grano y el número de filas de grano, respectivamente. Los QTL del carácter peso del grano se localizaron en los cromosomas 1 (31,7 cM, 61,6 cM y 162,2 cM), 2 (79,8 cM), 3 (67,2 cM y 107,7 cM), 5 (70,0 cM) y 8 (59,7 cM). Por su parte, los QTL para el carácter número de filas de grano se localizaron en los cromosomas 1 (116,4 cM), 2 (38,6 cM), 4 (107,9 cM) y 5 (68,1 cM) (Liu *et al.*, 2.016a). Los autores señalan que el QTL para el carácter número de filas de grano localizado en el brazo corto del cromosoma 2 (38,6 cM) presenta dos genes candidatos: *ZFL2* (*Zea FLORICAULA/LEAFY 2*) y *Abphyll1*. El primero de dichos genes candidatos determina la filotaxis de la espiga, de dística (teosinte) a polística (maíz). Respecto a peso del grano el QTL del cromosoma 2 presentaría también otro gen candidato, *pbfl* (factor1 de unión a prolamina o *Prolamin binding factor1*) (Liu *et al.*, 2.016a). Por último, es importante destacar que la colección de líneas de introgresión utilizada en el estudio citado está estrechamente relacionada con las poblaciones del presente estudio ya que constituye una selección de

materiales de dichas poblaciones la cual derivó, como fue mencionado con anterioridad, mediante paso mínimo de introgresión.

Los mecanismos de resistencia de las plantas contra los virus son variados y de distinta magnitud los cuales pueden ser complementarios en términos de tiempo de respuesta, localización y tipo de molécula viral blanco (genoma o proteínas) (Nicaise, 2014). Los diferentes mecanismos pueden clasificarse en:

- Resistencia dominante determinada por genes de resistencia (genes R) que codifican proteínas que interactúan con factores de avirulencia (Avr) del patógeno,
- Resistencia recesiva consecuencia de la ausencia de factores del huésped estrictamente necesarios para la compleción del ciclo biológico del virus,

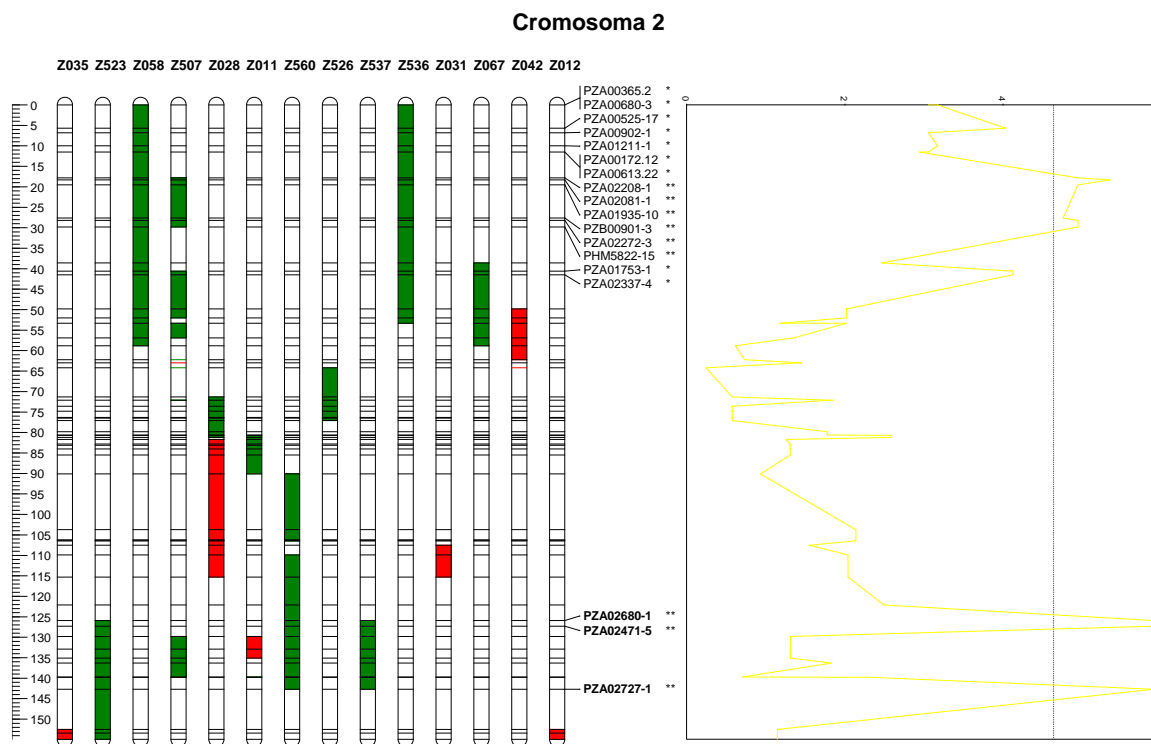


Figura 40. Izquierda: genotipo gráfico obtenido de la información genotípica de los SNP de los cromosomas 2 y 3. La figura muestra los cromosomas de aquellas NIL con al menos un segmento cromosómico de teosinte introgresado. Derecha: distribución del estadístico F en función de la asociación entre el BLUP para el rendimiento (REN) y el genotipo de los SNP de los cromosomas 2 y 3. La línea de puntos representa el valor crítico de F para un nivel de significación del 1 %. Referencias: Verde: homocigota para alelos provenientes de *Zea mays* spp. *parviglumis*, blanco: homocigota para alelos provenientes de la línea B73, rojo: heterocigota.

Cromosoma 3

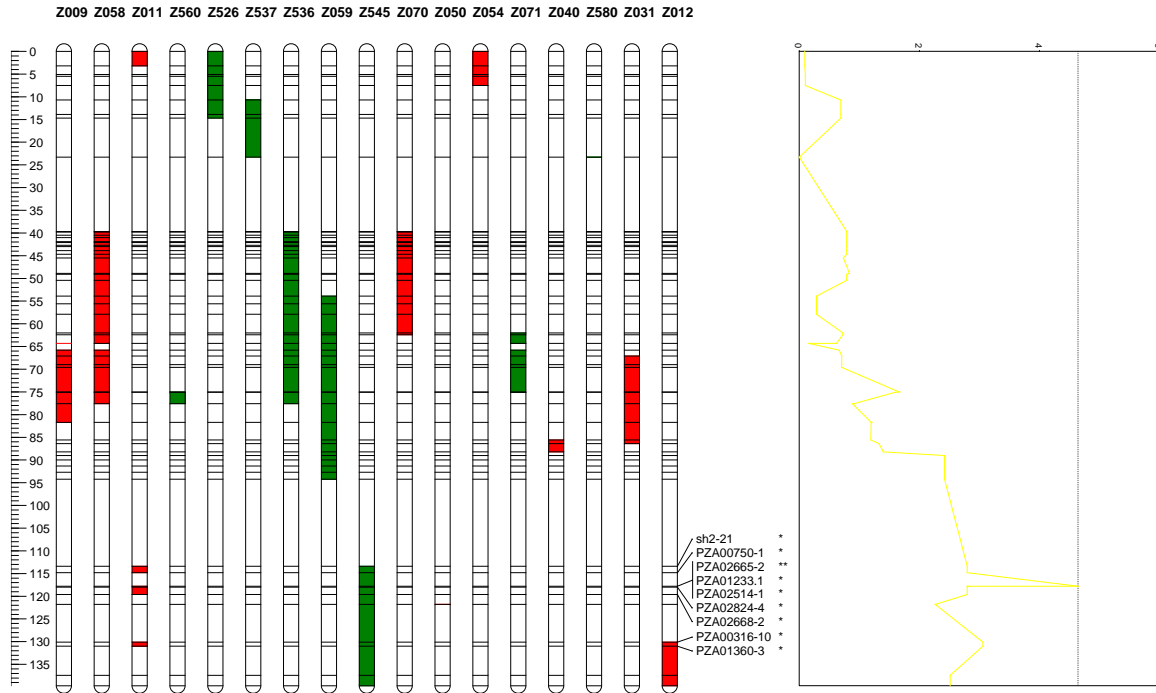


Figura 40 (continuación).

- Resistencia mediada por ARN de interferencia (ARNi) (silenciamiento génico),
- Resistencia mediada por hormonas. Este mecanismo involucra una respuesta celular a distancia mediada por hormonas inducida desde el sitio de infección. Esta respuesta, denominada resistencia sistémica adquirida, confiere a la planta resistencia o un estado de susceptibilidad reducida durante varias semanas (Nicaise, 2.014).

La Tabla 17 presenta las anotaciones funcionales surgidas del análisis de homología de secuencias en BLAST de los SNP asociados significativamente a los caracteres ISE y REN.

Los genes que codifican proteínas implicadas en la resistencia directa a MRC o que participan en mecanismos que confieren resistencia indirecta a la virosis, así como aquellas vinculadas al rendimiento, son desconocidas. Sin embargo, las secuencias de los marcadores PZA00172.12, PHM5822-15, PZA00108-4 y PZA00509-1, asociados significativamente a ISE, mostraron relación directa con secuencias de genes que codifican proteínas potencialmente asociadas con mecanismos de resistencia en especies vegetales o cultivos de interés económico: GRMZM2G040095, GRMZM2G345667, GRMZM2G031981 y GRMZM2G037683, respectivamente.

