



Identificación de genes de resistencia a *Leptosphaeria maculans* en genotipos locales de *Brassica napus* mediante marcadores moleculares

AUTORA: Lic. VICTORIA BESSONE

TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE MAGISTER EN GENÉTICA VEGETAL

DIRECTORA: Dra. Eugenia Alejandra Martin

CO- DIRECTORA: Dra. MSc. Lucrecia Cristina Gieco

Identificación de genes de resistencia a *Leptosphaeria maculans* en genotipos locales de *Brassica napus* mediante marcadores moleculares

Victoria Bessone

Licenciada en Biotecnología – Universidad Nacional de Rosario

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, 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 estación experimental agropecuaria Paraná de INTA, durante el período comprendido entre febrero 2014 y diciembre 2017, bajo la dirección de la Dra. Eugenia A. Martin y co-dirección de la Dra. Lucrecia C. Gioco.

Lic. Victoria Bessone

Dra. Eugenia A. Martin

Dra. Lucrecia C. Gioco

Defendida.....

AGRADECIMIENTOS

A mi directora de beca de INTA y co - directora de tesis, Lucrecia Gieco, quien siempre estuvo predispuesta y aportándome todos sus valiosos conocimientos y dándome una mano en lo que necesite. A Héctor Milisich, quien confió en mí desde un principio como becario.

A mi directora de tesis Eugenia Martin, quien siempre vio el lado positivo de las cosas y me motivó constantemente, aportándome todo su conocimiento y sabiduría. La distancia no fue un impedimento y se comprometió desde el primer momento.

A mi amiga y compañera de trabajo Gaby, una persona incondicional a quién le debo mucho por estar siempre, principalmente ayudándome a visualizar el objetivo.

A Alberto, el alma máter del laboratorio, esto no podría haber sido posible sin su ayuda constante, su compañerismo, su predisposición y sus buenas energías.

A todo el grupo de Genética, Mejoramiento y Biotecnología Vegetal, ya que todos de alguna u otra forma me ayudaron a concretar el trabajo. Especialmente a Lorena y Maricel por ayudarme con los datos y hacerme sus aportes en cada caso para lograr un buen análisis de los resultados.

A mis compañeros de maestría, lo mejor del posgrado sin duda. Con quienes pasamos momentos espectaculares. Principalmente quiero mencionar a Clari, una amiga para siempre, que me aguantó/a en todas y me ayudó con el trabajo también.

A mis amigos Quique y Caro, por el apoyo constante en todo, quienes acompañaron con buenas ondas y colaboraron con sus conocimientos. Siempre al pie del cañón.

A toda mi hermosa familia, por valorar mi esfuerzo y acompañarme siempre, el pilar fundamental de mi vida que me apoya en todos mis proyectos. Principalmente a mis padres por quienes hoy soy lo que soy, mis hermanos y los sobrinos más divinos del mundo que me podrían haber tocado.

A mis amigas, las tetés, las de siempre y para siempre, quienes incondicionalmente me bancan en absolutamente todo lo que emprendo. Por ellas, mi espalda nunca va a conocer el suelo.

A mi compañero de vida y mi sostén Mauro, el que nunca me dejó bajar los brazos y siempre me motivó a seguir adelante. El principal motor de mi vida quien, a diario, me da todo el amor del mundo. A mis compañeros desinteresados Batu y Flaco, quienes me acompañaron en todo momento haciendo los días más lindos. Los cuatro juntos formamos una hermosa familia. Seremos eternos.

A todos, gracias, nada de esto hubiera sido posible sin Ustedes.

PRESENTACIONES A CONGRESOS

2019

-IDENTIFICATION OF RESISTANCE GENES TO LEPTOSPHAERIA MACULANS IN LOCAL BRASSICA NAPUS GENOTYPES THROUGH MOLECULAR MARKERS. Bessone Victoria, Acosta María Gabriela, Schutt Lorena, Gallardo Maricel, Gioco Lucrecia, Milisich Héctor y Martín Eugenia. **International Rapeseed Congress**, IRC, Berlin 2019.

2016

-IDENTIFICACIÓN DE GENES DE RESISTENCIA A LA NECROSIS DEL TALLO (*Leptosphaeria maculans*) EN LINEAS EXPERIMENTALES DE COLZA (*Brassica napus*L.). **Bessone Victoria**, Schutt Lorena, Acosta María Gabriela, Gioco Lucrecia, Milisich Héctor y MARTIN Eugenia. **XXXI Reunión Argentina de Fisiología Vegetal**. Ciudad de Corrientes, 13-16 de noviembre de 2016.

- IDENTIFICACIÓN DE GENOTIPOS DE COLZA (*Brassica napus*) RESISTENTES A PHOMA Y DE ALTO RENDIMIENTO DEL PROGRAMA DE MEJORAMIENTO DE INTA EEA PARANÁ. **Bessone Victoria**, Acosta María Gabriela, Schutt Lorena, Gallardo Maricel, Gioco Lucrecia, Milisich Héctor¹ y Martín Eugenia. **XVIII Congreso y la XXXVI Reunión Anual de la Sociedad de Biología de Rosario**. Rosario, Santa Fe, 5 y 6 de diciembre de 2016.

2015

- IDENTIFICACIÓN DE GRUPOS DE PATOGENICIDAD DE AISLAMIENTOS DE PHOMA LINGAM, AGENTE CAUSAL DEL CANCRO DEL TALLO EN COLZA. Schutt de Varini, L.S Y **Bessone, V.** **XV Jornadas Fitosanitarias Argentinas**, ciudad de Santa Fe, octubre 2015. Libro de resúmenes ISSN 2451 – 8069.

2014

- PROGRAMA DE MEJORAMIENTO GENÉTICO DE COLZA EN EL INTA. Milisich, H.J.; Gioco, L.; Acosta, M.G.; Gallardo, M.; Schutt, L.; **Bessone, V.** **Simposio Latino Americano de Canola 2014**. Centro Cultural Notre Dame Menino Jesus, Passo Fundo, RS, Brasil. 19 a 21 de agosto 2014.

- BIOTECNOLOGÍA APLICADA A LOS PROGRAMAS DE MEJORAMIENTO DE TRIGO Y COLZA. Acosta MG., **Bessone V.**, Schutt L., Gallardo M., Gioco L. y Milisich H. **V Congreso Nacional e Internacional de AgroBiotecnología**. Paraná, Entre Ríos, 28 y 29 de agosto de 2014.

INDICE

INTRODUCCIÓN	1
I. Taxonomía y cultivo de colza	1
II. Mejoramiento del cultivo	3
III. Rendimiento	4
IV. Calidad del grano y aceite de colza	5
V. <i>Leptosphaeria maculans</i>	6
VI. Interacción planta – patógeno	8
i. Genes R y mecanismos de resistencia en <i>Brassica napus</i>	8
ii. Genes de avirulencia (avr) en <i>P. lingam</i>	11
iii. Manejo de la enfermedad	12
iv. Marcadores moleculares y selección	13
v. Estrategias para una resistencia más duradera	14
OBJETIVOS	17
MATERIALES Y MÉTODOS	18
1. Material Vegetal	18
2. Inoculaciones artificiales	18
Inóculo	18
Determinación del grupo de patogenicidad del aislamiento	18
Inoculaciones de las líneas experimentales	19
3. Evaluación del rendimiento	21
Condiciones ambientales	21
4. Determinación del contenido de aceite y perfil de ácidos grasos	23
5. Evaluación genotípica mediante marcadores moleculares	23
5.1. Extracción de ADN	23
5.2. Identificación de los diferentes <i>loci</i> de resistencia a <i>Phoma</i>	24
- <i>Identificación de los loci Rlm3y BLMR2</i>	25
- <i>Identificación de los loci Rlm1 y Rlm4</i>	27
- <i>Identificación del locus Rpg3Dun</i>	27
- <i>Identificación del locus LepR3</i>	28
6. Análisis estadísticos y selección de líneas parentales para cruzamientos artificiales	29
- <i>Análisis multivariados de los datos fenotípicos</i>	29
- <i>Análisis estadísticos de los datos genéticos</i>	29
- <i>Análisis Procrustes Generalizado para la selección de líneas</i>	29
RESULTADOS	31
1. INOCULACIONES	31

1.1. Evaluación para determinar el grupo de patogenicidad del aislamiento local de <i>Phoma lingam</i>	31
1.2. Evaluación de las inoculaciones artificiales de las líneas experimentales	31
2. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO	35
3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ACIETE Y PERFIL DE ACIDOS GRASOS	38
3.1. Contenido de aceite	38
3.2. Perfil de ácidos grasos	41
4. ANÁLISIS MULTIVARIADO	47
5. EVALUACIÓN GENOTÍPICA	51
5.1. Identificación de <i>Rlm3</i> y <i>BLMR2</i>	51
5.2. Identificación de <i>Rlm1</i> y <i>Rlm4</i>	57
5.3. Identificación de <i>Rpg3Dun</i>	59
5.4. Identificación de <i>LepR3</i>	59
6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS DATOS GENÉTICOS	60
7. ANÁLISIS GENERAL PARA LA SELECCIÓN DE LINEAS	65
DISUSIÓN	72
CONCLUSIONES	85
BIBLIOGRAFIA	87
ANEXO	104

ABREVIATURAS Y SÍMBOLOS

- A.** ANOVA: Análisis de la Varianza
ACP: análisis de componentes principales
AcooP: Análisis de coordenadas principales
Avr: *avirulence allele* (Alelo de avirulencia)
- B.** *BLMR2*: alelo de resistencia a *avrBLMR2*
- C.** Csp: cantidad suficiente para
CC: *coiled-coil motif*
CP: componente principal
CV: coeficiente de variación
- D.** DBCA: Diseño en Bloque Completamente Aleatorizado
dNTPs: *deoxynucleotide tri-phosphate*
dpi: días posteriores a la inoculación
- E.** ECR: ensayo comparativo de rendimiento
ETI: *effector triggered immunity* (Inmunidad Desencadenada por Efectores)
- G.** GP: Grupo de patogenicidad
- H.** HR: humedad relativa
- I.** InDel: Inserción/Delección
- L.** *LepR3*: alelo de resistencia a *avrLM1*
- M.** MAS: *marker assisted selection* (Selección Asistida por Marcadores)
- N.** NB-LRR: *nucleotide-binding site-leucine-rich repeat* (Sitio de unión a Nucleotidos Rico en Repeticiones de Leucina)
- P.** PAMPs: *pathogen associated molecular pattern* (Patrones Moleculares Asociados al Patógeno)
PCR: *Polymerase Chain Reaction* (Reacción en Cadena de la Polimerasa)
PTI: *PAMP triggered immunity* (Inmunidad Disparada por PAMP)
- R.** RAPDs: *Random Amplified Polymorphism DNAs* (ADNs Polimórfico Amplificado al Azar)
RH: *respose hypersensible* (Respuesta Hipersensible)
RFLP: *Restriction Fragment Length Polymorphism* (Polimorfismos de Longitud de Fragmentos de Restricción)
Rlm: genes de resistencia a phoma en colza
Rlm1: alelo de resistencia a *avrLM1*
Rlm3: alelo de resistencia a *avrLM3*
Rlm4: alelo de resistencia a *avrLM4*
Rpg3Dun: alelo de resistencia a *avrRpg3Dun*
- S.** SCAR: *Sequence Characterized Amplified Region*
SDS: Dodecil Sulfato Sódico
SNP: *Single nucleotide Polymorphism* (Polimorfismo de Nucleótido Único)
SSPs; *small-secret proteins* (Proteínas Pequeñas Secretadas)
SSR: *simple sequence repeat* (Repeticiones de Secuencia Simple)
- T.** TIR: *Toll-Interleukin receptor* (Receptor Interleukina Toll)
- Q.** QTL: *Quantitative Trait Loci* (Locus de un Carácter Cuantitativo)

