

"2012 - Año de Homenaje al doctor D. MANUEL BELGRANO"



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
Campo Experimental Villarino C.C. N° 14
S2125ZAA | Zavalla | Santa Fe | Argentina
Tel/Fax: +54 0341 497-0080
www.fcagr.unr.edu.ar
agro@unr.edu.ar



FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO

**CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE UNA POBLACIÓN
SEGREGANTE DE MAÍZ PARA RESISTENCIA AL MAL DE RIO CUARTO VIRUS**

MARIA LETICIA BORGHI

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS AGRARIAS

DIRECTOR: MIGUEL ANGEL DI RENZO

CO-DIRECTOR: NATALIA CECILIA BONAMICO

2019



UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO
FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
Campo Experimental Villarino C.C. N° 14
S2125ZAA | Zavalla | Santa Fe | Argentina
Tel/Fax: +54 0341 497-0080
www.fcagr.unr.edu.ar
agro@unr.edu.ar

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE UNA POBLACIÓN
SEGREGANTE DE MAÍZ PARA RESISTENCIA AL MAL DE RÍO CUARTO
VIRUS

MARIA LETICIA BORGHI
INGENIERA AGRÓNOMA-UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en la Universidad Nacional de Río Cuarto, durante el período comprendido entre los años 2012 a 2018, bajo la dirección de Miguel Angel Di Renzo.

Doctorando: María Leticia Borghi

Firma:

Director: Miguel Angel Di Renzo

Firma:

Co-Director: Natalia Cecilia Bonamico

Firma:

Defendida: 15 mayo de 2019.

AGRADECIMIENTOS

- A mis padres Stella y Rubén, quienes me alentaron incondicionalmente para poder finalizar esta etapa.
- A Gustavo, por acompañarme en este gran camino de formación profesional.
- A mis hermanos, por estar siempre presentes.
- A Natalia Bonamico, Ezequiel Rossi, Mercedes Ibañez y Miguel Di Renzo, por permitirme realizar este trabajo en su equipo, por los conocimientos que me transmitieron, por el apoyo, los consejos y guía a lo largo de estos años.
- A Mónica Balzarini, Daniel Presello y Luis Conci, por sus aportes, correcciones, sugerencias y ayuda en la redacción y en el análisis de datos que fueron significativos y valiosos en el desarrollo de este estudio.
- A mis compañeros de trabajo en Mejoramiento Genético en la UNRC: Valeria Girardi, Luciana Salvi y Maximiliano Dallo, por los momentos compartidos, las risas, las palabras de aliento y sobre todo por el trabajo en equipo.
- A Renata Cantoro y Santiago Alvarez Prado, por la ayuda brindada que me permitió llevar adelante este trabajo.
- A mis compañeros de trabajo, Belén Carbonari y Claudio Vagliengo, por el apoyo brindado y las fuerzas transmitidas durante la corrección del trabajo de tesis.
- Al CONICET y al Ministerio de Ciencia y Tecnología del Gobierno de la Provincia de Córdoba por otorgarme la oportunidad de formarme.

PUBLICACIONES Y PRESENTACIONES A CONGRESOS

PUBLICACIONES

- Borghi M.L., M.A. Ibañez, N.C. Bonamico, M.V. Knadus, D. Almorza Gomar, E.A. Guillen, J.C. Salerno, M.A. Di Renzo. 2012. Combining ability of flint corn inbred lines: Mal de Río Cuarto disease tolerance and grain yield. *Phyton* 81: 238-245.
- Bonamico N., M. Di Renzo, M. Ibañez, M. Borghi, D. Díaz, J. Salerno, M. Balzarini. 2012. QTL analysis of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize using recombinant inbred lines. *Journal of Agricultural Science* 150: 619-29.
- Bonamico N.C., M.A. Di Renzo, M.L. Borghi, M.A. Ibañez, D.G. Díaz, J.C. Salerno, M.G. Balzarini. 2013. Mapeo de QTL para una medida multivariada de la reacción al virus del mal de Río cuarto". *Journal of Basics and Applied Genetics* 24 (2):11-21.
- Rossi E.A., M.L. Borghi, M.A. Di Renzo, N.C. Bonamico. 2015. Quantitative Trait *loci* (QTL) Identification for Resistance to Mal de Río Cuarto Virus (MRCV) in Maize Based on Segregate Population. *The Open Agriculture Journal*, 9: 1-8.

CONGRESOS

- Borghi L., M. Ibañez, N. Bonamico, M. Dallo, M. Di Renzo. 2009. Mal de Río Cuarto disease in Maize: inheritance of resistance. *Biocell* 33 (3): 257. ISSN 0327-9545.
- Bonamico N., M. Ibañez, L. Borghi, M. Dallo, M. Di Renzo. 2009. Mecanismos involucrados en la tolerancia a Mal de Río Cuarto. XXXVIII CONGRESO ARGENTINO DE GENÉTICA. Argentina. Tucumán. *Lilloa* 45: 23.
- Borghi M.L., M.A. Ibañez, D.A. Presello, M.A. Di Renzo. Variabilidad genotípica en familias F_{2:3} de maíz para la virosis Mal de Río Cuarto. XL CONGRESO ARGENTINO DE GENÉTICA. Corrientes del 18 al 21 de Septiembre de 2011.
- Borghi M.L., N.C. Bonamico, M.A. Di Renzo, D.A. Presello. Identificación de QTL ligados a tolerancia a Mal de Río Cuarto en una población de F_{2:3}. XLI Congreso Argentino de Genética. 2012.
- Borghi M.L., N.C. Bonamico, P.I. Feliú, D.A. Presello, M.A. Di Renzo. Mapeo de QTL para una medida multivariada de la reacción al virus del Mal de Río Cuarto en familias F_{2:3} de maíz. XIX Jornadas Científicas Sociedad de Biología de Córdoba. La Falda 2013. Resumen.

INDICE

	Pág.
INTRODUCCIÓN	1
1. El cultivo del maíz (<i>Zea mays</i> L.)	1
2. La importancia del cultivo de maíz y su mejoramiento genético en Argentina	3
3. Enfermedades del maíz: la importancia del mal de Río Cuarto virus	6
4. Intervalo antesis-estigma y rendimiento en maíz	12
5. Principios básicos del mapeo basado en marcadores moleculares para caracteres cuantitativos	14
6. Mapeo de <i>loci</i> de caracteres cuantitativos (QTL)	16
7. Detección de QTL: métodos	19
8. Factores que influyen la detección de QTL	21
9. Aplicación de los QTL: selección asistida por marcadores	23
OBJETIVOS	25
MATERIALES Y MÉTODOS	26
1. Material vegetal	26
2. Ensayos de campo	26
3. Datos fenotípicos	28
4. Datos genotípicos	31
5. Análisis de datos	34
6. Construcción del mapa de ligamiento	36
7. Análisis de QTL	37
RESULTADOS	40
1. Caracterización fenotípica de familias segregantes $F_{2:3}$ en tres ambientes de evaluación y a través de ambientes	40
2. Estimaciones de heredabilidad	45
3. Correlaciones entre caracteres	48
4. Análisis de QTL MTME	50
DISCUSIÓN	55
1. Caracterización fenotípica de familias segregantes $F_{2:3}$ en tres ambientes de evaluación y a través de ambientes	55

2. Estimaciones de heredabilidad	58
3. Correlaciones entre caracteres	60
4. Análisis de QTL MTME	61
4.1. Contexto general: enfermedades virósicas en maíz	61
4.2. Consistencia de los QTL identificados con estudios previos sobre MRCV en maíz	63
4.3. Métodos de detección de QTL	66
4.4. Consideraciones finales QTL para resistencia al MRCV	69
CONCLUSIONES	73
BIBLIOGRAFÍA	74
ANEXOS	82

ABREVIATURAS

AD: análisis discriminante

Bin: región genómica

BLUP: *best linear unbiased predictor*

CIM: mapeo por intervalo compuesto

DH: doble haploides

IAE: intervalo antesis-estigma

INC: incidencia

ISE: índice de severidad

MM: marcadores moleculares

MRCV: mal de Río Cuarto virus

MTME: caracteres múltiples en ambientes múltiples

NIL: líneas cuasi isogénicas

QTL: *loci* de caracteres cuantitativos

RC: retrocruzas

RIL: líneas endocriadas recombinantes

RTO: rendimiento

SEV: severidad

SIM: mapeo por intervalo simple

SNP: *single nucleotide polymorphisms*

SSR: *simple sequence repeats*

RESUMEN

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE UNA POBLACIÓN SEGREGANTE DE MAÍZ PARA RESISTENCIA AL MAL DE RIO CUARTO VIRUS

La virosis producida por el mal de Río Cuarto virus (MRCV) es la enfermedad más importante del maíz (*Zea mays* L) en la Argentina. El MRCV -género *Fijivirus*, Familia *Reoviridae*- es transmitido de manera persistente por *Delphacodes kuscheli* Fennah. Estudios iniciales mostraron que la resistencia al MRCV es un carácter poligénico de moderada heredabilidad, regido por genes con efectos genéticos aditivos y no aditivos. Los genotipos usualmente tienen respuestas impredecibles porque esta enfermedad virósica, que se presenta de manera no sistemática, manifiesta una marcada interacción genotipo \times ambiente. Los objetivos del presente estudio fueron evaluar fenotípicamente familias segregantes $F_{2:3}$ de maíz por los caracteres índice de severidad (ISE), incidencia (INC) y severidad (SEV) del MRCV, así como por intervalo anthesis-estigma (IAE) y rendimiento (RTO); estimar la heredabilidad y correlación de los caracteres; identificar *loci* de caracteres cuantitativos (QTL) para ISE, INC y SEV; y determinar la consistencia en las posiciones encontradas. Un total de 208 familias $F_{2:3}$ derivadas del cruzamiento entre la línea parental susceptible (B73) y resistente (LP116), fueron evaluadas para los caracteres mencionados en tres ambientes en el área donde el MRCV es endémico. La extracción de ADN se realizó desde material vegetal obtenido de las líneas parentales y de las generaciones F_1 y F_2 . El análisis molecular se realizó con marcadores microsatélites y se efectuaron análisis de ligamiento entre los mismos para identificar regiones del genoma asociadas a los caracteres. Los valores estimados de heredabilidad fueron moderados para todos los caracteres en ambientes individuales donde las componentes de varianza genética y ambiental presentaron similares dimensiones; las estimaciones a través de ambientes fueron inferiores debido a una gran proporción de la componente de varianza genotipo \times ambiente. El ISE del MRCV presenta correlaciones positivas y significativas con síntomas en panojas y hojas, INC, SEV e IAE, y correlaciones negativas y significativas con altura de planta y RTO. Los QTL estables detectados para ISE, INC y SEV del MRCV, mediante el análisis de QTL para caracteres múltiples en ambientes múltiples (MTME), ubicados en los *bins* 1.03, 1.07, 4.01, 8.08 y 10.03, resultan posiciones consistentes al observar lo encontrado en estudios previos, por lo que serán regiones candidatas para profundizar la

investigación de las bases genéticas de la resistencia a la enfermedad. Sobre la base de heredabilidades moderadas e interacciones genotipo \times ambiente significativas, la selección para la resistencia requiere continuar con la evaluación de distintas fuentes de germoplasma a través de múltiples años y localidades.

Palabras clave: Incidencia (INC); Severidad (SEV); Intervalo anthesis-estigma (IAE); Rendimiento (RTO); *Loci* de caracteres cuantitativos (QTL).

ABSTRACT

PHENOTYPIC AND GENOTYPIC CHARACTERIZATION FOR MAL DE RIO CUARTO VIRUS RESISTANCE IN MAIZE BASED ON SEGREGATE POPULATION

CARACTERIZACIÓN FENOTÍPICA Y GENOTÍPICA DE UNA POBLACIÓN SEGREGANTE DE MAÍZ PARA RESISTENCIA AL MAL DE RIO CUARTO VIRUS

Mal de Río Cuarto virus (MRCV) is the most important disease of *Zea mays* L. The MRCV -genus *Fijivirus*, Family *Reoviridae*- is transmitted by *Delphacodes kuscheli* Fennah in a persistent mechanism. Resistance to MRCV disease is a polygenic trait with moderate heritability and showed additive and non-additive genetic effects. The goals of this work were to characterize phenotypically the response of maize genotypes for disease severity index (DSI), disease incidence (INC), and disease severity (SEV) to MRCV, as well as anthesis-silking interval (ASI) and grain yield (GY); to estimate heritability and correlations between the traits; to identify quantitative trait *loci* (QTL) for DSI, INC and SEV to MRCV, and to determine the consistency of the positions found. Two hundred and eight F_{2:3} segregating families derived from a cross between a susceptible inbred line (B73) and a resistant inbred line (LP116) were evaluated across three environments in the region where the disease is endemic. The molecular analyses with microsatellites markers were carried out. The estimates of heritability were moderate for DSI, INC, SEV, ASI and GY in individual environments where the components of genetic and environmental variance presented the same dimension; estimates across environments were lower in all traits due to a large proportion of the genotype \times environment variance component. The DSI to MRCV presents positive and significant correlations with symptoms in tassel and leaves, INC, SEV and IAE, and negative and significant correlation with RTO. The stable QTL detected by a multi-trait multi-environment (MTME) QTL analysis, for the traits DSI, INC and SEV were identified on *bins* 1.03, 1.07, 4.01, 8.08 and 10.03. These genomic regions were identified in previous studies and could be considered promising for detecting candidate genes related to MRCV. Based on moderate heritabilities and genotype \times environment interaction that were significant in this study and in the published literature on resistance to the MRCV, the selection for resistance would require evaluation of different germplasm across multiple environments.

Keywords: Incidence (INC) - Severity (SEV) - Anthesis-silking interval (ASI) - Grain yield (GY) - Quantitative trait *locus* (QTL)

INTRODUCCIÓN

1- El cultivo del maíz

El maíz (*Zea mays* L.), originario de centroamérica, fue introducido en Europa a fines del siglo XV, en donde se convirtió en un factor fundamental de la alimentación humana y animal. Debido a su productividad y adaptabilidad, se extendió rápidamente a todos los continentes del planeta, ocupando la tercera posición en cuanto a la producción total de cereales, después del arroz y del trigo. Durante la domesticación, que iniciaron los pueblos originarios americanos hace más de 8000 años, el maíz cultivado ganó varias cualidades nutricionales, pero perdió la capacidad de sobrevivir en forma silvestre. El teosinte (su ancestro), sin embargo, aún se encuentra como gramínea salvaje en México y Guatemala (Gear, 2006).

El maíz es una gramínea anual, con vainas foliares que se superponen y láminas alternadas anchas. Posee espigas (inflorescencias femeninas) de 7 a 40 centímetros de largo y flores estaminadas que, en conjunto, forman panojas terminales o inflorescencias masculinas. Se propaga por semillas producidas mayormente mediante fecundación cruzada, por lo que es un cultivo alógamo y el éxito reproductivo depende del movimiento del polen por el viento (Echeverría y Sainz Rozas, 2006). El rendimiento del cultivo de maíz resulta del crecimiento y del desarrollo, dos procesos simultáneos e interdependientes; el primero se refiere al número y al tamaño de las células, y el segundo a la sucesión progresiva de las etapas que llevan a establecer la morfología del organismo adulto (Andrade et al., 1997).

A nivel mundial existen varios tipos de maíces, los cuales pertenecen a la misma especie y solo se diferencian por una simple clasificación utilitaria, no botánica. Esta clasificación abarca formas múltiples del maíz, tamaños diversos, colores, texturas y adaptación a diferentes ambientes, constituyendo numerosas variedades primitivas o tradicionales que son cultivadas actualmente. En la Argentina las formas primitivas del maíz se localizan en zonas de agricultura de subsistencia y minifundios del noroeste argentino (NOA), noreste argentino (NEA), como así también, comunidades andinas y patagónicas. Desde el punto de vista comercial, es utilizado sólo un reducido número de

tipos del cultivo que se clasifican de acuerdo a la dureza del grano en duros o *flint*, dentados, pisingallo o *popcorn* y harinosos. Otro tipo de maíz utilizado en nuestro país son los maíces de alto valor, los mismos provienen de una asociación varietal que produce un grano de mayor valor nutritivo ya que tiene mayor concentración en aceite y proteína, que le da un valor agregado para la industria avícola y porcina (Gear, 2006).

En referencia a la producción mundial de cereales, el maíz representa el 33%, es decir, que 1 de cada 3 toneladas de cereales comercializadas en el mundo corresponden a este cultivo; siendo en el promedio de los últimos 3 años, de 1025 millones de toneladas. Estados Unidos, China, Brasil, Unión Europea y Argentina son los principales productores, ocupando nuestro país el cuarto lugar como productor (con el 3.4% de participación) y el tercero como exportador, con el 15.9% de las toneladas exportadas en el promedio de las tres campañas entre 2015/16 y 2017/18 (Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina, 2019). Las producciones argentinas de maíz de las campañas 2015/16 y 2016/17 fueron de 30 y 39 millones de toneladas, respectivamente. Para la campaña 2017/18 la cosecha de maíz se estimaba en 41 millones de toneladas, pero debido al contexto climático de sequía que atravesaron los cultivos, la misma bajó a 31; para la campaña 2018/19 se estima una producción de 50 millones de toneladas. En lo referente a la superficie sembrada, el cultivo aumentó campaña tras campaña de 3.9 millones de hectáreas en el año 2015 a 5.4 en el año 2018, un 35% más versus el promedio de los últimos 5 años (Bolsa de Cereales de Argentina, 2018). Cabe destacar, que en referencia a la producción mundial de maíz, en la campaña 2018/19, la provincia de Córdoba es la octava región productora de maíz con 18.2 millones de toneladas (38% de la producción nacional Argentina), luego de Iowa, Illinois, Nebraska, Minnesota, Matto Grosso, Indiana, South Dakota, y se constituye en primer productor nacional (Bolsa de Cereales de Córdoba, 2019). En esta fuente bibliográfica, se reportó que en cuanto a las exportaciones, dentro del top cuatro de exportadores mundiales de maíz se encuentra nuestro país que en la campaña actual tendría la mayor cosecha del cultivo de su historia, generando un saldo exportable de 30.5 millones de toneladas. En referencia al maíz pisingallo, nuestro país se consolida a nivel mundial como uno de los productores más destacado y como el principal exportador, con envíos a 112 países que alcanzaron el 97% del total producido (206.039 toneladas) por más de 112 millones de dólares, el 3% restante va al mercado interno (Senasa, 2018).

2- La importancia del cultivo de maíz y su mejoramiento genético en Argentina

En la Argentina, el cultivo de maíz no sólo representa un alimento, sino que se ha transformado en la fuente de energía renovable más importante. La principal causa de este suceso se debe a que el maíz se convirtió en uno de los granos más cultivados debido a su valor como forraje, biocombustible y materia prima para una gran cantidad de industrias (Echeverría y Sainz Rozas, 2006). Del total de la producción Argentina, el principal destino es la exportación (52%), seguido por el consumo ganadero que incluye producción de carnes, huevos y leche (27%); en tercer lugar aparece el sector molinero como demandante del grano con las moliendas seca y húmeda (4%), el alimento balanceado (7%) y el bioetanol (3%). El 7% restante está representado por otras finalidades, como el uso para semilla. Como resultado del aumento de producción, el maíz se convirtió en un cultivo estratégico para el desarrollo del país por su capacidad para generar empleo e inversiones; la cadena de valor propia del cultivo generó para el 2017, 172.693 puestos de trabajo, de los cuales 54% fueron directos y 46% indirectos (Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina, 2019).

El avance tecnológico en genética, condujo a que el maíz sea el cultivo con mayor aumento de rendimiento en los últimas cuatro décadas. Por otra parte, la oferta y variedad de los insumos utilizados en su producción, tales como agroquímicos, fertilizantes y maquinaria, provocaron profundos cambios para que tenga cada vez mayores rendimientos (ILSI, 2006). Este aumento es favorable en el escenario del contexto actual mundial, donde la población aumentará de 6900 a 9000 millones de habitantes para el año 2050 y se estima que la demanda mundial de maíz será mayor que la de trigo y arroz. El progreso agrotecnológico llevó a que la industria de semillas desarrolle germoplasma capaz de aprovecharlo; la evolución de la productividad del maíz en la Argentina se puede sintetizar en distintas etapas que arrancan desde el año 1970 donde se transitó del uso de variedades de polinización libre a la masificación de la siembra de híbridos dobles, luego los de tres líneas (1980) y finalmente los simples (1990) (Ferraroti, 2010). Luego del año 1980 continuó el proceso iniciado en la década anterior de sustitución de variedades localmente adaptadas por genotipos híbridos, lográndose avances en el manejo poscosecha del grano, en particular en los procesos de almacenamiento y secado, lo cual favoreció la

cosecha anticipada y la recolección con diferentes tenores de humedad. Durante esta década, el maíz recibió el aporte de genética proveniente de Europa y Estados Unidos, con lo cual se introduce germoplasma dentado con mayor potencial de rendimiento, particularmente en cruzas con el germoplasma local por su pertenencia a grupos heteróticos opuestos, lo cuál abrió el camino para la futura difusión de los híbridos simples (Rossi, 2007). En esta etapa, irrumpe en Argentina el sistema de siembra directa, que es adoptada por los productores debido al avance del deterioro del suelo, a la facilidad de manejo y a la reducción de costos. En la siguiente década, iniciada en 1990, se lograron incrementos en la cantidad y calidad de grano producido; entre las causas del crecimiento podemos destacar el aumento de la superficie dedicada al cultivo; la disponibilidad en el mercado de nuevos híbridos de mayor potencial de rendimiento y la resistencia a enfermedades y plagas; el incremento en el área fertilizada; la creciente utilización del sistema de siembra directa; la incorporación de la práctica de riego complementario; el recambio del parque de cosechadoras y, a partir del ciclo 1998/99, el uso de semillas transgénicas (Gear, 2006). Durante las décadas 70, 80 y 90, se paso de rendimientos promedios de 2683 Kg/ha, 3383 Kg/ha y 4715 Kg/ha (con un pico de 6078 Kg/ha), respectivamente (Rossi, 2007). Eyherabide y Damilano (2001) estimaron una tasa de ganancia genética de 67 Kg/ha/año entre 1979 y 1989 y de 249 Kg/ha/año entre 1989 y 1999; lo cual refleja el aumento en los rendimientos promedios a lo largo del tiempo debidos a mejoramiento genético y adaptación del germoplasma al ambiente. Maddonni (2017) informa ganancias de rendimiento y tasas de ganancia genética anual en dos grandes períodos que van desde 1961-1990 y 1990-2004, con 68 Kg/ha/año y 2.54% de tasa a 189 Kg/ha/año y 3.71% de tasa, respectivamente; lo cual representó un quiebre importante en los rendimientos de maíz a principios de los años 90. En el período 2005-2014 se estabilizó la tasa de ganancia genética anual de rendimiento, quizás por mayor superficie de maíz tardío y nuevas regiones de siembra; sin embargo el autor menciona para los últimos 22 años una tasa promedio de un 3%, donde la genética aporta un 60% y el manejo el 40% restante; este valor sitúa al país en una situación favorable respecto a la tasa de ganancia genética anual de rendimiento mundial que es del 1.6% para los últimos nueve años.

En la actualidad el mejoramiento genético del cultivo es realizado por empresas semilleras nacionales, multinacionales, institutos públicos, privados y universidades. En

cuanto al desarrollo de híbridos, la selección de los individuos progenitores y de los cruzamientos promisorios se realiza en ensayos a campo repetidos en diferentes ambientes y años; se evalúa el comportamiento a plagas y enfermedades, de tolerancia a la sequía y a salinidad, como así también el comportamiento de progenes emparentadas. Los marcadores genéticos se utilizan para aumentar la precisión de la selección a los fines de lograr híbridos de mejor comportamiento agronómico, producción y calidad (Lúquez y Salomón, 2016). Hoy el fitomejorador, además de los cruzamientos y la selección asistida por marcadores, cuenta con herramientas basadas en la metodología del ADN recombinante, o ingeniería genética, que permiten la transferencia de genes capaces de conferir resistencia a patógenos al fondo genético de los cultivares apreciados por el productor, dando origen a un organismo genéticamente modificado (OGM). Actualmente se pueden encontrar eventos de maíz genéticamente modificado; algunos de ellos corresponden a maíces Bt que controlan plagas, o bien a maíces donde también se han incorporado genes para otras proteínas insecticidas denominadas Vip. Así, se obtienen híbridos donde la característica de resistencia a insectos y la tolerancia a glifosato se expresan en la misma planta. Los primeros híbridos Bt expresaban solo una proteína, la tendencia actual es apilar genes para ampliar el espectro de control y contribuir a la resistencia (ArgenBio, 2018). En lo referente a resistencia a enfermedades, particularmente, al mal de Río Cuarto virus (MRCV), un grupo de investigadores del INTA Castelar decidió abordar el problema de la resistencia a la enfermedad por ingeniería genética, desarrollaron plantas de maíz con buen comportamiento (ILSI, 2006) y patentaron una estrategia de control basada en la expresión de secuencias derivadas del MRCV de manera de desencadenar silenciamiento génico de ARN en plantas transgénicas de maíz (del Vas, 2003). Este mecanismo de defensa antiviral involucra la degradación específica del ARN viral con el que se elimina la mayor parte o todo el ARN obteniéndose de esta manera resistencia a la infección viral. El mecanismo consta de varios pasos que comienzan con el procesamiento del ARN de doble cadena en pequeños fragmentos, cuyos extremos 3' se metilan, luego una de las cadenas de los fragmentos de ARN del virus se incorpora en un complejo enzimático que media el reconocimiento por complementariedad de secuencia entre el ARN y el ARNm ó el ADN blanco. El complejo puede producir el corte en el centro de la molécula de ARNm que llevará a su degradación, mediar la represión

traduccional del ARNm blanco ó generar la metilación de histonas del ADN blanco (Baulcombe, 2004). Otros estudios profundizaron sobre la función de las proteínas codificadas por el MRCV, con el objetivo de identificar si alguna/nas poseen actividad supresora del silenciamiento del ARN; Monguelli (2010) encontró que si bien ninguna de las proteínas del MRCV evaluadas logro interferir con el silenciamiento, la expresión de las proteínas no estructurales P7-1 y P7-2 codificadas por el segmento 7 del MRCV da lugar a reducciones en la acumulación del ARNm de transgenes expresados de manera transitoria o estable en un proceso que probablemente sea de origen postranscripcional; por lo que ambas proteínas podrían estar implicadas en la regulación de la expresión tanto de genes virales como del hospedante durante el desarrollo de la infección del MRCV.

3- Enfermedades del maíz: la importancia del mal de Río Cuarto virus

Las enfermedades causadas por virus en el cultivo de maíz pueden producir severas reducciones del rendimiento amenazando los suministros de producción agrícola y de alimentos en algunas regiones del mundo (Zambrano et al., 2014a). Las plantas tienen mecanismos evolucionados de defensa pasiva y activa que suprimen la multiplicación del virus y la propagación; estos mecanismos requieren la interacción de factores de las plantas y virales para conferir resistencia o susceptibilidad. El cambio climático inminente favorecerá la propagación y el aumento poblacional de los insectos vectores de virus que causan enfermedades en plantas, por lo que, en el futuro, éstas podrían incrementarse. En los últimos años en las regiones templadas los inviernos han sido más cálidos y coincidentemente varios cultivos han presentado mayores problemas asociados con enfermedades transmitidas por insectos vectores (Hogenhout et al., 2008). La identificación de los *loci* que confieren resistencia a virus y/o a enfermedades ofrece un enfoque para desarrollar líneas de maíz genéticamente resistentes que reducen las pérdidas de rendimiento causadas por enfermedades existentes y emergentes. La resistencia genética a virus se ha caracterizado en poblaciones de maíz en diversos ambientes utilizando diferentes técnicas de detección y *loci* de resistencia han sido identificados en casi todos los cromosomas del cultivo (Bonamico, 2010; Bonamico et al., 2010, Bonamico et al., 2012; Dallo, 2019; Dintinger et al., 2014; Di Renzo et al., 2004; Hao et al., 2014; Jones et al.,

2004; Junwen et al., 2012; Kreff et al., 2006; Kreff, 2009; Rossi, 2019; Zambrano et al., 2014a; Zambrano et al., 2014b).