El gen GRMZM2G040095 o lox6 (lipoxigenasa6) codifica para la enzima LOX 9 (linoleato 9s-lipoxigenasa).

Las lipoxigenasas vegetales catalizan la oxidación de ácidos grasos poliinsaturados (ácido linoleico y α -linolénico) en compuestos hidroperóxidos (ácido 12-oxo-cis-10,15-fitodienoico), precursores del ácido jasmónico, hormona reguladora del crecimiento vegetal y componente de la vía de transducción de señales en los mecanismos de defensa de las plantas (Laredo Alcalá *et al.*, 2.017). Por su parte, las oxilipinas, metabolitos de la vía de la lipoxigenasa, se encuentran involucradas en las respuestas de defensa de las plantas, ya sea en la transducción de señales o en actividades antimicrobianas directas (Yang *et al.*, 2.017). La documentación respecto a la importancia de la vía de la lipoxigenasa en la defensa de las plantas es vasta (Li *et al.*, 2.016). En papa, la inhibición de la lipoxigenasa suprime la resistencia frente al tizón tardío, promoviendo la propagación de la enfermedad (Dzhavakhiya *et al.*, 2.007). En arroz, la expresión del gen de la lipoxigenasa se incrementó luego de la infección con el patógeno del tizón del arroz (*Magnaporthe grisea*). La expresión de dicho gen comenzó en el mismo momento que el patógeno penetró el tejido foliar (Peng *et al.*, 1.994). De acuerdo con Woldemariam y colaboradores (2.018) las lipoxigenasas están vinculadas a la defensa contra las larvas de *Spodoptera exigua* en maíz. La defensa puede ser ejercida mediante cambios ya sea en la producción de metabolitos tóxicos o en la señalización de defensa de la planta. Por otra parte, Christensen y colaboradores (2.014) demostraron que LOX 9 es necesaria para montar una defensa efectiva mediada por jasmonato contra *Fusarium verticillioides* en maíz. Según los autores, las oxilipinas derivadas de la vía LOX 9 presentan propiedades químicas con actividad antimicrobiana.

El gen GRMZM2G037683 o lug5 (relacionado con 5-leunig) codifica para la proteína reguladora de la transcripción gro/tup1. Esta familia de proteínas actúa como corepresor general en diversas vías biológicas tales como la respuesta hormonal, la respuesta a estrés biótico y abiótico, además de numerosas vías de desarrollo, por ejemplo, en la transición floral y el desarrollo de hojas y flores. Por otra parte, existe numerosa evidencia de la participación de gro/tup1 en la señalización de ácido jasmónico y jasmonil-isoleucina a través de la interacción con proteínas adaptadoras específicas (Causier *et al.*, 2.012, Pauwels *et al.*, 2.010). Al igual que el ácido jas-

mónico, la hormona jasmonil-isoleucina regula una amplia gama de procesos de defensa y desarrollo de las plantas. Li y colaboradores (2.016) identificaron 11 genes que codifican para corepresores de la familia gro/tup1 en maíz.

El gen GRMZM2G345667 o phm5822 codifica para la proteína de unión de repetición pentatricopeptídica (PPR) (Tabla 17). Es interesante destacar que las PPR constituyen junto con los sitios de unión a nucleótidos con repeticiones ricas en leucina (NBS-LRR) y las proteínas transmembrana con repeticiones ricas en leucina (TM-LRR) análogos de genes de resistencia (RGA) (Sekhwal *et al.*, 2.015). Por su parte, el SNP PZA02081-1, asociado significativamente a REN, mostró homología significativa con el gen GRMZM2G372074 que transcribe para una proteína de almacenamiento en semilla y transferencia de lípidos que podría estar vinculada con el rendimiento (Tabla 17).

El análisis comparativo de secuencias mediante BLAST debería también involucrar el análisis exhaustivo de toda la región, es decir, no sólo las secuencias de SNP asociados significativamente a ambos caracteres sino también los intervalos entre dichos marcadores. Se debe tener presente que los caracteres analizados presentan herencia compleja, por lo que es improbable que una única proteína explique por sí sola el mecanismo que confiere resistencia a MRC o que incremente el rendimiento por lo que sería esperable que un mayor número de proteínas se encuentren vinculadas con la expresión fenotípica de dichos caracteres.

Tabla 17. Anotación funcional de secuencias de marcadores moleculares asociados significativamente a los caracteres índice de severidad de la enfermedad (ISE) y rendimiento en grano (REN).

SNP	Cr	Bin	cM	ISE	REN	Gen (Pfam)	Anotación funcional
PZA00680-3	2	2.01	0,0	***	*	GRMZM2G049495 (PF12796, PF00887)	Proteína con dominio de unión a Acil-CoA. Transporte intracelular de esteres Acil-CoA.
PZA00365.2	2	2.01	0,0	***	*	GRMZM2G051917 (PF04515)	Proteína de la familia de transportadores de colina de membrana plasmática.
PZA00525-17	2	2.01	5,7	***	*	GRMZM2G009994 (PF08737)	Proteína Rgp1 de la membrana del complejo de Golgi. Factor de intercambio de nucleótido de guanina.

Tabla 17 (continuación).

SNP	Cr	Bin	cM	ISE	REN	Gen (Pfam)	Anotación funcional
PZA00902-1	2	2.01	6,8	***	*	GRMZM2G070389 (PF04051)	Componente de partícula de proteína de transporte (TRAPP). Regulación del transporte vesicular retículo endoplasmático-complejo de Golgi.
PZA01211-1	2	2.01	10,0	***	*	GRMZM2G061745 (PF01398, PF13012)	Proteína de membrana mitocondrial. Regulación del mantenimiento de la estructura y función mitocondrial.
PZA00172.12	2	2.01	11,5	***	*	GRMZM2G040095 (PF00305)	Proteína de la familia de las lipoxigenasas. Regulación de diversos aspectos de la fisiología vegetal en los que se incluyen el crecimiento y el desarrollo, la resistencia a plagas, la senescencia y la respuesta a heridas. Junto con hidroperóxido liasas son responsables de diversas fragancias y otros componentes de señalización (Vick and Zimmerman, 1.987).
PZA00613.22	2	2.01	11,5	***	*	AC210003.2_FG015	
PZA02208-1	2	2.02	17,8	*	**	GRMZM5G882708 (PF00892)	Proteína con dominio EamA. Supuesto transportador integral de membrana.
PZA02081-1	2	2.02	18,3	*	**	GRMZM2G372074 (PF14547)	Proteína de almacenamiento en semilla de la superfamilia de albúminas 2S. Transferencia de lípidos, inhibidor funcional.
PZA01935-10	2	2.02	19,5	*	**	GRMZM2G305007 (PF03109)	Proteína de la superfamilia de las protein quinases.
PZB00901-3	2	2.02	27,6	*	**	GRMZM2G080054 (PF00010)	Proteína con dominio hélice-bucle-hélice de unión a ADN. Factor de transcripción, regulación del desarrollo y del metabolismo celular.
PZA02272-3	2	2.02	28,2	*	**	GRMZM2G008060 (PF13414)	Proteína con dominio de repetición tetratricopeptídica (TPR).

Tabla 17 (continuación).

SNP	Cr	Bin	cM	ISE	REN	Gen (Pfam)	Anotación funcional
							Supuestamente involucrada en la edición del ARN.
PZA00108-4	2	2.02	38,6	**		GRMZM2G031981 (PF00646)	Proteína F-box. Mediación de la interacción proteína-proteína. Proteína asociada con funciones celulares como transducción de señales y regulación del ciclo celular. Involucrada también en el crecimiento y el desarrollo vegetativo y reproductivo. En tabaco y tomate, una vez reconocido el patógeno, la proteína F-box ACRE189/ACIF1 puede regular la muerte y la defensa celular (van den Burg <i>et al.</i> , 2008).
PZA02680-1	2	2.06	125,9		**	GRMZM2G001297 (PF08028, PF02771, PF02770, PF01636)	Acil-CoA deshidrogenasa.
PZA02471-5	2	2.06	127,3		**	GRMZM2G097277 (PF06964)	Enzima alfa-L-arabinofuranosidasa. Cataliza la hidrólisis de enlaces alfa-L-arabinofuranósido no reductores terminales en alfa-L-arabinósidos.
PZA03054-5	3	3.04	54,7	**		GRMZM2G049672 (PF13176)	Repetición tetratricopeptídica (TPR), motivo estructural de proteína. Regulación de la interacción proteína-proteína y de la formación de complejos multiproteicos.
PZA01473-1	3	3.04	54,8	**		GRMZM2G081719 (PF04185)	Proteína de la familia de las fosfoestearasas.
zb21-1	3	3.04	55,5	**		GRMZM2G069208 (PF04845)	Proteína PurA de unión a ARN y ADN de cadena simple.
PHM15899-9	3	3.04	56,0	**		GRMZM2G003883 (PF02887, PF00224)	Proteína de la familia de las piruvato quinetas.
PZA00279-2	3	3.04	56,9	**		GRMZM2G111593 (PF13418, PF13415)	Proteína con motivo kelch.

Tabla 17 (continuación).