RESUMEN

La colza constituye el tercer cultivo oleaginoso a nivel mundial y presenta una alta demanda por sus características industriales que lo hacen apto para consumo humano, así como también para la producción de biocombustibles. La principal enfermedad fúngica en colza es conocida como cancro del tallo, producida por *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. y de Not. [Anamorfo *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm], un ascomycete hemibiotrófico. La resistencia a la misma puede ser del tipo cualitativa, presente en el estadio de plántula, en la cual se establece una interacción específica entre el gen R de la planta y el correspondiente gen de avirulencia del patógeno, o puede ser resistencia cuantitativa, la cuál es efectiva en plantas adultas mediante la acción acumulativa de múltiples *loci* de resistencia y más duradera (Delourme et al., 2006a; Rimmer 2006; Hayward et al., 2012; Raman et al., 2012, Larkan et al., 2016a). Una de las estrategias para aumentar la durabilidad de la resistencia cualitativa es la piramidización de genes, método a través del cual se busca combinar múltiples genes de resistencia en un mismo genotipo, de manera tal que todos estos genes R necesitan ser superados para que se manifieste la susceptibilidad a la enfermedad. El objetivo del presente trabajo de tesis fue seleccionar líneas portadoras de diferentes genes de resistencia, alto rendimiento y contenido de aceite, y adecuado perfil de ácidos grasos, para ser utilizadas como progenitores en el desarrollo de nuevos genotipos resistentes a *P. lingam*. Para ello se determinó el grupo de patogenicidad del aislamiento de *P. lingam* utilizado y luego se identificaron dentro de las 469 líneas experimentales de colza del programa, aquellas resistentes al aislamiento mediante inoculaciones artificiales. Las 59 líneas resultantes, se caracterizaron fenotípicamente para rendimiento, porcentaje de aceite y contenido de ácidos grasos en las campañas 2014 y 2015. Además, se caracterizaron genotípicamente, mediante la aplicación de diferentes tipos de marcadores moleculares para identificar los *loci* de resistencia *Rlm1*, *Rlm4*, *Rlm3*, *BLMR2*, *RpgDun* y *LepR3*. Los resultados de los ANOVAs indicaron que las variables rendimiento, porcentaje de aceite y perfil de ácidos grasos tuvieron interacción significativa con el ambiente por lo que se analizaron estadísticamente por campaña. Para todos estos análisis resultaron diferencias estadísticamente significativas entre líneas. El rendimiento promedio obtenido en la campaña 2014 fue de $2686,49 \pm 339,92$ kg/ha y de $2783,56 \pm 457,37$ kg/ha para 2015. Se puede destacar que las siguientes líneas dieron altos rendimientos en ambas campañas: 77C, 4R, 62L, 74L y 15(2)L, entre otras. El porcentaje de aceite promedio fue $42,52 \pm 0,05\%$ para 2014 y $44,39 \pm 0,05\%$ para 2015. Las líneas 76C, 9C, 32(3)C, 34(3)C y 32C fueron las de mayor

porcentaje de aceite para 2014 y 6R, 19R, 18R, 1R, 8R y 9L para 2015. El perfil de ácidos grasos promedio para todos los genotipos en ambos años, fue semejante al encontrado en países de larga trayectoria de producción, como Canadá, y estuvieron dentro de los valores aceptables para el consumo humano. Mediante un análisis de componentes principales para las variables fenotípicas de cada campaña, se encontró que un 81% de la variación total fue explicado por las dos primeras CP para 2014 y un 72% para la campaña 2015. Además, en ambas campañas se repite el patrón de correlación negativa entre ácido oleico y el resto de los ácidos grasos insaturados evaluados y el porcentaje de aceite. Por otro lado, también coincide en ambas campañas, que la CP1 separa a las líneas por el contenido de ácido oleico, contra las demás variables y la CP2 las separa por el contenido de ácido linoleico y rendimiento.

En la caracterización genotípica, de las 59 líneas evaluadas, 24 tuvieron un único alelo de resistencia, seis fueron positivas para el alelo *Rpg3Dun*, una para *Rlm1*, 11 para *LepR3* y seis para *Rlm4*. Otras presentaron dos alelos de resistencia, tres tienen la combinación *Rlm1* y *LepR3*, dos *Rlm4* y *Rpg3Dun*, otras dos *Rlm4* y *LepR3* y siete presentaron los loci *LepR3* y *Rpg3Dun*. Se encontraron líneas que fueron positivas para tres alelos de resistencia, seis para *Rlm4*, *LepR3* y *Rpg3Dun* y 1 para *Rlm1*, *LepR3* y *Rpg3Dun*. Con el fin de hacer una correcta selección de líneas que sean portadoras de diferentes genes de resistencia y que además tengan buen rendimiento, alto contenido de aceite y adecuado perfil de ácidos grasos, se analizaron los resultados obtenidos mediante Procrustes generalizado (APG). La variabilidad explicada a través de los dos primeros ejes de la descomposición de la matriz de consenso del análisis fue de 89%. Luego de analizar el ARM (árbol de recorrido mínimo) obtenido para la configuración del consenso, las líneas seleccionadas para dar inicio a un programa de apilamiento genético fueron 62L (*LepR3*, *Rpg3Dun*), 52L (*Rpg3Dun*, *LepR3*, *Rlm4*), 61C y 71L (*Rlm1* y *LepR3*) las cuales contienen los alelos mencionados y presentaron muy buenas características fenotípicas.

ABSTRACT

Rapeseed is the third oil crop worldwide and has a high demand for its industrial characteristics that make it suitable for human consumption and production of biofuels. Stem cancer caused by *L. maculans Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desmaz] and it is the disease that most affects the crop. In order to identify resistance genes, artificial inoculations were carry out with a local strain of *P. lingam* in 469 experimental lines of the INTA Paraná breeding program. Fifty-nine lines were resistant. Using specific molecular markers, a genetic characterization of the resistant lines was perform to identify resistant genes (*Rlm1*, *Rlm3*, *LePr3*, *Rpg3Dun*, *BLMR2* and *Rlm4*). The lines were characterize for yield, percentage of oil and content of fatty acids over two seasons (2014 and 2015).A Generalized Procrustes Analysis was conduct to correlate all the traits evaluated and identify elite lines. The lines62L (*LepR3*, *Rpg3Dun*), 52L (*Rpg3Dun*, *LepR3*, *Rlm4*), 61C y 71L (*Rlm1* and *LepR3*) were selected as candidates based on their performance and multiple resistant genes combination, to develop a genetic stacking breeding program of the crop.

INTRODUCCIÓN

I. Taxonomía y cultivo de colza

Brassica napus L. (AACC, $2n = 38$) conocida como colza o canola, se formó hace aproximadamente 7500 años mediante la hibridación interespecífica natural entre *B. rapa* (genoma AA, $2n = 20$) y *B. oleracea*, (genoma CC, $2n = 18$) seguida de la duplicación cromosómica, proceso conocido como alopoliploidización (Snowdon et al., 2002). La especie pertenece a la familia *Brassicaceae*, una gran familia eudicotiledóneas (Al-Shehbaz, 2012), que incluye a la especie modelo *Arabidopsis thaliana*. Hay evidencias de su cultivo en la India, varios siglos antes de Cristo, pasando luego a ser aprovechada en China y Japón a comienzos de la era cristiana (Iriarte y Valetti, 2008). En Europa, el cultivo de esta especie comenzó durante la Edad Media y posteriormente se extendió por todo el mundo. Actualmente constituye el tercer cultivo oleaginoso en producción a nivel mundial, luego de la palma y la soja (Fayyaz et al., 2014). Además, la especie presenta una alta demanda por sus características industriales que la hacen apta para consumo humano, así como también para la producción de biocombustibles (Brown et al., 2008; MCVetty et al., 2016).

Comparado con otras fuentes de aceite vegetal, por ejemplo, de soja, el aceite de colza es único por contener ácidos grasos de cadenas mayores a 18 carbonos (como los ácidos ecosenoico, 20:1; erúcico, 22:1; y nervónico, 24:1). Altas concentraciones de estos ácidos de cadena larga le proveen características de estabilidad, viscosidad y lubricidad que lo hacen un aceite altamente adecuado para aplicaciones industriales. La colza no fue cultivada extensamente en el continente americano hasta la década de 1920. Por ejemplo, durante la Segunda Guerra Mundial, las fuerzas armadas aliadas requerían grandes cantidades de aceite lubricante para sus flotas de barcos a vapor. Al ser el aceite de colza rico en ácido erúcico, fue el aceite de elección, ya que es muy estable a altas temperaturas en presencia de agua o vapor (Brown et al., 2008). Sin embargo, al finalizar la guerra, los buques de vapor se sustituyeron por diésel y posteriormente por energía nuclear, y la demanda de aceite de colza de calidad industrial disminuyó. Por otro lado, una desventaja muy importante del uso de colza para el consumo humano era el contenido de altas concentraciones de ácido erúcico (Brown et al., 2008). En este punto, la historia de la colza fue

alterada dramáticamente por los esfuerzos de mejoramiento de dos científicos canadienses, el Dr. Keith Downey y el Dr. Baldur Stefansson, quienes hicieron dos modificaciones genéticas importantes. En primer lugar, se afectó el alargamiento de ácidos grasos y se redujo la proporción de las cadenas de carbono de ácido erúcico, mientras aumentaba el ácido oleico. El primer cultivar de bajo contenido de ácido erúcico (denominado Oro) se comercializó en 1966 (Brown et al., 2008). En segundo lugar, en ese momento, todos los cultivares de colza tenían concentraciones relativamente altas de glucosinolatos en la harina de semillas, cuyos compuestos de descomposición reducían en gran medida el valor alimenticio. En 1974, los Doctores Downey y Stefansson identificaron plantas de bajo glucosinato en un cultivar polaco llamado “Bronowski” y este rasgo fue introducido en germoplasma adaptado, generándose el primer cultivar '00' (bajo en ácido erúcico y glucosinolatos) (Brown et al., 2008).

En 1978, la Asociación de Colza de Canadá (que más tarde se convertiría en el Consejo de Canola de Canadá) eligió la palabra "canola" para el aceite de colza comestible (< 2 % de erúcico y < de 30 μ mol de glucosinolatos). Los cultivares de canola tuvieron difusión a finales de los años setenta, y hoy en día se cultivan en todo el mundo por su aceite comestible (Brown et al., 2008). Actualmente, según el Departamento de Agricultura de Estados Unidos (USDA, 2016), la colza contribuye al 14% de la producción de aceite vegetal del mundo. En Sudamérica, los principales países productores son Argentina, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. En nuestro país, la producción en la campaña 2014 fue de 104.849 toneladas de granos, con más de 55.835 Ha sembradas, y para la campaña 2015 fue de 67.381 toneladas con 37.315 Ha de superficie sembrada (<http://www.minagri.gob.ar>).