A nivel mundial se han detectado por lo menos ocho virus que provocan grandes pérdidas de rendimiento, uno de ellos es el MRCV (mal de Río Cuarto virus) (Redinbaugh et al., 2004; Redinbaugh y Pratt, 2009). En la Argentina particularmente, se ha señalado la presencia del maize dwarf mosaic virus, MDMV; maize chlorotic mottle virus, MCMV; necrosis letal del maíz, CLN; sugarcane mosaic virus, SCMV, maize rayado fino virus, MRFV; barley yellow dwarf virus, BYDV y MRCV, siendo este último el que constituye la patología viral más importante en el país (Laguna y Giménez Pecci, 2004; Lenardon et al., 1998), debido a la incidencia y severidad en que se presenta en el maíz para granos, consumo en fresco (humano) ó bien para animales (Giménez Pecci et al., 2012).

Los primeros síntomas del MRCV fueron detectados a finales de los años 1960 en cultivos de maíz cercanos a la localidad de Río Cuarto (Córdoba, Argentina), denominándose “enfermedad de Río Cuarto” y constituyendo esta zona geográfica el área donde la enfermedad es endémica. La etiología viral de la enfermedad fue elucidada a inicios de 1980 cuando Nome et al. (1981), logran transmitir el virus a un no hospedante sano por injerto y asociar la enfermedad a partículas del maize rough dwarf virus (MRDV) o enanismo rugoso del maíz. Luego, Milne et al. (1983) basándose en los síntomas de la enfermedad, la morfología, la localización de las partículas virales y el número de segmentos genómicos, propusieron que el MRCV era una variante geográfica o serotipo del MRDV. Luego de varios estudios que permitieron completar (mediante la secuenciación de los segmentos genómicos) el genoma entero del virus, se propuso que el MRCV sea considerado una nueva especie del género *Fijivirus*, familia *Reoviridae* y el agente causal de la enfermedad MRCV (Conci et al., 1998; Distéfano et al., 2002; Distéfano et al., 2005; Guzmán et al., 2007).

El área de distribución de la enfermedad se amplió progresivamente desde el sur de la provincia de Córdoba hacia la superficie total de producción de maíz, con un avance de la misma hacia el Norte y Oeste de la Argentina (Jujuy, Tucumán, Santiago del Estero, Santa Fé y Corrientes) (Laguna et al., 2002). La presencia de la virosis y de los vectores en provincias argentinas limítrofes con Bolivia, Paraguay y Brasil indican un potencial riesgo de su difusión a regiones del continente aún no afectadas (Laguna y Giménez Pecci, 2004);

incluso Ornaghi et al. (1999)b, informaron su presencia en regiones productoras de Uruguay. La aparición de la virosis en la región centro sur de Córdoba coincidió con la introducción en la zona de los primeros híbridos comerciales que reemplazaron a las variedades tradicionales de maíz (Laguna y Giménez Pecci, 2004).

Entre las campañas agrícolas 1981/82 y 1991/92 se perdieron entre 2 y 41 millones de dólares, expandiéndose la enfermedad fuera del área en donde el MRCV es endémico (March et al., 1997). La epidemia más grave se registró durante la campaña 1996/97, con la cual se vieron afectadas 300.000 hectáreas de maíz de la pampa húmeda con pérdidas estimadas de 120 millones de dólares; también se registraron daños en regiones de las provincias de Río Negro y Entre Ríos (Lenardon et al., 1998). En la campaña 2006/07, se observó una severa epidemia del MRCV que afectó una amplia zona de cultivo con pérdidas de producción de grano. En esa campaña, Lenardon (2007) informó pérdidas estimadas (por la Secretaría de Agricultura, Ganadería y Alimentos de la provincia de Córdoba) en 70 millones de dólares. Durante la campaña actual de maíz -2018/19- en el mes de noviembre se detectó un pico poblacional de *Delphacodes kuscheli* en el área donde la enfermedad MRCV es endémica. En las campañas 2014/15, 2015/16 y 2016/17 se informaron poblaciones promedio de cinco insectos vectores por metro cuadrado, mientras que en la campaña actual el valor ascendió a los 25 insectos por metro cuadrado (<https://www.dekalb.com.ar/es-ar/novedades/mal-de-rio-iv-virus.html>). El pico poblacional mencionado puso en alerta al sector productivo, el cuál recurrió a diferentes estrategias de manejo para evitar una nueva epidemia de la enfermedad.

El MRCV es un virus icosaédrico de 60-70 nanómetros de diámetro y está constituido por 10 segmentos de doble cadena de ARN y doble capa proteica; la transmisión del mismo al maíz se realiza por medio del insecto vector *Delphacodes kuscheli* Fennah, Homóptera: Delphacidae, conocido como “chicharrita” (Ornaghi et al., 1993; Remes Lenicov et al., 1985), la que representa el vector más importante por la elevada proporción y distribución geográfica. Otros autores reportaron nuevas especies con capacidad de transmitir el virus; Velazquez et al. (2003), debido a la presencia de MRCV en regiones donde no se había detectado *D. kuscheli*, o se encontraba con poca frecuencia, condujeron estudios con *Delphacodes haywardii* Muir, lo que les permitió concluir en que la misma también es un vector del MRCV. Por otro lado, Velazquez et al. (2006)

encontraron *Pyrophagus tigrinus* Remes Lenicov & Varela en Jesús María (Córdoba) en cultivos de triticale afectados por MRCV; los autores demostraron en su trabajo la capacidad de la especie mencionada para transmitir el virus a triticale en condiciones experimentales, lo cual tiene implicancias muy importantes en la epidemiología de esta enfermedad. Las poblaciones del insecto vector *D. kuscheli* están constituídas por cinco estadíos ninfales que bajo condiciones de laboratorio la duración de cada uno de los estadíos del primero al quinto es de 4, 2.5, 3, 4 y 5.5 días, siguiendo un período de preoviposición alrededor de 4 días, tras el cual los adultos viven entre 1 y 3 semanas más (Arneodo et al., 2005). Los adultos pueden ser braquípteros o de alas cortas, abundantes en condiciones estables al comienzo del período de crecimiento del mismo, y macrópteros o de alas largas, adaptados a ambientes inestables. Los adultos macrópteros de ambos sexos tienen alas membranosas transparentes que sobrepasan el cuerpo y vuelan grandes distancias favorecidos por los vientos, por lo que son importantes desde el punto de vista epidemiológico (Ornaghi et al., 1999a).

La transmisión del agente causal a las plantas sucede en forma persistente cuando la chicharrita luego de adquirir el virus desde el floema de las plantas infectadas y concluido el período de latencia, introduce su estilete en los tejidos de conducción para alimentarse (Arneodo et al., 2002). Estos autores, reportaron un período de adquisición del virus mínimo por parte del vector de 5 horas, un período de latencia mínimo de 10 días, con una media de 16 a 17 días, y un período de inoculación de 30 minutos para la transmisión del MRCV. En referencia a la capacidad vectora del MRCV por *D. kuscheli* se ha comprobado mayor eficiencia cuando la adquisición del virus ocurre en las ninfas del primer estadío, las cuáles a su vez, presentan un período de latencia más corto (Arneodo et al., 2005). El entendimiento exacto del relacionamiento virus-vector contribuye a comprender la epidemiología de la enfermedad. En efecto, los períodos de latencia largos del MRCV en su vector necesarios para una eficiente transmisión del virus, como así también, la no preferencia de *D. kuscheli* para alimentarse del maíz (March et al., 1995; March et al., 1997), determina la ausencia de infecciones secundarias en el cultivo, conformando una enfermedad monocíclica (Arneodo et al., 2002; March et al., 1995). Esta información es de gran interés epidemiológico pues el vector del virus es un reservorio natural del mismo y por lo tanto la población de macrópteros migrantes, adaptadas a ambientes inestables

constituye el potencial inóculo, ya que éste es el estado de mayor movilidad por su capacidad de vuelo, y por lo tanto, definirá las epidemias de la enfermedad (Arneodo et al., 2005; Ornaghi et al., 1999b).

El insecto vector adquiere el virus de especies cultivadas como trigo (*Triticum aestivum* L.), avena (*Avena sativa* L.) y centeno (*Secale cereale* L.), que actúan como reservorios naturales del mismo. Cuando el insecto vector utiliza malezas y cultivos como sitios de ovoposición y cría, esas también resultan infectadas con el MRCV, adquiriendo la enfermedad. Al momento en que las malezas y gramíneas cultivadas invernales comienzan su senescencia las chicharritas migran a los cultivos de maíz próximos, durante etapas tempranas del mismo (Ornaghi et al., 1993).

Los síntomas que ocasiona la enfermedad pueden ser severos o leves. En síntomas severos, lo primero que se observa en las plantas afectadas es una disminución importante del crecimiento (enanismo), con plantas que alcanzan una altura de 1 a 1.20 metros con un tallo achatado y ensanchado. Hay acortamiento de entrenudos, y el tercio superior de la planta presenta un desarrollo foliar anormal con láminas muy disminuídas y erectas. Con respecto a la parte reproductiva en plantas infectadas, las panojas pueden ser prácticamente normales y en otros casos muy atrofiadas con problemas para producir polen; las espigas pueden ser prolíficas (generalmente en el mismo nudo), con producción escasa o nula de granos. Existen casos excepcionales, donde prácticamente no hay formación de entrenudos desde el nivel de inserción de la espiga a la panoja, o al contrario, no hay acortamiento de entrenudos mientras que las láminas del tercio medio y superior se reducen a rudimentos (Giménez Pecci et al., 2012). En casos de síntomas leves, los mismos no son perceptibles a simple vista, aunque también provocan daños económicos importantes. Tanto con síntomas severos como leves, la presencia de verrugas o enaciones en la cara inferior de las hojas ásperas al tacto, se constituyen en el síntoma característico de este grupo de virus, las mismas representan engrosamientos de las nervaduras con prominentes rugosidades. Las enaciones se pueden encontrar también en las brácteas de las espigas y en las vainas foliares (Anexo I, Figura 1) (Ornaghi et al., 1993; Ornaghi et al., 1999a). En cuanto al nivel de síntomas, estudios experimentales han permitido comprobar que independientemente del comportamiento del genotipo utilizado (susceptible o resistente al MRCV) cuando la infección se produce entre la emergencia de cultivo y la tercera hoja,

mayor es la cantidad de plantas con síntomas severos de la enfermedad, lo cual produce mayores pérdidas en el rendimiento (Ornaghi et al., 1999a). Además del momento en cual el vector infecta al cultivo es importante tener en cuenta las condiciones ambientales, ya que aquellas que provoquen estrés en el maíz, también van a predisponer a un mayor nivel de síntomas y cuando varios factores interaccionan al mismo tiempo, pueden ocurrir epidemias severas (Presello et al., 1997).

Las fechas de siembra tempranas (Lenardon et al., 1985), la siembra directa (Kreff et al., 2006) y el control del insecto vector con agroquímicos (March et al., 2002) constituyen estrategias para disminuir la incidencia de la enfermedad. Las siembras tempranas permiten evitar el solapamiento de la etapa de susceptibilidad de las plantas de maíz con altas densidades en la población de insectos vectores. Generalmente se aconseja el empleo de híbridos calificados comercialmente como "resistentes" al MRCV, cuando las épocas de siembra coinciden con los picos poblacionales del vector. El tratamiento químico de los vectores proporciona un control efectivo del insecto, pero para que se traduzca en una reducción significativa en la infección por el virus requiere de una aplicación frecuente de insecticidas, por lo que se convierte en una técnica costosa y que además puede llevar al desarrollo de resistencia en el insecto vector (Dintinger et al., 2014), razones por las cuales no se difundió entre los productores. En el control a campo del MRCV es indispensable considerar una serie de factores que van a determinar la fecha de siembra del cultivo, entre ellos se pueden mencionar las fluctuaciones poblacionales del insecto vector, el desarrollo de los cultivos de avena sobre los cuales crecen estas poblaciones, las condiciones climáticas y el período de mayor susceptibilidad del maíz. Para predecir la incidencia de la enfermedad existen métodos basados en la combinación de dos tipos de pronósticos. Uno de pre-siembra que se realiza durante el invierno según las variables climáticas de los meses junio, julio y agosto. Otro, al momento de la siembra que consiste en muestreos semanales de las poblaciones del insecto vector en cultivos de avena, para determinar el pico poblacional y la dispersión de los vectores hacia el maíz (March et al., 1995; March et al., 2002). Si bien el productor argentino puede implementar las metodologías de control mencionadas, actualmente el uso de germoplasma resistente al MRCV, bajo un manejo integrado, es una alternativa eficaz, económica y ambientalmente sustentable, ya que contar con esta herramienta permite independizarse del conocimiento de la población del vector y

realizar la siembra en las fechas óptimas para obtener un desarrollo del cultivo adecuado e incrementos y estabilidad en la producción de maíz (Bonamico, 2010; Di Renzo et al., 2002). A partir de la severa epidemia ocurrida en la campaña agrícola 1981/82 se trabajó en mejoramiento y se han obtenido genotipos con buen comportamiento frente a la enfermedad en el área en donde la misma es endémica. Mediante mejoramiento tradicional, se ha incorporado resistencia genética al MRCV a una serie de híbridos con los que el productor puede reducir los niveles de daño (Morata et al., 2003). Actualmente, se puede encontrar una amplia bibliografía sobre resistencia al MRCV (Bonamico, 2010; Bonamico et al., 2012; Dallo, 2019; Di Renzo et al., 2002; Di Renzo et al., 2004; Kreff et al., 2006; Kreff, 2009, Rossi et al., 2015; Rossi 2019).

4- Intervalo antesis-estigma y rendimiento en maíz

La fenología del cultivo de maíz se divide en etapas vegetativas y reproductivas. Luego de la diferenciación de la panoja, cuando la planta tiene 7 a 9 hojas expandidas, las yemas axilares desarrollan los primordios florales de la futura espiga. Dentro de cada yema axilar el número de hileras de espiguillas de la futura espiga queda definido tempranamente, mientras que la diferenciación de espiguillas continúa hasta una o dos semanas antes de la emergencia de los estigmas (R1), con lo cual en este estadio queda determinado el número potencial de granos que tendrá la planta, como así también el índice de área foliar máximo y la altura máxima (Andrade et al., 1997). El panojamiento consiste en la emergencia de la panoja a través de las hojas superiores y se completa al expandirse la última hoja. Luego de este estadio y dos o tres días antes de R1 se inicia la liberación de polen, proceso que se extiende durante dos o tres semanas. El intervalo de la floración se define, por lo tanto, como el intervalo de tiempo entre la dehiscencia de polen (antesis) y la extrusión de estigmas (intervalo antesis-estigma, IAE) (Bolaños y Edmeades, 1990). El momento en que ocurre la liberación de polen en relación con la aparición de los estigmas depende del genotipo, del ambiente y de la interacción entre estos factores (Echeverría y Sainz Rozas, 2006). En referencia al rendimiento del cultivo (RTO), el mismo está determinado por el número de granos y el peso promedio de los mismos. El número de granos es generalmente el componente más variable y se encuentra asociado a variaciones en el rendimiento. Sin

embargo, existen importantes variaciones en el RTO que están explicadas por variaciones en el peso promedio de los granos (Borrás y Gambín, 2010).

El maíz es particularmente sensible al estrés por sequía, si este evento se produce justo antes y durante la floración, que es cuando se define el potencial de RTO del cultivo, se observa un retraso de aparición de los estigmas en relación a la floración masculina y por lo tanto un aumento en el IAE (Bolaños y Edmeades, 1990; Ngugi et al., 2013). Según estos autores, la extrusión de los estigmas es un proceso muy sensible al déficit hídrico impuesto por condiciones de sequía; la antesis en cambio casi no se afecta por esta condición. Por ejemplo Bolaños y Edmeades (1990) citan que la sequía retrasó la extrusión de los estigmas en cuatro poblaciones de maíz examinadas, incrementando el intervalo de la floración. Según Dias Almeida et al. (2013), el estrés por sequía disminuye el RTO en más del 50% y aumenta el IAE en 3.2 días. La sequía permite, en un programa de mejoramiento para IAE identificar los genotipos capaces de sincronizar la floración masculina y femenina, ya que en buenas condiciones la variabilidad genética del intervalo de la floración se reduce considerablemente. Otra condición que puede retrasar la emergencia de los estigmas, pero en menor magnitud que la sequía es una densidad poblacional alta (Dow et al., 1984); por lo que la misma también puede utilizarse para seleccionar genotipos superiores en su capacidad de sincronizar la floración masculina y femenina en ausencia de condiciones de sequía. Ribaut et al. (1997) afirman que la sequía es uno de los eventos climáticos que provoca limitaciones en el crecimiento de la biomasa y la producción de semillas.

El IAE muestra relación con otras variables, por ejemplo con el RTO, Bolaños y Edmeades (1990) encontraron que este último disminuye un 10% por cada día de retraso en la extrusión de los estigmas desde 0 hasta 9 días y llega a ser prácticamente cero cuando el IAE excede los 10 días. Esta relación entre el IAE y el RTO, que confirman Ribaut et al. (1996) y Ribaut et al. (1997), se ha observado en muchos genotipos ya sea en colecciones sin mejoramiento del Banco de Germoplasma del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), hasta en poblaciones y variedades mejoradas, líneas endocriadas e incluso en híbridos. Edmeades y Bolaños (1998), muestran que IAE cortos son una medida fuerte de tolerancia a la sequía de los genotipos; por lo tanto, los genotipos que

tienen altos rendimientos bajo estrés de sequía poseen IAE corto, mientras que aquellos genotipos que maduran temprano y tienen IAE largo presentan rendimientos bajos.

Las variables IAE y RTO han sido objeto de numerosos estudios, pero no existe bibliografía donde se informe su relación con los caracteres de resistencia al MRCV.

5- Principios básicos del mapeo basado en marcadores moleculares para caracteres cuantitativos

La mayoría de las características agronómicas importantes se heredan cuantitativamente a diferencia de los rasgos que son controlados por un solo gen (herencia monogénica) o unos pocos genes (herencia oligogénica) (Lynch y Walsh, 1998). Al estudiar un carácter cuantitativo resulta de gran importancia estimar su heredabilidad, la que depende del carácter en particular, de la población utilizada y del ambiente de evaluación. Es así que la estimación de la heredabilidad deriva de la medición del valor fenotípico del carácter, la cual tiene influencia tanto de las frecuencias génicas como de los efectos ambientales (Falconer y MacKay, 1996). En estudios previos realizados para mapear regiones del genoma asociados a resistencia al MRCV (Di Renzo et al., 2002; Di Renzo et al., 2004; Bonamico, 2010, Bonamico et al., 2010; Bonamico et al., 2012; Dallo 2019; Rossi 2019), se estimaron valores de heredabilidad del índice de severidad de enfermedad como indicador de resistencia, próximos a 0.5 junto con la presencia de interacción genotipo \times ambiente significativa. Esto último sugiere que la resistencia al MRCV es afectada por el ambiente y que los genotipos son poco estables. Algunos autores proponen que la resistencia al MRCV se comporta como un carácter cuantitativo controlado por efectos genéticos aditivos y epistáticos y otros sugieren que una importante proporción de la varianza genética del carácter es debida a componentes no aditivos (Presello et al., 1995; Di Renzo et al., 2002).

Con el desarrollo de los marcadores moleculares (MM), a partir de los años 1980 una serie de herramientas para la manipulación genética de caracteres cuantitativos han sido sometidas a una gran revolución (Jones et al., 1997). Desde entonces mapas moleculares de alta densidad se construyeron para muchos cultivos como así también se hizo posible la manipulación de genes que determinan caracteres cuantitativos en base a marcadores (Xu

2010). Los MM representan diferencias genéticas entre organismos o especies y ocupan una posición específica dentro de un cromosoma denominada *loci* (plural) y *locus* (singular). Generalmente, ellos no representan un gen, sino que actúan como señales de los mismos; particularmente cuando están localizados muy cercanos a un gen de interés, al marcador se lo denomina gen “*tags*” (Collard et al., 2005). Los marcadores de ADN o MM surgieron por errores en la replicación de ADN que dan lugar a diferentes clases de mutaciones, por ejemplo mutaciones de punto, inserciones y deleciones. En lo que se refiere al uso de este tipo de marcadores además de la construcción de mapas de ligamiento (Paterson, 1996), podemos mencionar numerosas aplicaciones en el campo del mejoramiento genético vegetal como la evaluación del nivel de diversidad genética dentro de un germoplasma y la identidad de un cultivar. Dentro de los marcadores moleculares se encuentran tres grandes grupos de acuerdo al método de detección que se utilice: (1) basados en la hibridación de ADN; (2) basados en la reacción en cadena de la polimerasa (PCR); (3) basados en las secuencias de ADN (Jones et al., 1997; Winter y Kahl, 1995). Dentro del segundo grupo están los marcadores SSR (*simple sequence repeats*) o microsatélites, los mismos son codominantes, genoma-específicos y altamente polimórficos (Smith et al., 1997). En la actualidad, existen técnicas de alta resolución que permiten detectar mutaciones a nivel de un solo nucleótido conocidas como SNP (*single nucleotide polymorphisms*). Crosbie et al., (2006) mencionan el desarrollo del primer mapa de SNP en maíz, el mismo está compuesto de 2300 marcadores distribuidos al azar en todos los cromosomas, los cuales cubren un tamaño de 1604 centiMorgan (cM). Con esta plataforma de SNP, si los mejoradores necesitan diferenciar dos líneas elite del mismo grupo heterótico de maíz solo necesitan trabajar con un 20% de los marcadores, debido al nivel de información que maneja la plataforma. Los autores mencionados, reportaron que el uso de plataformas de SNP superó a la tecnología establecida con otros marcadores, debido a la facilidad de uso, rentabilidad y funcionalidad. Así, con un set de 1000 marcadores SNP se puede mapear el genoma completo en poblaciones con desequilibrio de ligamiento que estén sometidas al mejoramiento genético.

Los MM varían ampliamente en el grado de complejidad del método, el modo de herencia, el nivel de polimorfismo, los costos y tiempos requeridos para el desarrollo de la técnica. La localización y el efecto de los genes que controlan un carácter cuantitativo se

pueden determinar por el análisis genético basado en marcadores. Una región cromosómica ligada o asociada a un marcador con efectos sobre un carácter cuantitativo se define como QTL: *loci* de caracteres cuantitativos (Tanksley, 1993). La resistencia genética al MRCV se comporta como un carácter de herencia cuantitativa controlada por un sistema poligénico (Di Renzo et al., 2002). La identificación de regiones genómicas asociadas con QTL que regulan la resistencia a esta enfermedad puede ser empleada en el mejoramiento ya que facilitaría el desarrollo de genotipos resistentes.

6- Mapeo de *loci* de caracteres cuantitativos (QTL)

El mapeo de QTL comprende cuatro etapas principales que son: la generación de una población de mapeo, la caracterización genotípica que permita la construcción de un mapa de ligamiento, la evaluación fenotípica de la población y el análisis estadístico de asociación entre la información genotípica y fenotípica (Young, 1996).

El mapeo de QTL requiere poblaciones segregantes derivadas de reproducción sexual, donde exista desequilibrio de ligamiento genético. Tanksley (1993) define al desequilibrio de ligamiento genético como la asociación no al azar entre alelos de diferentes *loci* en una población de mapeo y anuncia como la principal causa del mismo al ligamiento físico de los *loci*. Generalmente, dos líneas endocriadas son los genotipos que originan una población de mapeo. Estas dos líneas deben presentar un comportamiento fenotípico opuesto o muy diferente para el carácter de interés; por ejemplo, si la característica de interés es altura de planta, una de las líneas debería ser de plantas altas y la otra de plantas bajas. La primera generación obtenida del cruzamiento, F₁ o híbrido, combina la información genética de los dos padres y, a partir de ella, se generan poblaciones de mapeo. Entre los tipos de poblaciones que se utilizan con mayor frecuencia en plantas para el mapeo de QTL se pueden mencionar las F₂ que se obtienen al autofecundar la generación F₁; las retrocruzas (RC) derivadas del cruzamiento del híbrido F₁ hacia una de las líneas parentales; los doble haploides (DH) producidos en especies que permiten el cultivo de tejidos mediante la regeneración de las plantas por la inducción de la duplicación de cromosomas de los granos de polen; las líneas endocriadas recombinantes (RIL) que se obtienen luego de sucesivas generaciones de autofecundación de una semilla

por planta a partir de una F_2 logrando líneas homocigotas que contienen una única combinación de un segmento cromosómico de las líneas parentales; y las líneas cuasi isogénicas (NIL) derivadas del cruzamiento de un parental donante por un parental recurrente para formar la F_1 , la descendencia resultante se vuelve a cruzar por varias generaciones con el parental recurrente hasta obtener líneas que contienen una o más regiones pequeñas de ADN del parental donante. La principal ventaja de las poblaciones F_2 y las RC es que se construyen con un menor número de años, a diferencia de las RIL que requieren entre seis a ocho generaciones de autofecundación; en referencia a las RIL y DH la mayor ventaja es que producen líneas homocigotas que se pueden multiplicar y reproducir sin cambios en la constitución genética lo que permite la realización de ensayos replicados en diferentes localidades y años, constituyéndose en recursos perdurables para el mapeo de QTL (Collard et al., 2005). Por otro lado, RIL o DH pueden transferirse entre diferentes laboratorios para análisis de ligamiento y adición de marcadores a mapas existentes, asegurando que todos los colaboradores trabajan con material idéntico (Paterson, 1996). Los tipos de poblaciones para el mapeo de QTL definen la estructura genética que soportan el análisis de QTL ya que determinan los genotipos posibles tanto para los marcadores como para los QTL. La elección del tipo de población de mapeo depende de la facilidad y del costo de producción de cada una en cada especie considerada, y de la importancia del tipo de acción génica de los genes que controlan el carácter de interés (Collard et al., 2005). Würschum (2012), realiza una consideración sobre la necesidad de evaluar fenotípicamente las poblaciones de mapeo en diferentes ambientes, localidades y años, ya que por lo general los genotipos de los programas de mejoramiento están en continuo cambio, a su vez destaca la importancia de utilizar testigos comunes en todos los ambientes.

La caracterización genotípica de la población de mapeo se realiza con MM que revelen diferencias entre las líneas parentales, es decir, marcadores polimórficos. Para realizar la caracterización se requiere la extracción de ADN de cada individuo de la población bajo estudio, como así también de las líneas parentales y en lo posible de la generación F_1 . Generalmente, los MM van a segregar en forma mendeliana, sin embargo, se puede encontrar distorsión en las relaciones de segregación. En el mapeo de una F_2 es posible observar tres genotipos y calcular efectos de dominancia y aditividad en cada

región del genoma. En las poblaciones provenientes de una RC existen sólo dos genotipos, por lo que no es posible separar los efectos de dominancia y aditividad. En las poblaciones DH, 100% homocigotas, y en las RC se pueden calcular sólo los efectos genéticos aditivos, al igual que en las poblaciones de RIL.