SNP	Cr	Bin	cM	ISE	REN	Gen (Pfam)	Anotación funcional
PZA01447-1	3	3.04	57,1	**		GRMZM2G087741 (PF03789, PF05920, PF03790, PF03791)	Proteína con dominio homeobox.
PZA00509-1	3	3.04	57,7	**		GRMZM2G037683 (PF00400)	Repetición WD40, motivo estructural de proteína. Transducción de señales y regulación de la transcripción para el control del ciclo celular, autofagia y apoptosis. Regulación de la formación de complejos multiproteicos.
PZA02134-3	3	3.04	58,0	**		GRMZM2G031568 (PF03982)	Enzima diacilglicerol transferasa. Síntesis de triglicéridos.
PZA00707.9	3	3.04	58,9	**		GRMZM2G069886 (PF02135, PF08214)	Enzima histona acetiltransferasa. Involucrada en procesos celulares como la transcripción, reparación de ADN y ensamble de la cromatina.
PZA02619-1	3	3.04	59,7	**		GRMZM2G073750 (PF02309, PF02362, PF06507)	Factor de transcripción de respuesta a auxina.
PZA03198-3	3	3.04	60,5	**		GRMZM2G160840 (PF00249)	Factor de transcripción de la familia Myb con dominio de unión a ADN.
PZA00920-1	3	3.04	64,1	**		GRMZM2G179465	
PZB02044.1	3	3.04	65,4	**		GRMZM6G980248	
PHM1959-26	3	3.05	79,3	**		GRMZM2G080917 (PF00628, PF12165)	Proteína con dominio PHD dedos de zinc. Regulación génica mediada por cromatina.
PZA02665-2	3	3.08	132,8	**	**	GRMZM2G156158 (PF04851, PF00271)	Helicasa DEAD/DEAH con dominio C-terminal conservado.

Entre los Fijivirus que infectan al maíz el virus del enanismo estriado de negro del arroz (RBSDV), causante del enanismo rugoso del maíz en China, es uno de los mejores estudiados. El análisis transcriptómico en estadio V3 de líneas de maíz sanas e infectadas con el virus RBSDV permitió detectar un total de 28 y 1085 genes expresados diferencialmente después de

1,5 y 3,0 días posteriores a la inoculación artificial, respectivamente. El análisis de las secuencias confirmó la expresión diferencial de genes relacionados con la síntesis de la pared celular y con cloroplastos como también de genes relacionados con la resistencia a enfermedades y a la respuesta al estrés (Zhou *et al.*, 2.016). Por su parte, el análisis proteómico de hojas infectadas con el virus RBSDV mostró respuestas muy complejas que implicaron cambios significativos en la expresión de 123 proteínas de gran diversidad funcional, así como de moléculas defensivas y de señalización. El estudio permitió detectar el incremento de enzimas reguladoras del estrés oxidativo (peroxidasa 39, ascorbato peroxidasa citosólica APx2 y catalasa isoenzima 3), lipoxigenasas y proteínas de unión a guanosina trifosfato (GTP) que modulan la defensa a distancia. Además, se observó el incremento de la enzima UDP-glucosiltransferasa BX9 que cataliza la inactivación de fitotoxinas (benzoxazinoides) relacionadas en la defensa contra herbívoros, hongos y bacterias y, muy posiblemente, implicadas en la defensa contra el virus RBSDV (Pechanova y Pechan, 2.015). Sobre esta base se podría plantear una hipótesis respecto a los genes vinculados a resistencia a MRC mediante un estudio transcriptómico y proteómico en líneas infectadas y no infectadas con MRCV para esclarecer los mecanismos de resistencia presentes en las líneas implicadas.

4.7. Alcances y perspectivas futuras

Las enfermedades virales son responsables, en términos de cantidad y calidad, de enormes pérdidas en la producción agrícola. Las pérdidas en el rendimiento no solo se traducen en un impacto severo en la economía sino también en una seria amenaza a la seguridad alimentaria. Por esta razón, la adopción de estrategias para el manejo de enfermedades de origen viral resulta de vital importancia para la producción agrícola a nivel global (Nicaise, 2.014). Las medidas tendientes a la destrucción de las plantas infectadas y el control de los organismos vectores mediante la aplicación de insecticidas no resultan ambientalmente sustentables. El adelanto de la fecha de siembra, la utilización de insecticidas curasemillas, el manejo adecuado del cultivo y el uso de materiales tolerantes son estrategias destinadas a reducir la incidencia y la severidad de la enfermedad e incrementar consecuentemente el rendimiento (March *et al.*, 1.998, 2.002; Di Renzo *et al.*, 2.004). Entre ellas, la utilización de genotipos resistentes representa una estra-

tegia eficaz y sostenible para el control de enfermedades de etiología viral. A pesar de las ventajas de la resistencia genética, se estima que una proporción reducida de la variabilidad genética disponible ha sido utilizada en este sentido (Nicaise, 2.014).

La variabilidad genética constituye la materia prima del mejoramiento genético. La domesticación y el mejoramiento genético han tenido profundas implicancias en la base genética de los cultivos. La utilización de un número limitado de probadores y la reutilización de genotipos superiores, entre otras, son prácticas corrientes de los programas de mejoramiento que tienden a erosionar la variabilidad genética. La domesticación y el mejoramiento genético del maíz, particularmente el maíz templado, derivaron en un severo cuello de botella (Warburton *et al.*, 2.017; Flint-Garcia, 2.013; van de Wouw *et al.*, 2.010). A pesar de las ventajas de las herramientas de edición genómica recientemente disponibles, la solución más rentable y efectiva para la expansión de la base genética del maíz templado la constituye el uso de germoplasma silvestre. Las razas nativas y los parientes silvestres del maíz representan un capital de recursos genéticos de fácil introgresión y expresión en el fondo genético del maíz cultivado. No obstante las ventajas que ofrece esta fuente de diversidad genética así como los distintos estudios que confirman la disponibilidad de variaciones genéticas útiles y el enorme potencial genético para el mejoramiento del rendimiento y el estrés biótico y abiótico (Casas Salas *et al.*, 2.001), ningún híbrido comercial de maíz templado actualmente disponible contiene diversidad genética derivada del uso de esta fuente de recursos genéticos (Warburton *et al.*, 2.017). Existen diversas razones de su limitada utilización. El principal desafío lo constituye el arrastre por ligamiento de caracteres no deseados. De esta manera, en el contexto de un mercado altamente competitivo como el del maíz con una gran demanda de híbridos de alto rendimiento, la introgresión de alelos de efecto negativo reduce la ganancia genética requiriendo muchas generaciones para la eliminación de dichos alelos y para la detección y selección de recombinantes con un comportamiento fenotípico superior. Sin embargo, el retrocruzamiento asistido por marcadores moleculares permite reducir el arrastre por ligamiento así como el número de retrocruzas y las generaciones necesarias para alcanzar la homocigosis (Warburton *et al.*, 2.017).

La colección de líneas de introgresión brinda una gran diversidad alélica y un excelente marco de referencia para el estudio de la expresión de la variabilidad del teosinte sobre el fondo genético de maíz cultivado. La carencia de este tipo de materiales puede ofrecer otra explicación

del limitado uso de este tipo de recursos genéticos en programas de mejoramiento genético (Warburton *et al.*, 2.017). A diferencia de otros tipos de poblaciones de mapeo, las NIL permiten la detección y la validación de los efectos de QTL y la creación de poblaciones de mapeo fino. De esta manera, las regiones cromosómicas para el carácter de interés se evalúan desde su detección inicial hasta el mapeo fino utilizando la misma fuente de germoplasma. Además, las NIL facilitan la introgresión de la variación alélica directamente sobre el germoplasma de la línea élite. (Liu *et al.*, 2.016a).

Distintos estudios detectaron regiones cromosómicas con efectos significativos sobre la tolerancia a mal de Río Cuarto (Bonamico *et al.*, 2.012; Di Renzo y Bonamico, 2.013; Di Renzo *et al.* 2.004; Kreff, 2.010; Kreff *et al.*, 2.006; Rossi *et al.*, 2.015). Dichos estudios utilizaron como modelo de análisis el germoplasma del maíz templado. Al igual que dichos estudios, el presente trabajo señala la presencia de regiones genómicas de efecto significativo sobre el rendimiento y la tolerancia a mal de Río Cuarto. Sin embargo, a diferencia de todas las investigaciones precedentes, este estudio utilizó un modelo de nula exploración: el germoplasma silvestre, particularmente el ancestro del maíz cultivado, *Zea mays* spp. *parviglumis*. El interés de este estudio radica en la fuente de resistencia utilizada para la realización del análisis. No existe bibliografía que cite QTL asociados a tolerancia a mal de Río Cuarto en materiales derivados de germoplasma silvestre.

Aunque se observaron algunas discrepancias respecto a la localización de los QTL detectados en maíz, las regiones cromosómicas detectadas en materiales derivados del cruzamiento entre maíz y teosinte coinciden o se localizan en cercanías de QTL reportados previamente (Kreff, 2.010). Los QTL detectados en la presente investigación se ubicaron en distintas posiciones de los cromosomas dos y tres. En general, los marcadores asociados a dichos QTL se agruparon en intervalos de 10 cM de longitud aproximadamente. Los SNP asociados a ISE y REN explicaron, en promedio, el 45 y el 12 % de la varianza fenotípica, respectivamente. Sin embargo, el modelo constituido por más de un marcador explicó el 66 y el 36 % de la variación fenotípica para tolerancia a MRC y rendimiento, respectivamente. Si bien los resultados obtenidos en el presente estudio son promisorios, los QTL detectados en la colección de líneas de introgresión de teosinte, ausentes en el germoplasma de maíz, constituyen nuevos loci potencialmente útiles para su uso en mejoramiento genético para tolerancia a MRC.