El potencial de rendimiento de un cultivo puede verse afectado por diversos factores, entre los que se pueden destacar los abióticos (fertilidad del suelo, disponibilidad hídrica, etc.) y los bióticos (plagas, enfermedades, etc.). En el cultivo de colza, las enfermedades que provocan mayores pérdidas en el rendimiento son de origen fúngico. La principal enfermedad fúngica que lo afecta es el cancro del tallo, producida por *Leptosphaeria maculans* (Desm.). La gravedad de la epidemia del cancro del tallo y la extensión de las pérdidas en rendimiento varía mucho, dependiendo, por ejemplo, de las condiciones climáticas y la región geográfica, así como también del genotipo del hospedante y del patógeno. Pérdidas de rendimiento promedio estimadas entre <10% y un máximo de 30% -50% han sido informadas como resultado del desarrollo de esta

enfermedad en cultivos de colza (Hall et al., 1993; Barbetti et al., 1999). Según fue documentado por Hwang (Hwang et al., 2016), el rendimiento en semilla por planta disminuyó en 1.8 g por cada unidad de aumento en la severidad de la enfermedad, lo que corresponde a una disminución en el rendimiento del 17.2% por cada unidad de aumento en la severidad de la enfermedad. En Francia, se informaron pérdidas de entre 5% y 20% (Aubertot et al., 2006), mientras que se documentaron pérdidas entre 8% y 29% en el Reino Unido desde 1987 hasta 1995 (Fitt et al., 2006). En Argentina, Iriarte (2012) observó que la infección del tallo antes del estado de roseta de 6 hojas está asociada con serias pérdidas de rendimiento, mientras que los ataques tardíos en estados reproductivos raramente causan pérdidas de rendimiento mayores al 1 o 2 %.

II. Mejoramiento del cultivo

La colza tiene una corta historia de mejoramiento, aproximadamente entre 400-500 años. Durante este período de domesticación, los eventos más destacados fueron la modificación de dos caracteres: ácido erúxico cero en semilla y bajo contenido de glucosinolatos (Li et al., 2014), como se mencionó anteriormente. Sin embargo, muchos rasgos tales como contenido de aceite, rendimiento de semilla, resistencia a enfermedades, entre otros, necesitan ser mejorados en los cultivares modernos.

En el año 2008, la Estación Experimental Agropecuaria Paraná del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA) inició un programa de mejoramiento genético de colza, el cual constituye el único programa de este tipo en nuestro país. En éste se prioriza la selección de materiales que presenten alto potencial de rendimiento, resistencia a enfermedades y mejora de la calidad industrial, con el objetivo de desarrollar nuevas líneas de la especie adaptadas a la región de cultivo en Argentina. Las líneas estabilizadas del programa, han sido evaluadas en ensayos comparativos de rendimiento y algunas de las mismas se encuentran en la etapa de confección de legajo para su inscripción en el INASE (Instituto Nacional de Semillas) y multiplicación de semilla. Algunas líneas del programa, junto a cultivares comerciales, han sido evaluadas fenotípicamente para resistencia a *L. maculans*, encontrándose que varias poseen resistencia a aislamientos obtenidos en diferentes localidades por el Grupo de Genética, Mejoramiento y Biotecnología Vegetal de la EEA Paraná del INTA (de Souza et al., 2014). Recientemente, se ha inscripto la primera variedad de colza obtenida en el programa de mejoramiento de INTA EEA Paraná, llamada Macacha INTA (en 2016). La misma está adaptada

a las diversas condiciones agroecológicas de la región de cultivo, es de tipo primaveral y de ciclo intermedio. Además, presenta buen comportamiento ante las principales enfermedades del cultivo y muy buena calidad industrial (Milisich H., comunicación personal).

III. Rendimiento

Para los cultivares de *B. napus*, el mejoramiento del rendimiento en semilla ha implicado, sucesivamente, la selección dentro de variedades autóctonas de poblaciones de polinización abierta, cruza de éstas y selección de pedigrí de familias derivadas. También, el desarrollo y selección de líneas doble haploide puras, el desarrollo de sintéticos, asociaciones varietales y finalmente, híbridos (Friedt y Snowdon, 2010). En el programa de mejoramiento de la especie de INTA se aplican técnicas convencionales (cruzamientos) y no convencionales (inducción de mutaciones mediante agentes químicos) para incrementar la variabilidad genética. Como resultado del proceso de endocria y selección de líneas con buen comportamiento agronómico, calidad industrial y resistencia a patógenos, las líneas estabilizadas se implantan en ensayos comparativos de rendimiento (ECR) preliminares. Posteriormente, aquellas seleccionadas por rendimiento se conducen en ECR de líneas avanzadas (Gieco, L.; comunicación personal; Programa de Mejoramiento de Colza INTA). Las líneas que participan en estos ensayos son evaluadas en diferentes ambientes y simultáneamente se multiplican para contar con suficiente semilla original para su eventual inscripción.

La colza tiene condiciones tanto agronómicas como comerciales para aumentar su producción, además de las mejoras en genética y manejo del cultivo de los últimos años, que han permitido elevar los rindes promedio en nuestro país a 1800 kg/ha, respecto de los 1400 kg/ha históricos. La colza es el único cultivo oleaginoso que se siembra en invierno (lo cual permite proveer a la industria aceitera en épocas de capacidad ociosa (Rondanini et al., 2015). Si bien en la provincia de Entre Ríos, el lino es también un cultivo invernal oleaginoso (Informes SIBER, BCERER), la colza representa una alternativa a la rotación trigo/soja, con la ventaja de liberar el lote hasta un mes antes que los cereales invernales y dejarlo disponible para sembrar, más tempranamente, un cultivo de segunda (soja, maíz, sorgo) (Rondanini et al., 2015; 2017).

La producción nacional de colza ha tenido grandes variaciones año a año, tomando solo los extremos, se sembraron mínimos de 12.700 hectáreas en 2010, y máximos de 92.700 hectáreas

en 2012, con una producción de 23 mil y 128 mil toneladas, respectivamente. En las campañas 2014 y 2015 el rendimiento fue de 1920,31 kg/ha y 1902,88 kg/ha, respectivamente, con una producción de 104.849 toneladas de granos para la campaña 2014, con más de 55.835 Ha sembradas y para la campaña 2015 fue de 67.381 toneladas con 37.315 Ha de superficie sembrada (<http://www.minagri.gob.ar>). Alguno de los motivos por los que la producción no alcanza un volumen estable, son los ajustes tecnológicos que año a año deben desarrollarse en los diferentes ambientes, tanto desde el punto de vista genético, como de manejo integral (siembra, protección y cosecha).

IV. Calidad del grano y aceite de colza

El nombre "canola" se deriva de "Canadá y ácido oleico" y su aceite se define como: "un aceite que debe contener menos del 2% de ácido erúcico, y el componente sólido de la semilla debe contener menos de 30 μ moles de cualquiera o cualquier mezcla de glucosinolato de 3-butenilo, glucosinolato de 4-pentenilo, 2-hidroxi-3-Butenilglucosinolato y glucosinolato de 2-hidroxi-4-pentenilo por gramo de sólido seco y seco al aire (Overber Agri®, 2015). Los glucosinolatos y el ácido erúcico son dos factores anti nutricionales, que, en cantidades elevadas, impiden el consumo de la harina en la alimentación animal y del aceite para consumo humano, respectivamente. Por ende, un aceite de calidad para consumo humano no contendrá ácido erúcico, tendrá bajo contenido de ácidos grasos saturados (no presentan dobles enlaces en su cadena) y una alta proporción de monoinsaturados (presentan un sólo doble enlace en su cadena), como el ácido oleico (McDonald, 1995). Diferentes estudios han demostrado que una dieta baja en ácidos grasos saturados y alta en monoinsaturados puede jugar un papel importante en la disminución del riesgo de enfermedades coronarias mediante la reducción de la síntesis de colesterol. El aceite de canola ocupa este nicho, teniendo el nivel más bajo de ácidos grasos saturados de todos los aceites comestibles y el segundo nivel más alto de grasas monoinsaturadas, luego del aceite de oliva (Windauer y Ploschuk, 2006; Brown et al., 2008). En Argentina, la calidad comercial del grano de colza-canola como oleaginosa alimenticia está definida según las normas de comercialización del país (Norma VII SAGPyA, 1994), e incluyen el contenido de (i) aceite (>43 %), (ii) ácido erúcico (<2%) y (iii) glucosinolatos (<20 μ moles g^{-1}). Es decir, que el mercado bonifica, penaliza o rechaza según la calidad del grano que se recibe. Por lo tanto, es de relevancia agronómica y económica estudiar cómo el ambiente y el manejo del cultivo modifican la calidad, y cuál es la

variabilidad genética presente en los materiales comerciales disponibles en el país, conducidos bajo distintas condiciones ambientales. El contenido de aceite del grano maduro de colza-canola puede alcanzar 50-52% del peso seco del grano. Este valor frecuentemente resulta menor en condiciones de producción, variando de acuerdo al genotipo, las condiciones ambientales durante el llenado de los granos y algunas prácticas de manejo como la fecha y densidad de siembra y el nivel de fertilización (Agosti y Miralles, 2011). El perfil de ácidos grasos también se define durante el llenado de los granos, aunque varios autores señalan que los cambios más importantes en la composición ácida ocurren al inicio del llenado, a pesar de que la acumulación de aceite continúa hasta cerca de madurez fisiológica del grano (Fowler y Downey, 1970; Rakow y McGregor, 1975; Diepenbrock y Geisler, 1979).

V. *Leptosphaeria maculans*

La necrosis o cancro del tallo, es causada por el hongo fitopatógeno *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. y de Not., Ascomycota hemibiotrófico, [Fase asexual, imperfecta, Anamorfo Deuteromycota *Phoma lingam* (Tode ex Fr.) Desm], cuyo daño más importante es el vuelco de la planta provocado por la lesión que se desarrolla en la base o cuello del tallo, (West et al., 2001; Fitt et al., 2006; Long et al, 2011; Raman et al., 2012; Wang, 2013). Este patógeno sobrevive como micelio y pseudotecios en restos vegetales pudiendo permanecer infectivo por 4 o 5 años y constituyendo el inóculo primario, además, las semillas de colza y otras plantas pertenecientes a la familia de las Brassicáceas también pueden ser reservorio de este patógeno. Los factores climáticos, principalmente las temperaturas y humedad elevada favorecen el desarrollo y la distribución de la enfermedad. Las temperaturas medias entre 8 y 15°C son favorables para la descarga de ascosporas presentes en el interior de los ascos de *L. maculans* que se encuentran en los restos vegetales, estas temperaturas deben ir acompañadas de períodos de alta humedad ambiental (rocío o precipitaciones). Una vez que las esporas son liberadas y transportadas por el viento a las plántulas jóvenes, se adhieren a los cotiledones, hojas o hipocótilo. Allí germinan en presencia de agua libre, penetran por los estomas o heridas mediante el tubo germinativo invadiendo los espacios intercelulares entre las capas de epidermis y el tejido en empalizada, para luego avanzar sobre el mesófilo. Las células mueren y la lesión toma el color gris verdoso característico. Sobre estas lesiones, que se denominan máculas, se formarán las estructuras fructíferas asexuales (picnidios) de *Phoma lingam* (forma infectiva), dando lugar a infecciones

secundarias dentro del cultivo (Brown et al., 2008; Formento, 2014). Las hifas del hongo se propagan y alcanzan las nervaduras e invaden la corteza del tallo en el sitio de unión con el pecíolo, dando lugar a la formación de canchros (Figura 1). Esta última fase suele ser la más peligrosa, ya que el transporte de agua y nutrientes hacia arriba y debajo de la herida en la planta se ve interrumpido (Fitt et al., 2006; Brown et al., 2008). Esto conlleva a una disminución en la formación de los granos, y cuando el cuello del tallo se debilita considerablemente como resultado de la infección, la planta puede volcarse. Las gotas de lluvia dispersan las esporas o picnidiosporas a cortas distancias dando lugar a las infecciones secundarias, siendo las condiciones favorables para el desarrollo de máculas temperaturas entre 20 a 25°C y mojado foliar no menor a 16 horas. Todas las infecciones en la vaina resultan en semillas infectadas (<http://www.overbergagri.co.za>, Brown et al., 2008).