La caracterización fenotípica comprende la evaluación del fenotipo de cada uno de los genotipos individuales de la población de mapeo. En general, el mapeo de QTL en plantas se realiza con un diseño experimental completamente aleatorizado. La utilización de diseños con repeticiones permite disminuir la incidencia de la variación ambiental y permite la estimación de los componentes de variancia.

Para el paso final del mapeo de QTL se requiere la construcción de un mapa de ligamiento entre los MM. Un mapa genético muestra la distribución lineal y la distancia de un grupo de genes y marcadores en cada uno de los cromosomas que constituyen el genoma de un organismo (Lynch y Walsh, 1998). El mapa está basado en el concepto básico de ligamiento, si dos o más genes o marcadores están físicamente cercanos sobre el mismo cromosoma, sus alelos se heredan juntos. Las proporciones en que estos genes segregan en una población se apartan de las esperadas bajo la ley de Mendel de segregación independiente. La mayoría de los gametos contienen las mismas combinaciones alélicas que los padres; sólo aquellos meiocitos que experimenten un intercambio entre cromátides no hermanas o *crossover* generarán gametos con combinaciones alélicas diferentes de las parentales, originando los recombinantes. El fundamento del mapa genético reside en la relación entre la frecuencia de recombinación y la distancia física entre los *loci*. De esta forma al determinar la frecuencia de recombinación entre dos genes o marcadores, uno puede estimar la distancia de mapa entre los mismos, siendo la unidad de mapeo equivalente a una frecuencia de recombinación del 1%; usualmente esta distancia se expresa en cM. Los marcadores moleculares que presenten una frecuencia de recombinación del 50% se describen como no ligados y se asume que están localizados en diferentes posiciones en el mismo cromosoma o bien sobre diferentes cromosomas. Idealmente, las distancias deben ser aditivas a fin de que cuando se añaden nuevos *loci* al mapa, las distancias obtenidas previamente no necesitan ser ajustadas de manera radical. Desafortunadamente, las frecuencias de recombinación no son aditivas a lo largo del cromosoma y por lo tanto son inapropiadas como medidas de distancia. Existen diferentes

funciones de mapeo que pueden predecir la distancia entre *loci* en el mapa, en base a la frecuencia de recombinación observada entre ellos; dentro de las mismas podemos mencionar la de Haldane (Haldane, 1919; Kearsey y Pooni, 1996) y la de Kosambi (Kosambi, 1994).

Con la población de mapeo definida, los datos genotípicos y fenotípicos y el mapa de ligamiento ya se puede realizar el análisis estadístico de asociación entre la información genotípica y fenotípica. Los marcadores son utilizados para dividir la población de mapeo en diferentes grupos genotípicos basados en la presencia o ausencia de un *locus* particular para un marcador y determinar si existen diferencias significativas entre las medias de los grupos definidos con respecto al carácter fenotípico medido. En caso de encontrar diferencias significativas entre las medias fenotípicas de los grupos genotípicos definidos estamos en presencia de ligamiento entre el *locus* del marcador utilizado para la división de la población de mapeo y el QTL que controla el carácter fenotípico; por lo tanto el QTL y el marcador se heredan juntos en la progenie; en cambio cuando no existe ligamiento, el QTL y el marcador se heredan de manera independiente y no se encuentran diferencias significativas entre las medias de los grupos definidos con respecto al carácter fenotípico. El mapeo de QTL representa una herramienta poderosa para diseccionar la arquitectura genética de características agronómicas complejas en las poblaciones de mejoramiento bajo estudio (Würschum, 2012).

7- Detección de QTL: métodos

Actualmente, existe una importante variedad de metodologías para identificar QTL. En un principio, la asociación entre un marcador y un carácter cuantitativo se evaluó mediante análisis de la variancia. Lander y Botstein (1989) propusieron usar mapas de ligamiento y realizar el mapeo con información de marcadores ligados o mapeo por intervalo simple (SIM) mediante máxima verosimilitud, donde la presencia de un QTL es evaluada a intervalos regulares sobre el mapa de ligamiento. Los marcadores flanqueantes pueden ser utilizados para inferir probabilidades condicionales para los genotipos de los QTL dado los genotipos de estos marcadores y la frecuencia de recombinación entre los QTL y los marcadores. Zeng (1994) utilizó un modelo de mapeo por intervalo compuesto

(CIM) considerando el uso de cofactores (covariables) para controlar la variación genética debido a la segregación de QTL en otras partes del genoma; lo que permite mejorar en comparación al SIM, la precisión y el poder del análisis de los QTL. El análisis discriminante (AD) (Fisher, 1936), permite identificar mediante estadística multivariada un set de marcadores moleculares asociados a regiones genómicas que codifican para caracteres de interés. Con la creciente disponibilidad de datos genómicos polimórficos y el potencial de explorar todos los eventos de recombinación que han ocurrido en la historia evolutiva de un germoplasma específico, estudios de mapeo de asociación se han convertido en una alternativa de gran alcance para la disección de rasgos cuantitativos en plantas (Hao et al., 2014). Esta estrategia de mapeo utiliza poblaciones con desequilibrio por ligamiento, el cual consiste en asociaciones no al azar entre alelos de diferentes *loci* y explora la variabilidad genética de líneas que no forman parte de un esquema de cruzamiento específico (Flint García et al., 2003; Würschum et al., 2012); es por ello que las colecciones de germoplasma, tales como las líneas de maíz desarrolladas por el CIMMYT, son utilizadas en este tipo de estudio.

Las metodologías por intervalos compuestos incluyen variantes de gran utilidad como el mapeo de caracteres múltiples (MTM) (Jiang y Zeng, 1995) que tiene en cuenta la estructura de correlación de los datos y permite realizar pruebas estadísticas para procesos biológicos que involucran caracteres múltiples. Los QTL suelen presentar sensibilidad a los efectos ambientales y variabilidad en los resultados en distintas poblaciones de mapeo, lo cual puede estar asociado a la metodología estadística utilizada. La mayoría de los estudios de detección de QTL, se desarrollan con poblaciones de mapeo que se evalúan para caracteres múltiples en distintas condiciones ambientales, sin tener en cuenta, por lo general, las correlaciones entre los mismos y la variabilidad ambiental. Los modelos mixtos ofrecen un marco estadístico adecuado para el análisis de este tipo de base de datos, sin imponer suposiciones poco realistas, como asumir por un lado, que no hay correlaciones genéticas entre los caracteres y los ambientes, y por otro lado, que las varianzas son constantes a través de los ambientes (Malosetti et al., 2008). Éste tipo de modelos, son una herramienta adecuada para el análisis de datos complejos y existen numerosas razones para su uso, incluida la facilidad con la que pueden manejarse las bases de datos incompletos y la capacidad de modelar de manera apropiada la variación del error (Smith et al., 2005). Bajo

este enfoque las respuestas se pueden modelar mediante la incorporación de factores fijos y aleatorios y de covariables, con un amplio rango de estructuras de varianza y co-varianza, lo que permite mejorar las pruebas y las estimaciones de los efectos de los tratamientos. Una aplicación de los modelos mixtos es su uso en los análisis de detección de QTL. La información de los marcadores moleculares puede ser incorporada dentro de estos modelos para probar los efectos de los polimorfismos de ADN sobre caracteres fenotípicos, siguiendo los principios del mapeo de QTL por regresión. Los enfoques estadísticos de modelos mixtos para análisis de QTL en caracteres múltiples en ambientes múltiples (MTME) representan, por lo tanto, una herramienta valiosa ya que consideran las correlaciones genéticas entre los caracteres y los ambientes; reducen la tasa de error tipo I al testear los efectos de los QTL; permiten observar interacciones QTL \times ambiente, y detectar las causas de las correlaciones genéticas entre los caracteres (QTL pleiotrópicos o ligados), como así también, observar los cambios en estas correlaciones que pueden ser causados por QTL con interacción con el ambiente (Jiang y Zeng, 1995; Malosetti et al., 2006; Malosetti et al., 2008). Este tipo de análisis representa un enfoque más fiable que el mapeo QTL para caracteres de manera individual, ya que los procesos fisiológicos en las plantas generalmente están correlacionados (Alvarez Prado et al., 2013).

8- Factores que influyen la detección de QTL

La detección de un QTL puede estar influenciada por varios factores, entre los que se puede mencionar las propiedades genéticas del QTL que controla el carácter de interés, lo cual hace referencia a la magnitud del efecto ya que solo los QTL con grandes efectos fenotípicos pueden ser detectados. Otra propiedad genética es la distancia entre dos QTL ligados ya que si los mismos están a 20 cM o menos son usualmente detectados como un único QTL (Tanksley, 1993). Los efectos ambientales constituyen un segundo factor que influye la detección de un QTL, esto se debe a que el ambiente puede tener influencia en la expresión de un carácter cuantitativo. Los estudios en múltiples ambientes y años permiten explorar esta influencia ambiental sobre los QTL de interés (Collard et al., 2005). Un tercer factor que afecta la detección de un QTL es el tamaño de la población bajo estudio, mientras más grande sea la población las probabilidades de detectar un QTL con

pequeños efectos son mayores, ya que un aumento en el tamaño de la población permite incrementar la potencia estadística de los test que se utilicen y por lo tanto la estimación del efecto de los QTL y de los intervalos de confianza (Tanksley, 1993). El cuarto factor que influye en la detección de un QTL es el error experimental, donde la principal fuente del mismo son los errores en la genotipificación de los marcadores y en la evaluación fenotípica. Los errores de genotipificación y los datos perdidos pueden afectar el orden y la distancia entre los marcadores dentro de los mapas de ligamiento (Hackett, 2002). Por otro lado, la precisión en la evaluación fenotípica es de gran importancia para lograr exactitud en el mapeo de QTL; un QTL confiable puede ser identificado a partir de datos fenotípicos exactos (Collard et al., 2005).

Debido a los factores descritos anteriormente, lo ideal es confirmar los estudios de mapeo de QTL, esto puede involucrar realizar el estudio de mapeo en poblaciones independientes que compartan los mismos genotipos parentales o bien que tengan genotipos parentales estrechamente relacionados de aquella población utilizada en el primer mapeo. En otras situaciones, se suele utilizar una población de mapeo de mayor tamaño a la utilizada en el primer mapeo. Las posiciones de los QTL y sus efectos deben ser por lo tanto evaluados en poblaciones independientes porque el mapeo de QTL basado en una única población resulta en una baja potencia de detección de QTL y en un gran sesgo en los efectos de los QTL detectados (Utz et al., 2000). Finalmente, se puede mencionar el uso de NIL para la confirmación de los estudios de mapeo.

El presente trabajo, forma parte de una línea de investigación para resistencia al MRCV en maíz desarrollado en la Universidad Nacional de Río Cuarto. Los estudios realizados hasta el momento utilizaron diferentes poblaciones de mapeo y metodologías estadísticas. En referencia al primer punto se evaluaron en múltiples ambientes poblaciones $F_{2:3}$ (familias compuestas por plantas F_3 provenientes de la autofecundación de diferentes plantas F_2), RIL derivadas de las líneas Mo17 con BLS14 por un lado y $F_{2:3}$ derivadas de las líneas B73 con LP116 por otro lado, NIL con introgresión de teosinte, así como una población diversa proveniente del CIMMYT. En referencia al segundo punto, para los análisis de detección de QTL se utilizaron metodologías como análisis de la varianza (ANOVA), SIM, CIM, AD, mapeo de asociación y regresión lineal múltiple; sin embargo, en ningún estudio se utilizó la metodología de detección de QTL MTME, con lo cual los

QTL detectados en el presente trabajo pueden ser analizados por la consistencia en sus posiciones con los QTL detectados con anterioridad con diferentes poblaciones de mapeo y metodologías estadísticas. El uso de predicción genómica para la reacción al MRCV en maíz en una población diversa, constituye el foco de las investigaciones actuales que se están desarrollando en el grupo de trabajo de la cátedra de Mejoramiento Genético de la FAV de la UNRC.

9- Aplicación de los QTL: selección asistida por marcadores

Si un marcador está genéticamente ligado a un gen que controla un carácter de interés agronómico, la selección de este marcador resulta en la selección indirecta del gen de interés. Este hecho constituye el fundamento del proceso denominado selección asistida por marcadores moleculares (MAS), herramienta complementaria al mejoramiento genético convencional que minimiza el efecto ambiental y facilita la acumulación de los genes de resistencia en un fondo genético común (Collard et al., 2005). Los patógenos y los insectos al presentar variabilidad, son capaces de superar las resistencias impuestas por genes simples. Debido a esto, la durabilidad de la resistencia alcanzada para muchos cultivos ha sido incrementada con el uso de diversidad genética mediante la incorporación de genes de resistencia mayor, diferentes cultivares, variedades multilíneas y por la piramidización de genes de resistencia; la selección asistida por marcadores es de gran utilidad para lograr las medidas anteriores (Mohan et al., 1997).

El mejoramiento genético con marcadores puede categorizarse en cuatro clases; por un lado la MAS, por otro lado podemos mencionar la retrocruza asistida por marcadores (MABC) para recuperar el parental recurrente con el gen de interés; selección recurrente asistida por marcadores (MARS) para el QTL, y selección asistida por marcadores funcionales (MGOI) para caracteres simples o complejos (Crosbie et al., 2006). La MAS es considerada superior a la selección fenotípica convencional cuando el carácter de interés es de baja heredabilidad y está afectado por condiciones ambientales, interacción genotipo \times ambiente, así como por interacciones genéticas de tipo no aditivas, o cuando la evaluación del carácter de interés es muy difícil y/o costosa (Paterson, 1996). Un factor que afecta la aplicación de la MAS en un programa de mejoramiento genético es la estabilidad

del QTL identificado a través de distintos fondos genéticos, así como la consistencia a través de las diferentes generaciones (Asíns, 2002). La identificación de posiciones consistentes en los QTL en distintas generaciones es esencial para la selección asistida, ya que generalmente los QTL se identifican en etapas tempranas de los programas de mejoramiento y los marcadores ligados, se utilizan en la selección de líneas durante las sucesivas generaciones de autofecundación. Con QTL inconsistentes, se reduce la posibilidad de llevar a cabo una selección a favor del carácter de interés. Por otra parte, para su empleo en la selección asistida de variables de adaptación amplia, es importante que los QTL no sólo sean consistentes en distintas generaciones del germoplasma sino también en diferentes ambientes de evaluación (Groh et al., 1998). La selección fenotípica convencional puede ser complementada mediante selección indirecta con marcadores moleculares (Asíns, 2002).

La identificación de QTL para distintas enfermedades de plantas y la consecuente selección asistida favorecen el logro de la efectiva acumulación de genes de resistencia cuantitativa (Asíns, 2002). Estudios realizados en la FAV de la UNRC en poblaciones de mapeo $F_{2:3}$ y RIL permitieron estimar valores moderados de heredabilidad de la variable resistencia al MRCV (Di Renzo et al., 2002; Bonamico et al., 2012) y además realizar análisis de asociación que indicaron la presencia de QTL en los grupos de ligamiento 1, 2, 4, 6, 8 y 10 (Di Renzo et al., 2004; Bonamico, 2010; Bonamico et al., 2010; Bonamico et al., 2012; Dallo, 2019; Rossi, 2019). Otros estudios, realizados por investigadores de INTA Castelar en poblaciones de mapeo $F_{2:3}$ y RIL, provenientes de diferente fondo genético permitieron localizar varios QTL relacionados a los síntomas de la enfermedad en el cromosoma 1, 2, 4, 8 y 10 (Kreff et al., 2006; Kreff, 2009). Resulta interesante mencionar que solo algunos QTL detectados en los estudios mencionados presentaron estabilidad y consistencia. Esto puede deberse a la influencia de factores tales como el tamaño muestral, las condiciones ambientales, los métodos de detección de QTL, la heterogeneidad genética (Austin y Lee, 1996). La evaluación de la estabilidad y la consistencia de los QTL para resistencia al MRCV identificados, es crucial para poder desarrollar efectivas estrategias de mejoramiento genético.

HIPÓTESIS

La variabilidad fenotípica y genotípica existente en una población segregante de familias $F_{2:3}$ de maíz para resistencia al MRCV permite identificar, mediante el uso de marcadores moleculares del tipo SSR (*simple sequence repeats*), *loci* involucrados en la determinación de la misma y analizar su consistencia a través de distintos fondos genéticos, generaciones y ambientes.

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Identificar asociaciones entre polimorfismos genéticos (marcadores moleculares de ADN) y la resistencia al MRCV en un grupo de familias $F_{2:3}$ de maíz.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Evaluar fenotípicamente familias segregantes $F_{2:3}$ de maíz por los caracteres índice de severidad (ISE), incidencia (INC) y severidad (SEV) del MRCV, así como por intervalo antes-estigma (IAE) y rendimiento (RTO).
- 2- Estimar la heredabilidad de los caracteres.
- 3- Determinar la correlación entre los caracteres.
- 4- Caracterizar genotípicamente familias segregantes $F_{2:3}$ con SSR.
- 5- Identificar *loci* de caracteres cuantitativos (QTL) para los caracteres ISE, INC y SEV del MRCV.
- 6- Estimar los efectos genéticos e interacción QTL \times ambiente para los QTL identificados para todos los caracteres.
- 7- Determinar la consistencia en la posición de los QTL asociados a resistencia al MRCV.

MATERIALES Y MÉTODOS

1- Material vegetal

El material parental para la formación de la población de mapeo $F_{2:3}$ utilizada está constituido por dos líneas endocriadas, una susceptible a la virosis (B73, perteneciente al grupo heterótico Iowa Stiff Stalk Synthetic) y otra resistente a la misma (LP116, desarrollada en INTA Pergamino). Durante la campaña agrícola 2007/08 se sembraron 30 semillas de cada línea y se realizaron fecundaciones cruzadas en el estadio de floración, lo cual permitió obtener 12 híbridos F_1 .

Durante el otoño-invierno del año 2008 se enviaron a la Estación Experimental del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) de Yuto ($23^{\circ} 07' 42.83'' S$; $64^{\circ} 19' 17.49'' O$) las 12 espigas F_1 para que fueran autofecundadas a contraestación. En la campaña agrícola 2009/10 en el campo experimental de la UNRC ($33^{\circ} 06' 16.08'' S$; $64^{\circ} 17' 54.55'' O$) se sembraron semillas F_2 provenientes de una de las espigas F_1 . Al momento de observar sincronía floral se procedió a autofecundar el mayor número posible de plantas. Sin embargo, debido a las condiciones de estrés (sequía y elevadas temperaturas) sólo se obtuvieron 40 familias $F_{2:3}$, que representan familias compuestas por plantas F_3 provenientes de la autofecundación de diferentes plantas F_2 . Durante el otoño-invierno del año 2010 se envió nuevamente material a INTA Yuto, esta vez constituido por semillas F_2 provenientes de otra espiga F_1 con la finalidad de autofecundarlas; en total se obtuvieron 168 familias $F_{2:3}$ que sumadas a las 40 obtenidas en Río Cuarto totalizan una población de 208 familias $F_{2:3}$. Durante el estadio de floración masculina y una vez realizadas las autofecundaciones, en el campo experimental de la UNRC (campaña 2009/10) y en INTA Yuto (otoño-invierno del año 2010) se extrajo tejido vegetal de cada planta F_2 y se conservó a $-60^{\circ} C$ hasta realizar la extracción de ADN.

2- Ensayos de campo

El comportamiento fenotípico de las familias $F_{2:3}$, fue registrado en los campos experimentales de la UNRC situados en la localidad de Río Cuarto (campo experimental

CAMDOCEX, 33° 06' 16.08" S; 64° 17' 54.55" O) durante el ciclo agrícola 2010/11 y en La Aguada (campo experimental Pozo del Carril, 32° 58' 17.25" S; 64° 38' 58.43" O) durante el ciclo agrícola 2010/11 y 2011/12. Cada combinación localidad-año fue considerada como ambientes diferentes para los análisis estadísticos. El estudio se llevó a cabo utilizando un diseño en bloques completos al azar con dos repeticiones de cada familia F_{2:3}, cada repetición se constituyó de 15 plantas espaciadas a 0.15 metros una de otra. En los tres ensayos el control de malezas previo a la implantación de los mismos se realizó con agroquímicos y el control de malezas postemergentes se realizó, cuando fue necesario, en forma manual; la siembra fue efectuada de manera manual en surcos marcados a 0.70 metros (Figura 2-a). Con la finalidad de lograr un adecuado nivel de infección del MRCV los ensayos fueron establecidos en lotes provenientes de avena (Figura 2-b). Además, lotes cercanos presentaron el mismo u otro verdeo de invierno. En los tres ambientes de evaluación, se realizó transmisión controlada con el insecto vector, para lo cual luego de sembrar las semillas, cada surco fue cubierto con arcos de hierro que fueron el soporte estructural de unos pequeños túneles de malla fina (Figura 2-c). Al momento en que las plantas de maíz alcanzaron el estado de coleoptile (mayor susceptibilidad al ataque del vector) las mismas se sometieron a transmisiones controladas mediante macrópteros del insecto vector recolectadas en cultivos de avena. Las fechas de siembra fueron definidas de acuerdo al pico poblacional del insecto vector de manera de lograr la sincronización entre los estadios de mayor susceptibilidad del maíz al MRCV (coleoptile a tercer hoja) con los picos poblacionales para obtener un buen nivel de transmisión controlada con el insecto vector (Cuadro 1). La población del insecto vector fue distribuída regularmente en el túnel donde se introdujeron aproximadamente siete insectos adultos vectores del MRCV por cada plántula de maíz. Luego de transcurrida una semana las mallas finas de los túneles fueron extraídas para permitir el normal crecimiento de las plantas de maíz (Figura 2-d) y otras posibles infecciones naturales por la llegada de chicharritas de lotes lindantes.

Cuadro 1. Fecha de siembra y de transmisión controlada con el insecto vector.

Localidad	Campaña 2010-11		Campaña 2011-12
	La Aguada	Río Cuarto	La Aguada
Fecha de siembra	11/11/2010	01/12/2010	02/12/2011
Fecha de transmisión controlada	25/11/2010	13/12/2010	14/12/2011



Figura 2. a- Siembra manual de los ensayos; b- Lote de avena bajo pastoreo, cercano a la parcela destinada al ensayo en la localidad de La Aguada; c- Vista del ensayo con túneles de malla fina colocados para la transmisión de la enfermedad mal de Río Cuarto virus en la localidad de Río Cuarto; d- Vista del ensayo con familias F_{2:3} en la localidad de La Aguada. Fuente: fotos propias.

3- Datos fenotípicos

La evaluación del comportamiento fenotípico de las familias F_{2:3} frente al MRCV se realizó observando diferentes síntomas en cada una de las 15 plantas en las dos

repeticiones de cada familia en dos momentos del ciclo de crecimiento del maíz que fueron a floración y a madurez fisiológica. A floración, se registraron los siguientes caracteres:

-Altura de la planta (AP), medida en centímetros como la distancia entre el nivel del suelo y el extremo distal de la panoja.

-Síntomas en la panoja (TP), donde 0= normal; 1= extremo de las ramificaciones de la panoja sin flores diferenciadas (2 cm); 2= entre 2 cm y un 50% de la longitud de las ramificaciones de la panoja sin flores diferenciadas; 3= flores diferenciadas en el eje central y en menos del 50% de la longitud de las ramificaciones de la panoja; 4= panoja sin flores diferenciadas; 5= ausencia de panoja.

-Presencia y tipo de enaciones (PE), donde 0= ausencia de enaciones; 1= enaciones tenues aisladas; 2= enaciones tenues en rosario; 3= enaciones tipo nervaduras engrosadas; 4= enaciones tipo callo.





-Acortamiento de entrenudos (AE), donde 0= entrenudos normales; 1= presencia de entrenudos acortados.

-Aspecto de hojas del tercio superior, las mismas se caracterizaron mediante el acortamiento de hojas (LH) donde 0= hoja normal; 1= presencia de hoja acortada; la presencia de hojas angostas (HA) donde 0= hoja normal; 1= presencia de hoja angosta, y la presencia de hojas rasgadas (HR) donde 0= hoja normal; 1= presencia de hoja rasgada.

Los caracteres mencionados (AP, TP, PE, AE y aspecto de hojas del tercio superior) ya estaban fijados en cada planta de las familias evaluadas; a diferencia de los síntomas en la espiga que se midieron a madurez fisiológica del cultivo. En este estado fenológico se evaluó la presencia de síntomas en la espiga (0= espiga normal; 1= hasta 2/3 de la espiga con granos desarrollados normalmente; 2= hasta 1/3 de la espiga con granos desarrollados normalmente; 3= espiga con granos vanos; 4= ausencia de espiga) y a su vez se observó presencia o ausencia de espigas curvas y múltiples.

La información obtenida mediante estos caracteres permitió asignar a cada planta un grado de severidad de acuerdo a la escala propuesta por Ornaghi et al. (1999a) que agrupa a las mismas en cuatro grados de severidad según combinación de síntomas de la enfermedad (Cuadro 2).

Cuadro 2: Grados de severidad y sintomatología de la enfermedad mal de Río Cuarto virus de acuerdo a la escala propuesta por Ornaghi et al., (1999a). Fuente: fotos propias.

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

Con las mediciones tomadas por planta en los dos estados fenológicos y con el grado de severidad asignado; se calculó la resistencia de cada genotipo por medio de un índice de severidad de enfermedad (ISE) que toma valores de 0% en plantas sin enfermedad hasta 100% en plantas completamente enfermas (Grau et al., 1982; Di Renzo et al., 2002); el mismo se estimó de la siguiente manera:

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

donde “grado_i” grado de severidad de cada planta evaluada según la escala de severidad descripta (Ornaghi et al., 1999a); “n° total de plantas” es el número total de plantas evaluadas en cada familia F_{2:3} y $3 = n^{\circ}$ grados de severidad -1.

Además del ISE establecido para cada repetición de cada familia F_{2:3}, fue estimado el valor de incidencia (INC) y de severidad (SEV) de enfermedad basados en el grado de severidad asignado a cada planta. La variable INC se expresó como el porcentaje de plantas que presentaron síntomas respecto al total de plantas de cada familia F_{2:3} (plantas con grado de severidad 0 se consideraron sanas, y plantas con grado de severidad 1, 2 ó 3 se consideraron enfermas); la variable SEV se expresó como el promedio del registro de grados de las plantas individuales dentro de cada familia F_{2:3}.

También se registraron para cada repetición de cada familia F_{2:3} el intervalo antesis-estigma (IAE) y el rendimiento (RTO). El IAE se estimó con el registro de las fechas de antesis y de floración femenina mediante visitas diarias a los ensayos en floración contabilizando los días en los cuáles el 25, el 50 o el 75 % de las plantas de cada repetición entraban en floración masculina y femenina. El RTO (Kg/ha) se estimó sobre cada repetición de las familias F_{2:3} a partir del peso de granos corregido al 14.5% de humedad; la trilla se realizó de manera manual al llegar a madurez de cosecha.

4- Datos genotípicos

La extracción de ADN se realizó desde material vegetal obtenido de las líneas parentales y de las generaciones F₁ y F₂. Para ello, en la etapa de floración se cosecharon hojas tiernas correspondientes al tercio superior de cada planta. Las muestras fueron liofilizadas en la Facultad de Ciencias Exactas de la UNRC y luego se mantuvieron a -60 °C hasta el momento de la extracción de ADN. La extracción de ADN genómico se realizó en el Instituto de Genética “Ewald A. Favret” (INTA), siguiendo el método propuesto por Saghai-Marroof et al. (1984), que comprendió las siguientes etapas:

1. El material liofilizado se trituroó en un homogenizador automático (FastPrep® 24 Instrument, MP Biomedicals LLC, Irvine, CA, USA). El tejido obtenido (300-

400 miligramos (mg)) se colocó en un tubo de polipropileno de 15 mililitros (ml) para centrifugación.