Los resultados del presente estudio aportan información respecto de los QTL asociados a rendimiento y a tolerancia a mal de Río Cuarto. Para la utilización de dichas regiones cromosómicas en proyectos de selección asistida por marcadores moleculares (MAS) se requiere de la validación de los resultados de la presente investigación. Por un lado, la posición de los QTL detectados debería confirmarse colectando nuevos datos fenotípicos de modo de ponderar el efecto de los posibles errores (escapes) que pudieran haberse dado en las categorizaciones fenotípicas frente a la enfermedad. Para esto debería asegurarse una densidad de insecto vector óptima de manera que la presión del virus sea la correcta. Asimismo, sería deseable explorar otros ambientes de manera de evaluar su efecto en relación al componente genético en la expresión del QTL. De esta manera, se podría confirmar si las NIL Z536 y Z058, que fueron las isolíneas de mejor comportamiento frente a mal de Río Cuarto, pueden utilizarse como fuentes de resistencia genética. Una vez confirmada la *performance* de dichos genotipos frente a la virosis sería recomendable la realización de nuevos cruzamientos entre Z536 y Z058 no sólo con B73 sino también con otros fondos genéticos para la creación de distintos tipos de poblaciones segregantes: F₂, F_{2:3}, retrocruzas, líneas endocriadas recombinantes, poblaciones de dobles haploides y poblaciones de mapeo por asociación. En este sentido, el análisis de la población de 928 NIL, a partir de la cual derivó la colección de líneas de introgresión del presente estudio, no sólo constituye una estrategia de validación alternativa sino un recurso para la detección de recombinaciones en las regiones cromosómicas asociadas con el rendimiento y la tolerancia a MRC con el fin de estrechar dichos intervalos dada su longitud promedio (11,4 cM). También, el análisis de una colección de cultivares y líneas de germoplasma de élite puede ser utilizada para la validación de la asociación QTL-marcador. Los estudios de validación no sólo deben estar orientados a confirmar las regiones asociadas a ISE y REN sino también a precisar dichas regiones a los efectos de reducir la frecuencia de aparición de recombinantes entre el QTL y el marcador y estrechar la región que contiene el QTL a fin de evitar el arrastre por ligamiento de *loci* no deseados presentes en el germoplasma silvestre. De esta manera, una vez identificados los marcadores ligados al QTL, dichas estrategias implicarán la creación de grandes poblaciones de mapeo y la caracterización genotípica mediante la utilización de una alta densidad de marcadores moleculares, fundamentalmente en la región ligada al QTL. Dichas estrategias combinadas con estudios complementarios tales como análisis de secuenciación genómica y patrones transcripcionales y de expresión proteica, permitirán el aislamiento y la clonación del gen de

interés conduciendo a precisar la región a introgresar y minimizar el impacto sobre la ganancia genética derivado del efecto de arrastre por ligamiento.

Aunque las estrategias citadas están orientadas en precisar y minimizar los efectos negativos de la introgresión de los genes detectados en el maíz cultivado, derivado del uso directo del germoplasma silvestre como fuente de resistencia, dichas estrategias son también útiles para el uso indirecto de esta fuente de variación. Es decir, la información de secuencia puede ser utilizada para la búsqueda de la misma región en materiales genéticamente más cercanos a la línea receptora. Por el contrario, la información de secuencia puede ser utilizada para la implementación de herramientas de edición genómica si dicha región no existe en una fuente de germoplasma estrechamente relacionada. Ambas estrategias eliminan de plano los efectos adversos del arrastre por ligamiento (Warburton *et al.*, 2017).

La selección asistida por marcadores moleculares (MAS) es una herramienta económica, rápida, confiable y precisa para la selección de caracteres de importancia agronómica. Estudios adicionales permitirían utilizar estos QTL en selección y retrocruzamiento asistido por marcadores moleculares. Su implementación aumentaría la eficiencia de los programas de mejoramiento genético para resistencia a MRC. Además, la utilización de esta fuente de resistencia a la enfermedad expandiría la variabilidad genética del maíz cultivado. Dicha herramienta constituye un complemento del mejoramiento genético convencional superando algunas limitaciones de ésta. Entre ellas, el sesgo subjetivo de la caracterización fenotípica. También, la utilización de herramientas moleculares en programas de mejoramiento aceleraría el ciclo de cría y, de esta manera, el incremento de la ganancia genética por unidad de tiempo. Su implementación estimularía la aparición rápida de híbridos adaptados a la enfermedad para un mercado ávido de respuestas, demandante y altamente competitivo.

CAPÍTULO 5: CONCLUSIONES

El análisis por marcador individual permitió detectar, en distintas posiciones de los cromosomas 2 y 3, 10 y 23 marcadores SNP asociados significativamente ($p < 0,01$) con la variación observada en los caracteres REN e ISE, respectivamente.

Los marcadores asociados a ISE y REN explicaron, en promedio, el 45 y el 12 % de la variación fenotípica, respectivamente. El SNP PZA00525-17 (cromosoma 2, posición 5,7 cM) explicó el 56 % de la variabilidad fenotípica del ISE. El modelo constituido por los marcadores PZA00525-17 y PZA03198-3 explicó el 66 % de la varianza fenotípica total de dicho carácter. Respecto a REN, el modelo constituido por los marcadores PZA02081-1, PZA02680-1, PZA02471-5, PZA02727-1 y PZA02665-2 explicó el 36 % de la varianza fenotípica total.

La heredabilidad del ISE en el ambiente LA11 fue alta ($H^2 = 63,8$). La componente de varianza genética representó alrededor del 44 % de la variabilidad observada en dicho ambiente. La componente de varianza genética del carácter REN constituyó el 55 % de la variabilidad total observada en el ambiente RC11. De esta manera, la heredabilidad del carácter REN fue alta ($H^2 = 68,9$).

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Angaji, S. 2.009. Single nucleotide polymorphism genotyping and its application on mapping and marker-assisted plant breeding. *Afr J Biotechnol* 8: 908–914.

Annicchiarico, P. 2.007. Wide - versus specific-adaptation strategy for lucerne breeding in northern Italy. *Theor Appl Genet* 114(4): 647–57.

Annicchiarico, P; P Manunza; A Arnoldi and G Boschin. 2.014. Quality of *Lupinus albus* L. (white lupin) seed: Extent of genotypic and environmental effects. *J Agric Food Chem* 62: 6539–6545.

Arbelaez, J; L Moreno; N Singh; C Tung; L Maron; Y Ospina; C Martinez; C Grenier; M Lorieux; S McCouch. 2.015. Development and GBS-genotyping of introgression lines (ILs) using two wild species of rice, *O. meridionalis* and *O. rufipogon*, in a common recurrent parent, *O. sativa* cv. Curinga. *Mol Breed* 35: 1–18.

Argüello Caro, E; G Maroniche; A Dumón; M Sagadín; M Del Vas and G Truol. 2.013. High viral load in the planthopper vector *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Delphacidae) is associated with successful transmission of mal de Río Cuarto virus. *Ann Entomol Soc Am* 106(1): 93–99.

Arneodo, J; E Lorenzo; I Laguna; G Abdala and G Truol. 2.002a. Cytopathological characterization of Mal de Río Cuarto virus in corn, wheat and barley. *Fitopatol Bras* 27: 298–302.

Arneodo, J; A Guzmán; L Conci; I Laguna and G Truol. 2.002b. Transmission features of Mal de río cuarto virus in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. *Ann Appl Biol* 141: 195–200.

Asíns, M. 2.002. Review: Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. *Plant Breed* 121: 281–291.

Attoui, H; P Mertens; J Becnel; S Belaganahalli; M Bergoin; C Brussaard; J Chappell; M Ciarlet; M del Vas; T Dermody; P Dormitzer; R Duncan; Q Fang; R Graham; K Guglielmi; R Harding; B Hillman; A Makkay; C Marzachi; J Matthijssens; R Milne; F Mohd Jaafar; H Mori; A Noordeloos; T Omura; J Patton; S Rao; M Maan; D Stoltz; N Suzuki; N Upadhyaya; C Wei;

H Zhou. 2011. Family reoviridae. *In: Virus Taxonomy: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses*. King, A; M Adams; E Castens; E Lefkowitz (Eds.). Elsevier. San Diego, California, USA.

Aylor, D; B Baltazar and J Schoper. 2005. Some physical properties of teosinte (*Zea mays* spp. *parviglumis*) pollen. *J Exp Bot* 419: 2401–2407.

Balzarini, M; C Bruno y A Arroyo. 2005. *Análisis de Ensayos Agrícolas Multiambientales. Ejemplos en Info-Gen*. Brujas. Córdoba, Argentina.

Balzarini, M. 2006. *Aplicaciones de modelos mixtos en agricultura. Notas de clases*. Universidad Nacional de Córdoba, 179 pp.