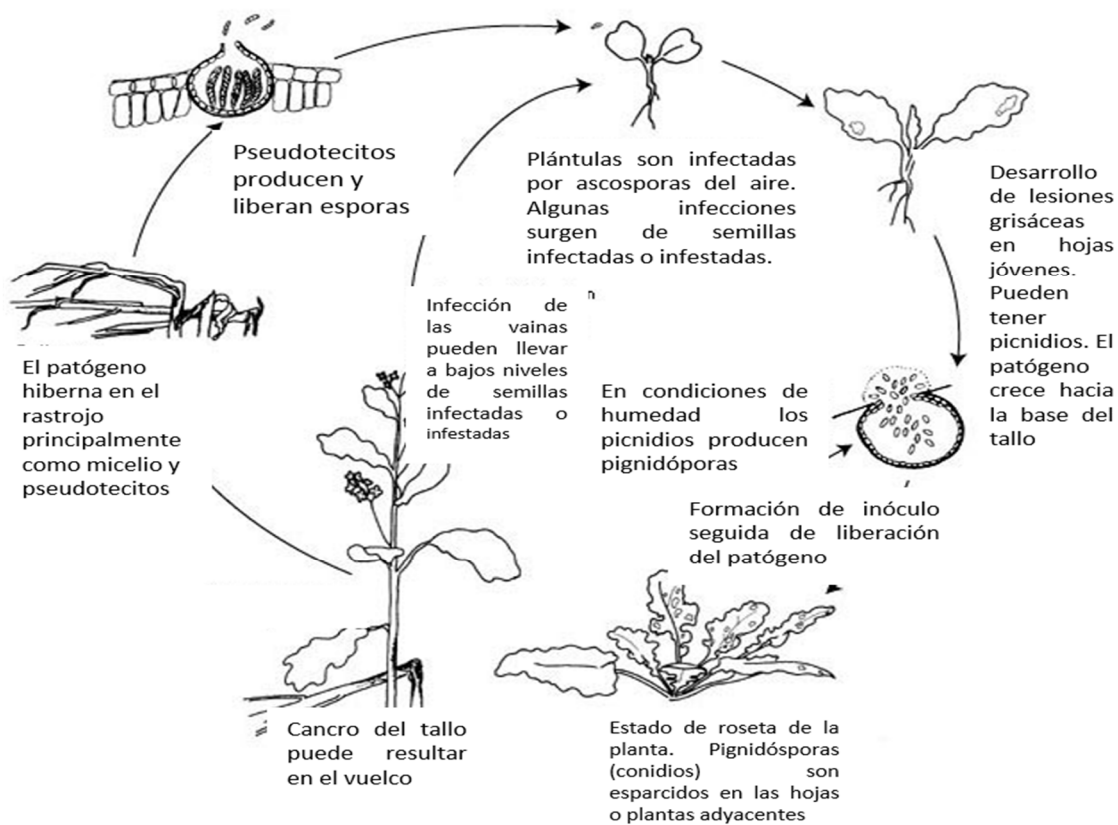


Figura 1. Ciclo de vida de *L. maculans*. Imagen modificada de <https://agro.basf.ca>.

VI. Interacción planta – patógeno

i. Genes R y mecanismos de resistencia en *Brassica napus*

Las respuestas inmunes del hospedador al patógeno pueden dividirse en dos categorías. Una respuesta basal inducida por señales genéticas del patógeno (elicitors) conocidos como “patrones moleculares asociados al patógeno (en inglés PAMPs/MAMPs/DAMPs/DANGER), la denominada *inmunidad desencadenada por PAMPs* (PAMP triggered immunity’: PTI). Es una respuesta moderada de defensa que se caracteriza por la detección de los PAMPs a través de receptores de membrana extracelulares tales como proteínas receptoras y quinasas similares a receptores. El otro tipo de respuesta es la *inmunidad desencadenada por efecto de los genes R* (ETI: *effector triggered immunity*), en la cual las proteínas raza específicas (Avr) del patógeno desencadenan un mecanismo de defensa que incluye una respuesta hipersensible (RH), llevando a la muerte celular del hospedador en el sitio de infección. En este caso, la detección o perturbación de los efectores del patógeno está mediada por receptores intracelulares que poseen repeticiones ricas en leucina (NB-LRR) (Tsuda y Katagiri, 2010; Dangl et al., 2013). Cuando se estudian patógenos foliares, la RH de genes raza específicos R proveen un fenotipo visual que indica una interacción incompatible y permite la determinación de la virulencia del patógeno, de manera sencilla y rápida. Esta distinción es usada para separar las interacciones específicas de los genes R, llamada resistencia cualitativa, presente principalmente en el estadio de plántula, de aquella resistencia cuantitativa, efectiva de plantas adultas mediante la acción acumulativa de múltiples *loci* de resistencia (Delourmeet et al., 2006; Rimmer 2006; Hayward et al., 2012; Raman et al., 2012b, Larkan et al., 2016a).

Pueden ocurrir dos tipos de interacciones entre el patógeno y la planta; compatibles e incompatibles. La interacción compatible ocurre en ausencia de una respuesta eficaz de defensa del huésped, permitiendo la penetración, invasión y multiplicación del patógeno en sus tejidos, desarrollándose la enfermedad. Esto puede ser debido a la falta de un alelo de resistencia dominante en la planta que interactúe con el alelo de resistencia dominante del patógeno o a la ausencia de un alelo de virulencia en el locus del patógeno correspondiente. En cambio, una interacción incompatible se produce cuando no hay desarrollo de la enfermedad debido a la presencia de un alelo eficaz de resistencia en el huésped (R) con un alelo para Avr en el locus patógeno correspondiente. En una interacción incompatible, la planta activa los mecanismos de

defensa efectivos, lo que se manifiesta como resistencia. (Stange et al., 2007, Dangl et al., 2013, Gabriel et al., 2017).

El reconocimiento de patógenos a través los genes de resistencia (R) se explica en la teoría gen a gen (Flor, 1971) la cual se basa en el reconocimiento directo o indirecto de los efectores. En la forma directa las proteínas NB-LRR reconocen los efectores del patógeno asociándose físicamente con ellos (Catanzariti et al. 2006, 2010; Dodds et al. 2010). En el reconocimiento indirecto (modelos *guard/decoy* y *bait-switch*) los efectores deben interactuar con una proteína accesoria para ser detectados por las proteínas NB-LRRs. El efector induciría un cambio en la proteína accesoria, una molécula similar a su blanco o ser utilizado como cofactor para permitir su reconocimiento por parte de las proteínas NB-LRR (Van der Hoorn et al. 2008). En el modelo de guardia la proteína NB-LRR se encuentra vigilando a la proteína accesoria que resulta ser blanco del efector, en el momento en que el efector modifica la proteína accesoria ésta será reconocida por la proteína NB-LRR iniciando la vía de señalización para activar la respuesta ETI. El tercer modelo conocido como de *bait-switch* posee dos etapas. En la primera etapa el efector se une a la proteína accesoria (*bait*) que se encuentra asociada a una proteína NB-LRR. En la segunda etapa el efector, unido a la proteína accesoria que funciona como cofactor en la reacción, es reconocido por el dominio LRR de la proteína NB-LRR. Esta interacción entre el efector y la proteína NB-LRR es lo que funciona como interruptor o (*switch*) activando la señalización para dar comienzo a las respuestas ETI (Collier et al. 2009).

Exceptuando al recientemente clonado gen R de *B. napus*, *LepR3*, el cual se ha identificado que codifica para una proteína transmembrana (Larkan et al., 2013), los genes R codifican pequeñas proteínas secretadas (SSPs; *small-secret proteins*) con varios residuos de cisteína (Stukenbrock and McDonald, 2009; Rouxel et al., 2011). La clase más grande de genes R incluye proteínas con un sitio putativo de unión a nucleótidos (NBS) y otro sitio rico en repeticiones de leucina (LRR). Los genes de resistencia NBS-LRR codifican para receptores intracelulares que se componen de un dominio N terminal variable seguido por los dominios NBS y LRR. Los LRR pueden ser el principal determinante en la especificidad de reconocimiento del producto del gen de la avirulencia (Ellis et al., 2000), mientras que se cree que la región NBS es importante para la actividad de unión a ATP. Estudios previos de análisis de secuencias revelaron que los dominios NBS comparten un alto grado de homología y tienen un número de motivos conservados (Wan

et al., 2012). Los genes NBS-LRR se pueden subdividir en dos tipos distintos basado en la estructura de su dominio N-terminal: un motivo de bobina en espiral (CC) o un motivo tipo *Toll*, dominio de receptor de interleucina-1 de mamífero (TIR) (Meyers et al., 2003). Se ha demostrado que la clase de genes NBS-LRR es abundante y ampliamente distribuida en todo el genoma de especies de plantas, por ejemplo en *Arabidopsis* constituye aproximadamente el 1% del genoma (Ellis et al., 2000). Estudios genéticos y genómicos realizados en *Arabidopsis* y arroz (Bai et al., 2002; Richly et al., 2002), muestran que la mayoría de los genes NBS-LRR están presentes en grupos o clusters de genes (Hulbert et al., 2001; Wan et al., 2012). La disposición agrupada de estos genes puede ser un atributo crítico que permite la generación de nuevas especificidades de resistencia vía recombinación o la conversión génica (Meyers et al., 2003). En el genoma de *B. rapa* casi el 50% de los miembros de la familia NBS fueron detectados como conjuntos en tándem dentro de clusters homogéneos, sugiriendo la duplicación en tándem en combinación con poliploidía, desempeñado un papel importante en la expansión de la codificación genes NBS-LRR en el genoma de *Brassica* (Vicente et al., 2001; Mun et al., 2009).

Actualmente, se han descrito 16 *loci* de resistencia cualitativa o específica a *P. lingam*: *Rlm1*, *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7*, *Rlm9*, *LepR3*, *BLMR1*, *BLMR2*, *LmFr1*, *LEM1*, *cLmR1*, *cRLM*, *Rlm.wwai-A1*, *QRlm.wwaiA10a* y *Rpg3Dun* (Delourme et al., 2006; Rimmer 2006; Balesdent et al., 2013), algunos de los cuáles se organizan en clústeres en los cromosomas de *B. napus* (Delourme et al., 2004, 2006a). Sin embargo, sólo dos de éstos genes mayores han sido clonados y caracterizados, *LepR3* y *Rlm2* (Larkan et al., 2016b).