2. A los 300-400 mg de tejido obtenido se les agregó 9 ml de solución amortiguadora CTAB (bromuro mixto de alquiltrimetil amonio) para extracción a 65 °C. Los componentes de la solución CTAB para preparar 1000 ml, fueron 1 M Tris-ClH, pH 7.5, concentración final 100 mM, 100 ml; 5 M cloruro de sodio, concentración final 700 mM, 140 ml; 0.5 M ácido etilendiaminotetraacético (EDTA), pH 8.0, concentración final 50 mM, 100 ml; agua deionizada, 600 ml; CTAB (10%), concentración final 2% (v/v), 20 gramos (gr). Se adicionaron 120 µl de 2-mercaptoetanol. Se mezcló invirtiendo los tubos con suavidad durante 10 minutos (min).
3. Los tubos se incubaron agitando con suavidad durante 60-90 min en horno a 65 °C.
4. Retirados los tubos del horno y luego de 5 min se agregaron 4.5 ml de cloroformo/octanol (24:1). Se invirtieron los tubos durante 10 min para mezclar.
5. Se centrifugó durante 15 min a 1300-1500 revoluciones por minuto (rpm) y 25 °C.

Nota: a menos de 15 °C, el complejo CTAB/ácido nucleico puede precipitar, arruinando la preparación.

6. El sobrenadante se trasvasó a otros tubos de 15 ml. Se agregaron 4.5 ml de cloroformo/octanol (24:1) y se invirtieron los tubos durante 10 min para mezclar.
7. Se centrifugó durante 15 min a 1300-1500 rpm y 25 °C.
8. Con una pipeta, se trasvasó el sobrenadante a otros tubos de 15 ml y se agregaron 15 µl de ARNasa de 10 mg/ml. Luego se invirtieron los tubos para mezclar y se incubaron 60 min a 37 °C.
9. Se agregaron 6 ml de isopropanol (2-propanol) frío, invirtiendo con suavidad los tubos hasta lograr la formación de la medusa de ADN.
10. Los tubos se dejaron 24 hs a 4 °C para favorecer la precipitación, y luego se centrifugaron durante 5 min a 1500 rpm y 10 °C. Una vez precipitado el ADN se descartó el sobrenadante y se realizaron tres lavados con una solución compuesta de etanol 76%, acetato de sodio 0.2 M, acetato de amonio 10 mM y agua deionizada. Cada lavado se hizo con 1 ml de la solución durante 30 min. Entre el

primer y segundo lavado el pellet de ADN se trasvasó a un tubo de microcentrífuga de 1.5 ml y se centrifugó brevemente (20 s).

11. Luego del tercer lavado, el pellet de ADN se dejó secar en flujo laminar y se resuspendió en 400 µl de buffer TE (1 M Tris-ClH, pH 8.0; 0.5 M EDTA; agua deionizada).

La cantidad y calidad del producto de precipitación se evaluó utilizando un espectrofotómetro (NanoDrop® ND-1000 Technologies Inc., Nilmington, DE, USA). Luego de evaluar la cantidad y calidad de ADN se realizaron las diluciones de uso (25 ng/µl) para la caracterización molecular.

Las secuencias de 173 juegos de iniciadores de microsatélites distribuidos en los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10 fueron obtenidas a partir de la base de datos de maíz (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>). Se intentó escoger aquellos marcadores que fueron polimórficos en otras líneas de *Zea mays* utilizadas en estudios de resistencia al MRCV para aumentar la probabilidad de que fueran polimórficos entre las líneas parentales utilizadas en la construcción de esta población. El ADN de los parentales LP116 y B73 fue utilizado para identificar marcadores SSR polimórficos mediante la reacción de PCR. Los componentes de cada reacción de PCR fueron Buffer 10X, cloruro de magnesio 25 mM, iniciadores (primers) 5 mM, dNTPs 10 mM, *Taq* ADN polimerasa 1.25 u/µl, ADN 25 ng/µl, 6X buffer de carga con colorante rojo de cresol; constituyendo un volumen final por tubo de 20 µl.

La reacción de amplificación por PCR para la detección de marcadores polimórficos fue realizada en el IGEAF INTA Castelar en un termociclador BIOMETRA UNO-Thermoblock, con el programa de amplificación del ADN que se detalla a continuación: 2 min a 94 °C seguidos de 10 ciclos de 30 segundos (s) para desnaturalización del ADN a 94 °C, 1 min para hibridación de los iniciadores a 65 °C ($\Delta t^\circ - 1^\circ\text{C}$ por ciclo) y 2 min para amplificación a 72 °C. Luego se realizaron 25 ciclos de 30 s a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C. A continuación de los 35 ciclos mencionados, se programó un paso de extensión de 5 min a 72 °C. El producto de amplificación por PCR fue separado en geles de agarosa Metaphor al 4 % p/v (BMA-FMC BioWhittaker, Rockland, ME USA) disuelta en buffer TBE 1 X (0.090 M Tris borato; 0.002 M EDTA), con el agregado de 3.8 µl de bromuro de etidio (10 mg/ml) por cada 100 ml de buffer. De

buffer TBE se elaboró un stock 10 X de 1000 ml a pH 8.0, con 108 gr de tris base 0.9 M; 55 gr de ácido bórico 0.9 M y 40 ml de 0.5 M EDTA. Un marcador de peso molecular 100 pb DNA Ladder (Promega) fue utilizado para estimar el tamaño del fragmento amplificado. La corrida electroforética se realizó con buffer de electrodos TBE 0.5X (0.045 M Tris borato; 0.001 M EDTA) manteniendo 60-80 V constantes aproximadamente 90-180 min. Terminada la electroforesis, el gel fue expuesto en un transiluminador UV (ultravioleta) y fotografiado (Kodak Digital Science DC260) para su documentación final.

Las caracterizaciones moleculares de los marcadores que resultaron polimórficos se realizaron en el Laboratorio de Biotecnología de la FAV - UNRC con el ADN de las plantas F₂. La metodología utilizada para la reacción de amplificación por PCR fue la misma que la aplicada en IGAEF INTA Castelar para la detección de polimorfismo molecular entre los parentales.

5- Análisis de datos

Con la finalidad de caracterizar fenotípicamente las 208 familias segregantes F_{2:3}, Análisis de varianza (ANOVA) para cada carácter dentro de cada ambiente y a través de ambientes (datos de los tres ambientes analizados conjuntamente), se realizaron utilizando el procedimiento SAS Mixed (SAS, versión 6.12; SAS Institute, Cary, N.C., USA). El modelo estadístico utilizado es el siguiente:

$$y_{ijk} = \mu + \alpha_i + (\beta/\alpha)_{ij} + \bar{Y}_k + (\alpha\bar{Y})_{ik} + \varepsilon_{ijk}$$

donde y_{ijk} es el carácter medido en el ambiente i en el bloque j en el genotipo k ; μ es la media general, α_i es el efecto del ambiente i ; $(\beta/\alpha)_{ij}$ es el efecto del bloque j dentro de ambiente i , \bar{Y}_k es el efecto del genotipo k (familias F_{2:3}), $(\alpha\bar{Y})_{ik}$ es el efecto de la interacción genotipo $k \times$ ambiente i , ε_{ijk} es el error experimental. En el modelo los efectos de los factores genotipo e interacción genotipo \times ambiente fueron tratados como aleatorios distribuidos normalmente, con media cero y varianzas constantes; mientras que los efectos de los factores bloque y ambiente como fijos.

Posterior al ANOVA, se compararon las medias de los caracteres de las familias F_{2:3} con las de los parentales. Se utilizó la prueba LSD Fisher con un nivel de significancia del 0.05 mediante el software InfoStat versión 2018 (Di Rienzo et al., 2018). Por otro lado, a través de ambientes se realizaron histogramas de frecuencias relativas de los caracteres, expresadas en número de familias F_{2:3}.

Para estimar la heredabilidad, se obtuvieron los componentes de varianza por medio del estimador de máxima verosimilitud restringida (REML). La heredabilidad para cada ambiente y a través de ambientes se estimó de acuerdo a Hallauer y Miranda (1981), pero con las modificaciones propuestas por Kearsley y Pooni (1996) para familias F_{2:3}, ya que dentro de la varianza ambiental en este tipo de poblaciones hay un remanente de varianza genotípica que debe considerarse. La heredabilidad por ambiente fue estimada de acuerdo a la siguiente fórmula:

$$h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_a^2 - 1/2 \sigma_g^2)$$

donde σ_g^2 = varianza genotípica y σ_a^2 = varianza ambiental. Kearsley y Pooni (1996) para familias F_{2:3} informan una varianza entre familias ($\sigma_{B=Between}^2$), la cual se asume que es genotípica bajo diseños de campo completamente aleatorizados y equivale a la σ_g^2 ; y una varianza dentro de familias ($\sigma_{W=Within}^2$), la cual representa la varianza ambiental, dentro de la que hay un remanente de $1/2$ de σ_g^2 . Debido a que estos autores asumen que los efectos de dominancia son muy pequeños en estas poblaciones y por lo tanto son ignorados, la σ_g^2 esta representada por efectos de aditividad y la heredabilidad estimada en el presente estudio es en sentido estricto.

Para la estimación de la heredabilidad a través de ambientes se utilizó la siguiente fórmula:

$$h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_{ga}^2 / a + (\sigma_a^2 - 1/2 \sigma_g^2 / r))$$

donde σ_g^2 = varianza genotípica; σ_{ga}^2 = varianza de la interacción genotipo × ambiente; σ_a^2 = varianza ambiental (con la corrección planteada con anterioridad); r = n° de repeticiones y a = n° de ambientes.

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

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

donde $F = (1-h^2)^{-1}$; $\alpha/2 = 0,05$; $1-(\alpha/2) = 0,95$; $gl_1 =$ grados de libertad de genotipo y $gl_2 =$ grado de libertad del error residual.

Para determinar la correlación entre los caracteres, mediante los valores de BLUP (*best linear unbiased predictor*) de cada genotipo en cada ambiente se calcularon los coeficientes de correlación de Pearson, mediante el software InfoStat versión 2018 (Di Rienzo et al., 2018).

6- Construcción del mapa de ligamiento

Para la caracterización genotípica de las familias $F_{2:3}$ se utilizaron 173 marcadores moleculares tipo SSR. A partir de los datos del genotipado se obtuvo una matriz con cada individuo F_2 y el genotipo correspondiente a cada uno de los marcadores evaluados. Previo al análisis de ligamiento de los SSR polimórficos entre las líneas parentales, se evaluó la bondad de ajuste de la segregación para los mismos a través de un test de Chi-cuadrado. Aquellos marcadores que presentaron una segregación diferente a la esperada (1:2:1) fueron eliminados, ya que la precisión en la estimación de la posición de los posibles QTL declina cuando los marcadores exhiben distorsión significativa en la segregación (Cardinal et al., 2001).

Para evaluar ligamiento entre marcadores polimórficos se estimaron las frecuencias de recombinación entre *loci* mediante análisis multipunto. Dichas frecuencias fueron transformadas en distancias (cM) según la función de mapeo de Haldane (1919) utilizando el programa MAPMAKER/Exp. versión 3.0 (Lander et al., 1987). MAPMAKER es un programa desarrollado para la construcción de mapas genéticos de ligamiento el cual calcula las distancias genéticas según el porcentaje de recombinación. Si el valor del estadístico LOD (\log_{10} de la expresión de verosimilitud del cociente probabilidad de ligamiento/probabilidad de independencia), que es función de la probabilidad de ligamiento respecto al no ligamiento, es mayor que un umbral y la distancia de ligamiento es menor a un valor límite, los marcadores pueden considerarse ligados. El ligamiento se declaró significativo cuando el valor de LOD excedió un umbral de 2.5 y la frecuencia de recombinación fue menor al 50%. Posteriormente se estimó, en cada grupo de ligamiento, el orden de los marcadores.

7- Análisis de QTL

Para identificar regiones genómicas asociadas a los caracteres ISE, INC y SEV del MRCV, con la utilización de la información generada en el mapa de ligamiento y el fenotipado de la población de mapeo, se realizó el análisis de QTL.

Para el mapeo de QTL se utilizó la metodología modelos mixtos para caracteres múltiples en ambientes múltiples (MTME) (Alvarez Prado et al., 2013; Malosetti et al., 2006; Malosetti et al., 2008), mediante el software QTL Cartographer V2.5 (Wang et al., 2011). La base de datos MTME consistió de K genotipos, evaluados en I ambientes, con medidas sobre L caracteres en J bloques (en este estudio, $K = 208$, $I = 3$, $L = 3$ y $J = 2$). De esta forma, se puede definir un vector “ y ” con dimensiones $N \times 1$, con $N = KILJ$ que contiene todas las observaciones ordenadas por caracteres dentro de ambientes y dentro de genotipos en cada bloque. Los efectos del factor genotipo fueron tratados como aleatorios, mientras que los efectos de las combinaciones carácter-ambiente y bloques dentro de cada combinación como fijos. El modelo lineal mixto para los datos es el siguiente:

$$y = X\beta + Zu + \varepsilon$$

donde y es el vector de las observaciones fenotípicas, β es el vector de los efectos fijos, u y ε son vectores de efectos aleatorios debidos a genotipo y error, respectivamente. X y Z son las matrices asociadas con los efectos fijos y aleatorios. Los efectos genéticos aleatorios se distribuyen normalmente, $u \sim N(0, G)$, siendo G la matriz de varianza-covarianza genética (vcov^G). Finalmente, ε es el vector del error asociado con cada observación y se distribuye normalmente, $\varepsilon \sim N(0, R)$ donde R es la matriz de la varianza del error. La matriz vcov^G , tiene en su diagonal la varianza genética de cada combinación carácter-ambiente, y fuera de la diagonal la co-varianza genética entre pares de combinaciones carácter-ambiente para el mismo genotipo. Esta matriz es de gran interés ya que refleja la magnitud y el patrón de relacionamiento entre los efectos genéticos. De acuerdo con Malosetti et al. (2008), los efectos genéticos aleatorios a través de los ambientes no son independientes si existen genes/QTL con efectos a través de los mismos. En adición, los efectos genéticos para diferentes caracteres no son independientes si los genes/QTL para los mismos están ligados o son pleiotrópicos. Los efectos de los QTL a

través de los ambientes, frecuentemente, presentan efectos distintos, lo cual resulta en varianzas genéticas heterogéneas, que se deben reflejar en el modelo de la matriz vcov^G . Con esta finalidad, se probaron diferentes modelos para la matriz vcov^G , para detectar el de mejor ajuste. Se seleccionó el modelo de simetría compuesta con varianzas heterogéneas, por presentar el menor valor de BIC (*Bayesian Information Criterion*) (Schwarz, 1978).

A continuación, con el modelo seleccionado para la matriz vcov^G , se estimaron los valores de BLUP con el modelo mixto que fueron utilizados para el análisis de QTL. En el modelo del análisis de QTL MTME, el modelo simple para detección de QTL es el siguiente:

$$y = X\beta + X^{\text{QTL}}\alpha + Zu + \varepsilon$$

donde X^{QTL} es una matriz diseño derivada de la información de los marcadores moleculares, cuya configuración asume los efectos pleiotrópicos de los QTL para todos los caracteres. El término α es el vector de los efectos fijos de los QTL. En el modelo de QTL MTME, el vector α presenta dimensiones $M \times 1$ y contiene los efectos genéticos aditivos de los QTL para todos los caracteres en cada uno de los ambientes. La extensión de este modelo simple de detección de QTL al modelo final de QTL múltiples que incluye los efectos aditivos de todos los QTL detectados es el siguiente:

$$y = X\beta + \sum_q X_q^{\text{QTL}}\alpha_q + Zu + \varepsilon$$

El análisis MTME se realizó en dos pasos: 1) barrido genómico completo con pruebas para los QTL múltiples considerando las correlaciones entre caracteres y ambientes, y 2) modelo final para los QTL múltiples detectados en el paso 1 con pruebas de los efectos y significancia de los mismos dentro de un modelo único y las posibles interacciones entre ellos. El procedimiento de mapeo de caracteres múltiples (MTM), que implementa el CIM fue utilizado para el paso 1. En este CIM se establecieron como parámetros de control los siguientes valores: se utilizó el modelo estándar (modelo 6) para especificar los marcadores que fueron utilizados como cofactores, el número de marcadores control fue de cinco, el tamaño de la ventana fue de 10 cM, el método de regresión utilizado fue regresión *stepwise*

y el nivel de probabilidad de 0.05. El valor de velocidad de caminado para el barrido genómico fue de 2 cM. El umbral para declarar la presencia de un QTL múltiple significativo fue $LOD = 7$ (Alvarez Prado et al., 2013); el mismo fue asignado para controlar la tasa de error tipo I (falsos positivos), ya que un valor de umbral muy bajo se puede traducir en encontrar QTL falsos, y un valor muy alto puede implicar el hecho de perder QTL significativos para las variables bajo estudio.

Las posiciones detectadas en el paso 1 fueron consideradas como QTL candidatos y constituyeron el modelo inicial para el paso 2 del análisis de QTL MTME, donde se construyó un modelo final para los QTL múltiples. De esta manera las estimaciones de las posiciones de los QTL dentro de los intervalos fueron mejoradas, ya que se probó la significancia con un $LOD = 3$ para los caracteres, se evaluó el efecto de los QTL encontrados en el paso 1, se buscaron más QTL, se probaron interacciones epistáticas y finalmente se calculó la varianza fenotípica explicada por el modelo final.

Para comparar la significancia de cada modelo y saber si los QTL posibles de encontrar en el paso 2 mejoran el modelo final de QTL, se realizó una prueba de cociente de verosimilitud (Likelihood ratio test, LRT):

$$LRT = 2(\log L1 - \log L0)$$

donde $L1$ y $L0$ corresponden a los valores de likelihood bajo el modelo final e inicial, respectivamente. La diferencia entre ambos valores se multiplica por 2 para tener una distribución chi cuadrado, y así ser evaluada con los niveles de significancia propios del test. Los grados de libertad para la prueba fueron iguales a la diferencia en el número de parámetros entre el modelo final e inicial (número de parámetros es la diferencia en el número de QTL entre los dos modelos).

RESULTADOS

1- Caracterización fenotípica de familias segregantes F_{2:3} en tres ambientes de evaluación y a través de ambientes

La población de mapeo constituida por 208 familias F_{2:3} manifestó diferentes comportamientos para los caracteres bajo estudio, lo cual está relacionado con la variabilidad en su constitución genética, como así también en los factores que modulan la enfermedad MRCV tales como precipitaciones, temperaturas y nivel de eficiencia en la transmisión controlada del insecto vector. Por lo tanto, se realizó un análisis de los datos fenotípicos con la finalidad de caracterizar los genotipos evaluados. En el Cuadro 3 se presentan las medias del índice de severidad (ISE), incidencia (INC) y severidad (SEV) de enfermedad, intervalo anthesis-estigma (IAE) y rendimiento (RTO) en las líneas parentales y en las familias F_{2:3}. En ambientes individuales los valores de ISE mínimos y máximos de las F_{2:3} fueron de 0 y 100% para La Aguada 2010-11 (LA 2010-11) y La Aguada 2011-12 (LA 2011-12), mientras que en Río Cuarto 2010-11 (RC 2010-11) y a través de ambientes fueron de 0 a 80%. La intensidad media de los síntomas de la enfermedad reflejada en el ISE en las familias F_{2:3}, varió entre niveles bajos (24.89%) a intermedios (49.35%) en los tres ambientes de evaluación. Las familias F_{2:3} en el ambiente LA 2011-12 presentaron los valores más altos para ISE (49.35%) y para SEV (2.59); sin embargo para el carácter INC el valor de 0.58 fue intermedio entre el que presentaron en el ambiente RC 2010-11 de 0.47, y en el ambiente LA 2010-11 de 0.61; este comportamiento refleja que las familias evaluadas no mostraron una tendencia consistente en los tres ambientes evaluados, ya que las medias de ISE, INC y SEV no fueron similares en los mismos. Al comparar los tres ambientes de evaluación, los menores y mayores valores para los caracteres de enfermedad se registraron en RC 2010-11 y LA 2011-12, respectivamente.

La línea parental resistente, LP116, no manifestó síntomas de enfermedad en ninguno de los ambientes evaluados, por lo tanto el ISE, la INC y la SEV al MRCV fueron nulas. Las diferencias entre ambos parentales para los caracteres ISE, INC y SEV fueron estadísticamente significativas ($p < 0.05$) en ambientes individuales y a través de ambientes, lo cual se visualiza con letras distintas al lado de las medias de cada carácter.

En lo que al comportamiento de las familias $F_{2:3}$ se refiere y la semejanza del mismo con los parentales, en el ambiente LA 2010-11 y a través de ambientes el valor del ISE medio de las mismas tuvo diferencia significativa ($p < 0.05$) con los valores medios del ISE de los parentales, manifestando un comportamiento fenotípico distinto a ellos. En RC 2010-11, ambiente con menor nivel de enfermedad, la media de las $F_{2:3}$ no presentó diferencias significativas con respecto a LP116, contrario a lo que ocurrió en LA 2011-12 donde la media de las familias fue semejante al parental susceptible B73; por lo tanto, fenotípicamente en cuanto a síntomas del MRCV, en RC 2010-11 las familias segregantes mostraron en promedio semejanza al parental resistente, y en LA 2011-12 al susceptible.

Para los caracteres INC y SEV, en el análisis por ambiente, las medias de las familias $F_{2:3}$ difirieron significativamente del parental resistente y mostraron comportamiento fenotípico similar al parental susceptible B73 sin diferencias estadísticamente significativas; lo mismo se observó a través de ambientes para SEV. Para INC la media de las familias segregantes difirió de ambos parentales en el análisis a través de ambientes. En ambientes individuales y a través de ambientes los valores de INC mínimos y máximos de las $F_{2:3}$ fueron de 0 y 1; y para ISE de 1 y 3.

Cuadro 3. Estimación de las medias (\pm E.E.) del índice de severidad del mal de Río Cuarto virus y demás caracteres evaluados en las líneas parentales (LP116 y B73) y en 208 familias F_{2:3}, en ambientes individuales y a través de ambientes.

Carácter	Genotipo	Ambiente							
		Río Cuarto 2010-11		La Aguada 2010-11		La Aguada 2011-12		A través de ambientes	
ISE	LP116	0.00 \pm 0.00	a	0.00 \pm 0.00	a	0.00 \pm 0.00	a	0.00 \pm 0.00	a
	B73	55.67 \pm 7.67	b	93.67 \pm 0.34	c	87.00 \pm 2.00	b	78.78 \pm 7.69	c
	F _{2:3}	24.89 \pm 1.06	a	43.08 \pm 1.50	b	49.35 \pm 1.89	b	39.11 \pm 0.93	b
	F _{2:3} Mín-Máx	0 - 83		0 - 100		0 - 100		0 - 80	
	LSD	17.36		24.45		31.06		15.14	
INC	LP116	0.00 \pm 0.00	a	0.00 \pm 0.00	a	0.00 \pm 0.00	a	0.00 \pm 0.00	a
	B73	0.84 \pm 0.06	b	1.00 \pm 0.00	b	1.00 \pm 0.00	b	0.95 \pm 0.04	c
	F _{2:3}	0.47 \pm 0.02	b	0.61 \pm 0.02	b	0.58 \pm 0.02	b	0.55 \pm 0.01	b
	F _{2:3} Mín-Máx	0 - 1		0 - 1		0 - 1		0 - 1	
	LSD	0.25		0.28		0.33		0.17	
SEV	LP116	0.00 \pm 0.00	a	0.00 \pm 0.00	a	0.00 \pm 0.00	a	0.00 \pm 0.00	a
	B73	1.99 \pm 0.13	b	2.81 \pm 0.01	b	2.61 \pm 0.06	b	2.47 \pm 0.16	b
	F _{2:3}	1.56 \pm 0.03	b	2.09 \pm 0.04	b	2.59 \pm 0.04	b	2.06 \pm 0.02	b
	F _{2:3} Mín-Máx	1 - 3		1 - 3		1 - 3		1 - 3	
	LSD	0.34		0.39		0.33		0.24	
IAE	LP116	1.11 \pm 0.26	a	4.60 \pm 1.21	a	4.05 \pm 1.21	b	2.95 \pm 0.59	b
	B73	1.25 \pm 0.48	a	3.00 \pm 1.30	a	4.60 \pm 1.21	a	3.07 \pm 0.71	a
	F _{2:3}	1.55 \pm 0.09	a	3.56 \pm 0.15	a	4.61 \pm 0.16	a	3.05 \pm 0.08	a
	F _{2:3} Mín-Máx	0 - 6		0 - 14		0 - 15		0 - 9	
	LSD	1.04		1.75		1.90		0.97	
RTO	LP116	4309.60 \pm 390.03	b	792.93 \pm 96.12	a	686.21 \pm 108.24	b	3164.00 \pm 414.61	b
	B73	2568.22 \pm 390.15	a	430.39 \pm 40.66	a	295.22 \pm 10.22	a	1837.59 \pm 376.36	a
	F _{2:3}	3714.71 \pm 84.72	b	552.68 \pm 24.87	a	353.92 \pm 13.87	a	1671.41 \pm 57.59	a
	F _{2:3} Mín-Máx	301 - 8016		0 - 2405		0 - 1623		150 - 5994	
	LSD	609.56		265.21		155.80		507.51	

ISE = Índice de severidad del MRCV; INC= Incidencia del MRCV; SEV= Severidad del MRCV; IAE= Intervalo antesis-estigma; RTO= Rendimiento \pm Error estándar.

Medias seguidas por la misma letra en la columna indican diferencias no significativas con un nivel de significancia de 0.05 según prueba de LSD.

F_{2:3} Mín-Máx = Valores mínimos y máximos registrados en 208 familias F_{2:3}.

Para el carácter IAE las medias de las familias F_{2:3} no difirieron de las medias de ambos parentales en RC 2010-11 y en LA 2010-11, pero en LA 2011-12 y a través de ambientes las medias de las F_{2:3} presentaron IAE similar al parental B73 y difirieron del parental resistente LP116 ($p < 0.05$). En ambientes individuales los valores de IAE mínimos y máximos fueron de 0 a 6, 0 a 14 y 0 a 15 en RC 2010-11, LA 2010-11 y LA 2011-12; respectivamente; mientras que a través de ambientes fueron de 0 a 9.

Finalmente, el RTO refleja una situación similar a la encontrada con ISE, debido a que la media de las F_{2:3} en el ambiente menos estresante (RC 2010-11) presentó comportamiento similar al parental LP116 y en el más estresante (LA 2011-12) presentó comportamiento similar al parental B73 y su media difirió significativamente del parental

resistente ($p < 0.05$). Esto último, se observó también en el análisis a través de ambientes. En cuanto a RTO en LA 2011-12 todos los genotipos presentaron los menores valores, lo cual sugiere una posible relación entre nivel de enfermedad y éste carácter. En ambientes individuales los valores de RTO mínimos y máximos fueron de 301 a 8016, 0 a 2405 y 0 a 1623 en RC 2010-11, LA 2010-11 y LA 2011-12, respectivamente; mientras que a través de ambientes fueron de 150 a 5994.

En la Figura 3 se presentan las distribuciones de frecuencias relativas a través de tres ambientes de la zona en donde la enfermedad MRCV es endémica, para los caracteres ISE, INC, SEV, IAE y RTO.