Bassi, F; A Bentley, G Charmet, R Ortiz, J Crossa. 2016. Breeding schemes for the implementation of genomic selection in wheat (*Triticum* spp.). *Plant Sci* 242: 23–36.

Bernardo, R. 2010. *Breeding for Quantitative Traits in Plants*. 2nd Ed. Stemma Press, Woodbury, MN, USA.

Boito, G y 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.

Bolsa de Cereales de Córdoba, Departamento de Información Agroeconómica. 2018. Informe de cultivos N°144. Septiembre 2018.

Bolsa de Comercio de Rosario, Dirección de Informaciones y Estudios Económicos. 2017. Anuario Estadístico 2017.

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; M Balzarini; A Arroyo; M Ibañez; D Díaz; J Salerno and M Di Renzo, 2010. Association between microsatellites and resistance to Mal de Río Cuarto in maize by discriminant analysis. *PHYTON* 79: 31–38.

Bonamico, N; M Di Renzo; M Ibañez; M Borghi; D Díaz; J Salerno and M Balzarini. 2.012. QTL analysis of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize using recombinant inbred lines. *J Agric Sci* 150(5): 619–629.

Boopathi, N. 2.013. *Genetic Mapping and Marker Assisted Selection. Basics, Practice and Benefits*. Springer. New Delhi, India.

Borghi, M. 2.012. Identificación de QTL ligados a resistencia al Mal de Río Cuarto en maíz. Maestría en Genética Vegetal. UNR - INTA.

Bostock, R; M Pye and T Roubtsova. 2.014. Predisposition in plant disease: Exploiting the nexus in abiotic and biotic stress perception and response. *Annu Rev Phytopathol* 52: 23.1–23.33.

Broman, K and S Sen. 2.009. *A Guide to QTL Mapping with R/qtl*. Springer. New York, United States.

Butler, D. 2.009. asreml: asreml() fits the linear mixed model. R package version 3.0. URL www.vsni.co.uk.

Capdevielle, F. 2.001. Evaluation of discriminant analysis procedure combining agronomic and molecular marker information for germplasm improvement in rice. MSc Thesis. LSU.

Carr, D; J Murphy and M Eubanks. 2.006. Genetic variation and covariation for resistance and tolerance to *Cucumber mosaic virus* in *Mimulus guttatus* (Phrymaceae): A test for costs and constraints. *Heredity* 96: 29–38.

Casas Salas, J; J de Jesús Sánchez González; J Ramírez Díaz; J Ron Parra y S Montes Hernández. 2.001. Rendimiento y sus componentes en retrocruzas maíz-teocintle. *Rev Fitotec Mex* 24(1): 17–26.

Causier, B; M Ashworth; W Guo and B Davies. 2.012. The TOPLESS interactome: A framework for gene repression in Arabidopsis. *Plant Physiol* 158: 423–438.

Chardon, F; B Virlon; L Moreau; M Falque; J Joets; L Decousset; A Murigneux and A Charcosset. 2.004. Genetic architecture of flowering time in maize as inferred from quantitative trait loci meta-analysis and synteny conservation with the rice genome. *Genetics* 168: 2169–2185.

Chen, G; X Wang; J Hao; J Yan; J Ding. 2.015. Genome-wide association implicates candidate genes conferring resistance to maize rough dwarf disease in maize. *PLoS ONE* 10(11): e0142001.

Christensen, S; A Nemchenko; Y Park; E Borrego; P Huang; E Schmelz; S Kunze; I Feussner; N Yalpani; R Meeley and M Kolomiets. 2.014. The novel monocot-specific 9-lipoxygenase ZmLOX12 is required to mount an effective jasmonate-mediated defense against *Fusarium verticillioides* in maize. *Am Phytopathol Soc* 27(11): 1263–1276.

Churchill, G and R Doerge. 1.994. Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138(3): 963–971.

Cohen, J and W Galinat. 1.984. Potencial use of alien germoplasm for maize improvement. *Crop Sci* 24: 1011–1015.

Collard, B; M Jahufer; J Brouwer and E Pang. 2.005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169–196.

Collard, B and D Mackill. 2.008. Marker-assisted selection: An approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil Trans R Soc B* 363: 557–572.

Conti, M. 1.984. Epidemiology and Vectors of Reolike Plant Viruses. In *Current Topics in Pathogen-Vector-Host Research*. Ed. K. F. Harris. Praeger Scientific. New York, USA.

Coutiño-Estrada, B and V Vidal-Martínez. 2.006. Variance components of corn hybrids evaluated in the USA corn belt. *Agrociencia* 40: 89–98.

Crossa, J. 2.012. From genotype \times environment interaction to gene \times environment interaction. *Curr Genomics* 13: 225–244.

Cullis B, A Smith, N Coombes. 2.006. On the design of early generation variety trials with correlated data. *J Agric Biol Environ Stat* 11(4): 381–393.

Darwin, C. 1.868. *The Variation of Animals and Plants Under Domestication*. First Ed. Orange Judd & Co. New York, USA.

Degioanni, A; J de Prada y J Cisneros. 2.008. Características del área de estudio, unidades ambientales y productores de la muestra. En: *Estudios socioeconómicos de la sustentabilidad de los sistemas de producción y recursos naturales. Percepción económica y visión de los productores agropecuarios de los problemas ambientales en el sur de Córdoba, Argentina*. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA), Argentina.

Descamps, L; C Sánchez Chopa. 2.012. Primer registro de *Delphacodes kuscheli* (Hemiptera: Auchenorrhyncha) en cereales de invierno y en sorgo de la región del Sudoeste Bonaerense. *Entomotropica* 27(3): 153–158.

Di Renzo, M; N Bonamico; D Díaz; J Salerno; M Ibañez and J Gesumaría. 2.002. 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 and J Salerno. 2.004. Microsatellites markers linked to QTL for resistance to Mal de Río Cuarto disease in *Zea mays* L. *J Agr Sci* 142: 289–298.

Di Renzo, M y N Bonamico. 2.013. Mapeo de QTL para resistencia a mal de Río Cuarto en maíz. *BAG* 24(1): 13–18.

Distéfano, A; L Conci; M Muñoz Hidalgo; F Guzmán; H Hopp and M del Vas. 2.003. Sequence and phylogenetic analysis of genome segments S1, S2, S3 and S6 of Mal de Río Cuarto virus, a newly accepted *Fijivirus* species. *Virus Res* 92: 113–121.

Doebley, J. 1.990. Molecular systematics of *Zea* (Gramineae). *Maydica* 35: 143–150.

Doebley, J and A Stec. 1.991. Genetic analysis of the morphological differences between maize and teosinte. *Genetics* 129: 285–295.

Doebley, J and A Stec. 1.993. Inheritance of the morphological differences between maize and teosinte: Comparison of results for two F2 populations. *Genetics* 134: 559–570.

Doebley, J. 2.004. The genetics of maize evolution. *Annu Rev Genet* 28(1): 37–59.

Dominici, D. 2.007. Enfermedades causadas por virus y mollicutes en maíz, Dr. Sergio Leonardón (IFFIVE – INTA, Universidad Nacional de Río Cuarto [en línea]. Sitio web: Agronomía Informa - Facultad de Agronomía - UBA. Capital Federal, Buenos Aires, Rep. Arg. Consultado el 18/03/2.012. URL: <http://agro.uba.ar/>

Dzhavakhiya, V; O Ozeretskovskaya and S Zinovyeva. 2.007. Immune response. *In: Comprehensive and Molecular Phytopathology* (Dyakov, Y; V Dzhavakhiya and T Korpela Eds.). Elsevier. Amsterdam, The Netherlands. pp. 265–314.

Evans, D and L Cardon. 2.004. Guidelines for genotyping in genomewide linkage studies: Single-nucleotide-polymorphism maps versus microsatellite maps. *Am J Hum Genet* 75: 687–692.

Eyhérabide, G. 2.004. Incorporación de germoplasma indígena de maíz en materiales elite. *IDIA XXI: Revista de información sobre investigación y desarrollo agropecuario* 6: 105–110.

Eyhérabide, G. 2.006. Mejoramiento genético de maíz y su trayectoria en la Argentina. En: *Maíz y nutrición. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Serie de informes especiales de ILSI Argentina.* Capital Federal, Buenos Aires.

Falconer, D and T Mackay. 1.996. *Introduction to Quantitative Genetics.* Longman Ed. Edinburgh, England.

Flint-Garcia, S. 2.013. Genetics and consequences of crop domestication. *J Agric Food Chem* 61: 8267–8276.

Fu, Y. 2.015. Understanding crop genetic diversity under modern plant breeding. *Theor Appl Genet* 128(11): 2131–2142.

Fukunaga, K; J Hill; Y Vigouroux; Y Matsuoka; J Sanchez; G Liu; E Buckler and J Doebley. 2.005. Genetic diversity and population structure of teosinte. *Genetics* 169: 2241–2254.

Gear, G. 2.006. El cultivo del maíz en la Argentina. En: Maíz y nutrición. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Serie de informes especiales de ILSI Argentina. Capital Federal, Buenos Aires.