La resistencia de planta adulta o cuantitativa, es una resistencia del tipo parcial, no específica que implica la acción de muchos genes menores y está mediada por QTL (*Quantitative Trait Loci*) (Delourme et al., 2006a). La presencia de estos factores de resistencia se expresa ante el menor desarrollo de tejido necrótico en la base del tallo comparado con el encontrado en variedades susceptibles. Este tipo de resistencia es también más durable que la de tipo cualitativa (Boyd 2006; Poland et al., 2009), ya que los genes implicados no dan como resultado una rápida ruptura de la resistencia (Kaur et al., 2009), pero su eficiencia varía según las condiciones ambientales. Debido a la complejidad del genoma de colza, las regiones duplicadas experimentan cambios importantes que pueden causar modificaciones estructurales, funcionales y/o reguladoras de los genes duplicados (Jackson et al., 2010; Wang et al., 2012; Fopa Fomeju et al., 2014). Delourme

et al. (2008) plantean la hipótesis de que los genes de resistencia cuantitativa funcionan en una interacción compleja de muchos genes de respuesta al patógeno que por sí solos no muestran grandes efectos fenotípicos, lo que no provocaría una fuerte presión selectiva sobre el hongo.

ii. Genes de Avirulencia (Avr) en *P. lingam*

En cuanto a la identificación de genes de avirulencia, se han adquirido mejores progresos en *P. lingam*, ya que se han clonado siete de los 14 genes conocidos: *AvrLm1*, *AvrLm4-7*, *AvrLm6*, *AvrLm11*, *AvrLmJ1*, *AvrLm2*, y *AvrLm3* (Gout et al., 2006; Fudal et al., 2007; Parlange et al., 2009; Balesdent et al., 2013; Van de Wouw et al., 2014, 2016; Plissonneau et al., 2016). Además, algunos de estos genes de avirulencia han sido encontrados en grupos (*clusters*), como los *AvrLm1-2-6* y *AvrLm3-4-7-9-AvrLepR1* (Balesdent et al., 2002; Ghanbarnia et al., 2012). En contraste con las estructuras de dominio conservadas de las proteínas R, las proteínas Avr son generalmente muy divergentes en las funciones de secuencia y patogenicidad (Chisholm et al., 2006; Bent & Mackey 2007; Kamoun 2007). Parlange y colaboradores (Parlange et al., 2009) encontraron que no existe homología de secuencia entre las regiones codificantes *AvrLm1*, *AvrLm6* y *AvrLm4-7*. Todos los genes *Avr* tienen características típicas de los genes efectores fúngicos, ya que, codifican para pequeñas proteínas secretadas, están altamente reguladas en etapas tempranas de la infección y muestran baja homología con genes de otras especies de hongos. Los efectores son elementos claves en la virulencia fúngica contra las plantas y son particularmente importantes durante la fase biotrófica de la infección (Kloppholz et al., 2011). *P. lingam*, que es un hemibiótrofo, se basa inicialmente en los efectores para suprimir las defensas de las plantas, y posteriormente utiliza efectores para matar las células vegetales. (Lo Presti et al., 2015). El alto potencial evolutivo de éste patógeno es una característica tanto de su ciclo de vida como de su estructura genómica. La mayoría de los efectores putativos o candidatos están localizados en ADN repetitivo rico en transposones y se ven afectados por una mutación puntual repetida (Rouxel et al., 2011). Los genes efectores se sobreexpresan principalmente durante la infección de la hoja primaria (Soyer et al., 2014). Esta información sobre la localización genómica, la organización de genes y la dinámica de expresión es útil para comprender la interacción patógeno-huésped.

Los ensayos de inoculación en cotiledones se han utilizado rutinariamente para identificar resistencia a *P. lingam* (Williams y Delwiche 1979, Rimmer y van den Berg 1992, Rouxel et al.,

2003, Marcroft et al., 2012). La caracterización de los genes R en una variedad dada de colza se puede lograr mediante el análisis de sus interacciones con un conjunto de aislados de los patógenos portadores de genes de Avirulencia (Avr) conocidos. Por ejemplo, basado en las reacciones fenotípicas a diferentes aislamientos con alelos Avr conocidos, Rouxel y colaboradores (2003) dedujeron los genes R específicos en diferentes accesiones de *B. napus* principalmente originarias de Europa. Por el contrario, cuando no se conoce la identidad de genes Avr en el patógeno, los aislamientos pueden ser categorizados en varios grupos de patogenicidad (GP) (Koch et al., 1991; Mengistu et al., 1991). Esto puede determinarse en función de la interacción fenotípica por inoculaciones artificiales en los cotiledones de los cultivares Westar (no posee genes R), Glacier (posee *Rlm2*, *Rlm3*) y Quinta (posee *Rlm1-4* ligados y *Rlm3*), principalmente. Por ejemplo, el alelo resistente dominante *Rlm2* del cultivar Glacier en respuesta al gen *Avrlm2* en un aislamiento GP2 de *P. lingam*, resulta en una reacción incompatible entre Glacier y el aislamiento GP2 (Ansan-melayah et al., 1998).

iii. Manejo de la enfermedad.

En Argentina la enfermedad fue detectada por primera vez en el año 1994 (Gaetán et al., 2001) registrándose desde ese momento epifitias de intensidad variable en función tanto de las condiciones climáticas que predispongan a la enfermedad como de la susceptibilidad del cultivar y la avirulencia/virulencia del patógeno (Gaetán y Madia, 2006; Gaetán, 2006; Iriarte et al., 2012), alcanzando en cultivares susceptibles hasta un 60% de incidencia (Iriarte y Valetti, 2008). Las estrategias utilizadas para disminuir la incidencia de la enfermedad incluyen: la siembra de variedades resistentes, la rotación de cultivos y manejo de rastrojos, así como también variaciones en la fecha de siembra y aplicación de fungicidas (West et al., 2001; Sivasithamparam et al., 2005; Aubertot et al., 2006). En el caso de los fungicidas, sin embargo, la eficacia de ciertos principios activos ha disminuido debido a la presencia de cepas fúngicas resistentes a los mismos (Brent and Hollomon, 2007). El incremento de la producción de colza y el aumento del área sembrada, han favorecido el desarrollo de dicha enfermedad en los últimos años, llevando a grandes pérdidas económicas. Es por esto que el desarrollo de cultivares resistentes es el método más efectivo y sustentable para el control del cancro del tallo, que puede combinarse con prácticas de manejo del cultivo.

Si bien la caracterización bioquímica y morfológica (Azam et al., 2013), tanto en invernáculo como a campo son herramientas de gran utilidad para los programas de mejoramiento, la caracterización molecular es esencial para identificar la base genética de la resistencia. La identificación de genes de resistencia mediante marcadores moleculares es muy efectiva, ya que éstos pueden detectar un alto grado de polimorfismo y no son sensibles a las variaciones ambientales y de desarrollo (Rabbani et al., 2010; Zeb et al., 2011; Ahmad et al., 2014). Marcadores moleculares estrechamente ligados a genes de interés son muy útiles para la selección asistida y para la piramidización de dos o más genes en un solo genotipo, a fin de lograr una resistencia más durable (Ahmad et al., 2014, Fayyaz et al., 2014).

iv. Marcadores moleculares y selección.

Los marcadores moleculares se han convertido en una herramienta importante para asistir al mejoramiento de diversos cultivos. En los últimos años, la identificación de fuentes naturales de resistencia a *P. lingam* en colza, ha permitido el desarrollo de líneas y cultivares resistentes (Delourme et al., 2006; Rimmer 2006). Se han informado en trabajos previos de mapeo de poblaciones, el ligamiento entre los genes de resistencia conocidos y marcadores moleculares de distinto tipo. Dentro de los marcadores moleculares asociados a los genes de resistencia, los marcadores funcionales son los más ampliamente utilizados, ya que derivan de motivos polimórficos (mutaciones) dentro de los genes. Dentro de este grupo se encuentran los del tipo SSR (*Simple Sequence Repeat* o microsatélites) y SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) (Raman et al., 2013). Los marcadores de tipo SSR presentan una gran ventaja al ser de naturaleza codominante, presentar amplia distribución en el genoma y ser altamente reproducibles. Un *locus* SSR está definido por las secuencias de los cebadores flanqueantes al microsatélite. Por el alto polimorfismo que suelen presentar por *locus* (multialelismo) se los considera los marcadores ideales para el mejoramiento en especies autógamas (Levitus et al., 2010). Por su parte, los SNPs poseen polimorfismo en un solo nucleótido. Algunos autores consideran SNP sólo cuando ocurre una sustitución de base, otros consideran también la inserción/delección de una base (InDel). Los SNPs son de naturaleza dialélica y son muy abundantes en el genoma, siendo la frecuencia de SNPs de 1 cada 100-300 pb para los genomas vegetales. Pueden localizarse tanto en regiones codificantes, regulatorias y no codificantes (Levitus et al., 2010). Otro tipo de marcador molecular que ha sido recientemente desarrollado son los SCAR (*Sequence Characterized Amplified*

Region) (Levitus et al., 2010), los cuales se obtienen a partir del desarrollo de cebadores específicos para fragmentos amplificados polimórficos RAPDs (*Random Amplified Polymorphism DNAs*). En algunos casos, pueden ser codominantes. Se han identificado marcadores moleculares de tipo SSR para *Rlm1*, *Rlm4*, *Rlm.wwai-A1* y *QRlm.wwai-A10a* (Yu et al., 2005; Raman et al., 2012a; Raman et al., 2012b), mientras que para los loci *Rlm2*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7* y *Rlm9*, existen marcadores del tipo RAPDs (Delourme et al., 2004; Parlange et al., 2009) y para los loci *Rlm3*, *BLMR1* y *BLMR2*, se han identificado marcadores de tipo SNP (Long et al., 2011; Wang, 2013). El locus *LepR3* fue identificado en *B. napus* asociado a marcadores de tipo InDel (*insertion/deletion*) (Larkan et al., 2013) y a un SCAR (Yu et al., 2008). Para la identificación de *Rpg3Dun* se encontraron marcadores tipo SRAP (*Sequence-Related Amplified Polymorphism*) (Dusabenyagasani et al., 2008, Long et al., 2011). Mientras que mediante la utilización de marcadores RFLP (*Restriction Fragment Length Polymorphism*), los loci *LmFr1* y *LEMI* fueron caracterizados por Dion et al., (1995). Mayerhofer et al., (1997 y 2005) identificaron marcadores RFLP, RAPD y SCAR asociados al locus *cLmR1*. La utilización de marcadores moleculares conocidos permite seleccionar tempranamente los genotipos que posean alelos de resistencia a *P. lingam*, permitiendo así ahorrar tiempo y recursos en el proceso de selección de los programas de mejoramiento genético de la especie.

v. Estrategias para una resistencia más duradera

P. lingam ha mostrado un alto potencial evolutivo para superar los principales genes de resistencia en *B. napus*. La aparición de nuevos aislamientos virulentos lleva al quiebre de la resistencia mediada por el gen R (Balesdent et al., 2006; Fitt et al., 2006; Sprague et al., 2006). En Francia a mediados de la década de los noventa, el uso a gran escala de cultivares que contenían *Rlm1* llevaron al quiebre de esta resistencia en sólo 3 años debido a la rápida evolución del patógeno (Rouxel et al., 2003a, Sprague et al., 2006). El aumento en cultivares comerciales con resistencia *Rlm1*, resultó en una rápida disminución de la proporción de aislados portadores de AvrLm1 (Rouxel et al., 2003b, 2011). Señalando un caso reciente, Zhang y colaboradores (2015) identificaron que en aislamientos de *P. lingam* existía una marcada disminución en la frecuencia del alelo de avirulencia hacia *Rlm3*, AvrLm3, indicando el quiebre de la resistencia de *Rlm3*, probablemente debido al uso excesivo de este único gen de resistencia en el germoplasma canadiense de *B. napus*.