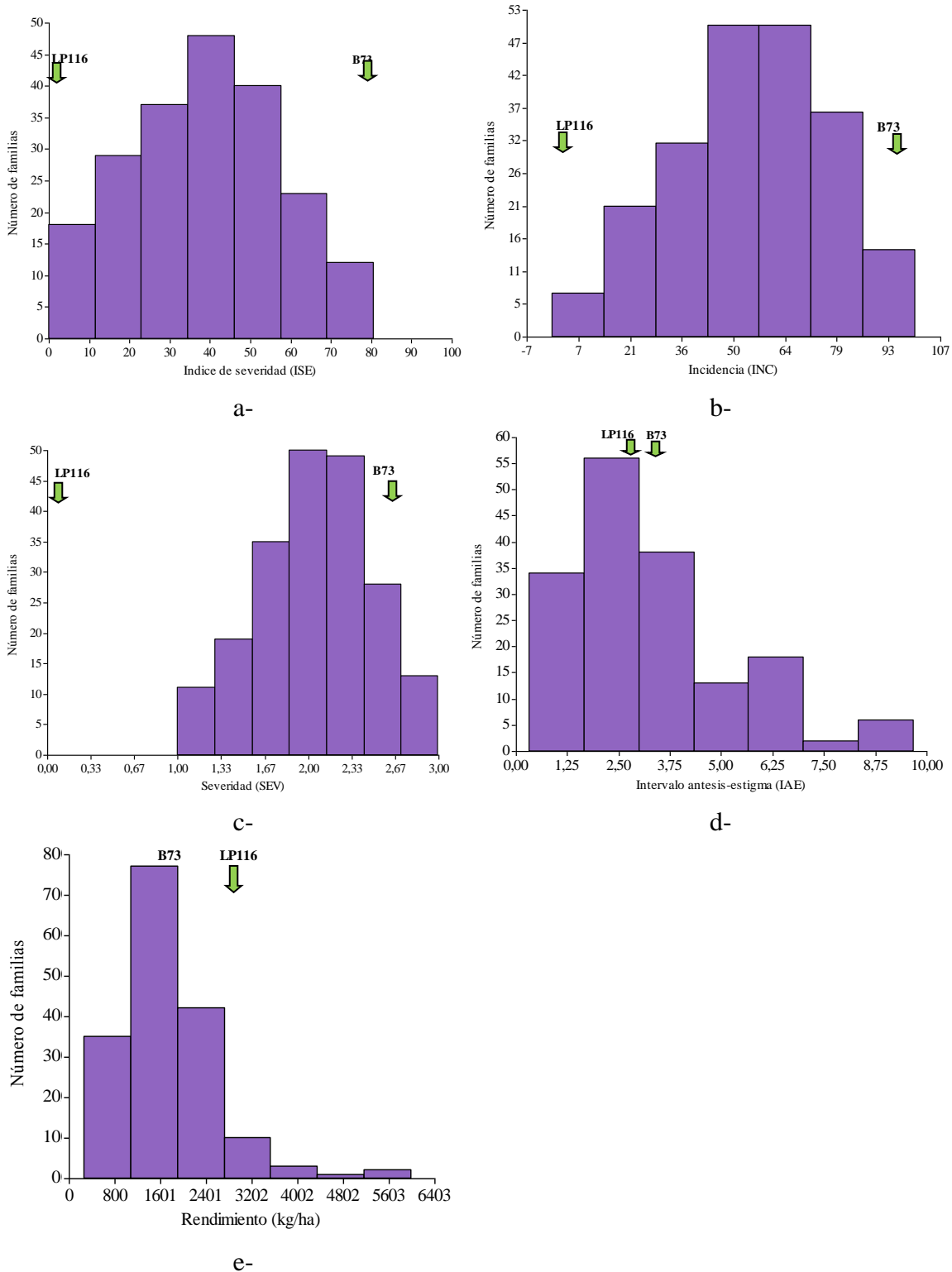


Figura 3. Distribución de las frecuencias relativas (número de familias $F_{2:3}$) en los tres ambientes evaluados de: a- Índice de severidad del mal de Río Cuarto virus (ISE); b- Incidencia de enfermedad (INC) expresada en %; c- Severidad de enfermedad (SEV); d- Intervalo antes-estigma (IAE); e- Rendimiento (RTO). El comportamiento medio del parental resistente (LP166) y del parental susceptible (B73) esta indicado para cada variable.

Para los caracteres ISE e INC, las medias de las líneas parentales se sitúan cercanas a los límites de las distribuciones (Figura 3-a y 3-b); sin embargo en los análisis por ambientes los valores máximos de las $F_{2:3}$ superan a las medias del parental susceptible (ver Cuadro 3, $F_{2:3}$ Mín-Máx). Al considerar la distribución de frecuencias para el carácter SEV (Figura 3-c), unas diez familias $F_{2:3}$ presentaron valores más altos que el parental susceptible B73, lo cuál indica segregación transgresiva. Para los caracteres IAE y RTO, las distribuciones de las familias $F_{2:3}$ a través de tres ambientes fueron cercanas a la normal y presentaron asimetría hacia la derecha. Para IAE y RTO, la distribución fenotípica continua de las $F_{2:3}$ exhibió valores que superaron las medias de ambos parentales, lo cuál sugiere herencia transgresiva ya que algunas familias presentaron menor IAE y mayor RTO que el parental resistente LP116, y otras presentaron mayor IAE y menor RTO que el parental susceptible B73.

2- Estimaciones de heredabilidad

En el Cuadro 4 se presentan las estimaciones de heredabilidad en sentido estricto de acuerdo a Hallauer y Miranda (1981) con las modificaciones propuestas por Kearsey y Pooni (1996) e intervalos de confianza (IC) para los caracteres evaluados ISE, INC, SEV, IAE y RTO, en 208 familias $F_{2:3}$, en ambientes individuales y a través de ambientes. Todos los caracteres relacionados a la enfermedad (ISE, INC y SEV) mostraron valores de heredabilidad moderados, que variaron desde 0.30 a 0.77 tanto para ambientes individuales como a través de ambientes.

Para el carácter RTO, las heredabilidades fueron moderadas en el análisis por ambiente (0.53 a 0.64) y en el análisis a través de ambientes la estimación fue más baja (0.44). La misma tendencia se observó para el IAE, donde en el análisis por ambientes los valores fueron desde 0.61 a 0.69, pero a través de ambientes la heredabilidad fue la más baja de las reportadas en este estudio con un valor de 0.24. Los intervalos de confianza, fueron consistentes en cada uno de los ambientes, así como a través de ambientes. De manera general los mismos fueron mayores a través de ambientes, con lo cuál los valores de heredabilidad estimados en ambientes individuales fueron más precisos. Los estimadores de los componentes de varianza genotípica y de la interacción genotipo \times ambiente fueron

altamente significativos ($p < 0.001$) en los tres ambientes y a través de ambientes para los caracteres evaluados (datos no mostrados). En los análisis por ambiente, se observa que de las estimaciones de varianza total, en todas los caracteres la mitad es varianza ambiental y la otra mitad es genética (observar CV (%) en el Cuadro 4= componente de varianza explicada en porcentaje respecto a la suma de la varianza ambiental, genética y de la interacción genotipo \times ambiente), a excepción de los componentes estimados para el carácter SEV en RC 2010-11 donde un 73% de la varianza total es ambiental, lo cuál se refleja en el valor más bajo de heredabilidad estimado. En los análisis a través de ambientes, el componente de varianza genotipo \times ambiente fue de 30% en promedio para los caracteres ISE, INC y SEV; mientras que para IAE y RTO fue de 72% y 51%, respectivamente.

Cuadro 4. Estimación de los componentes de varianza, heredabilidad en sentido estricto junto a sus intervalos de confianza para el índice de severidad (ISE), incidencia (INC), severidad (SEV) del mal de Río Cuarto virus, intervalo antesis-estigma (IAE) y rendimiento (RTO) en 208 familias F_{2:3}, en ambientes individuales y a través de tres ambientes donde la enfermedad es endémica.

Parámetro	Ambiente							
	La Aguada 2010-11	CV (%) ²	Río Cuarto 2010-11	CV (%) ²	La Aguada 2011-12	CV (%) ²	A través de ambientes	CV (%) ²
Carácter: ISE								
Componente de varianza								
σ_g^2	358.306 ± 68.775	39	183.836 ± 34.592	40	806.360 ± 117.365	54	146.244 ± 35.284	15
σ_a^2	558.901 ± 55.204	61	278.663 ± 27.391	60	681.891 ± 66.865	46	506.600 ± 28.866	53
σ_{ga}^2	-	-	-	-	-	-	303.340 ± 41.515	32
Heredabilidad								
h^2	0.48		0.49		0.74		0.45	
IC 90%	0.315 - 0.605		0.329 - 0.612		0.658 - 0.802		0.306 - 0.564	
Amplitud relativa ¹ (%)	29.1		28.4		14.4		25.8	
Carácter: INC								
σ_g^2	0.058 ± 0.009	48	0.048 ± 0.008	46	0.097 ± 0.014	56	0.022 ± 0.005	17
σ_a^2	0.064 ± 0.006	52	0.057 ± 0.006	54	0.077 ± 0.008	44	0.066 ± 0.004	50
σ_{ga}^2	-	-	-	-	-	-	0.045 ± 0.006	34
Heredabilidad								
h^2	0.62		0.59		0.77		0.47	
IC 90%	0.500 - 0.711		0.461 - 0.688		0.698 - 0.825		0.332 - 0.580	
Amplitud relativa ¹ (%)	21.1		22.7		12.7		24.8	
Carácter: SEV								
σ_g^2	0.215 ± 0.040	43	0.105 ± 0.031	27	0.145 ± 0.031	40	0.043 ± 0.014	10
σ_a^2	0.290 ± 0.032	57	0.290 ± 0.033	73	0.220 ± 0.027	60	0.271 ± 0.018	65
σ_{ga}^2	-	-	-	-	-	-	0.102 ± 0.020	25
Heredabilidad								
h^2	0.54		0.30		0.49		0.36	
IC 90%	0.378 - 0.660		0.050 - 0.484		0.293 - 0.632		0.184 - 0.498	
Amplitud relativa ¹ (%)	28.2		43.5		33.9		31.4	
Carácter: IAE								
σ_g^2	7.885 ± 0.818	49	1.770 ± 0.267	52	8.285 ± 0.914	47	0.449 ± 0.214	8
σ_a^2	8.310 ± 0.805	51	1.650 ± 0.158	48	9.250 ± 0.896	53	1.042 ± 0.059	19
σ_{ga}^2	-	-	-	-	-	-	3.866 ± 0.309	72
Heredabilidad								
h^2	0.64		0.69		0.61		0.24	
IC 90%	0.527 - 0.726		0.594 - 0.763		0.488 - 0.703		0.041 - 0.398	
Amplitud relativa ¹ (%)	19.8		17.0		21.5		35.7	
Carácter: RTO								
σ_g^2	127036.690 ± 13556.093	49	1464970.945 ± 203413.037	42	17040.130 ± 1999.181	49	224433.505 ± 55872.167	17
σ_a^2	132367.280 ± 13616.476	51	1999260.010 ± 196516.537	58	17862.310 ± 1997.066	51	429615.950 ± 25034.432	32
σ_{ga}^2	-	-	-	-	-	-	684150.670 ± 69098.099	51
Heredabilidad								
h^2	0.64		0.53		0.64		0.44	
IC 90%	0.520 - 0.730		0.382 - 0.643		0.508 - 0.737		0.289 - 0.559	
Amplitud relativa ¹ (%)	20.9		26.1		22.9		27.0	

± Error estándar.

¹Amplitud relativa expresada como la relación (%) del intervalo de confianza (IC) con respecto a la heredabilidad estimada (h^2).

σ_g^2 = varianza genotípica; σ_a^2 = varianza ambiental; σ_{ga}^2 = varianza de la interacción genotipo × ambiente (con la corrección planteada por Kearsey y Pooni 1996).

²Componente de varianza expresada en porcentaje respecto a la suma de las σ_g^2 , σ_a^2 y σ_{ga}^2 .

3- Correlaciones entre caracteres

La eficiencia de la selección indirecta depende de la heredabilidad del carácter y de la correlación entre los caracteres (Falconer y MacKay, 1996). Si los caracteres bajo estudio presentan correlaciones altas y significativas, entonces, algunos de ellos podrían ser de utilidad práctica en la selección de germoplasma para la producción de híbridos con adecuado comportamiento frente a la virosis MRCV.

Los valores de coeficiente de correlación de Pearson se estimaron con los BLUP de los caracteres. Las correlaciones entre los valores de ISE entre los tres ambientes de evaluación fueron bajas y no significativas ($p > 0.05$) (Cuadro 5). Estos resultados sugieren un comportamiento poco estable de las familias $F_{2:3}$.

Cuadro 5. Correlación del índice de severidad del mal de Río Cuarto virus para las 208 familias $F_{2:3}$ entre tres ambientes del área donde la enfermedad es endémica.

Ambiente	Ambiente	
	La Aguada 2010-11	Río Cuarto 2010-11
Río Cuarto 2010-11	0.01 ^{ns}	
La Aguada 2011-12	0.02 ^{ns}	0.05 ^{ns}

ns= no significativo.

La correlación del ISE del MRCV con AP, TP, LH, HA y HR, fue en todos los casos estadísticamente significativa ($p < 0.01$) (Cuadro 6).

Cuadro 6. Correlación del índice de severidad del mal de Río Cuarto virus con otros caracteres en tres ambientes donde la enfermedad es endémica y a través de ambientes, para las 208 familias $F_{2:3}$.

Ambiente	AP	TP	LH	HA	HR
La Aguada 2010-11	-0.42*	0.35*	0.53*	0.55*	0.19*
Río Cuarto 2010-11	-0.28*	0.36*	0.58*	0.62*	0.20*
La Aguada 2011-12	-0.46*	0.26*	0.63*	0.55*	0.15*
A través de ambientes	-0.32*	0.29*	0.57*	0.55*	0.11*

ISE= Índice de severidad del MRCV; AP= Altura de planta; TP= Tipo de panoja; LH= Longitud de hoja; HA= Hoja angosta; HR= Hoja rasgada.

*Correlación significativa con un nivel de significancia $p < 0.01$.

En el Cuadro 7 se presentan los coeficientes de correlación de Pearson entre los caracteres medidos en las 208 familias $F_{2:3}$ a través de ambientes. Los coeficientes

presentaron valores medios, intermedios y altos en todos los casos significativos ($p < 0.01$), a excepción del coeficiente de correlación entre AP con HR que fue negativo y no significativo ($r = -0.06$, $p > 0.05$). Para AP, la correlación fue negativa y significativa ($p < 0.01$) con el resto de los síntomas del MRCV. Las mayores correlaciones negativas y significativas a través de ambientes de evaluación se observaron entre AP con TP y AE; luego con síntomas en hoja fueron más bajas. Por otro lado, se detectaron correlaciones intermedias, positivas y significativas entre TP con LH, HA y AE ($r = 0.28$, 0.34 y 0.32 , respectivamente), altas y significativas entre LH con HA, AE y PE ($r = 0.83$, 0.65 y 0.44 , respectivamente), altas y significativas entre HA con AE y PE ($r = 0.64$ y 0.41) y alta y significativa entre AE con PE ($r = 0.46$). En lo referente a la correlación del ISE con el resto de los caracteres, las más altas fueron las encontradas con AE y PE ($r = 0.61$ y 0.74).

Cuadro 7. Coeficientes de correlación de Pearson entre los caracteres medidos en las 208 familias F_{2:3} a través de ambientes.

Variable	ISE	AP	TP	LH	HA	HR	AE
<i>r</i> Pearson							
AP	-0.32*						
TP	0.24*	-0.30*					
LH	0.57*	-0.22*	0.28*				
HA	0.55*	-0.25*	0.34*	0.83*			
HR	0.11*	-0.06ns	0.11*	0.20*	0.19*		
AE	0.61*	-0.33*	0.32*	0.65*	0.64*	0.11*	
PE	0.74*	-0.23*	0.17*	0.44*	0.41*	0.22*	0.46*

ISE= Índice de severidad del MRCV; AP= Altura de planta; TP= Tipo de panoja; LH= Longitud de hoja; HA= Hoja angosta; HR= Hoja rasgada; AE= Acortamiento de entrenudos; PE= Presencia de enaciones.

*Correlación significativa con un nivel de significancia $p < 0.01$; ns= no significativo.

El Cuadro 8 indica que el ISE se correlaciona negativamente con el RTO ($r = -0.27$) y positivamente con IAE, INC y SEV ($r = 0.10$, 0.89 y 0.16 , respectivamente). El RTO se correlaciona negativamente con el IAE ($r = -0.22$) y finalmente la INC y SEV se correlacionan positivamente con el IAE ($r = 0.06$ y 0.12).

Cuadro 8. Coeficientes de correlación de Pearson para los caracteres índice de severidad, rendimiento, intervalo antesis-estigma, incidencia y severidad del mal de Río Cuarto virus a través de los tres ambientes de evaluación.

Variable	ISE	RTO	IAE	INC
RTO	-0.27*			
IAE	0.10*	-0.22*		
INC	0.89*	-0.10*	0.06*	
SEV	0.16*	-0.25*	0.12*	0.14*

ISE= Índice de severidad del MRCV; RTO= Rendimiento; IAE= Intervalo antesis-estigma; INC= Incidencia del MRCV; SEV= Severidad del MRCV. *Correlación significativa con un nivel de significancia $p < 0.01$.

4- Análisis de QTL MTME

Las secuencias de 173 juegos de iniciadores de microsatélites distribuidos sobre los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5, 6, 8, 9 y 10 fueron obtenidas a partir de la base de datos de maíz (<http://www.agron.missouri.edu/ssr.html>, verificado en abril de 2017). Del total de los SSR evaluados (Anexo II, Cuadro 9), 129 presentaron bandas nítidas, de los cuáles 51 fueron polimórficos y 78 monomórficos entre las líneas parentales; 44 secuencias no amplificaron bajo el programa de PCR utilizado. El análisis de QTL se realizó con los 51 marcadores polimórficos seleccionados estratégicamente ya que están localizados en grupos de ligamiento en los cuáles se detectaron regiones de resistencia al MRCV en trabajos anteriores (Bonamico, 2010; Bonamico et al., 2012; Di Renzo et al., 2004; Kreff et al., 2006; Kreff, 2009).

En el primer paso del mapeo de QTL mediante modelos mixtos para caracteres múltiples en ambientes múltiples (MTME) se identificaron 12 QTL múltiples. Estas posiciones se consideraron como QTL candidatos para el segundo paso del análisis que estima el modelo final para los QTL múltiples. Como resultado de las pruebas realizadas, no se detectaron QTL nuevos para el modelo final, por lo que no se aplicó la prueba LRT; tampoco se encontraron interacciones epistáticas significativas entre los QTL detectados. Por lo tanto, el modelo final (luego de evaluar el efecto de los QTL detectados en el paso 1) para los QTL múltiples consiste de 12 QTL ubicados en los cromosomas 1, 2, 4, 8 y 10. La Figura 4 muestra los resultados de los QTL múltiples encontrados con el modelo final en cada uno de los tres ambientes de evaluación, con la posición cromosómica y carácter al que afectan. Los efectos genéticos aditivos de los QTL se muestran en cada ambiente con

signos + y -, lo cual indica que los alelos que contribuyen a reducir el valor de ISE, INC y SEV, provienen del parental susceptible B73 o del parental resistente LP116, respectivamente (los efectos aditivos se estiman por la mitad de la diferencia entre los valores genotípicos de los dos padres homocigotas; en este trabajo se asumió que el padre 1 es B73 y el padre 2 es LP116; siendo el segundo parental el que lleva los alelos favorables para los caracteres bajo estudio). Los efectos no significativos se muestran con ns = no significativo.

El análisis de QTL MTME permitió la identificación de diez QTL para ISE en los cromosomas 1, 2, 8 y 10; seis QTL para INC en los cromosomas 1, 8 y 10; y siete QTL para SEV en los cromosomas 1, 4, 8 y 10. Los QTL se pueden categorizar en dos clases, los que afectan a un solo carácter (cuatro en total) y los QTL pleiotrópicos que afectan a dos (cinco QTL) o más caracteres (tres QTL).

En lo referente a la estabilidad de los QTL detectados, de los diez QTL informados para ISE, dos de ellos fueron estables en los tres ambientes de evaluación, ubicados en el cromosoma 1 (*umc1021-bin 1.03* y *bnlg1025-bin 1.07*, donde *bin* es la región genómica) y seis fueron estables en dos ambientes, ubicados en los cromosomas 1, 2, 8 y 10 (*bnlg 1179-bin 1.01*, *bnlg1338-bin 2.01*, *bnlg1246-bin 8.05*, *phi080-bin 8.08*, *bnlg1712-bin 10.03* y *bnlg1074-bin 10.04*). Para el carácter INC, de las seis posiciones identificadas solo dos presentaron estabilidad en todos los ambientes, ubicadas en los cromosomas 8 y 10 (*phi 080-bin 8.08* y *bnlg1712-bin 10.03*). Finalmente, para SEV, de los siete QTL solo uno fue estable en los tres ambientes, ubicado en el cromosoma 4 (*umc1022-bin 4.01*), y cinco fueron estables en dos ambientes, ubicados en los cromosomas 1, 8 y 10 (*bnlg1598-bin 1.06*, *phi080-bin 8.08*, *umc1337-bin 10.02*, *bnlg1712-bin 10.03* y *bnlg1074-bin 10.04*). El resto de los QTL para los tres caracteres solo se expresaron en uno de los tres ambientes de evaluación. Esta inconsistencia, pone en evidencia la presencia de interacción QTL \times ambiente, lo cual es esperable en este tipo de ensayos a campo que involucran condiciones ambientales contrastantes.

Las posiciones y los efectos de los QTL pueden ayudar a comprender las causas de las correlaciones genéticas entre los caracteres. De los 12 QTL encontrados, como se mencionó anteriormente, algunos presentaron la misma posición para más de una variable, lo cual puede indicar presencia de pleiotropía o bien un ligamiento entre los QTL. Cinco

regiones cromosómicas presentaron significancia para las variables ISE e INC, mientras que en tres regiones en los cromosomas 8 y 10 se encontró significancia para las tres variables juntas ISE, INC y SEV. En general, no se observaron correlaciones genéticas consistentes, aunque se pueden sugerir correlaciones genéticas positivas por los tres QTL pleiotrópicos, uno de ellos en el cromosoma 8 (*phi 080-bin 8.08*), y los dos restantes en el cromosoma 10 (*bnlg1712-bin 10.03* y *bnlg1074-bin 10.04*).

En el segundo paso del análisis de QTL MTME, además de definir el modelo de los 12 QTL, se obtuvo el porcentaje de varianza fenotípica total explicada por el mismo para cada carácter (Figura 5). La proporción explicada presentó un rango de 9 a 31% a través de los caracteres y ambientes. En promedio, los caracteres ISE y SEV fueron los que presentaron los porcentajes más altos de varianza fenotípica explicada por el modelo final (26 y 21%, respectivamente), seguidos por la INC (13%). Los valores de varianza explicada para ISE (31, 29 y 20%) y SEV (19, 21 y 23%) presentaron homogeneidad a través de los ambientes, lo cual es acorde a la mayor cantidad de QTL estables que se encontraron para ambos caracteres. Para INC los porcentajes de varianza fenotípica explicada fueron heterogéneos a través de los ambientes (14, 17 y 9%), lo cual se manifiesta en la presencia de QTL inconsistentes que se identificaron para este carácter a través de ambientes; esto pone en evidencia la presencia de interacción genotipo \times ambiente. Para ISE y SEV, se observó menos interacción genotipo \times ambiente, reflejado en los porcentajes de varianza explicada más homogéneos y en la mayor cantidad de QTL con efectos consistentes en los tres ambientes de evaluación o al menos en dos.

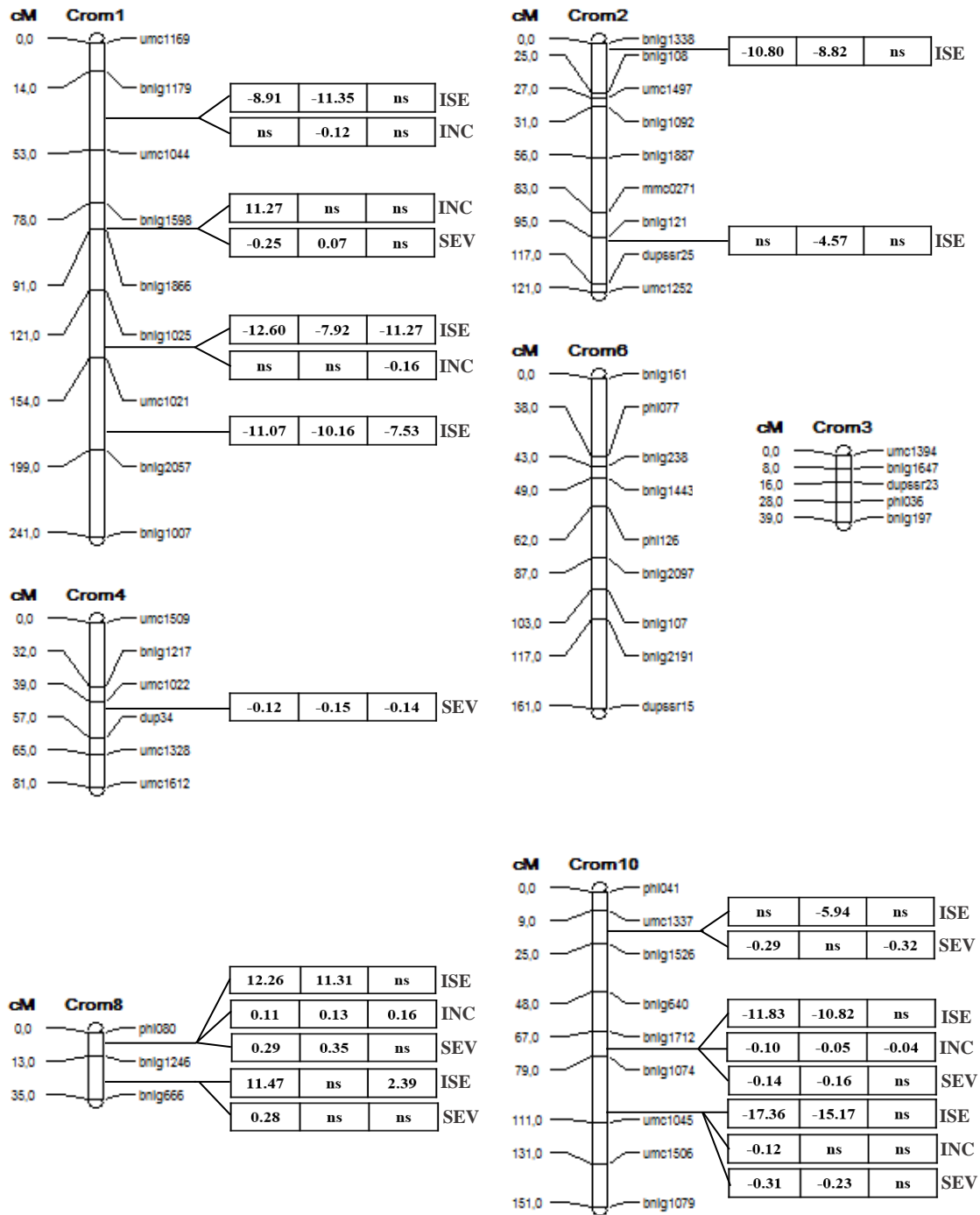


Figura 4. Ubicación cromosómica de los QTL detectados para el índice de severidad (ISE), incidencia (INC) y severidad (SEV) de la enfermedad mal de Río Cuarto virus. Los QTL están representados por barras con conectores que corresponden a la posición en el cromosoma. Los tres bloques que componen cada barra muestran los efectos aditivos de los QTL en cada ambiente (LA 2010-11: La Aguada 2010-11, RC 2010-11: Río Cuarto 2010-11 y LA 2011-12: La Aguada 2011-12, de izquierda hacia derecha), ns= efectos aditivos no significativos.