Giolo, S; J Soler; M Batista; M de Almeida and A Pereira. 2.011. Evidence of SNP effect on the risk of rheumatoid arthritis: Effects of covariate adjustment upon association results. *Rev Bras Biom* 29: 47–59.

Goodstein, D; S Shu; R Howson; R Neupane; R Hayes; J Fazo; T Mitros; W Dirks; U Hellsten; N Putnam and D Rokhsar. 2.012. Phytozome: A comparative platform for green plant genomics. *Nucleic Acids Res* 40(D1): D1178–D1186.

Grau, C; V Radke and F Gillespie. 1.982. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant Dis* 66: 506–508.

Grilli, M. 2.008. An area-wide model approach for the management of a disease vector planthopper in an extensive agricultural system. *Ecol Model* 213: 308–318.

Grondona, M. 2.001. Una aplicación de técnicas de remuestreo (permutación) en la detección de QTLs. VI Reunión Científica del Grupo Argentino de Biometría. Tandil, Buenos Aires.

Grondona, M. 2.005. Introducción al mapeo de marcadores y QTLs en plantas. 34° Congreso Argentino de Genética. Trelew, Chubut.

Guimarães, E; J Ruane; B Scherf; A Sonnino and J Dargie eds. 2.007. Marker-Assisted Selection. Current Status and Future Perspectives in Crops, Livestock, Forestry and Fish. Food and Agriculture Organization of the United Nations, Rome, Italy.

Hallauer, A and M Carena. 2.009. Maize breeding. *In: Handbook of plant breeding: Cereals* (MJ Carena Ed). Springer, New York, NY. pp. 3–98.

Hammer, K and Y Teklu. 2.008. Plant genetic resources: Selected issues from genetic erosion to genetic engineering. *J Agric Rural Dev Trop Subtrop* 109(1): 15–50.

Hausmann, B; H Parzies; T Presterl; Z Sušić and T Miedaner. 2.004. Plant genetic resources in crop improvement. *Plant Genet Resour* 2(1): 3–21.

Heffner, E; A Lorenz; J Jannink; M Sorrells. 2.010. Plant breeding with genomic selection: Gain per unit time and cost. *Crop Sci* 50(5): 1681–1690.

Hyten, D; Q Song; I Choi; M Yoon; J Specht; L Matukumalli; R Nelson; R Shoemaker; N Young and P Cregan. 2.008. High-throughput genotyping with the GoldenGate assay in the complex genome of soybean. *Theor Appl Genet* 116: 945–952.

Illumina, Inc. GoldenGate® Assay Workflow [en línea]. Sitio web: Illumina. San Diego, California, EE. UU. Consultado el 10/03/2.018. URL: <https://www.illumina.com/>

Keneni, G; E Bekele; M Imtiaz; K Dagne. 2.012. Genetic vulnerability of modern crop cultivars: Causes, mechanism and remedies. *Int J Plant Res* 2(3): 69–79.

Kreff, E; M Pacheco; D Díaz; C Robredo; D Puécher; A Céliz and J Salerno. 2.006. Resistance to Mal de Río Cuarto virus in maize: A QTL mapping analysis. *BAG* 17: 41–50.

Kreff, E. 2.010. Genómica aplicada al mapeo preciso de genes de resistencia al mal de Río Cuarto en maíz. Tesis de Doctorado en Ciencias Agrarias. UNR.

Laguna, I y M Pecci. 1.997. El Mal de Río Cuarto. INTA. PROMARC.

Lambing, C; F Franklin and C Wang. 2.017. Understanding and manipulating meiotic recombination in plants. *Plant Physiol* 173: 1530–1542.

Laredo Alcalá, E; J Martínez Hernández; A Iliná; L Guillen Cisneros y F Hernández Castillo. 2.017. Aplicación de ácido jasmónico como inductor de resistencia vegetal frente a patógenos. *Rev Mex Cienc Agríc.* 8(3): 673–683.

Lenardón, S; G March; S Nome and J Ornaghi. 1.998. Recent outbreak of “Mal de Río Cuarto” virus on corn in Argentina. *Plant Dis* 82: 448.

Lenardón, S; G March y J Ornaghi. 1.999. Virus del Mal de Río Cuarto en maíz. *En: Enfermedades de los cultivos extensivos e intensivos. Hoja informativa. Instituto de Fitopatología y Fisiología Vegetal (IFFIVE-INTA), Córdoba, Argentina.*

Lenardón, S; P Vallone; J Marcellino; F Giolitti; S De Breuil; A Salomón. 2.007. Comportamiento de híbridos comerciales de maíz frente al virus del mal de Río Cuarto en el área endémica 2.006/2.007. *En: Informe de Actualización Técnica Maíz 5. EEA INTA Marcos Juárez. Marcos Juárez, Córdoba, Argentina.*

Li, F; H Jia; L Liu; C Zhang; Z Liu; Z Zhang. 2.014. Quantitative trait loci mapping for kernel row number using chromosome segment substitution lines in maize. *Genet Mol Res* 13(1): 1707–1716.

Li, X; G Ahammed; Z Li; M Tang; P Yan and W Han. 2.016. Decreased biosynthesis of jasmonic acid via lipoxygenase pathway compromised caffeine-induced resistance to *Colletotrichum gloeosporioides* under elevated CO₂ in tea seedlings. *Phytopathology* 106: 1270–1277.

Li, H; K Huang; H Du; H Wang; X Chen; S Gao; H Liu; M Cao; Y Lu; T Rong and S Zhang. 2.016. Genome-wide analysis of *gro/tup1* family corepressors and their responses to hormones and abiotic stresses in maize. *J Plant Biol* 59: 603–615.

Liu, B. 1.998. *Statistical Genomics: Linkage, Mapping and QTL Analysis*. CRC Press. Boca Raton, Florida, US.

Liu, C; J Weng; D Zhang; X Zhang; X Yang; L Shi; Q Meng; J Yuan; X Guo; Z Hao; C Xie; M Li; X Ci; L Bai; X Li and S Zhang. 2.014. Genome-wide association study of resistance to rough dwarf disease in maize. *Eur J Plant Pathol* 139: 205–216.

Liu, Z; J Cook, S Melia-Hancock, K Guill, C Bottoms, A Garcia, O Ott, R Nelson, J Recker, P Balint-Kurti, S Larsson, N Lepak, E Buckler, L Trimble, W Tracy, M McMullen and S Flint-Garcia. 2.016a. Expanding maize genetic resources with predomestication alleles: Maize-teosinte introgression populations. *Plant Genome* 9(1): 1–11.

Liu, Z; A Garcia; M McMullen and S Flint-Garcia. 2.016b. Genetic analysis of kernel traits in maize-teosinte introgression populations. *Genes Genom Genet* 6: 2523–2530.

Luan, J; F Wang; Y Li; B Zhang and J Zhang. 2012. Mapping quantitative trait *loci* conferring resistance to rice black-streaked virus in maize (*Zea mays* L.). *Theor Appl Genet* 125: 781–791.

Mackay, T; E Stone and J Ayroles. 2009. The genetics of quantitative traits: Challenges and prospects. *Nat Rev Genet* 10(8): 565–577.

Mano, Y; M Muraki; M Fujimori; T Takamizo and B Kindiger. 2005. Identification of QTL controlling adventitious root formation during flooding conditions in teosinte (*Zea mays* ssp. *huehuetenangensis*) seedlings. *Euphytica* 142: 33–42.

Mano, Y and F Omori. 2013. Flooding tolerance in interspecific introgression lines containing chromosome segments from teosinte (*Zea nicaraguensis*) in maize (*Zea mays* spp *mays*). *Ann Bot* 112(6): 1125–1139.

March, G y J Ornaghi. 1993. Respuesta de especies de teosinte (*Zea*) al virus causal del Mal de Río Cuarto. *In: Workshop Mal de Río Cuarto del maíz*. INTA, Córdoba. pp. 68.

March, G; J Ornaghi; J Beviaqua y A Marinelli. 1993. Intensidad del Mal de Río Cuarto y pérdidas causadas a la producción en las campañas agrícolas 1.981/82 a 1.990/91. *Gac Agron* 76: 384–388.

March, G; M Balzarini; J Ornaghi; J Beviacqua and A Marinelli. 1995. Predictive model for “Mal de Río Cuarto” disease intensity. *Plant Dis* 79: 1051–1053.

March, G; J Ornaghi; J Beviacqua y S Lenardon. 1998. Manual Técnico del Mal de Río Cuarto. Ed. Morgan. Argentina.

March, G; J Ornaghi; J Beviaqua; A Rago; S Lenardon. 2002. Systemic insecticides for control of *Delphacodes kuscheli* and the Mal de Río Cuarto virus on maize. *Int J Pest Manage* 48: 127–132.

Marinelli, A; J Muñoz; S Lenardón y C Martino. 1988. Detección de un retrovirus semejante al causal del Mal de Río Cuarto del maíz en sorgo de alepo (*Sorghum halepense* P.) y mijo (*Panicum milliaceum* L.). II Jornadas de Investigación - UNC. Córdoba, Argentina.

Maroniche, G; V Mongelli; A Peralta; A Distéfano; G Llauger; O Taboga; E Hopp; M del Vas. 2.010. Functional and biochemical properties of Mal de Río Cuarto virus (Fijivirus, Reoviridae) P9-1 viroplasm protein show further similarities to animal reovirus counterparts. *Virus Res* 152: 96–103.