-Mejoramiento del pool génico de los genes R mediante la introgresión de genes de otras especies

La introgresión de genes de resistencia a *P. lingam* a partir de otras especies de *Brassica* o miembros de la familia de *Brassicaceae* a menudo aumenta la resistencia. (Howlett 2004). Para ello, es importante encontrar fuentes alternativas de genes R contra el patógeno por lo que se han estudiado dichos genes en especies de *Brassica* distintas de *B. napus*, incluyendo diferentes accesiones de sus progenitores diploides, *B. rapa* y *B. oleracea*. Por ejemplo, los genes de resistencia a *P. lingam*, *LepR1*, *LepR2* y *LepR3*, se han introgresado en *B. napus* a partir de un cruzamiento interespecífico entre *B. rapa* ssp. *sylvestris* x *B. oleracea* var. *alboglabra* (Crouch et al., 1994, Buzza and Easton, 2002). Los loci *LepR1* y *LepR2* se identificaron y mapearon en los grupos de ligamiento A02 y A10, respectivamente (Yu et al., 2005). Mientras que *LepR3*, está presente en el cultivar *B. napus* 'Surpass400' y se ha asignado al grupo de ligamiento A10, a una distancia de 11,7 cM del locus *LepR2* (Yu et al., 2008). Además, *LepR3* fue el primer gen de resistencia a la enfermedad en ser clonado (Larkan et al., 2013).

También se han estudiado especies relacionadas como *Diplotaxis muralis*, *Arabidopsis thaliana* y *Sinapis arvensis*, las cuales también podrían ser fuentes de resistencia al patógeno (Delourme et al., 2006). Además, los parientes silvestres de las especies de *Brassica* podrían aumentar la diversidad genética de los cultivares actuales a través de cruzamientos, resíntesis (hibridaciones interespecíficas entre especies relacionadas), mutagénesis, transformaciones genéticas y experimentos de recombinación (Mikolajczyk, 2007).

- Piramidización de genes

En los programas de mejoramiento convencionales, la incorporación de genes de resistencia de tipo cualitativa ha sido efectiva, con la ventaja de poder detectarse en plántula, así como también su combinación con loci de resistencia de tipo cuantitativa (Leflon et al., 2007; Brun et al., 2010; Delourme et al., 2014). La piramidización de genes es un método potencial para desarrollar resistencia más durable a *P. lingam* y otras enfermedades, a través de la combinación de múltiples genes de resistencia en un genotipo, de manera tal que todos estos genes R necesitan ser superados para que se manifieste la susceptibilidad a la enfermedad. En un esquema de piramidización de genes, la estrategia consiste en acumular en un único genotipo, genes que han sido identificados

en diferentes padres. El uso de marcadores moleculares, aumenta la velocidad del proceso, mediante la selección asistida por marcadores (MAS). En general, la piramidización de genes tiene como objetivo la derivación de un genotipo ideal que es homocigótico para los alelos favorables en todos los *loci*. Actualmente, los nuevos desarrollos tecnológicos como la automatización, el diagnóstico específico de alelos y la tecnología de diversidad de *arrays* hacen que el proceso sea más potente y eficaz (Joshi y Nayak, 2010). Si a esta metodología se la acompaña con estrategias de rotación de cultivares que contengan diferentes genes R, se puede limitar la presión de selección hacia una composición de genes *avr* particular. En Australia, la diversificación de la resistencia en diferentes variedades comerciales de canola como resultado de cambios en sus programas de mejoramiento (Marcroft et al., 2012a) proporcionó estrategias alternativas de manejo de la enfermedad. Por lo tanto, la comprensión de la diversidad genética de genes R es fundamental para el desarrollo a largo plazo de la resistencia a *P. lingam* (Marcroft et al., 2012b; Hayward et al., 2012).

OBJETIVOS

OBJETIVO GENERAL

Asistir al programa de mejoramiento nacional de colza de INTA EEA Paraná en el desarrollo de nuevas líneas locales resistentes a *P. lingam* y que presentan una *performance* igual o superior a las existentes en nuestro país.

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Determinar el grupo de patogenicidad del aislamiento de *P. lingam* utilizado, mediante la inoculación de cultivares diferenciales.
2. Identificar líneas experimentales de colza resistentes a *P. lingam* mediante inoculaciones artificiales.
3. Caracterizar fenotípicamente las líneas resistentes a *P. lingam* para rendimiento, porcentaje de aceite y contenido de ácidos grasos.
4. Identificar *loci* de resistencia a *P. lingam* mediante la aplicación de diferentes tipos de marcadores moleculares.
5. Seleccionar líneas portadoras de diferentes genes de resistencia, alto rendimiento y contenido de aceite, y adecuado perfil de ácidos grasos, para ser utilizadas como progenitores en el desarrollo de nuevos genotipos resistentes *P. lingam*.

MATERIALES Y MÉTODOS

1. MATERIAL VEGETAL

Como material vegetal se utilizaron 469 líneas de colza pertenecientes al Programa de Mejoramiento de INTA EEA Paraná. Dichas líneas inéditas fueron obtenidas, mediante cruzamientos artificiales específicos. Las poblaciones de las cuales provienen las líneas se condujeron mediante el método masal modificado, desde F₂ a F₆. En la generación F₆ (líneas a partir de plantas individuales seleccionadas en F₅) fueron evaluadas fenotípicamente para la reacción frente al patógeno mediante inoculaciones artificiales.

2. INOCULACIONES ARTIFICIALES

Inóculo

Luego de la determinación del grupo de patogenicidad de los tres aislamientos existentes, como se explica en el siguiente punto, se utilizó un aislamiento virulento local de *Phoma lingam* (Teleomorfo *L. maculans*) de la colección de aislamientos pertenecientes al Grupo de Genética, Mejoramiento y Biotecnología Vegetal de la EEA Paraná del INTA, previamente identificado por sus características morfológicas y culturales coincidentes con las descritas por Sutton (1980) para *P. lingam* (Schutt de Varini y Bessone, 2015). El mismo fue cultivado en placas de Petri de 9 cm de diámetro con medio APG 2% (Agar papa glucosado) durante 12 a 14 días en cámara de crecimiento, con una alternancia de 12 hs de luz NUV y 12 horas de oscuridad a 22-24 °C (± 3 °C), preparándose una suspensión de esporas en agua destilada estéril y ajustándose la concentración entre 5×10^5 - 1×10^7 conidios ml⁻¹ (Bansal et al., 2002) mediante el conteo en cámara de Neubauer.

Determinación del grupo de patogenicidad del aislamiento

Con el objetivo de determinar el grupo de patogenicidad (GP) de distintos aislamientos de *P. lingam* colectado en el área de influencia de la EEA Paraná, se llevaron a cabo inoculaciones artificiales utilizándolos cultivares diferenciales: Westar (sin gen de resistencia), Quinta (*Rlm1-4*) y Glacier (*Rlm2*, *Rlm3*). La interacción fenotípica con estos cultivares establece cuatro GP: GP1, avirulento en los tres cultivares; GP2, Westar susceptible, Quinta y Glacier

resistentes; GP3, Quinta medianamente resistente, Westar y Glacier susceptibles; GP4, Glacier, Quinta y Westar susceptible (Mengistu et al., 1991).

El ensayo se realizó en condiciones de invernáculo con fotoperiodo de 16 hs de luz y temperatura entre 15 – 25 °C. Para llevar a cabo la inoculación de los cultivares diferenciales se sembraron semillas de cada genotipo ensayado, y una vez emergidas, se dejaron cuatro plántulas de cada genotipo en tres macetas plásticas conteniendo sustrato de vermiculita esterilizado. Sobre los cotiledones de entre 12 y 15 días de edad, se realizaron lesiones con aguja histológica a ambos lados de la nervadura central y se inocularon, mediante micropipeta, con 10 µl de la suspensión de conidios sobre la herida (Bansal et al., 1994). Las plántulas inoculadas permanecieron cubiertas con polietileno asperjado con agua destilada, para mantener 100% de humedad relativa (HR) por 48 hs. Luego de las 48 hs, se retiró el polietileno y se mantuvieron las plantas en invernáculo hasta el momento de la evaluación, con control de temperatura y humedad. La evaluación de los síntomas de la interacción, se realizó mediante observación visual directa aplicando la escala de Williams (Williams, 1985) a los 14 días posteriores a la inoculación (dpi). Dicha escala abarca del 0 al 9, siendo 0 = sin síntomas visibles (completamente resistente); 1 = oscurecimiento limitado alrededor de la herida, con un diámetro entre 0.5 y 1.5 mm y pueden presentar halo clorótico; 3 = lesiones necróticas oscuras de 1.5 a 3 mm y posibilidad de halo clorótico; 5 = lesiones de 3 a 5 mm sin esporulación, lesión claramente delimitada por un margen negro, puede presentarse tejido colapsado de color verde-gris o mediante una necrosis oscura; 7 = tejido colapsado de 3 a 5 mm de diámetro y de color verde-gris, claramente delimitado sin márgenes oscuros y 9 = tejido colapsado con abundante formación de picnidios alrededor del área inoculada, con lesiones de más de 5 mm de diámetro y márgenes difusos (completamente susceptible).

Inoculaciones de las líneas experimentales

Con el mismo método descrito anteriormente para los cultivares diferenciales, para tres macetas de cada línea con cuatro plántulas cada una, se llevaron a cabo las inoculaciones de las 469 líneas del programa de mejoramiento, con el aislamiento local de *P. lingam*. A diferencia de la evaluación de los cultivares diferenciales, las líneas experimentales se evaluaron aplicando la escala de severidad adaptada de Bansal (Bansal et al., 1994, Tabla 1), a los 14 dpi. Esta escala es una escala adaptada de la de Williams (1985) y es una manera

más sencilla de seleccionar las interacciones fenotípicas entre el patógeno y los cotiledones. Se seleccionaron aquellos genotipos fenotípicamente resistentes (grados de severidad entre 0 y 1) y medianamente resistentes, (grados de severidad entre 1 y 2) según escala de Bansal (Tabla 1, Bansal et al., 1994, Bansal et al., 2002; de Souza, 2014). Los cultivares utilizados como controles fueron: Columbus (*Rlm1*, *Rlm3*), Darmor (*Rlm2*, *Rlm9*, *Lepr3*), Bristol (*Rlm2*, *Rlm9*), Quinta (*Rlm1-4*, *Rlm3*), Glacier (*Rlm2*, *Rlm3*), Westar (no *Rlm*), Dunckeld (*Rlm2*, *Rlm4*, *Rpg3Dun*), Surpass 400 (*Lepr3*, *BLMR2*), Falcom (*Rlm4*) y Jet Neurf (*Rlm4*).

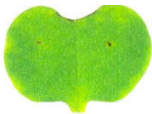
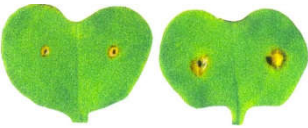
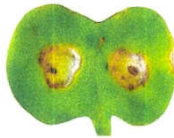
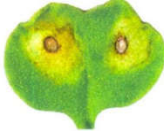

Grado	Síntomas de le enfermedad	
0	Sin síntomas visibles de la enfermedad	
1	Respuesta hipersensible alrededor de la herida (diámetro entre 0,5-3 mm)	
2	Tejido colapsado color verde grisáceo con margen distintivo y/o áreas necróticas	
3	Tejido colapsado color verde grisáceo con margen difuso en expansión. Pueden formarse picnidios	
4	La mayor parte del tejido con lesiones verde grisáceo colapsado con abundante formación de picnidios	

Tabla 1. Escala de Bansal (1994). Grados de severidad utilizados para la evaluación de las reacciones entre *B. napus* y *P. lingam* en cotiledones bajo condiciones de crecimiento en invernáculo. Valores promedio entre 0 – 1 se consideran resistentes, entre 1 – 2, medianamente resistentes.

3. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO

Se caracterizaron las condiciones ambientales de las dos campañas agrícolas (2014 y 2015) ya que son factores influyentes sobre el rendimiento y la calidad del grano. Para ello se tomaron en cuenta los datos registrados de precipitaciones y rangos de temperaturas del Observatorio Agro-meteorológico de la EEA Paraná.

CONDICIONES AMBIENTALES DEL CICLO DEL CULTIVO

Debido a que tanto el rendimiento como la calidad del aceite de colza se ven fuertemente afectados por las condiciones ambientales imperantes durante el crecimiento y desarrollo del cultivo, se realizó una caracterización de las temperaturas medias y precipitaciones durante los ciclos agrícolas 2014 y 2015. Los mismos se describen a continuación y los registros se muestran en la Tabla 2.

Mes	Precipitación (mm)			Temperatura (°C)			Lluvias (mm)			Temperatura (°C)		
	2014	Normal ¹	Diferencia	2014	Normal ¹	Diferencia	2015	Normal ¹	Diferencia	2015	Normal ¹	Diferencia
Enero	62,9	116,5	-53,6	26	24,9	1,1	245,3	115,8	129,5	24,9	24,9	0
Febrero	147,8	109,2	38,6	23,6	23,8	-0,2	149,9	109,8	40,1	24,3	23,8	0,5
Marzo	164,4	156,2	8,2	20,4	21,8	-1,4	137,3	156,3	-19	23	21,8	1,2
Abril	222,7	103,7	119	19,1	18,2	0,9	36,4	105,2	-68,8	21,7	18,2	3,5
Mayo	30,2	52,4	-22,2	15,7	15,4	0,3	87,5	52,1	35,4	18	15,4	2,6
Junio	8,2	39,2	-31	12,9	12,5	0,4	41,7	38,8	2,9	14,8	12,5	2,3
Julio	54	29	25	13,5	11,9	1,6	26,5	29,2	-2,7	13,5	12	1,5
Agosto	0	32,4	-32,4	15,8	13,4	2,4	105,1	32	73,1	16,3	13,4	2,9
Setiembre	80,5	53,7	26,8	17,1	15,3	1,8	21,9	53,7	-31,8	15,7	15,3	0,4
Octubre	70,2	106,6	-36,4	21,5	18,1	3,4	78,6	106,2	-27,6	17,7	18,2	-0,5
Noviembre	113	111,1	1,9	21,6	20,9	0,7	119,4	111	8,4	21,1	20,9	0,2
Diciembre	129,7	117,6	12,1	23,3	23,5	-0,2	124,5	117,6	7,1	24,2	23,5	0,7
Total	1083,6	1027,4	56,2				1174,1	1027,5	146,6			

Tabla 2. Precipitaciones y temperaturas medias mensuales de la EEA Paraná. Años 2014, 2015 y normal para cada año. ¹ Promedio histórico 1934-2013 en 2014 y Promedio histórico 1934-2014 en 2015. Fuente: Observatorio Agrometeorológico de la EEA Paraná.

2014.

PRECIPITACIONES. Las lluvias ocurridas a partir de febrero permitieron una recarga adecuada del perfil en los primeros meses de 2014 y no se observó estrés hídrico durante los meses de mayo y junio, a pesar de que las lluvias fueron menores de lo normal. Además, las precipitaciones totales durante el ciclo de cultivo fueron superiores al promedio normal (+ 56,2

mm). También se debe resaltar que en octubre las lluvias fueron menores a las esperadas (-36,4 mm).

TEMPERATURAS. Las temperaturas medias durante el ciclo de cultivo estuvieron por encima del promedio histórico (los meses de setiembre y octubre tuvieron, en promedio, 1,8 y 3,4°C por encima de la media).

2015.

PRECIPITACIONES. A diferencia del ciclo 2014, en 2015 las precipitaciones de otoño no permitieron una recarga adecuada del perfil. Posteriormente, durante septiembre y octubre se presentaron menores lluvias que el valor promedio histórico para esos meses (-31,8 mm y -27,6 mm, respectivamente). Las precipitaciones totales fueron superiores al normal (+146,6 mm).

TEMPERATURAS. Las temperaturas medias se caracterizaron por encontrarse, en promedio, por encima del promedio normal (10,6 °C en total), con excepción de octubre, donde el promedio fue 0,5°C inferior.

Para la evaluación del rendimiento de las líneas resistentes se realizaron ensayos comparativos de rendimiento (kg/ha) en las dos campañas: 2014 y 2015, en la EEA de INTA ubicada en la localidad de Oro Verde, Entre Ríos, a 12,5 km de la ciudad de Paraná. Los ensayos se implantaron según un diseño en bloque completamente aleatorizado (DBCA) con tres repeticiones y parcelas de 4,3 m². La densidad de siembra se estimó para lograr 80 plantas viables/m². Una vez obtenidos los datos de rendimiento, mediante el paquete estadístico InfoStat[®] (Di Rienzo et al., 2017), se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad (prueba de normalidad de Shapiro-Wilks y Q-Q plot) y de homocedasticidad (gráficos de dispersión de los residuos en función de los residuos predichos). En el análisis estadístico de los datos se incluyeron cuatro testigos comerciales, dado su alto rendimiento y calidad aceitera, los cuales se repitieron en ambas campañas. Éstos fueron: Rivette, Bioaureo 2486, Legacy y Hyola 76. Se procedió a realizar un ANOVA ($p=0,05$) con las correspondientes interacciones (línea*campaña, campaña>bloque) a ser evaluadas y prueba de comparación de medias para determinar las diferencias significativas, LSD Fisher.

4. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO DE ACEITE Y PERFIL DE ACIDOS GRASOS.

A las mismas líneas que resultaron fenotípicamente resistentes y fueron evaluadas en ensayos comparativos de rendimiento, se les determinó el contenido de aceite y perfil de ácidos grasos mediante un monocromador NIRs™ 2500 (NIRSystems, Silver Spring, USA), el cuál fue previamente calibrado para su utilización con colza. Este trabaja en un rango de onda de 400 nm a 2500 nm, con una cubeta circular de 50 mm de diámetro, a una resolución espectral de 0,5 nm (4200 datos por muestra). Las determinaciones fueron realizadas para las tres repeticiones de cada línea de ambas campañas (2014 y 2015). Para realizar las determinaciones se coloca 60 g de semillas en la cubeta y se procede a la lectura. Como testigo de alto porcentaje de aceite se utilizó el cultivar comercial Bioaureo 2386. Se obtuvo el perfil de los principales ácidos grasos: los saturados los cuales incluyen al ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0), araquídico (20:0), behénico (22:0) y lignocérico (24:0), e insaturados, determinándose oleico (18:1), linoleico (18:2), linolénico (18:3) y erúcico (22:1). Las significancias de las diferencias de los datos fueron analizadas mediante ANOVA ($p < 0.05$) con el paquete estadístico InfoStat® (Di Rienzo et al., 2017) y se aplicó la prueba de LSD de Fisher para la comparación de las medias. fue necesario para completar el análisis (Di Rienzo et al., 2017). Previamente se verificó el cumplimiento de los supuestos de normalidad y de homocedasticidad para cada ácido graso.

EVALUACIÓN GENOTÍPICA MEDIANTE MARCADORES MOLECULARES

5. 1. EXTRACCIÓN DE ADN

Al grupo de líneas que resultaron fenotípicamente resistentes al aislamiento de *Phoma lingam* utilizado, se les realizaron extracciones de ADN para evaluarlas genéticamente mediante diferentes marcadores moleculares asociados a genes de resistencia a dicho patógeno. Para ello se colectaron hojas verdes jóvenes de cada genotipo y se trituraron con N₂ líquido, en tubos plásticos descartables de 1.5 ml. Luego se les agregó 600 µl de solución de extracción (1,5 M TRIS-HCl pH 8.8, 0,5 M EDTA, 4M NaCl) y 200 µl de 20% Dodecil Sulfato Sódico (SDS). Se incubaron durante 30 minutos a 65°C en bloque seco, se les agregó 200 µl de 2,5M AcNa y se colocaron en hielo durante 20 minutos. A las muestras se les adicionó 400 µl de

cloroformo y se centrifugaron a 14000 rpm durante 20 min. Se recuperó la fase acuosa de cada muestra y se les añadió 500 µl de alcohol isopropílico para llevar nuevamente a centrifugación durante siete minutos a 14000 rpm. Al pellet obtenido se lo lavó tres veces con alcohol etílico 70 %, centrifugando siete minutos cada vez. El pellet resultante se dejó secar en cámara de flujo y se resuspendió en 100 µl de agua estéril libre de nucleasas. Luego fueron tratadas las muestras con ARNasa e incubadas 1 hs a 37°C o durante toda la noche a temperatura ambiente.

La calidad del ADN obtenido se corroboró en geles de agarosa al 1% (p/v), teñidos con Sybr Safe DNA Gel Stain® (Invitrogen™) y se visualizaron en transiluminador de luz azul. La cuantificación se realizó mediante lectura espectrofotométrica a 260/280 nm, considerando que $DO_{260}=1$ equivale a 50 µg/ml de ADN, utilizando un espectrofotómetro NanoDrop 8000 Thermo Fisher Scientific®.

5.2. IDENTIFICACIÓN DE LOS DIFERENTES *LOCI* DE RESISTENCIA A *PHOMA*

Mediante reacciones en cadena de la polimerasa (PCR) se amplificaron marcadores moleculares de diferentes tipos para la identificación de *loci* de resistencia a *P. lingam* disponibles en la bibliografía: microsatélites, SNPs, SCAR e InDel. La elección de estos genes se basó en primer lugar, en la mayor probabilidad de presencia de los mismos, dado el fondo genético de los parentales de donde provienen estas líneas, y en segundo lugar en las herramientas y equipamientos disponibles en el laboratorio para la realización de las reacciones de amplificación y visualización de los productos obtenidos. En todos los casos se utilizó un termociclador Veriti™ Thermal Cycle de Applied Biosystems. En la Tabla 3 se muestran los nombres y las secuencias de los marcadores utilizados (cebadores fabricados por Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, EE. UU), así como también la distancia respecto al alelo de resistencia (cM) o el tamaño de banda esperado (pb), según corresponda.

Locus	Nombre del Marcador	Tipo de marcador	Cebadores (s: sentido/ a: antisentido)	Distancia (cM) / Tamaño de banda (pb)
<i>Rlm3</i>	SNP80870	SNP	s: GAACCATCCCTTTCGACGTT a: AGCTAAATTCTCCCGCTGCT	3 cM
<i>BLMR2</i>	10B23a	SNP	s: GAAGTGGTAACCGAGAGACAA a: AGGCGAAACTTCATCAGAGCA	2.4 cM
<i>Rlm1</i>	Xol12-e03	SSR	s: CTTGAAGAGCTTCCGACACC a: GACGGCTAACAGTGGTGGAC	214 pb (R) / 128pb y 177 pb (NR)
	Xna12-a02a	SSR	s: AGCCTTGTTGCTTTTCAACG a: AGTGAATCGATGATCTCGCC	193 pb (R) / nulo (NR)
<i>Rlm4</i>	BRMS075	SSR	s: GTTTCACATATTTTCTCTGTTTATT a: ACCTTAAATGTTAAGTAAGCTAAAC	180 pb(R) / nulo (NR)
<i>Rpg3Dun</i>	BN204	SCAR	s: GGTGCAAACGATGTATTCAAGA a: GTTTGTAAAACCGACCTTCA	799 pb (R) / 499 pb (NR)
<i>LepR3</i>	Ind10-12	InDel	s: GGACGGTGCATGGGTGAATAACAG a: CGTTTGAAAACCGACCTTCA	506 pb (R) / 794 pb (NR)

Tabla 3. Descripción de los marcadores moleculares utilizados. Se indica su denominación, tipo de marcador, secuencias de los oligonucleótidos y las distancias o tamaños de bandas esperados.