Figura 5. Varianza fenotípica total (VFT) y varianza fenotípica explicada (VFE) por el modelo final para los QTL múltiples para el índice de severidad (ISE), incidencia (INC) y severidad (SEV) de la enfermedad mal de Río Cuarto virus en los tres ambientes de evaluación: LA 2010-11: La Aguada 2010-11, RC 2010-11: Río Cuarto 2010-11, LA 2011-12: La Aguada 2011-12.

DISCUSIÓN

1- Caracterización fenotípica de familias segregantes F_{2:3} en tres ambientes de evaluación y a través de ambientes

La evaluación de genotipos de maíz por su comportamiento frente al MRCV mediante transmisión controlada es compleja debido a la dimensión que adquieren los ensayos de campo. Sin embargo, mediante la utilización de la misma nos aseguramos un nivel de enfermedad adecuado para poder realizar una correcta evaluación fenotípica de las familias F_{2:3}. En el caso de que la selección dependa sólo de la transmisión natural es posible que una baja incidencia de la enfermedad con ausencia de síntomas suficientemente severos así como una elevada incidencia y severidad, ocurrentes de manera aleatoria en distintos años, dificulten la realización exitosa de trabajos de identificación de factores genéticos que contribuyan a la resistencia (Bonamico, 2010). En cuanto a las tasas de transmisión del MRCV por el vector, diversos autores publicaron valores muy bajos de las mismas; Arneodo et al. (2002), informaron valores de transmisión dependientes de los períodos de adquisición del virus por parte del vector y del período de inoculación para la transmisión del mismo a plantas sanas; de esta manera publicaron tasas del 1% al 20% con período de adquisición del virus de 5 y 48 horas, respectivamente; y eficiencias de transmisión del 3.3% al 12.2% con períodos de inoculación de 30 minutos a 6, 12 y 24 horas. Por otro lado, Ornaghi et al. (1999), reportaron probabilidades de transmisión del 1% al 5.2 %. Sobre estos conocimientos, de eficiencias bajas en la transmisión del virus por el vector, Presello et al. (2007) informaron que para el desarrollo de epidemias del MRCV se necesita de una alta densidad poblacional y movilidad del vector. En la bibliografía sobre virosis transmitidas por insectos en maíz, muchos autores realizaron transmisión controlada del vector para mejorar la eficiencia de detección de QTL ya que se asegura un nivel de enfermedad, entre ellos Junwen et al. (2012), quienes trabajaron con el complejo viral MRDD (Maize rough dwarf disease). Este complejo viral, es causado por el MRDV (Maize rough dwarf virus) en Europa, por el MRCV (Mal de Río Cuarto virus) en Sur América y por el RBSDV (Rice black-streaked virus) en Asia; y es transmitido por una chicharrita (*Laodelphax sriatellus* *Fallen*) de manera persistente. Estos autores, realizaron la

transmisión del vector en dos etapas: la inoculación y la infección natural. En el paso de la inoculación, los materiales genotípicos y sus padres fueron germinados y luego transportados a un invernadero en el estado de una hoja que es cuando el maíz tiene mayor susceptibilidad a la infección, al igual que para MRCV. Después de la confirmación de la presencia del virus en los insectos transmisores, los mismos se dispersaron en el interior del invernadero y luego de una inoculación de cinco días, las plantas fueron trasplantadas con tres hojas en promedio a la etapa de infección natural. Este procedimiento es similar al que se realizó en el presente trabajo, ya que en primer lugar recolectamos chicharritas, luego una vez sembrado el cultivo, el mismo se cubrió con redes y se dispersaron los insectos vectores por un período de siete días; después el cultivo fue descubierto y las plantas de maíz que estaban en estados vegetativos iniciales fueron expuestas a otras posibles infecciones naturales ya que se daban por la llegada de chicharritas de lotes lindantes. Dintinger et al. (2014) trabajaron con dos enfermedades virósicas, MMV (Maize mosaic virus) y MStV (Maize stripe virus), y con el objetivo de lograr una presión homogénea de enfermedad en el material bajo estudio luego de la germinación en invernáculos, las plántulas fueron sometidas a inoculación masiva durante tres días con insectos virulíferos. La realización de infecciones controladas junto con la adecuada elección de la fecha de siembra de los ensayos realizados en los ciclos agrícolas 2010-11 y 2011-12 en Río Cuarto y en La Aguada (ambas localidades se encuentran dentro del área donde la enfermedad es endémica), permitió recolectar de lotes de avena gran cantidad de insectos vectores con alta probabilidad de estar infectados, lo cuál favoreció una adecuada manifestación de síntomas en los materiales evaluados tal como se indicó en el Cuadro 3.

En los tres ambientes la elección de las fechas de siembra y de transmisión controlada se estimaron en base al sistema de pronóstico de siembra y presembrado (basados en variables dependientes del clima, del huésped o del patógeno) que constituye una importante herramienta para el control y manejo de enfermedades (March et al., 1995). Bonamico (2010) menciona que determinadas condiciones ambientales al actuar en conjunto ocasionan un estrés bajo el cuál las plántulas de maíz se predisponen a recibir una infección viral mayor. Giménez Pecci et al. (2012) informaron que algunos factores abióticos (sequías, heladas tempranas, fertilizantes en dosis no adecuadas, vientos rasantes, planchado de suelos, fitotoxicidad por herbicidas) pueden predisponer al cultivo de maíz a

una epidemia; ya que extienden el período de mayor sensibilidad a la infección. Las condiciones ambientales del ensayo establecido en La Aguada 2011-12 se caracterizaron por presentar sequía y elevadas temperaturas durante la mayor parte del ciclo ontogénico del maíz, lo cual explica el mayor nivel de enfermedad que se obtuvo en este ambiente ya que las plantas estuvieron más estresadas y por lo tanto con mayor predisposición a la infección mediante las chicharritas. La mayor presión de enfermedad en este ambiente se tradujo en que las familias $F_{2:3}$ manifestaron los mayores valores de IAE y los menores valores de RTO (Cuadro 3).

En lo referente a las medias de las familias $F_{2:3}$ y de ambos parentales (Cuadro 3), Morata et al. (2003) encontraron en dos localidades con alta presión de enfermedad que el grado promedio de severidad del MRCV en genotipos experimentales no difirió estadísticamente del promedio de los genotipos testigos resistentes; sin embargo en la evaluación del MRCV referida como grado promedio de severidad, diferencias estadísticamente no significativas pueden implicar diferencias agronómicas de gran importancia. En el presente trabajo, para el ISE en RC 2010-11 la media de las $F_{2:3}$ no presentó diferencias significativas con respecto a LP116, lo cual coincide con lo que los autores citados mencionan. Por otro lado, para el mismo carácter y para INC y SEV en otros ambientes de evaluación, como así también a través de ambientes, las medias de las $F_{2:3}$ no presentaron diferencias estadísticamente significativas con las medias del parental susceptible B73, lo cual indica la presencia de resistencia parcial recesiva y por lo tanto de efectos genéticos no aditivos para estos caracteres. La recesividad parcial de la resistencia al MRCV hace suponer que una importante proporción de la varianza genética para la reacción a la enfermedad es atribuible a componentes no aditivos (dominancia, sobredominancia y/o epistasis) y sugiere la posibilidad de obtener material resistente de las familias segregantes $F_{2:3}$. Estos resultados son consistentes con estudios previos sobre la herencia de la resistencia al MRCV que informan la presencia de efectos genéticos no aditivos (Di Renzo et al., 2002, 2004), de dominancia y de epistasis (Presello, 1993; Presello et al., 1995), de dominancia (Marino y Teyssandier, 1982), y no aditivos (Borghi et al., 2012). Cabe destacar, que otros autores como Morata et al. (2003), Presello et al. (1995) y Lorenzo (1992) concluyen que tanto los efectos genéticos aditivos como no aditivos son significativos en la herencia de la resistencia al MRCV. En este trabajo se encontró para el

carácter SEV a través de ambientes (Figura 3-c) y para ISE en ambientes individuales (Cuadro 3) segregación transgresiva hacia el parental susceptible B73. Di Renzo et al. (2002), sugieren que la reacción a la enfermedad MRCV es de herencia cuantitativa y probablemente controlada por un sistema poligénico debido a que la misma muestra segregación transgresiva, por lo tanto, existe la posibilidad de obtener material resistente a partir de una población segregante.

La herencia transgresiva encontrada para IAE y RTO (Figura 3-d y 3-e) también fue publicada por diversos autores. Mirabilio et al. (2010), publicaron herencia transgresiva para RTO, y al igual que en el presente estudio las líneas parentales se ubicaron muy próximas entre sí para estos caracteres, con lo cual destacan la importancia de explorar varios ambientes para tomar datos fenotípicos para una correcta interpretación de los posibles marcadores moleculares asociados. Palmieri et al. (2010) encontraron distribuciones con asimetrías hacia la derecha para las variables IAE y RTO en una población de RIL y al igual que Mirabilio et al. (2010), también las líneas parentales se ubicaron muy próximas entre sí para los caracteres evaluados.

2- Estimaciones de heredabilidad

Las estimaciones de los componentes de varianza que figuran en el Cuadro 4, presentaron errores estándar pequeños y fueron altamente significativos ($p < 0.001$) tanto en ambientes individuales como a través de ambientes (datos no mostrados). Las estimaciones de las varianzas genotipo \times ambiente (σ^2_{ga}) para todos los caracteres fueron altamente significativas ($p < 0.001$) y mayores a las varianzas genotípicas (σ^2_g) en el análisis a través de ambientes (Cuadro 4). Estos resultados sugieren inestabilidad de algunos genotipos en diferentes ambientes y una influencia ambiental importante en los caracteres de la enfermedad como así también en IAE y RTO; para estos caracteres la varianza de la interacción representa un 72 y un 51% de la variabilidad total observada en los genotipos.

Los valores de heredabilidad para ISE, INC y SEV fueron similares en ambientes individuales (0.48 a 0.62), sobresalen como valores bajos 0.30 solo para SEV en RC2010-11, y como valores moderados-altos 0.74 y 0.77 para ISE e INC en LA2011-12, donde la componente de varianza genética es mayor (54% y 56%, respectivamente). Al considerar

todos los ambientes en conjunto el valor de la heredabilidad fue más bajo lo cual manifiesta la presencia de interacción genotipo \times ambiente; ésta se observa en la proporción de los componentes de varianza total, en donde en promedio un 30% corresponde al de la interacción y un 50% al ambiente. Para el ISE, los resultados fueron coincidentes con los publicados por Di Renzo et al. (2002), quienes en una población de $F_{2:3}$ con diferente fondo genético al utilizado en este estudio, encontraron valores que van desde 0.44 a 0.56 tanto en ambientes individuales como a través de ambientes; estas heredabilidades también presentaron similares intervalos de confianza. Bonamico et al. (2012) en una población de RIL proveniente de las líneas parentales Mo17 y BLS14, encontraron valores más bajos del parámetro para ISE, INC y SEV de enfermedad, lo que puede deberse a la constitución de la población de mapeo que ya tiene sucesivas generaciones de autofecundación. Dallo (2019) encontró en una población de NIL valores de heredabilidad de 0.63 para ISE en un ambiente de evaluación, donde la componente de varianza genética fue del 44%, valores similares a los encontrados en esta tesis. Rossi (2019) en una población contituída por líneas de maíz, encontró heredabilidades que oscilaron entre 0.63 y 0.71 para ISE, 0.63 y 0.70 para INC, y 0.60 y 0.71 para SEV, valores más altos a los publicados en el presente estudio en ISE y SEV, y similares en INC. Dintinger et al. (2005) encontraron valores altos de heredabilidad de 0.96 y 0.90, para incidencia y severidad de la enfermedad MStV (transmitida bajo inoculación artificial) en maíz, lo cual indica presencia de variabilidad genotípica y un control del ambiente bueno.

En el presente estudio, las heredabilidades para los caracteres RTO e IAE fueron moderadas en los ambientes individuales (0.53-0.69); estos resultados muestran coincidencias con los reportados en diferentes trabajos de investigación. Semagn et al. (2013) informaron valores de 0.54 para IAE y 0.58 para RTO en algunas situaciones ambientales. Dias Alemida et al. (2013) publicaron valores para IAE de 0.48 y 0.53 en dos poblaciones de mapeo y para RTO de 0.38, 0.51 y 0.66 en tres poblaciones de mapeo. Huang et al. (2010) publicaron estimaciones del parámetro más altas de 0.84 y 0.81 para IAE y RTO, respectivamente. Ribaut et al. (1997) informaron heredabilidades moderadas para RTO de 0.66 en una población de mapeo de familias $F_{2:3}$. Mirabilio et al. (2010) en una población de RIL también publicaron valores moderados para RTO de 0.56, y altos para IAE de 0.72. Dallo (2019) publicó valores de 0.68 en un ambiente de evaluación,

donde la componente de varianza genética fue del 55%, valores similares a los encontrados en esta tesis. Al igual de lo que ocurre con los caracteres de enfermedad, el análisis a través de ambientes arroja valores más bajos que los encontrados por ambiente, lo cuál refleja nuevamente interacción genotipo \times ambiente.

En todos los casos las heredabilidades para IAE fueron similares o mayores que para RTO, por lo tanto, si se comprenden las bases genéticas del primer carácter mencionado que presenta una correlación con el RTO, se podría diseñar una estrategia de mejoramiento eficiente basada en marcadores (Dias Almeida et al., 2013). En un número de estudios llevados adelante por el CIMMYT con maíz bajo sequía, la heredabilidad del IAE fue similar a la del RTO y las correlaciones genéticas entre ambos caracteres fueron de -0.4 y -1 (Bolaños y Edmeades, 1990); por lo tanto, estos resultados, similares a los encontrados en este estudio, demuestran el uso potencial del IAE como un carácter secundario para el mejoramiento del RTO.

En este estudio los valores de heredabilidad fueron moderados tanto para los caracteres de enfermedad como para IAE y RTO, lo cual plantea la presencia de variabilidad genética pero también ambiental, y con esto, la necesidad de continuar evaluando esta población de mapeo $F_{2:3}$ en generaciones avanzadas de autofecundación y en diversos ambientes, ya que distintas familias tienen comportamientos diferentes en distintos ambientes y años.

3- Correlaciones entre caracteres

La inestabilidad fenotípica observada en las familias $F_{2:3}$ para el carácter ISE (Cuadro 5) fue encontrada en diversos trabajos que utilizaron otras poblaciones de mapeo (Bonamico, 2010; Di Renzo et al., 2002). Los estimadores de la interacción genotipo \times ambiente que fueron altamente significativos ($p=0.001$) para el ISE a través de ambientes, junto a la baja correlación entre los valores de ISE entre los ambientes de evaluación, muestra la baja consistencia en la respuesta de las familias a través de los ambientes (Cuadro 5).

La correlación entre el ISE del MRCV con AP, TP, LH, HA y HR en los ambientes individuales y a través de ambientes indicó que la mayor susceptibilidad está

asociada con menor altura (por la presencia de correlaciones negativas), síntomas en panojas y hojas deformadas (Cuadro 6).

La correlación del ISE con el resto de los caracteres presentada en el Cuadro 7 fue informada anteriormente por Bonamico (2010), Di Renzo et al. (2002) y Salvi (2013). Kreff et al. (2006) explican que una baja o nula correlación entre los diferentes síntomas de la enfermedad puede deberse a la presencia de regiones cromosómicas independientes que afectan a los mismos, sin embargo, no es un indicador seguro de que no existen regiones cromosómicas en común. El AE y la PE son dos caracteres de fácil medición que presentaron correlaciones altas y significativas con el ISE, con lo cual podrían ser utilizados como caracteres predictores del mismo, ya que probablemente presenten bases genéticas comunes.

La correlación negativa del ISE con el RTO y positiva con el IAE es esperable, ya que aumentos en el nivel de enfermedad provocan un menor rendimiento y un aumento del IAE debido a que el cultivo se encuentra bajo estrés. El RTO se correlaciona negativamente con el IAE ($r = -0.22$, $p < 0.01$) (Cuadro 8); esta relación fue comprobada por varios autores. Ribaut et al. (1997) encontraron correlaciones de Pearson entre el RTO y el IAE de -0.07 (ns), -0.40 ($p < 0.01$) y -0.39 ($p < 0.01$) en ambientes sin estrés por sequía, con estrés intermedio por sequía y con estrés fuerte por sequía, respectivamente. Dias Almeida et al. (2013) encontraron correlaciones entre IAE y RTO en tres poblaciones diferentes de mapeo de -0.21 ($p < 0.01$), -0.21 ($p < 0.01$) y -0.67 ($p < 0.01$).

4- Análisis de QTL MTME

4.1- Contexto general: enfermedades virósicas en maíz

En lo referente a las posiciones en donde se encontraron QTL para ISE, INC y SEV en este estudio con el análisis de QTL MTME (Figura 4) diversos autores publicaron QTL para enfermedades causadas por virus en las mismas posiciones o bien similares.

Hao et al. (2014) identificaron para resistencia al complejo viral MRDD (Maize rough dwarf disease) en una población de RIL con marcadores SNP cinco QTL, uno de ellos estable a través de ambientes localizado en la región genómica *bin* 1.03 y los cuatro

QTL restantes en los *bins* 1.11, 2.06, 4.09 y 10.02, lo que coincide con algunas posiciones encontradas aquí, ya que para el carácter ISE se encontraron dos QTL estables en las posiciones 1.03 y 1.07 (esta última cercana a la 1.11) y dos QTL en el cromosoma 2 (*bins* 2.01 y 2.06); y para SEV un QTL estable en la posición 4.01. En lo referente a la posición 10.02, se encontró un QTL estable en dos ambientes para SEV, y en la posición aledaña, *bin* 10.03, un QTL estable para INC. Esta posición, fue importante para ISE y SEV, ya que en la misma se detectaron regiones asociadas a estos caracteres en algunos ambientes evaluados. Junwen et al. (2012) en una población de RIL de maíz con mapeo genético mediante SSR detectan cinco QTL ligados al índice de severidad del complejo viral MRDD, dentro de los mismos destacan dos ubicados en los *bins* 8.07 y 10.05. Estas posiciones son cercanas a las encontradas en el presente estudio, ya que para ISE se detectaron QTL estables en dos ambientes, dos de ellos en el cromosoma 8 (bnlg1246-*bin* 8.05 y phi 080-*bin* 8.08) y el resto en el cromosoma 10 (bnlg1712-*bin* 10.03 y bnl1074-*bin* 10.04).

Dintinger et al. (2014) en una población de RIL con mapeo genético mediante SSR informaron dos QTL para las enfermedades MMV (Maize mosaic virus) y MStV (Maize stripe virus), uno de ellos ubicado en el *bin* 1.03. En esta posición, se encontró un QTL estable en los tres ambientes de evaluación para ISE; por otro lado, la posición 1.01, cercana a la 1.03, fue informada con QTL estables en dos ambientes para ISE y solo en uno para INC.

Zambrano et al. (2014a) encontraron QTL para incidencia y severidad de seis enfermedades producidas por virus que atacan al maíz en cuatro grupos de ligamiento, dentro de los cuáles están el 1 y el 10. En la población F_{2:3} evaluada se encontraron QTL para INC y SEV en ambos cromosomas, en algunos casos estables en los tres ambientes y en otros casos en dos ambientes. Por otro lado, Zambrano et al. (2014b) publicaron para la enfermedad MRFV (Maize rayado fino virus) de maíz un QTL detectado en dos poblaciones de RIL en la región 52.6 cM del cromosoma 10, lo cual permite verificar en parte que esta región está asociada a la resistencia a enfermedades producidas por virus en maíz, ya que otros autores también encontraron en la misma posición agrupamientos de genes de resistencia (Jones et al., 2004). En este estudio, se detectó para el carácter INC un QTL estable en los tres ambientes de evaluación en el cromosoma 10 en la posición 77 cM (bnlg1712-*bin* 10.03); en la misma posición para ISE y SEV el QTL fue estable en dos

ambientes. Si bien la región genómica 10.03, posición 77 cM no es la misma que la informada por los autores, es cercana, e indicaría una región del genoma asociada a la menor incidencia de las enfermedades virósicas. Para los caracteres INC y SEV se observa la presencia de QTL estables en distintos cromosomas; para INC en los grupos de ligamiento 8 y 10, mientras que para SEV en el 4. Esto permite inferir que los QTL de los mismos implican distintos mecanismos de resistencia. Algunos autores argumentan que los QTL para INC en maíz involucran varios mecanismos de defensa que evitan la invasión de virus en la planta, mientras que los QTL para SEV involucran mecanismos de resistencia que afectan a la tasa de multiplicación del virus dentro de la planta (Dintinger et al., 2005).

Los efectos genéticos aditivos de los QTL identificados, en la mayoría de los QTL resultaron negativos, lo cual indica que los alelos favorables que contribuyen a reducir el valor del ISE, INC y SEV, provienen del parental resistente LP116.

4.2- Consistencia de los QTL identificados con estudios previos sobre MRCV en maíz

La detección de regiones genómicas asociadas a QTL para resistencia al MRCV permite dilucidar las bases genéticas de la misma y es una herramienta útil para el mejoramiento del cultivo de maíz cuando los QTL identificados son consistentes (Eathington et al., 2007). En la bibliografía actual, se pueden encontrar muchos trabajos sobre resistencia al MRCV, en los cuáles se han informado las posiciones genómicas de QTL distribuidos en distintos cromosomas, con variabilidad en la estabilidad de los mismos. Esta falta de consistencia, puede deberse a la complejidad de la resistencia a la enfermedad (Di Renzo et al., 2002).

Estudios previos sobre el MRCV permitieron ubicar regiones cromosómicas responsables de la expresión de *loci* involucrados en la resistencia a la enfermedad, en distintas poblaciones de mapeo (F₂, RIL y NIL) (Cuadro 10). Estas poblaciones son ampliamente utilizadas para el mapeo de caracteres de interés en distintos programas de mejoramiento (Xu, 2010). Di Renzo et al. (2004), detectaron dos QTL para resistencia en los cromosomas 1 (*bin* 1.03) y 8 (*bins* 8.03-04) en generaciones tempranas (F_{2:3}) de una población derivada del cruzamiento entre las líneas parentales Mo17 y BLS14, mientras que Kreff et al. (2006) identificaron cinco regiones asociadas a síntomas del MRCV en una

generación temprana ($F_{2:3}$) de otra población de mapeo proveniente de un híbrido, ubicadas en los cromosomas 1 (*bins* 1.02-03, 1.07-08), 4 (*bins* 4.05-07), 8 (*bin* 8.02) y 10 (*bins* 10.04-05). Kreff (2009) ya en poblaciones avanzadas de RIL y NIL detecta mediante un mapeo genético de elevada resolución la posición 65.99 en el cromosoma 2 asociada al grado de resistencia a la infección al MRCV. Bonamico (2010) y Bonamico et al. (2010) en una población de RIL derivada del cruzamiento entre las líneas Mo17 y BLS14, detectan mediante diferentes métodos estadísticos QTL para ISE y síntomas del MRCV en los cromosomas 1 (*bins* 1.01, 1.02, 1.03, 1.04, 1.06), 2 (*bin* 2.06), 4 (*bins* 4.03, 4.05, 4.09), 6 (*bin* 6.02), 8 (*bins* 8.02, 8.03, 8.04, 8.08) y 10 (*bins* 10.02, 10.07). Bonamico et al. (2012), en el mismo fondo genético detectan cuatro QTL para INC y SEV del MRCV en los cromosomas 1 (*bins* 1.01, 1.06), 4 (*bin* 4.08) y 10 (*bin* 10.02). Dallo (2019), en una población de NIL derivada del parental B73 y Teosinte, reporta marcadores SNP asociados al ISE del MRCV en los cromosomas 2 (*bins* 2.01, 2.02, 2.03, 2.06, 2.07) y 3 (*bins* 3.04, 3.05, 3.08). Rossi (2019) en líneas de CIMMYT, encuentra para ISE, incidencia y severidad, 46 regiones genómicas ubicadas principalmente en los cromosomas 2 y 5.

De manera general se puede concluir en que estos estudios que se basan en distintas poblaciones de mapeo de generaciones tempranas y avanzadas de autofecundación, con distintos fondos genéticos y mediante diferentes análisis estadísticos, destacan diferentes posiciones que se han repetido en los mismos y que coinciden con las encontradas en el presente estudio mediante el modelo final de QTL, dentro de ellas se destacan en el cromosoma 1 los *bins* 1.03 y 1.07 donde se encontraron dos QTL estables en los tres ambientes para ISE, en el cromosoma 8 el *bin* 8.08 donde se encontró un QTL estable en los tres ambientes para INC. En referencia al QTL estable en los tres ambientes para SEV en la región genómica 4.01, si bien esta posición no se encuentra en las referencias citadas anteriormente, si lo están cercanas a la misma como las posiciones 4.03, 4.05, por lo que el cromosoma 4 representa regiones genómicas asociadas a la resistencia a la enfermedad que deben estudiarse con mayor detalle. Si dejamos de lado los QTL estables para las tres variables en los tres ambientes, encontramos regiones en distintos *bins* que coinciden con las encontradas en las referencias citadas, a modo de ejemplo podemos mencionar los QTL para ISE estables en dos ambientes en las posiciones 1.01, 8.08 y 10.04, y los QTL para SEV también estables en dos ambientes en los *bins* 1.06, 8.08, 10.02

y 10.04. Finalmente, si comparamos las regiones de QTL pleiotrópicos para ISE, INC, y SEV con los trabajos citados, encontramos que las regiones donde se posicionan (*bins* 8.08, 10.03 y 10.04) son iguales o cercanas a donde se posicionan QTL para resistencia a MRCV (Cuadro 10).

Las líneas de investigación del grupo de trabajo podrían enfocarse en generar un mapeo más fino en los grupos de ligamiento 2 y 4, el primero destacado por Dallo (2019), Kreff (2009) en la posición 65.99 cM y Rossi (2019); y el segundo reportado por Bonamico (2010), Bonamico et al. (2012) y Kreff et al. (2006).

Cuadro 10. Identificación de QTL y marcadores moleculares asociados con la reacción al mal de Río Cuarto virus (MRCV).