Maroniche, G; V Mongelli; G Llauger; V Alfonso; O Taboga; M del Vas. 2.012. In vivo subcellular localization of Mal de Río Cuarto virus (MRCV) non-structural proteins in insect cells reveals their putative functions. *Virology* 430(2): 81–89.

Mayor, P. 2.001. Identificación de marcadores microsatélites ligados a la tolerancia a Mal de Río Cuarto (MRCV) en maíz (*Zea mays* L.). Tesis de Maestría en Genética Vegetal. UNR-INTA.

McMullen M, S Kresovich, H Villeda, P Bradbury, H Li, Q Sun, S Flint-Garcia, J Thornsberry, C Acharya, C Bottoms, P Brown, C Browne, M Eller, K Guill, C Harjes, D Kroon, N Lepak, S Mitchell, B Peterson, G Pressoir, S Romero, M Oropeza Rosas, S Salvo, H Yates, M Hanson, E Jones, S Smith, J Glaubitz, M Goodman, D Ware, J Holland, E Buckler. 2.009. Genetic properties of the maize nested association mapping population. *Science* 325(5941): 737–740.

Michelmore, R; I Paran and R Kesseli. 1.991. 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.

Milne, R; M del Vas; R Harding; R Marzachì and P Mertens. 2.005. Genus Fijivirus. *In: Virus taxonomy. Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Fauquet, C; M Mayo; J Manilof; V Desselberger and L Ball (Eds.). Elsevier Academic. London, United Kingdom.

Ministerio de Agricultura y Ganadería del Gobierno de la Provincia de Córdoba, República Argentina. 2.016. Resultados de las campañas agrícolas 1.999 - 2.000 a 2.012 - 2.013 [en línea]. Sitio web: Ministerio de Agricultura y Ganadería del Gobierno de la Provincia de Córdoba. Córdoba, Rep. Arg. Consultado el 15/11/2.016. URL: <http://magya.cba.gov.ar>

Mohler, V and C Singrun. 2.004. General considerations: Marker-assisted selection. *In: Biotechnology in Agriculture and Forestry. Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement* (Lörz, H and G Wenzel Eds). Springer. Berlin, Germany.

Molina, M and C Naranjo. 1.987. Cytogenetic studies in the genus *Zea*. 1. Evidence for five as the basic chromosome number. *Theor Appl Genet* 73: 542–550.

Molina, M; M García; C López and V Moreno Ferrero. 2.004. Meiotic pairing in the hybrid (*Zea diploperennis* x *Zea perennis*) x *Zea mays* and its reciprocal. *Hereditas* 141: 135–141.

Molina, M. 2.011. Estudios citogenéticos evolutivos del género *Zea*. Tesis de Doctorado en Biología Vegetal. UPV.

Mongelli, V. 2.010. Estudio funcional de las proteínas codificadas por el virus del Mal de Río Cuarto en hospedantes vegetales. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. UBA. Buenos Aires, Argentina.

Morata, M; D Presello; M Gonzalez y E Frutos. 2.003. Aptitud combinatoria entre líneas de maíz resistentes a Mal de Río Cuarto. *Fitopatol Bras* 28: 236–244.

Nault, L; D Gordon; V Damsteegt and H Iltis. 1.982. Response of annual and perennial teosintes (*Zea*) to six maize viruses. *Plant Dis* 66(1): 61–62.

Nicaise, V. 2.014. Crop immunity against viruses: Outcomes and future challenges. *Front Plant Sci* 5: 660.

Nome, S; S Lenardón; B Raju; I Laguna; S Lowe and D Docampo. 1.981. Association of retrovirus-like particles with disease of Río Cuarto of Argentina. *Phytopathol Z* 101: 7–15.

Nuss, E and S Tanumihardjo. 2.010. Maize: A paramount staple crop in the context of global nutrition. *Compr Rev Food Sci Food Saf* 9(4): 417–436.

Ogunola, O; L Hawkins, E Mylroie, M Kolomiets, E Borrego, J Tang, W Williams and M Warburton. 2.017. Characterization of the maize lipoxygenase gene family in relation to aflatoxin accumulation resistance. *PLoS ONE* 12(7): e0181265.

Olivera Carrión, M. 2.006. Aporte nutricional de las principales formas de consumo del maíz en la alimentación humana. En: Maíz y nutrición. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Serie de informes especiales de ILSI Argentina. Capital Federal, Buenos Aires.

Olson, A; J Pataky; C D'Arcy and R Ford. 1.990. Effects of drought stress and infection by maize dwarf mosaic virus on sweet corn. *Plant Dis* 74: 147–151.

Onwude, D; R Abdulstter; C Gomes and N Hashim. 2.016. Mechanisation of large-scale agricultural fields in developing countries – a review. *J Sci Food Agric* 96(12): 3969–3976.

Ornaghi, J; J Beviacqua; G March and S Lenardon. 1.999a. Detection of Mal de Río Cuarto virus in Uruguay. *Fitopatol Bras* 24: 471–471.

Ornaghi, J; G March; G Boito; A Marinelli; J Beviacqua; J Giuggia and S Lenardón. 1.999b. Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli* vector of Mal Río Cuarto Virus. *Maydica* 44: 219–223.

Ornaghi, J; G March; R Moschini; M Martínez; G Boito. 2.011. 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.

Ott, O. 2.009. The search for novel resistance alleles: Screening teosinte-maize introgression lines for resistance to Northern Leaf Blight. Honors Thesis, Plant Science Research Program, College of Agriculture and Life Sciences. Cornell University, New York, USA.

Parma, P; G Pirri; F Damina and G Greppi. 2.011. Application of DNA microarray technology in *Bos taurus* genomic analysis: Preliminary results. *Ital J Anim Sci* 2(1): 61–63.

Paterson, A. 2.006. Leafing through the genomes of our major crop plants: Strategies for capturing unique information. *Nature* 7: 174–184.

Patterson N, A Price, D Reich. 2.006. Population structure and eigenanalysis. *PLoS Genet* 2(12): e190.

Pauwels, L; G Barbero; J Geerinck; S Tilleman; W Grunewald; A Perez; J Chico; R Bossche; J Sewell; E Gil; G Garcia-Casado; E Witters; D Inze; J Long; G De Jaeger; R Solano and A Goossens. 2010. NINJA connects the co-repressor TOPLESS to jasmonate signalling. *Nature* 464:788–791.

Pechanova, O y T Pechan. 2015. Maize-pathogen interactions: An ongoing combat from a proteomics perspective. *Int J Mol Sci* 16: 28429–28448.

Peng, L; Y Shirano; H Ohta; T Hibino; K Tanaka and D Shibata. 1994. A novel lipoxygenase from rice. Primary structure and specific expression upon incompatible infection with rice blast fungus. *J Biol Chem* 269(5): 3755–3761.

Poggio, L; G Gonzalez; V Confalonieri; C Comas and C Naranjo. 2005. The genome organization and diversification of maize and its allied species revisited: Evidences from classical and FISH-GISH cytogenetic analysis. *Cytogenet Genome Res* 109 (1-3): 259–267.

Popp, J; K Petó; J Nagy. 2013. Pesticide productivity and food security. A review. *Agron Sustain Dev* 33(1): 243–255.

Presello, D; A Celiz y E Frutos. 1995. Efectos genéticos asociados con la resistencia a la enfermedad Mal de Río Cuarto en líneas endocriadas de maíz. *In: Proceedings of III Latin American and XVI Andean Zone of Maize Researchers Meeting. Tomo I* (LG Avila and LM Céspedes Eds). Fundación SI Patiño, Bolivia. pp. 407–413.

Pritchard, J; M Stephens; N Rosenberg and P Donnelly. 2000a. Association mapping in structured populations. *Am J Hum Genet* 67(1): 170–81.

Pritchard, J; M Stephens and P Donnelly. 2000b. Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945–959.

R Core Team. 2016. R: A Language and Environment for Statistical Computing. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria. URL <https://www.R-project.org/>.

Raven, P. 2014. GM crops, the environment and sustainable food production. *Transgenic Res* 23(6): 915–21.

Redinbaugh, M and R Pratt. 2.008. Virus Resistance. *In: Maize Handbook*. 2nd Ed. (S Hake and J Bennetzen Eds). Springer-Verlag, NY, USA. pp. 255–270.

Redinbaugh, M and R Pratt. 2.009. Virus Resistance. *In: Handbook of Maize: Its Biology* (Bennetzen, J and S Hake Eds.). Springer-Verlag, NY, USA. pp. 251–270.

Remes Lenicov, A; I Laguna; P Rodriguez Pardina; R Mariani; E Virla; P Herrera y E Dagoberto. 1.999. Diagnóstico del virus del “Mal de Río Cuarto” y sus vectores en maíz en Argentina. *Manejo Integr Plagas* 51: 36–46.

Rodríguez Pardina, P; M Giménez Pecci and I Laguna. 1.998. Wheat: A new natural host for the Mal de Rio Cuarto Virus in the endemic disease area, Río Cuarto, Cordoba Province, Argentina. *Plant Dis* 82: 149–152.

Rossi, D. 2.007. Evolución de los cultivares de maíz utilizados en la Argentina [en línea]. Sitio web: *Revista Agromensajes*. Rosario, Santa Fe, Rep. Arg. Consultado el 22/03/2.012. URL: <https://core.ac.uk/>

Rossi, E; M Borghi; M Di Renzo and N Bonamico. 2.015. Quantitative trait loci (QTL) identification for resistance to Mal de Rio Cuarto Virus (MRCV) in maize based on segregate population. *Open Agric J* 9: 48–55.

Salvi, S; S Castelletti; R Tuberosa. 2.009. An updated consensus map for flowering time QTLs in maize. *Maydica* 54: 501–512.

Sasson, A. 2.000. La contribución de las biotecnologías a la alimentación. *Biotecnol Apl* 17(1): 1–6.

Satorre, E; R Benech Arnold; G Slafer; E de la Fuente; D Miralles; M Otegui y R Savin. 2.003. *Producción de Granos. Bases Funcionales para su Manejo*. Editorial Facultad de Agronomía. Capital Federal, Buenos Aires.

Schmalenbach, I; T March; T Bringezu; R Waugh and K Pillen. 2.011. High-resolution genotyping of wild barley introgression lines and fine-mapping of the threshability locus *thresh-1* using the Illumina GoldenGate Assay. *Genes Genomes Genet* 1: 187–196.

Schuster, I y C Cruz. 2.008. Estatística genômica aplicada a populações derivadas de cruzamentos controlados. 2^{da} Ed. UFV, Viçosa, Brasil.

Sekhwal, M; P Li; I Lam; X Wang; S Cloutier and F You. 2.015. Disease resistance gene analogs (RGAs) in plants. *Int J Mol Sci* 16: 19248–19290.

Semagn, K; Å Bjørnstad and Y Xu. 2.010. The genetic dissection of quantitative traits in crops. *Electron J Biotechnol* 13(5): 1–45.

Sharma, S; H Upadhyaya; R Varshney and C Gowda. 2.013. Pre-breeding for diversification of primary gene pool and genetic enhancement of grain legumes. *Front Plant Sci* 4: 309.

Shen, R; J Fan; D Campbell; W Chang; J Chen; D Doucet; J Yeakley; M Bibikova; E Wickham Garcia; C McBride; F Steemers; F Garcia; B Kermani; K Gunderson and A Oliphant. 2.005. High-throughput SNP genotyping on universal bead arrays. *Mutat Res* 573: 70–82.

Shi, L. 2.008. Resistance in maize rough dwarf virus and gray leaf spot disease gene positioning. Master's Degree Thesis. BUA.

Singh, B and A Singh. 2.015. *Marker-Assisted Plant Breeding: Principles and Practices*. Springer. New Delhi, India.

Szalma, S; B Hostert; J LeDeaux; C Stuber and J Holland. 2.007. QTL mapping with near-isogenic lines in maize. *Theor Appl Genet* 114: 1211–1228.

Tameling, W; S Elzinga; P Darmin; J Vossen; F Takken; M Haring; B Cornelissen. 2.002. The tomato R gene products I-2 and Mi-1 are functional ATP binding proteins with ATPase activity. *Plant Cell* 14(11): 2929–2939.

Tanksley, S. 1.993. Mapping polygenes. *Annu Rev Genet* 27: 205–233.

United States Department of Agriculture, Foreign Agricultural Service. 2.018. *World Agricultural Production*. Circular Series, September 2.018.

van de Wouw, M; T van Hintum; C Kik; R van Treuren; B Visser. 2.010. Genetic diversity trends in twentieth century crop cultivars: A meta analysis. *Theor Appl Genet* 120: 1241–1252.

van den Berg, I; S Fritz and D Boichard. 2013. QTL fine mapping with Bayes C(π): A simulation study. *Genet Sel Evol* 45(19): 1–11.

van den Burg, H; D Tsitsigiannis; O Rowland; J Lo; G Rallapalli; D MacLean; F Takken and J Jones. 2008. The F-box protein ACRE189/ACIF1 regulates cell death and defense responses activated during pathogen recognition in tobacco and tomato. *Plant Cell* 20(3): 697–719.

van Heerwaarden, J; J Doebley; W Briggs; J Glaubitz; M Goodman; J de Jesus Sanchez Gonzalez and J Ross-Ibarra. 2011. Genetic signals of origin, spread, and introgression in a large sample of maize landraces. *P Natl Acad Sci USA* 108 (3): 1088–1092.

Vicario, J. Se cumplen 45 años de la aparición del Mal de Río Cuarto [en línea]. Sitio web: Sociedad Rural de Río Cuarto. Río Cuarto, Córdoba, Rep. Arg. Consultado el 18/03/2012. URL: <http://www.sruralrc.org/>

Vick, B and D Zimmerman. 1987. Oxidative Systems for the Modification of Fatty Acids: The Lipoxygenase Pathway. *In: Lipids: Structure and Function. The Biochemistry of Plants* (Stumpf, P Ed). Academic Press, NY, USA. pp. 53–90.

Voorrips, R. 2002. MapChart: Software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93(1): 77–78.

Wang, F; G Qin; Z Sui; Z Wang; Z Wang; J Yu and J Zhang. 2006. Improved method for assaying maize plant resistance to maize rough dwarf disease by artificial inoculation and real-time RT-PCR. *Eur J Plant Pathol* 116: 289–300.

Warburton, M; G Wilkes; S Taba; A Charcosset; C Mir; F Dumas; D Madur; S Dreisigacker; C Bedoya; B Prasanna; C Xie; S Hearne and J Franco. 2011. Gene flow among different teosinte taxa and into the domesticated maize gene pool. *Genet Resour Crop Evol* 58(8): 1243–1261.

Warburton, M; S Rauf; L Marek; M Hussain; O Ogunola and J Sanchez Gonzalez. 2017. The use of crop wild relatives in maize and sunflower breeding. *Crop Sci* 57: 1227–1240.

Wijnker, E and H de Jong. 2008. Managing meiotic recombination in plant breeding. *Trends Plant Sci* 13: 640–646.

Wisser, R; P Balint-Kurti and R Nelson. 2006. The genetic architecture of disease resistance in maize: A synthesis of published studies. *Phytopathology* 96: 120–129.

Woldemariam, M; K Ahern; G Jander and V Tzin. 2018. A role for 9-lipoxygenases in maize defense against insect herbivory. *Plant Signal Behav* 13(1): e1422462.

Wusirika, R; K Li; R Phillips and J Bennetzen. 2011. *Zea*. In: *Wild Crop Relatives: Genomic and Breeding Resources* (C Kole). Springer, Berlin, Germany. pp. 457–488.

Xu, Y. 2010. *Molecular Plant Breeding*. CAB International. Cambridge, MA, USA.

Yamamoto, E; H Matsunaga; A Onogi; H Kajiya-Kanegae; M Minamikawa; A Suzuki; K Shirasawa; H Hirakawa; T Nunome; H Yamaguchi; K Miyatake; A Ohyama; H Iwata and H Fukuoka. 2016. A simulation-based breeding design that uses whole-genome prediction in tomato. *Sci Rep* 6: 19454.

Yan, W; L Hunt; Q Sheng and Z Szlavnics. 2000. Cultivar evaluation and mega-environment investigation based on GGE Biplot. *Crop Sci* 40: 597–605.

Yan, W; P Cornelius, J Crossa and L Hunt. 2001. Two types of GGE biplots for analyzing multi-environment trial data. *Crop Sci* 41: 656–663.

Yang, H; J Jian; X Li; D Renshaw; J Clements; M Sweetingham; C Tan and C Li. 2015. Application of whole genome resequencing data in the development of diagnostic DNA markers tightly linked to a disease-resistance locus for marker-assisted selection in lupin (*Lupinus angustifolius*). *BMC Genomics* 16: 660.

Yang, Q; Y He, M Kabahuma, T Chaya, A Kelly, E Borrego, Y Bian, F El Kasmi, L Yang, P Teixeira, J Kolkman, R Nelson, M Kolomiets, J Dangl, R Wisser, J Caplan, X Li, N Lauter and P Balint-Kurti. 2017. A gene encoding maize caffeoyl-CoA *O*-methyltransferase confers quantitative resistance to multiple pathogens. *Nat Genet* 49(9): 1364–1372.

Zambrano, J; M Jones; E Brenner; D Francis; Adriana Tomas; M Redinbaugh. 2014. Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus-resistant maize inbred line. *Theor Appl Genet* 127(4): 867–880.

Zamir, D. 2001. Improving plant breeding with exotic genetic libraries. *Nat Rev Genet* 2 (12): 983–989.

Zhang, H; J Yang; J Chen and M Adams. 2008. A black-streaked dwarf disease on rice in China is caused by a novel fijivirus. *Arch Virol* 153(10): 1893–1898.

Zhou, Y; Z Xu; C Duan; Y Chen; Q Meng; J Wu; Z Hao; Z Wang; M Li; H Yong; D Zhang; S Zhang; J Weng and X Li. 2016. Dual transcriptome analysis reveals insights into the response to Rice black-streaked dwarf virus in maize. *J Exp Bot* 67(15): 4593–4609.

Zoratti, L; L Palmieri, L Jaakola and H Häggman. 2015. Genetic diversity and population structure of an important wild berry crop. *AoB Plants* 7: plv117.