Parental susceptible	Parental tolerante	Población de mapeo	Carácter ¹	Loci de resistencia	Cromosoma (<i>bin</i>)	Método de análisis ²	Referencia bibliográfica
Mo17	BLS14	F _{2:3}	ISE	Dos QTL	1 (1.03), 8 (8.03-04)	CIM	Di Renzo et al. (2004)
				Siete SSR	1 (1.03, 1.04), 8 (8.02, 8.06)	ANOVA	
-	-	F _{2:3}	Síntomas del MRCV	Cinco QTL	1 (1.02-03, 1.07-08), 4 (4.05-07), 8 (8.02), 10 (10.04-05)	CIM	Kreff et al. (2006)
-	-	RIL NIL	Grado de resistencia a la infección del MRCV	SSR SNP	Cromosoma 2, posición 65.99	CIM LD	Kreff (2009)
Mo17	BLS14	RIL	ISE	12 QTL	1 (1.01, 1.03, 1.04, 1.06), 4 (4.03, 4.05, 4.09), 6 (6.02), 8 (8.02, 8.03, 8.04, 8.08), 10 (10.02, 10.07)	SIM CIM	Bonamico (2010)
Mo17	BLS14	RIL	Síntomas del MRCV y severidad	Seis SSR	1 (1.02, 1.06), 2 (2.06), 6 (6.02), 8 (8.08)	AD	Bonamico et al. (2010)
Mo17	BLS14	RIL	Incidencia y severidad del MRCV	Cuatro QTL	1 (1.01, 1.06), 4 (4.08), 10 (10.02)	SIM CIM	Bonamico et al. (2012)
B73	LP116	F _{2:3}	ISE, Incidencia y severidad del MRCV.	Ocho QTL	1 (1.03, 1.07), 10 (10.03, 10.04, 10.06)	SIM CIM	Rossi et al.(2015)
B73	PI 384071 Teosinte	NIL	ISE	SNP	2 (2.01, 2.02, 2.03, 2.06, 2.07), 3 (3.04,3.05, 3.08)	ANOVA	Dallo, 2019.
-	-	Líneas CIMMYT	ISE, incidencia y severidad del MRCV	SNP	46 <i>bins</i> distribuidos en los 10 cromosomas, principalmente 2 y 5	LD y regresión lineal múltiple	Rossi, 2019.

¹ISE = Índice de severidad de enfermedad; MRCV= mal de Río Cuarto virus.

²SIM = Mapeo por intervalo simple; CIM= Mapeo por intervalo compuesto; ANOVA= Análisis de la varianza; LD= Mapeo de asociación; AD= Análisis discriminante discreto.

4.3- Métodos de detección de QTL

La existencia de QTL para resistencia al MRCV ha sido informada en estudios previos (Cuadro 10) donde se detectan regiones de ADN distribuidas en varios grupos de ligamiento mediante diferentes metodologías estadísticas que se detallaran a continuación.

En referencia a los métodos de detección de QTL, mediante la estrategia llamada mapeo por intervalo simple (SIM) en una población de RIL, fueron identificados dos QTL ubicados en el cromosoma 1 (*bin* 1.01) y 4 (*bin* 4.08), que explicaron entre 8 y 10% de la variación fenotípica en la reacción al MRCV (Bonamico et al., 2012).

Mediante la estrategia llamada mapeo por intervalo compuesto (CIM), Di Renzo et al. (2004) identificaron dos QTL ubicados en el cromosoma 1 (*bin* 1.03) y 8 (*bin* 8.03-04), que explicaron simultáneamente 36.2% de la variación fenotípica en la reacción al MRCV. Bonamico et al. (2012) informaron la existencia de cuatro QTL (*bins* 1.01, 1.06, 4.08, 10.02) que explicaron entre 6 y 14% de la variación fenotípica para la incidencia y severidad del MRCV. Kreff et al. (2006) identificaron los QTL mediante CIM y los mismos explicaron de manera general menos del 10% de la varianza fenotípica. Kreff (2009) trabajó con dos poblaciones segregantes provenientes de cruzamientos biparentales con fondos genéticos distintos a los utilizados por Bonamico et al. (2012) y mediante el método mencionado identificó marcadores tipo SSR y SNP asociados significativamente con resistencia a MRCV en los cromosomas 2 y 5.

Otro método utilizado para ubicar regiones cromosómicas responsables de la expresión de *loci* involucrados en la resistencia al MRCV, es el análisis discriminante discreto (AD). Bonamico et al. (2010) realizaron evaluaciones fenotípicas en una población de RIL en seis ambientes pertenecientes a la zona central de la Argentina, en donde la enfermedad es endémica. Esta metodología de análisis permitió identificar marcadores SSR pertenecientes a los cromosomas 1, 2, 6 y 8 significativamente asociados con grado de severidad y otros caracteres relacionados a síntomas de la enfermedad MRCV.

El mapeo de asociación es otra estrategia para el mapeo de QTL; mediante la aplicación de este método y el uso de una población de NIL de maíz, Kreff (2009) identificó marcadores asociados significativamente con resistencia al MRCV en el cromosoma 2. Rossi (2019), mediante la misma metodología, en un grupo de líneas de maíz de CIMMYT, identificó para ISE, incidencia y severidad del MRCV, 54 SNP en 46

regiones genómicas ubicadas principalmente en los cromosomas 2 y 5, que explicaron en promedio el 10% de la varianza fenotípica. Luego mediante regresión lineal múltiple sobre los SNP significativos, identificó 14 SNP en diferentes ambientes que explicaron entre el 21 al 44% de la varianza fenotípica según carácter y ambiente. Dallo (2019), mediante análisis de QTL por marcador individual, en una población de NIL, identificó diferentes posiciones genómicas para ISE del MRCV, particularmente en los cromosomas 2 (*bins* 2.01, 2.02, 2.03, 2.06 y 2.07) y 3 (*bins* 3.04, 3.05 y 3.08).

En este estudio, el análisis de QTL MTME permitió generar toda la información para los tres caracteres y los tres ambientes dentro de un único modelo, por lo tanto, no tuvo que combinar los resultados de distintas metodologías como SIM y CIM en ambientes individuales y a través de ambientes, con lo cuál se obtiene un enfoque más fiable que el mapeo QTL para caracteres de manera individual, ya que los procesos fisiológicos en las plantas generalmente están correlacionados (Alvarez Prado et al., 2013). Los resultados de QTL mediante la metodología de modelos mixtos (Figura 4) si se comparan con los obtenidos por Rossi et al. (2015), con análisis simples por SIM y CIM para cada carácter en cada ambiente (Anexo III, Cuadro 11), son similares en cuanto a las posiciones detectadas, pero si se compara con los efectuados a través de ambientes (Anexo IV, Cuadro 12) se observa mayor precisión en los mismos, ya que para ISE se detectaron dos QTL estables en los tres ambientes en las posiciones 1.03 y 1.07, mientras que el *bin* 10.04 informado en el Anexo IV como significativo a través de ambientes, en el análisis de QTL MTME esta posición sólo fué estable en dos ambientes. Para el carácter INC, al comparar los resultados se observa que solo la posición 10.04 que se informa en el Anexo IV resulta presente en un ambiente con la metodología de modelos mixtos, de esta manera no consideramos como QTL estables o consistentes los que están en ese *bin* y en las posiciones 1.03, 1.07 y 10.06. Finalmente, para el carácter SEV, la posición 10.04 que se obtiene mediante CIM, en el análisis de QTL MTME solo resultó estable en dos ambientes, por lo que para este carácter solo se considera como consistente la posición del marcador *umc1022-bin* 4.01, ya que para su identificación se tiene la certeza de que se consideraron las correlaciones genéticas entre los caracteres y los ambientes. Los análisis de QTL para cada carácter en cada ambiente, presentan la desventaja de no poder comparar los efectos y la ubicación de un QTL identificado en un ambiente con los encontrados en el resto de los ambientes; y los análisis

de QTL para cada carácter a través de ambientes, si bien pueden presentar resultados similares en la localización de QTL, arrojan un número menor de QTL que los que se obtienen en el análisis de QTL MTME (Malosetti et al., 2008). Por otro lado, el análisis realizado permitió obtener información útil sobre las correlaciones genéticas entre los caracteres; las mismas en el presente estudio se asociaron a QTL pleiotrópicos en los cromosomas 8 y 10.

De manera general, los porcentajes de variación fenotípica explicada por el modelo final para los QTL múltiples fueron mayores a los mencionados en la bibliografía citada en esta sección para los QTL individuales, el único valor similar es al que informaron Di Renzo et al. (2004) de 36.2% para dos QTL simultáneamente. Si comparamos los resultados encontrados en la Figura 5 con los valores de R^2 de los Anexos III y IV, se observa que en todos los casos los QTL explican de manera individual entre 5.3% al 18.5% en análisis por ambientes y entre 5.6% al 10.8% en el análisis a través, por lo tanto, el análisis de QTL mediante la metodología implementada en el presente escrito permitieron obtener valores más altos del porcentaje de varianza fenotípica explicada. Ahora, si se suman los R^2 de los QTL para cada carácter en cada ambiente (Anexo III) o bien los R^2 para cada carácter a través de ambientes (Anexo IV), se obtienen en algunos casos valores mayores a los que explica el modelo final para los QTL múltiples para cada carácter en cada ambiente; estos resultados reflejan la sobreestimación en los porcentajes de varianza fenotípica explicada en los análisis individuales por SIM y CIM (Jiang y Zeng, 1995).

La interacción QTL \times ambiente se detectó en esta población de mapeo, por la presencia de regiones que no fueron consistentes en los tres ambientes de evaluación. Los cambios en el tamaño de los efectos aditivos y de los signos de los QTL a través de los ambientes también indican interacciones de los mismos con el ambiente. La identificación de QTL ambiente específicos son una herramienta fundamental para los mejoradores genéticos al momento de piramidizar alelos favorables o bien seleccionar genotipos con adaptación específica.

Jiang y Zeng (1995), destacaron tres ventajas que presentan los análisis de QTL múltiples cuando se los compara con los realizados de manera individual para un carácter en un ambiente, las mismas se pueden resumir en los siguientes puntos: 1- el análisis

múltiple estadísticamente es igual a la suma de los test estadísticos realizados de manera individual en caracteres independientes; 2- el análisis múltiple da información precisa en la identificación de QTL cuando se trabaja con caracteres correlacionadas de manera moderada a alta; 3- el análisis múltiple es más potente que los análisis por separado en el mapeo de QTL y mejora la precisión en la estimación de distintos parámetros; 4- el análisis múltiple posee procedimientos apropiados que permiten realizar pruebas estadísticas para procesos biológicos que involucran caracteres múltiples.

4.4- Consideraciones finales QTL para resistencia al MRCV

Numerosas investigaciones describen la existencia de regiones cromosómicas en las que los *loci* de resistencia a patógenos se agrupan en *cluster* sobre algunos cromosomas en lugar de estar distribuidos al azar (McMullen y Simcox, 1995; Redinbaugh et al., 2004, Redinbaugh y Pratt, 2009; Wisser et al., 2006). Hao et al. (2014) sugieren que algunos QTL que confieren resistencia a enfermedades, están localizados en las mismas regiones cromosómicas, por lo tanto, exhiben resistencia a múltiples enfermedades. Wisser et al. (2006) informaron la presencia de dos *clusters* en los cromosomas 1 y 3, respectivamente; y de un *cluster* en cada uno de los cromosomas 2, 4, 5 y 10. Redinbaugh y Pratt (2009) señalaron cuatro *clusters* en los cromosomas 1, 3, 6 y 10. Con anterioridad, McMullen y Simcox (1995) mencionaron dos *clusters* de genes de resistencia a virus en los cromosomas 1 y 6. Para la reacción al MRCV los resultados obtenidos con diferentes poblaciones de mapeo, diferentes fondos genéticos y métodos de análisis estadísticos, sugirieron que los QTL asociados con la resistencia al MRCV en la mayoría de los ambientes de evaluación, están ubicados en los cromosomas 1, 2, 4, 6, 8 y 10 (Bonamico, 2010; Bonamico et al., 2012; Di Renzo et al., 2004; Kreff et al., 2006; Kreff 2009; Dallo 2019, Rossi 2019), lo cual sugiere que las regiones cromosómicas identificadas también se hallan involucradas en la resistencia a otras enfermedades en maíz. Particularmente los QTL cuyas posiciones corresponden a los *bins* 1.03, 1.06, 1.07, 8.02, 8.04, 8.06, 8.08, 10.02, 10.04-05 y 10.07, ampliamente identificados, podrían considerarse promisorios para la detección de genes candidatos relacionados con esta enfermedad virósica (Cuadro 10). En este estudio, los QTL estables para ISE, INC y SEV, relacionados con la resistencia al MRCV, ubicados en

los *bins* 1.03, 1.07, 4.01, 8.08 y 10.03, resultan posiciones consistentes al observar lo encontrado en estudios previos y se ubican en grupos de ligamiento donde existen *clusters* de genes de resistencia a enfermedades de maíz. Redinbaugh y Pratt (2009) y McMullen et al. (1994), reportaron genes para resistencia a virus, el gen *msv1* (*Maize streak virus resistance 1*) en la posición 1.05, y el gen *wsm3* (*Wheat streak mosaic resistance 3*) en el *bin* 10.06; respectivamente. Las regiones genómicas 1.05 y 10.06 son cercanas a donde en este estudio encontramos QTL estables, lo cuál valida la consistencia de las posiciones encontradas, ya que están en los mismos cromosomas donde otros autores encontraron *cluster* de genes de resistencia y en posiciones cercanas a donde se reportaron éstos dos genes de resistencia a virosis. Recientemente, Rossi et al. (2019) realizaron un meta análisis de QTL para resistencia a enfermedades causadas por virus y hongos en maíz, el mismo se realizó sobre la base de 110 estudios que reportaron QTL para resistencia a estas enfermedades, basados en diferentes poblaciones de mapeo, tamaños de población y metodologías estadísticas. El objetivo de los investigadores fue mediante el meta análisis identificar QTL de efecto relativamente mayor para las enfermedades mencionadas. El análisis permitió identificar que los cromosomas 10 (*bin* 10.06), 6 (*bin* 6.02), 5 (*bin* 5.03), 1 (*bins* 1.03, 1.04, 1.05, 1.06, 1.10) y 2 (*bins* 2.04, 2.07), presentaron QTL de efecto mayor para resistencia a enfermedades causadas por hongos y virus. Sin embargo, los QTL de efecto mayor para resistencia a enfermedades causadas por hongos no se ubicaron en los mismos cromosomas (2 y 5) que para las enfermedades causadas por virus (1 y 6), a excepción del cromosoma 10, donde la probabilidad de encontrar QTL de efecto mayor para la resistencia a ambos patógenos es el doble que en el resto del genoma. Estos resultados resumen y confirman los hallazgos publicados sobre regiones genómicas claves para el mejoramiento molecular de maíz contra enfermedades que pueden causar pérdidas importantes de rendimiento.

Los resultados obtenidos podrían contribuir al desarrollo de programas eficientes de mejoramiento genético para resistencia al MRCV en maíz, especie vegetal de interés regional y nacional. Las investigaciones realizadas han generado conocimientos teóricos y prácticos favorables para la comprensión de los mecanismos genéticos involucrados en la reacción a la infección del MRCV. Estudios adicionales permitirían utilizar estos QTL para aumentar la eficiencia de los programas de mejoramiento mediante la selección (MAS) y

retrocruza (MAB) asistida por marcadores, como así también en la conservación de germoplasma y en técnicas genómicas. Si bien la eficiencia de la MAS en comparación con la selección fenotípica es cercana a 1 para resistencia al MRCV (Di Renzo et al., 2004), el mapeo de QTL para resistencia a esta enfermedad puede mejorar la eficiencia en el mejoramiento, ya que la selección se puede realizar desde estados iniciales del cultivo. Por otro lado, solo las regiones asociadas con la resistencia al MRCV que hayan sido consistentes en las posiciones a través de ambientes y en distintos fondos genéticos y generaciones, pueden ser recomendadas para su uso en la MAS (Asíns, 2002; Bonamico et al., 2012; Groh et al., 1998).

Si bien, se han identificado un gran número de genes que confieren resistencia a enfermedades causadas por virus en maíz; poco conocimiento se ha logrado sobre la naturaleza bioquímica y molecular de los mecanismos de resistencia en las plantas. La posibilidad de inocular mecánicamente al maíz con los virus conocidos, va a permitir un avance en el conocimiento sobre los mecanismos de resistencia (Redinbaugh et al., 2004). Junwen et al. (2012) promueven investigaciones que se deben llevar a cabo para aumentar el conocimiento de los mecanismos de resistencia a virus en el maíz; las técnicas de clonación posicional y etiquetado de transposones serían buenos métodos para estudiar el mecanismo de resistencia de las enfermedades virósicas.

El trabajo presentado aportó la delimitación de regiones del genoma de maíz vinculadas a la expresión para la resistencia al MRCV, consistentes con las reportadas en trabajos anteriores que utilizaron otras metodologías estadísticas; cabe destacar que la aplicación del análisis de QTL MTME se ha reportado en la mayoría de los casos para caracteres de RTO y estrés por sequía y nitrógeno, pero no se ha encontrado su aplicación en caracteres relacionados a enfermedades como se hizo en el presente trabajo. Estos resultados muestran que la resistencia a la enfermedad es un carácter complejo y que los *loci* detectados son regiones candidatas para profundizar la investigación de las bases genéticas de la resistencia al MRCV. Sobre la base de las heredabilidades moderadas y la interacción genotipo \times ambiente significativa en este estudio, la selección para la resistencia requiere continuar con la evaluación de distintas fuentes de germoplasma en otros ambientes, enfocando los esfuerzos dentro de las regiones detectadas para lograr un

mapeo más fino y finalmente identificar el gen o genes responsable de la contribución de cada QTL a la variabilidad observada en la resistencia a la virosis.

CONCLUSIONES

- 1-La resistencia al MRCV presenta efectos genéticos no aditivos de dominancia, sobredominancia y/o epistasis.
- 2-La presencia de herencia transgresiva define la posibilidad de obtener material resistente al MRCV y con buen comportamiento frente a IAE y RTO a partir de una población segregante de familias F_{2:3}.
- 3-Los valores estimados de heredabilidad fueron moderados para ISE, INC, SEV, IAE y RTO en ambientes individuales e inferiores través de ambientes, por lo que la selección para la resistencia requiere continuar con la evaluación de distintas fuentes de germoplasma en otros ambientes. La heredabilidad del IAE fue similar a la del RTO y la correlación entre ambos caracteres resalta el uso potencial del IAE como un carácter secundario para el mejoramiento del RTO.
- 4-El ISE del MRCV presenta correlaciones negativas y significativas con AP y RTO, y positivas y significativas con síntomas en panojas y hojas, INC, SEV e IAE. El acortamiento de entrenudos y la presencia de enaciones pueden ser utilizados como caracteres predictores del ISE.
- 5-Los QTL estables detectados para ISE, INC y SEV del MRCV, ubicados en los *bins* 1.03, 1.07, 4.01, 8.08 y 10.03, resultan posiciones consistentes al observar lo encontrado en estudios previos.
- 6-Los QTL identificados para los caracteres INC y SEV involucran distintos mecanismos de resistencia.
- 7-Los QTL para los caracteres ISE, INC y SEV del MRCV, se ubicaron en grupos de ligamiento y posiciones genómicas semejantes a donde existen *clusters* de genes de resistencia a enfermedades de maíz, y próximas a *bins* donde se encontraron los genes *msv1* y *wsm3* para resistencia a virus.

BIBLIOGRAFÍA

- Alvarez Prado S., C.G. López, B.L. Gambin, V.J. Abertondo, L. Borrás. 2013. Dissecting the genetic basis of physiological processes determining maize kernel weight using the IBM (B73 × Mo17) Syn4 population. *Field Crops Research* 145: 33-43.
- Andrade F.H., A.G. Cirilo, S.A. Uhart, M.E. Otegui. 1997. Ecofisiología del cultivo de maíz. La Barrosa (Ed.). Dekalbpres. INTA, FCA-UNMP. Balcarce, Argentina.
- ArgenBio 2018. La Biotecnología, cultivos resistentes a insectos o Bt. www.argenbio.org. <http://www.argenbio.org/index.php?action=novedades¬e=261>.
- Arneodo J.D., F.A. Guzmán, L.R. Conci, I.G. Laguna, G.A. Truol. 2002. Transmission features of *Mal de Río Cuarto virus* in wheat by its planthopper vector *Delphacodes kuscheli*. *Annals of Applied Biology* 141: 195-200.
- Arneodo J., F. Guzmán, S. Ojeda, M.L. Ramos, I. Laguna, L. Conci, G. Truol. 2005. Transmisión del *Mal de Río Cuarto virus* por ninfas de primer y tercer estadio de *Delphacodes kuscheli*. *Pesquisa Agropecuária Brasileira* 40: 187-191.
- Asíns M.J. 2002. Present and future of quantitative trait locus analysis in plant breeding. Review. *Plant Breeding* 121: 281-291.
- Austin D., M. Lee. 1996. Comparative mapping in F2:3 and F6:7 generations of quantitative trait loci for grain yield and yield components in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 817-826.
- Baulcombe D. 2004. RNA silencing in plants. *Nature* 431: 356-363.
- Bolaños J., G.O. Edmeades. 1990. La importancia del intervalo de la floración en el mejoramiento para la resistencia a sequía en maíz tropical. *Agronomía Mesoamericana* 1: 45-50.
- Bolsa de Cereales de Argentina. 2018. Informe cierre de campaña, maíz 2017/18. Departamento de Estimaciones Agrícolas Bolsa de Cereales, 6 de septiembre de 2018. <http://www.bolsadecereales.com.ar>. Consultado: 11/03/2019.
- Bolsa de Cereales de Córdoba. 2019 Córdoba dorada: la importancia de su maíz en el mundo. Informe económico n° 277. Departamento de economía, 11 de abril de 2019. <http://www.bccbba.com.ar>. Consultado: 27/04/2019.
- Bonamico N. 2010. Mapeo de QTL en líneas endocriadas recombinantes de maíz: regiones del genoma que confieren tolerancia a Mal de Río Cuarto. Tesis de Doctorado en Ciencias Biológicas. UNRC.
- Bonamico N.C, M.G. Balzarini, A.T. Arroyo, M.A. Ibanez, D.G. Diaz, J.C. Salerno, M.A. 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, M. Balzarini. 2012. QTL analysis of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize using recombinant inbred lines. *Journal of Agricultural Science* 150: 619-29.
- Borghi M.L., M.A. Ibañez, N.C. Bonamico, M.V. Kandus, D. Almorza Gomar, E.A. Guillen, J.C. Salerno, M.A. Di Renzo. 2012. Combining ability of flint corn inbred lines: Mal de Río Cuarto disease tolerance and grain yield. *Phyton* 81: 238-245.
- Borrás L., B.L. Gambín. 2010. Trait dissection of maize kernel weight: towards integrating hierarchical scales using a plant biomass approach. *Field Crop Research* 118: 1-12.

- Cardinal A., M. Lee, N. Sharopova, W. Woodman-Clikeman, M. Long. 2001. Genetic mapping and analysis of quantitative trait *loci* for resistance to stalk tunneling by the European corn borer in maize. *Crop Science* 41: 835-845.
- Collard B.C.Y., M.Z.Z. Jahufer, J.B. Brouwer, E.C.K. Pang. 2005. An introduction to markers, quantitative trait *loci* (QTL) mapping and marker - assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica* 142: 169-196.
- Conci L.R., F. Guzmán, M. del Vas, K. Ishikawa, A.J. Distéfano, E. Hopp, T. Omura. 1998. Identificación de secuencias consenso para la RNA-polimerasa, en el segmento mayor del virus del “Mal de Río Cuarto”. *Fitopatología* 33: 21-22.
- Crosbie T.M., S.R. Eathington, G.R. Johnson, M. Edwards, R. Reiter, S. Stark, R.G. Mohanty, M. Oyervides, R.E. Buehler, A.K. Walker, R. Dobert, X. Delannay, J.C. Pershing, M.A. Hall, K.R. Lamkey. 2006. Plant Breeding: Past, Present, and Future, in Plant Breeding: The Arnel R. Hallauer International Symposium (eds K. R. Lamkey and M. Lee), Blackwell Publishing, Ames, Iowa, USA.
- Dallo M.D. 2019. Identificación de QTL asociados a respuesta a Mal de Río Cuarto en una colección de líneas de introgresión de Teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*). Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas, UNRC.
- del Vas M., A.J. Distéfano, L.R. Conci, M. Muñoz Hidalgo, D.M. Lewi, H.E. Hopp. 2003. Patente presentada ante el INPI (Instituto Nacional de Propiedad Industrial) para “Construcción genética quimérica, vector que la contiene y método para conferir, a una planta, resistencia al virus del Mal de Río IV”. Publicada en el Boletín de Patentes No 154 del 23 de Abril de 2003.
- Dias Almeida G., D. Makumbi, C. Magorokosho, S. Nair, A. Borem, J.M. Ribaut, M. Banziger, B.M. Prasanna, J. Crossa, R. Babu. 2013. QTL mapping in three tropical maize populations reveals a set of constitutive and adaptive genomic regions for drought tolerance. *Theoretical Applied Genetics* 126: 583-600.
- Dintinger J., D. Verger, S. Caiveau, A.M. Risterucci, J. Gilles, F. Chiroleu, B. Courtois, B. Reynaud, P. Hamon. 2005. Genetic mapping of maize stripe disease resistance from the Mascarene source. *Theoretical and Applied Genetics* 111: 347-359.
- Dintinger J.A., S. Salgon, B. Reynaud. 2014. QTL mapping of a partial resistance to the corn delphacid-transmitted viruses in Lepidopteran-resistant maize line Mp705. *Plant Breeding* 133: 19-27.
- Di Renzo M.A., N.C. Bonamico, D.G. Díaz, J.C. Salerno, M.A. Ibañez, J.J. Gesumaría. 2002. Inheritance of resistance to Mal de Río Cuarto (MRC) disease in *Zea mays* (L.). *Journal of Agricultural Science* 139: 47-53.
- Di Renzo M.A., N.C. Bonamico, D.G. Diaz, M.A. Ibañez, M.E. Faricelli, M.G. Balzarini, J.C. Salerno. 2004. Microsatellite markers linked to QTL for resistance to Mal de Río Cuarto disease in *Zea mays* L. *Journal of Agricultural Science* 142: 289-95.
- Di Rienzo J.A., F. Casanoves, M.G. Balzarini, L. Gonzalez, M. Tablada, C.W. Robledo. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Distéfano A.J., L.R. Conci, M. Muñoz-Hidalgo, F.A. Guzmán, H.E. Hopp, M. del Vas. 2002. Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of Mal de Río Cuarto virus (MRCV): evidence that the virus should be a separate *Fijivirus* species. *Archives of Virology* 147: 1699-1709.

- Distéfano A.J., H.E. Hopp, M. del Vas. 2005. Sequence analysis of genome segments S5 and S10 of Mal de Río Cuarto virus (*Fijivirus*, *Reoviridae*). *Archives of Virology* 150: 1241-1248.
- Dow E.W., T.B. Daynard, J.F. Muldoon, DJ. Mayor, G.W. Thurtell. 1984. Resistance to drought and density stress in Canadian and European maize (*Zea mays* L.) hybrids. *Canadian Journal of Plant Science* 64: 575-585.
- Eathington S.R., T.M. Crosbie, M.D. Edwards, R.S. Rieter, J.K. Bull. 2007. Molecular markers in a commercial breeding program. *Crop Science* 47: 154-163.
- Echeverría H.E., H. Sainz Rozas. 2006. Maíz. Pág. 255-282. En: Fertilidad de Suelos y Fertilización de Cultivos. H.E. Echeverría y F.O. García (eds.). Editorial INTA, Buenos Aires, Argentina.
- Edmeades G.O., J. Bolaños, M. Bänziger, J.M. Ribaut, J.W. White, M.P. Reynolds. 1998. Improving crop yields under water deficits in the tropics, In V.L. Chopra, R.B. Singh and A. Varma (Eds), "Crop Productivity and Sustainability - Shaping the Future", ICSC Oxford and IBH New Delhi, 437-451.
- Eyherabide G.H., A.L. Damilano. 2001. Comparison of genetic gain for grain yield of maize between the 1980s and 1990s in Argentina. *Maydica* 46: 277-281.
- Falconer D.S., T.F.C. MacKay. 1996. Introduction to Quantitative Genetics. 4th Edn. 87 Longman, London.
- Ferraroti J. 2010. Mejoramiento genético vegetal y biotecnología aplicada. Su importancia en la expansión agrícola y la productividad granaria. Pág. 521-532.
- Fisher R.A. 1936. The use of multiple measurements in taxonomic problems. *Annals of eugenics* 7: 179-188.
- Flint García S.A., J.M. Thornsberry, E.S. Buckler. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review Plant Biology* 54: 357-374.
- Fundación Agropecuaria para el Desarrollo de Argentina (FADA). 2019. Maíz 360°. Análisis de la Argentina y el mundo. Río Cuarto, Córdoba, enero de 2019. <http://www.fundaciónfada.org>. Consultado: 17/03/2019.
- Gear J. 2006. El cultivo de maíz en la Argentina. En: Maíz y Nutrición. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Recopilación de ILSI Argentina, volumen II.
- Giménez Pecci M.P., I.G. Laguna, S.L. Lenardon. 2012. Mal de Río Cuarto del maíz. En: Enfermedades producidas por virus y mollicutes en Argentina. Ediciones INTA. ISBN 978-987-679-116-8.
- Grau C.R., V.L. Radke, F.L. Gillespie. 1982. Resistance of soybean cultivars to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Plant disease* 66: 506-508.
- Groh S., D. González De León, M. Khairallah, C. Jiang, D. Bergvinson, M. Bohn, D. Hoisington, A. Melchinger. 1998. QTL mapping in tropical maize: III. Genomic regions for resistance to *Diatraea* spp. and associated traits in two RIL populations. *Crop Science* 38: 1062-1072.
- Guzmán F.A., A.J. Distéfano, J.D. Arneodo, H.E. Hopp, S.L. Lenardon, M. del Vas, L.R. Conci. 2007. *Archives of Virology* 152: 565-573.
- Hackett C. 2002. Statistical methods for QTL mapping in cereals. *Plant Molecular Biology* 48: 585-599.
- Haldane J.B.S. 1919. The combination of linkage values, and the calculation of distance between the *loci* of linked factors. *Journal of Genetics* 8: 299-309.

- Hallauer A.R., J.B. Miranda. 1981. *Quantitative Genetics in Maize Breeding*, 2nd Edn. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Hao D., Y. Cheng, G. Chen, H. Lu, M. Shi, Z. Zhang Z, X. Huang X, Y. Mao, L. Xue. 2014. Identification of significant single nucleotide polymorphisms for resistance to Maize rough dwarf disease in elite maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Euphytica* 206: 689-700.
- Hogenhout S., A. El-Desouky, A. Whitfield, M. Redinbaugh. 2008. Insect vector interactions with persistently transmitted viruses. *Annual Review of Phytopathology* 46: 327-59.
- Huang H.Y., D. Madur, V. Combes, C.L. Ky, D. Coubriche, P. Jamin, S. Jouanne, F. Dumas, E. Bouty, P. Bertin, A. Charcosset, L. Moreau. 2010. The genetic architecture of grain yield and related traits in *Zea maize* L. Revealed by comparing intermated and conventional populations. *Genetics* 186: 395-404.
- ILSI Argentina. 2006. Maíz y nutrición. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Recopilación de ILSI Argentina. Serie de Informes Especiales, volumen II.
- Jiang C., Z.B Zeng. 1995. Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140: 1111-1127
- Jones N., H. Ougham, H. Thomas. 1997. Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytology* 137: 165-177.
- Jones M.W, M.G. Redinbaugh, R.J. Anderson, R. Louie. 2004. Identification of quantitative trait loci controlling resistance to Maize chlorotic dwarf virus. *Theoretical Applied Genetics* 110:48-57.
- Junwen L., F. Wang, Y. Li, B. Zhang, J. Zhang. 2012. Mapping quantitative trait loci conferring resistance to rice black-streaked virus in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 125: 781-791.
- Kearsey M., H. Pooni. 1996. *The genetical analysis of quantitative traits*. Chapman & Hall, London.
- Knapp S.J., W.W. Stroup, W.M. Ross. 1985. Exact confidence intervals for heritability on a progeny mean basis. *Crop Science* 25: 192-194.
- Kosambi D. 1994. The estimation of map distances from recombination values. *Ann Eugen* 12: 172-175.
- Kreff E.D., M.G. Pacheco, D.G. Díaz, C.G. Robredo, D. Puecher, A. Céliz, J.C. Salerno. 2006. Resistance to Mal de Río Cuarto Virus in Maize: A QTL Analysis. *Journal of Basic and Applied Genetics* 17 (1): 41-50.
- Kreff E.D. 2009. Genómica aplicada al mapeo preciso de genes de resistencia al Mal de Río Cuarto en maíz. Tesis Doctorado, Universidad Nacional de Rosario, Rosario, Santa Fé.
- Laguna I.G, A.M. Remes Lenicov, E.G. Virla, A.O. Avila, M.P. Giménez Pecci, P. Herrera, J. Garay, D. Ploper, M. Mariani. 2002. Difusión del virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) del maíz, su vector, delfácidos asociados y huéspedes alternativos en la Argentina. *Revista de la Sociedad Entomológica Argentina*: 61: 87-97.
- Laguna I.G., M. de la P. Giménez Pecci. 2004. Cultivo el maíz en la Argentina: Enfermedades causadas por virus. 158 *Idia XXI*: 158-162.
- Lander E.S., P. Green, J. Abrahamson, A. Barlow, M.J. Daley, S.E. Lincoln, L. Newburg. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary

- genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-781.
- Lander E.S., D. Botstein. 1989. Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121: 185-199.
- Lenardon S.L., G.J. March, J.E. Beviacqua, A. Marinelli, J.A. Ornaghi, E.M. Astorga. 1985. Diferentes épocas de siembra y cultivares de maíz como alternativa para disminuir la incidencia del Maize rough dwarf virus (MRDV) agente causal del "Mal de Río Cuarto". IDIA. Pág. 78-83.
- Lenardon S.L., G.J. March, S.F. Nome, J.A. Ornaghi. 1998. Recent outbreak of "Mal de Río Cuarto" virus on corn in Argentina. *Plant Disease* 82: 448.
- Lenardon S. 2007. Enfermedades causadas por virus y mollicutes en maíz. Agronomía informa Facultad de Agronomía, UBA www.agro.uba.ar/http://agro.faua.info/node/165.
- Lorenzo N., D. Presello, S. Castellano, L. Giorda, A. Legasa. 1992. Aptitud combinatoria entre ocho líneas de maíz: resistencia al "Mal de Río Cuarto" y rendimiento. Actas V Congreso nacional de maíz, Pergamino, Argentina, pp. 39-49.
- Lúquez J., N. Salomón. 2016. Estado actual y perspectivas del mejoramiento genético de plantas en Argentina. *Journal of Basic & Applied Genetics* 27.
- Lynch M., B. Walsh. 1998. Genetics and analysis of quantitative traits. Sinauer Associates, Sunderland, Mass. Pág. 379-430. In: Chapter 14: Principles of Marker based Analysis. ISBN 0-87893-481-2.
- Maddonni G.A. 2007. Ganancias de rendimiento en maíz: ¿efecto del mejoramiento o del manejo del cultivo?. V Jornada Lares de Actualización Técnica en Soja y Maíz Pergamino, 7 de Julio de 2017.
- McMullen M.D., M.W. Jones, K.D. Simcox, R. Louie. 1994. Three genetic loci control resistance to *Wheat streak mosaic virus* in the maize inbred Pa405. *Molecular Plant Microbe Interactions* 7:708-712. doi:10.1094/MPMI-7-0708
- McMullen M.D., K.D. Simcox. 1995. Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. *Molecular Plant Microbe* 8: 811-815.
- Malosetti M., M.P. Boer, M.C.A.M. Bink, F.A. Van Eeuwijk. 2006. Multi-trait QTL analysis based on mixed models with parsimonious covariance matrices. In: Proceedings of the 8th World Congress on Genetics Applied to Livestock Production, August 13-18, Belo Horizonte, MG, Brasil. [http://www.wcgalp8.org.br/wcgalp8.Article 25-04](http://www.wcgalp8.org.br/wcgalp8.Article%2025-04).
- Malosetti M., J.M. Ribaut, M. Vargas, J. Crossa, F.A. Van Eeuwijk. 2008. Multi-trait multi-environment QTL mixed model with an application to drought and nitrogen stress trials in maize (*Zea mays* L.). *Euphytica* 161: 241-257.
- March G.J., M. Balzarini, J.A. Ornaghi, J.E. Beviacqua, A. Marinelli. 1995. Predictive model for "Mal de Río Cuarto" disease intensity. *Plant Disease* 79: 1051-1053.
- March G., J. Ornaghi, J. Beviacqua, S. Lenardon. 1997. Manual Técnico del Mal de Río Cuarto. Ed. Morgan-Mycogen. Argentina.
- March G.J., J.A. Ornaghi, J.E. Beviacqua, J. Giuggia, A. Rago, S. Lenardon. 2002. Systemic insecticides for control of *Delphacodes kuscheli* and the Mal de Río Cuarto virus on maize. *International Journal of Pest Management* 48: 127-132.
- Marino E.A., E.E. Teyssandier. 1982. Estudios preliminares sobre el modo de herencia de la resistencia al Mal de Río Cuarto en maíz. Congreso anual de la Sociedad Argentina de Genética, Bs As.

- Milne R.G., G. Boccoardo, E. Dal Bó, F. Nome. 1983. Association of maize roug dwarf virus with mal de Río Cuarto in Argentina. *Phytopathology* 73: 1290-1292.
- Mirabilio V., K.E. D'Andrea, M.E. Otegui, A.G. Cirilo, G. Eyherabide. 2010. Variabilidad genotípica en líneas endocriadas recombinantes de maíz: I. estudio de la heredabilidad para los determinantes ecofisiológicos del rendimiento. IX Congreso Nacional de Maíz, Rosario 2010, pág: 353-358.
- Mohan M., S. Nair, A. Bhagwat, T.G. Krishna, M. Yano, C.R. Bhatia, T. Sasaki. 1997. Genoma mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Molecular breeding* 3: 87-103.
- Mongelli V.C. 2010. Estudio funcional de las proteínas codificadas por el virus del Mal de Río Cuarto en hospedantes vegetales. Tesis de doctorado. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.
- Morata M.M, D.A. Presello, M. González, E. Frutos. 2003. Aptitud combinatoria entre líneas de maíz resistentes a Mal de Río cuarto. *Fitopatología Brasileira* 28: 236-244.
- Ngugi K., J. Cheserek, C. Muchira, G. Chemining'wa. 2013. Anthesis to Silking Interval Usefulness in Developing Drought Tolerant Maize. *Journal of Renewable Agriculture* 1 (5): 84-90.
- Nome S.F., S.L. Lenardon, B.C. Raju, I.G. Laguna, S.K. Lowe, D.M. Docampo. 1981. Association of reovirus-like particles with "Enfermedad de Río Cuarto" of maize in Argentina. *Phytopathologie Zhurnal* 101: 7-15.
- Ornaghi J.A., G. Boito, G. Sanchez, G. March, J.E. Beviacqua. 1993. Studies on the populations of *Delphacodes kuscheli* Fennah in different years and agricultural areas. *Journal of Genetics and Breeding* 47: 277-282.
- Ornaghi J.A., G.J. March, G.T. Boito, A. Marinelli, J.E. Beviacqua, J. Giuggia, S.L. Lenardon. 1999a. Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli* vector of "Mal Río Cuarto" Virus. *Maydica* 44: 219-223.
- Ornaghi J.A., J.E. Beviacqua, D.R. Aguirrezabala, G.J. March, S.L. Lenardon SL. 1999b. Detection of Mal de Río Cuarto virus in Uruguay. *Fitopatología Brasileira* 24: 471.
- Palmieri E., K.E. D'Andrea, M.E. Otegui, A.G. Cirilo, G.H. Eyherabide. 2010. Variabilidad genotípica en líneas endocriadas recombinantes de maíz: II-Estudio de la heredabilidad para los determinantes numéricos del rendimiento. IX Congreso Nacional de Maíz, Rosario 2010, pág: 358-360.
- Paterson A.H. 1996. Making genetic maps. In: A.H. Paterson (Ed.), *Genome Mapping in Plants*, pp. 23-39. R.G. Landes Company. San Diego, California: Academic Press, Austin, Texas.
- Presello D. 1993. Herencia de la tolerancia a Mal de Río Cuarto en tres líneas endocriadas de maíz. Workshop Mal de Río Cuarto del Maiz, pp.72-73. INTA IFIVE. Córdoba. Argentina.
- Presello D., A. Céliz, E. Frutos. 1995. Efectos genéticos asociados con la resistencia a la enfermedad Mal de Río Cuarto en líneas endocriadas de maíz. Memorias de la III Reunión Latinoamericana y XVI Reunión de la zona andina de Investigación en Maíz, Cochabamba, SC, Bolivia, I: 407-417.
- Presello D., M. Alvarez, J. Colazo, A. Damilano, G. Eyherabide, A. Fernández, M. Hourquescos. 1997. Comportamiento de Cultivares de Maíz en el Norte de la

- provincia de Buenos Aires y Área endémica del Mal de Río Cuarto. Ciclo 1996/97. Tecnología Agropecuaria INTA Pergamino II: 1-6.
- Presello D., G. Eyherabide, J. Iglesias, R. Lorea. 2007. Comportamiento de cultivares en Pergamino frente a enfermedades durante la campaña 2006/2007: Roya común del maíz y Virus del Mal de Río Cuarto. II Jornada Actualización Técnica de maíz.
- Redinbaugh M.G., M.W. Jones, R.E. Gingery. 2004. The genetics of virus resistance in maize (*Zea mays* L.). *Maydica* 49: 183-190.
- Redinbaugh M.G., R.C. Pratt. 2009. Virus Resistance. In: Bennetzen J.L., Hake S.C. (Eds.) Handbook of Maize: Its Biology. Springer-Verlag, New York. Pág. 251-270.
- Remes Lenicov A.M.M. de, A. Teson, E. Dagoberto, N. Huguet. 1985. Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto en maíz. *Gaceta Agronómica* 25: 251-258.
- Ribaut J.M., D.A. Hoisington, J.A. Deutsch, C. Jiang, D. González de León. 1996. Identification of quantitative trait *loci* under drought conditions in tropical maize. 1. Flowering parameters and the anthesis–silking interval. *Theoretical and Applied Genetics* 92: 905-914.
- Ribaut J.M., C. Jiang, D. González-de-León, G.O. Edmeades, D.A. Hoisington. 1997. Identification of quantitative trait *loci* under drought conditions in tropical maize. 2. Yield components and marker-assisted selection strategies. *Theoretical and Applied Genetics* 94: 887-896.
- Rossi D. 2007. Evolución de los cultivares de maíz utilizados en la Argentina. *Revista Agromensajes* 22: 3-10.
- Rossi E.A., M.L. Borghi, M.A. Di Renzo, N.C. Bonamico. 2015. Quantitative trait *loci* (QTL) identification for resistance to mal de Río Cuarto virus (MRCV) in maize based on segregate population. *The open agriculture journal* 9: 1-8.
- Rossi E.A. 2019. Mapeo por asociación de resistencia a la enfermedad Mal de Río Cuarto en maíz. Doctorado en Ciencias Biológicas. Facultad de Ciencias Exactas, UNRC.
- Rossi E.A., M. Ruiz, M.A. Rueda Calderón, C.I. Bruno, N.C. Bonamico, M.G. Balzarini. 2019. Meta-Analysis of QTL studies for resistance to fungi and viruses in maize. *Crop science* 59: 1-15.
- Saghai-Maroo M.A., K.M. Soliman, R.A. Jorgensen, R.W. Allard. 1984. Ribosomal DNA spacer length polymorphisms in barley: mendelian inheritance, chromosomal location, and population dynamics. *Proceeding of National Academy of Sciences of the United States of America* 81: 8014-8018.
- Salvi L. 2013. Microsatélites ligados con tolerancia a la enfermedad Mal de Río Cuarto en maíz. Tesis de grado Licenciatura en Ciencias Biológicas. UNRC.
- SAS Institute. 1997. SAS/STAT *software*: changes and enhancements through release 6.12. SAS Inst, Cary, NC.
- Schwarz G. 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics* 6: 461–464.
- Semagn K., Y. Beyene, M.L. Warburton, A. Tarekegne, S. Mugo, B. Meisel, P. Sehabiague, B.M. Prasanna. 2013. Meta-analyses of QTL for grain yield and anthesis silking interval in 18 maize populations evaluated under water-stressed and well-watered environments. *BMC Genomics* 14: 313.
- Senasa, Servicio Nacional de Sanidad y Calidad Agroalimentaria. Comercio internacional. Buenos Aires, 15 de febrero de 2018. <http://www.senasa.gob.ar>. Consultado: 11/03/2019.

- Smith J.S., E.C. Chin, H. Shu, O. Smith, S. Wall, M.L. Senior, S. Mitchell, S. Kresovich, J. Ziegler. 1997. An evaluation of the utility of SSR *loci* as molecular markers in maize (*Zea mays* L.): comparison with data from RFLPs and pedigree. *Theoretical and Applied Genetics* 95: 163-173.
- Smith A.B., B.R. Cullis, R. Thompson. 2005. The analysis of crop cultivar breeding and evaluation trials: an overview of current mixed model approaches. *The Journal of Agricultural Science* 143: 449-462.
- Tanksley S.D. 1993. Mapping polygenes. *Annals Review of Genetics* 27: 205-233.
- Utz H.F., A.E. Melchinger, C.C. Schon. 2000. Bias and sampling error of the estimated proportion of genotypic variance explained by quantitative trait *loci* determined from experimental data in maize using cross validation and validation with independent samples. *Genetics* 154: 1839-1849.
- Velazquez P.D., J.D. Arneodo, F.A. Guzmán, L.R. Conci, G.A. Truol. 2003. Delphacodes haywardi Muir, a New Natural Vector of Mal de Río Cuarto virus in Argentina. *Journal of Phytopathology* 151:669 - 672.
- Velazquez P.D., F.A. Guzmán, L.R. Conci, A.M.M. de Remes Lenicov, G.A. Truol. 2006. Pyrophagus tigrinus Remes Lenicov & Varela (Hemiptera: Delphacidae), nuevo vector del Mal de Río Cuarto virus (MRCV, Fijivirus) en condiciones experimentales. *Agriscientia* 23: 9-14.
- Wang S., C.J. Basten, Z.B. Zeng. 2011. Windows QTL Cartographer 2.5. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Winter P., G. Kahl. 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology* 11: 438-448.
- Wisser R.J., P.J. Balint-Kurti, R.J. Nelson. 2006. The genetic architecture of disease resistance in maize: a synthesis of published studies. Mini Review. *Phytopathology* 96: 120-129.
- Würschum T. 2012. Mapping QTL for agronomic traits in breeding populations. *Theoretical and Applied Genetics* 125: 201-210
- Xu Y. 2010. Molecular Dissection of Complex Traits: Theory, in: Molecular Plant Breeding. International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). México, DF.
- Young N.D. 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 34: 479-501.
- Zambrano J.L, M.W. Jones, E. Brenner, D.M. Francis, A. Tomas, M.G. Redinbaugh. 2014a. Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus-resistant maize inbred line. *Theoretical and Applied Genetics* 127: 867-880.
- Zambrano J.L, M.W. Jones, D.M. Francis, A. Tomas, M.G. Redinbaugh. 2014b. Quantitative trait *loci* for resistance to Maize rayado fino virus. *Molecular Breeding* 34: 989-996
- Zeng Z.B. 1994. Precision mapping of quantitative trait *loci*. *Genetics* 136: 1457-1468.

ANEXOS



Anexo I, Figura 1. Síntomas característicos del MRCV, a- Planta enanizada; b- Acortamiento de entrenudos; c- y d- Malformaciones en hojas superiores y panoja; e- Malformación en espigas; f- Síntomas en espiga, esterilidad; g- y h- Enaciones; i-Enaciones en bráctes de espiga. Fuente: fotos propias.

Anexo II, Cuadro 9. Fenotipo molecular de las líneas parentales (B73 y LP116) de 129 marcadores SSR

SSR (bin)	F ¹	SSR (bin)	F ¹	SSR (bin)	F ¹	SSR (bin)	F ¹
umc 1177 (1.01)	M	mmc0271 (2.07)	P	umc 1612 (4.08)	P	phi 123 (6.07)	M
bnlg 1179 (1.01)	P	dupssr 25 (2.08)	P	bnlg 589 (4.09)	M	phi 070 (6.07)	M
bnlg 1014 (1.01)	M	umc 1551 (2.09)	M	umc 1328 (4.09)	P	phi 089 (6.08)	M
bnlg 1007 (1.02)	P	bnlg 1520 (2.09)	M	bnlg 1847 (5.06)	P	bnlg 2037 (8.01)	M
bnlg 1866 (1.03)	P	umc 1252 (2.09)	P	phi 075 (6.00)	M	umc 1304 (8.02)	M
bnlg 439 (1.03)	M	umc 1394 (3.01)	P	bnlg 1600 (6.00)	M	bnlg 666 (8.02)	P
umc 1021 (1.03)	P	phi 099 (3.02)	M	umc 1023 (6.00)	M	umc 1741 (8.03)	M
umc 1044 (1.03)	P	bnlg 1647 (3.04)	P	umc 1002 (6.00)	M	umc 1487 (8.03)	M
umc 1169 (1.04)	P	bnlg 602 (3.04)	M	bnlg 238 (6.00)	P	umc 1470 (8.03)	M
bnlg 1016 (1.04)	M	phi 036 (3.04)	P	phi 126 (6.00)	P	phi 115 (8.03)	M
umc 1515 (1.05)	M	phi 053 (3.05)	M	bnlg 161 (6.00)	P	bnlg 1246 (8.05)	P
bnlg 1598 (1.06)	P	bnlg 420 (3.05)	M	bnlg 1422 (6.01)	M	bnlg 240 (8.06)	M
bnlg 2057 (1.06)	P	phi 073 (3.05)	M	bnlg 1753 (6.01)	M	phi 080 (8.08)	P
bnlg 1025 (1.07)	P	bnlg 1601 (3.06)	M	bnlg 2097 (6.01)	P	umc 1131 (8.09)	M
bnlg 1643 (1.08)	M	dupssr 23 (3.06)	P	bnlg 1867 (6.01)	M	dupssr 19 (9.02)	M
phi 055 (1.09)	M	bnlg 2241 (3.06)	M	bnlg 1188 (6.01)	M	dupssr 6 (9.02)	M
bnlg 1720 (1.09)	M	bnlg 197 (3.07)	P	phi 077 (6.01)	P	phi 027 (9.03)	M
bnlg 1597 (1.10)	M	phi 046 (3.08)	M	bnlg 107 (6.01)	P	phi 041 (10.00)	P
bnlg 1055 (1.11)	M	bnlg 1536 (3.09)	M	bnlg 1047 (6.01)	M	umc1152 (10.01)	M
bnlg 2123 (1.11)	M	bnlg 1098 (3.1)	M	bnlg 1426 (6.01)	M	phi 052 (10.02)	M
phi 109642 (2.00)	M	bnlg 1370 (4.00)	M	bnlg 1165 (6.01)	M	phi 063 (10.02)	M
bnlg 1338 (2.01)	P	umc 1509 (4.01)	P	bnlg 1249 (6.01)	M	umc 1337(10.02)	P
umc 1622 (2.01)	M	umc 1022 (4.01)	P	bnlg 391 (6.01)	M	bnlg 640 (10.03)	P
bnlg 1092 (2.01)	P	phi 021 (4.03)	M	umc 1018 (6.01)	M	bnlg 1079(10.03)	P
bnlg 1327 (2.02)	M	bnlg 1126 (4.03)	M	bnlg 2191 (6.01)	P	bnlg 1712(10.03)	P
umc 1542 (2.02)	M	nc 004 (4.03)	M	bnlg 1432 (6.01)	M	bnlg 1526(10.04)	P
bnlg 2248 (2.03)	M	umc 1088 (4.04)	M	nc 009 (6.04)	M	bnlg 1074(10.04)	P
bnlg 108 (2.04)	P	nc 005 (4.05)	M	phi 031 (6.04)	M	umc 1506(10.05)	P
bnlg 1047 (2.05)	M	umc 1362 (4.05)	M	bnlg 1443 (6.05)	P	umc1045 (10.06)	P
bnlg 1887 (2.06)	P	bnlg 1217 (4.05)	P	nc 012 (6.05)	M	umc 1556(10.07)	M
bnlg 121 (2.06)	P	phi 079 (4.05)	M	phi 129 (6.05)	M		
bnlg 1225 (2.06)	M	dupssr 34 (4.07)	P	dupssr 15 (6.06)	P		
umc 1497 (2.07)	P	bnlg 1189 (4.07)	M	nc 013 (6.05)	M		

F¹ = Fenotipo molecular de las líneas parentales (B73 y LP116); M= monomórfico. P= polimórfico.

Anexo III, Cuadro 11. Parámetros estimados asociados con QTL para el índice de severidad (ISE), incidencia (INC) y severidad (SEV) del mal de Río Cuarto virus en 208 familias F_{2:3} derivadas del cruzamiento entre B73 × LP116 en tres ambientes.

Trait	QTL Position ¹	Environment ²	LOD Score ³	Additive Effect	R ²
INC	1.03 (bnl1866)	E2	6,78a	-0,29	14,2
	1.03 (umc1021)	E1	6,02ab	-0,07	12,6
	1.07 (bnlg1025)	E2	7,13a	-0,26	14,9
	8.08 (phi080)	E1	3,35ab	0,09	7,3
	10.04 (bnlg1074)	E2	9,08a	-0,27	18,5
SEV	1.02 (bnlg1007)	E1	3,65a	-0,59	8,8
	1.03 (umc1021)	E2	3,39ab	-0,36	8,0
	4.05 (bnlg1217)	E3	2,5ab	-0,14	5,3
	6.05 (bnlg1443)	E1	3,44b	-0,03	8,6
	8.08 (phi080)	E1	2,72a	0,27	6,7
DSI	1.03 (bnlg 1866)	E2	5,10b	-0,49	10,8
	1.03 (umc1021)	E1	3,96ab	-0,12	8,5
	1.07 (bnlg1025)	E2	4,12ab	-0,35	8,8
	8.08 (bnlg640)	E2	2,62b	-0,28	5,7
	10.03 (bnlg640)	E2	2,62b	-0,28	5,7

¹ Localización cromosómica: bin y marcador SSR mas próximo.

² Combinaciones localidad-año: E1: Río Cuarto 2010-11, E2: La Aguada 2010-11, E3: La Aguada 2011-12.

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

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

Fuente: Rossi et al. (2015).

Anexo IV, Cuadro 12. Parámetros estimados asociados con QTL para el índice de severidad (ISE), incidencia (INC) y severidad (SEV) del mal de Río Cuarto virus en 208 familias F_{2:3} derivadas del cruzamiento entre B73 × LP116 a través de tres ambientes.

Trait	QTL Position ¹	LOD Score ²	Additive Effect	R ²
INC	1.07 (bnlg1025)	3,68ab	-0,49	7,9
	10.04 (bnlg1074)	2,59ab	-0,38	5,6
	10.06 (umc1045)	4,56ab	-0,53	9,7
	1.03 (umc1021)	5,04a	-0,28	10,8
SEV	10.04 (bnlg1074)	4,04 b	-0,35	8,8
DSI	1.03 (bnlg1866)	3,90ab	-0,57	8,3
	1.07 (bnlg1025)	3,59ab	-0,15	7,7
	10.04 (bnlg1074)	3,10ab	-0,17	6,7

¹ Localización cromosómica: bin y marcador SSR mas próximo.

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

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

Fuente: Rossi et al. (2015).