- Identificación de *Rlm3* y *BLMR2*

Se utilizaron los marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) SNP80870 y 10B23a, los cuales están ligados a los loci *Rlm3* (Wang, 2013) y *BRLM2* (Long et al., 2011), respectivamente. Las condiciones de las amplificaciones y el programa de PCR utilizándose muestran en la Tabla4. Para su visualización, se resolvieron en geles de agarosa al 1,5% (p/v), sometidos a electroforesis a 100 V constantes durante 1 hora y se revelaron mediante tinción con Sybr Safe DNA Gel Stain® (Invitrogen™). Como controles positivos para el alelo asociado a la resistencia se utilizaron los cultivares comerciales Glacier (*Rlm3*) y Surpass 400 (*BLMR2*) y como control negativo, el cultivar Westar en ambos casos.

Reactivo	Concentración	Pasos	nº/ ciclos	Temperatura	tiempo
ADN	75 ng	I	1	95 °C	5 min
Buffer de reacción	1X	II	11	95 °C	30 s
MgCl ₂	1,5 mM			57 °C (-0.5°C /ciclo)	30 s
DNTPs	0.2 mM			72 °C	45 s
Cebador sentido	1 µM	III	24	95 °C	30 s
Cebador antisentido	1 µM			52 °C	30 s
H ₂ O _d	Csp/VF = 10 µl			72 °C	45 s
		IV	1	72 °C	5 min

Tabla 4. *Izquierda)* Reacciones de PCR realizadas para la identificación de los loci *BLMR2* y *Rlm3*. *Derecha)* Programa de PCR utilizado para ambos marcadores moleculares. *Csp*: cantidad suficiente para; *VF*: volumen final.

Las bandas de 1300 pb y 390 pb (putativamente correspondientes a *Rlm3* y *BLMR2*, respectivamente), fueron eluidas del gel, y disueltas en agua libre de nucleasas. La dilución obtenida fue utilizada para hacer una nueva amplificación de cada muestra, utilizando el protocolo anteriormente mencionado, y así purificar el amplicón. Los amplicones fueron posteriormente enviados a secuenciar a la Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG de INTA Castelar, a fin de determinar la secuencia e identidad de cada uno de ellos. Para ello se utilizaron los cebadores sentido y antisentido antes mencionados correspondientes a cada locus (*Rlm3* y *BLMR2*). Los archivos de la secuencia de cada amplicón fueron evaluados, ensamblados y editados con el software BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3 (Copyright © 1997-2005 Tom Hall). Para el caso de los amplicones obtenidos con el marcador 10B23a (*BLMR2*), fue necesario realizar una nueva purificación de los mismos en geles de poliacrilamida al 6% (p/v) y nuevamente reamplificados con las condiciones antes mencionadas. Posteriormente al análisis de las secuencias, se realizaron alineamientos mediante BLASTn (Zhang et al., 2000) contra la base de datos *RefSeq Genome Database* para confirmar la identidad de los fragmentos obtenidos. Se determinó la presencia o ausencia de la resistencia por *Rlm3* o *BLMR2* según las secuencias obtenidas.

- Identificación de Rlm1 y Rlm4

Utilizando los marcadores de tipo microsatélites (SSR: *Simple Sequence Repeat*) Xol12-e03/ Xna12-a02a, para el locus *Rlm1* (Raman et al., 2012a) y BRM075 (Raman et al., 2012b) para *Rlm4*, se llevaron a cabo las amplificaciones mediante PCRs de acuerdo a Raman et al., (2005). En la Tabla 5 se muestran las reacciones optimizadas para cada marcador y el programa de amplificación utilizado. Para el marcador Xol12-e03/ Xna12-a02a se utilizaron como cultivares control Quinta y Columbus, portadores del alelo de resistencia en el locus *Rlm1* y para BRM075 los cultivares Dunkeld y Quinta, resistentes por poseer el gen *Rlm4*. En ambos casos el genotipo Westar se utilizó como cultivar susceptible (no posee genes de resistencia). Las amplificaciones fueron resueltas en geles de poliacrilamida al 6% (p/v) (acrilamida: bisacrilamida 19:1), sometidos a electroforesis a 65 W constantes, 45 mA y 1400 V. Luego fueron visualizados mediante tinción con AgNO₃ (Bassam et al., 1991).

Reactivo	Concentración		Pasos	n°/ciclos	Temperatura	tiempo
	Xol12-e03/ Xna12-a02a	BRM075				
ADN	10 ng	50 ng	I	1	95 °C	5 min
Buffer de reacción	1X	2 X	II	6	95 °C	1 min
MgCl ₂	1,5 mM	1,5 mM			60 °C (-1°C /ciclo)	1 min
dNTPs	0.2 mM	0.2 mM			72 °C	1 min
Cebador sentido	0.25 μM	1 μM	III	34	95 °C	1 min
Cebador antisentido	0.25 μM	1 μM			55 °C	1 min
H ₂ O _d	Csp/VF = 10 μl	Csp/VF = 10 μl			72 °C	1 min
			IV	1	72 °C	5 min

Tabla 5. *Izquierda)* Reacciones de PCR realizadas para la identificación de los loci *Rlm1* y *Rlm4*. *Derecha)* Programa de PCR utilizado para ambos marcadores moleculares. Csp: cantidad suficiente para; VF: volumen final.

- Identificación de Rpg3Dun

Para la identificación del locus *Rpg3Dun* se utilizó el marcador SCAR (*Sequence Characterized Amplified Region*) BN204 (Dusabenyagasani et al., 2008). Las condiciones de las amplificaciones y el programa de PCR utilizado se exponen en la Tabla 6. La corrida electroforética se llevó a

cabo en geles de agarosa al 1,5 % (p/v) a 100 V constantes durante 1 hora. Luego se visualizaron los amplicones por tinción con Sybr Safe DNA Gel Stain® (Invitrogen™).

Los amplicones de 799 pb indican la presencia del alelo de resistencia, mientras que la presencia de un amplicón de 499 pb indicaría la ausencia de la resistencia conferida por el locus *Rpg3Dun*. Los cultivares Dunkeld (*Rpg3Dun* positivo) y Westar (sin gen de resistencia), fueron utilizados como controles.

Reactivo	Concentración	Pasos	nº/ ciclos	Temperatura	tiempo
ADN	20 ng	I	1	95 °C	5 min
Buffer de reacción	1X	II	11	95 °C	30 s
MgCl ₂	1,5 mM			57 °C (-0.5°C /ciclo)	30 s
dNTPs	0.2 mM			72 °C	45 s
Cebador sentido	1 µM	III	24	95 °C	30 s
Cebador antisentido	1 µM			52 °C	30 s
H ₂ O	Csp/VF = 10 µl			72 °C	45 s
		IV	1	72 °C	5 min

Tabla 6. Izquierda) Reacciones de PCR realizadas para la identificación del locus *Rpg3Dun*. **Derecha)** Programa de PCR utilizado para el marcador BN204. Csp: cantidad suficiente para; VF: volumen final.

-Identificación del locus *LepR3*

Para la identificación del locus *LepR3* se utilizó un marcador molecular tipo InDel (Inserción/Delección) el cual genera amplicones de 506 pb si está presente y de 794 pb si no lo está (Larkan et al., 2013). Como testigos se utilizaron los cultivares Surpass 400, como portador de *LepR3* (control positivo) y Westar como susceptible (control negativo). En la Tabla 7 se presentan las condiciones de las reacciones de amplificación mediante PCR. El programa utilizado fue el mismo que para el locus *Rpg3Dun* (Tabla 6, derecha), al igual que las condiciones de corrida electroforética y visualización, detallados anteriormente.

Reactivo	Concentración
ADN	40 ng
Buffer de reacción	1X
MgCl ₂	2,5 mM
dNTPs	0.2 mM
Cebador sentido	1 μM
Cebador antisentido	1 μM
H ₂ O _d	C _{sp} /V _F = 10 μl
BSA	200 ng/μl

Tabla 7. Reacciones de PCR realizada para la identificación del locus LepR3. C_{sp}: cantidad suficiente para; V_F: volumen final.

5. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS Y SELECCIÓN DE LÍNEAS PARENTALES PARA CRUZAMIENTOS ARTIFICIALES

Análisis multivariados de los datos fenotípicos

Para analizar las variables fenotípicas en conjunto, se analizaron las correlaciones entre las variables y se realizaron Análisis de Componentes Principales (ACP) entre las variables rendimiento, % aceite y contenido de los principales ácidos grasos insaturados con el programa InfoStat[®] (Di Rienzo et al., 2017). Se analizó de este modo, la interdependencia entre las distintas variables y los consecuentes gráficos biplots que representan la variabilidad las líneas para cada caso.

Análisis estadísticos de los datos genéticos

Para analizar los resultados de marcadores moleculares se utilizó el programa InfoGen[®] (Balzarini et al., 2016). Se realizaron análisis de clasificación (conglomerados), para formar grupos tal que los elementos de un grupo sean más parecidos entre sí que con los elementos de otro grupo, Se utilizó para la clasificación la técnica de conglomerados jerárquicos UPGMA (*Unweigthed Pair-Group Arithmetic Average Method*).

Análisis Procrustes Generalizado para la selección de líneas

Con el fin de hacer una correcta selección de líneas que sean portadoras de diferentes genes de resistencia y que además tengan buen rendimiento, alto contenido de aceite y adecuado perfil

de ácidos grasos, se analizaron los resultados obtenidos mediante análisis Procrustes generalizado (APG) con el paquete estadístico InfoStat® (Di Rienzo et al., 2017). Mediante esta técnica multivariada se pueden analizar variables de distinta naturaleza, como ser binarias (marcadores moleculares) y continuas (datos fenotípicos o morfológicos). Los sucesivos pasos o transformaciones que se realizan en éste incluyen normalización, rotación, reflexión y escalamiento de los datos bajo dos criterios: (1) que se mantengan las distancias Estadística multivariada entre los individuos de las configuraciones individuales, y (2) que se minimice la suma de cuadrados entre puntos análogos, es decir correspondientes al mismo elemento, y su centroide. La configuración de consenso se obtiene como la media de todas esas configuraciones individuales transformadas (Di Rienzo et al., 2017; Balzarini, 2016). Esta se puede realizar de dos maneras, una esa partir de los datos de las componentes principales para los datos fenotípicos (CP) provistos por el ACP y con los datos de las coordenadas principales (AcooP) para los datos genotípicos. La otra forma es partiendo de los datos genéticos como tal y los datos fenotípicos previamente estandarizados.

RESULTADOS

1. INOCULACIONES

1. 1. Evaluación para determinar el grupo de patogenicidad del aislamiento local de *Phoma lingam*

Las inoculaciones sobre los cultivares diferenciales Westar (sin gen de resistencia), Quinta (Rlm1,3-4) y Glacier (Rlm2, Rlm3), fueron realizadas para los tres aislamientos locales con los que se contaba, según protocolo de Mengistu (Mengistu et al., 1991). Los aislamientos presentaron diferencias tanto en el aspecto de la colonia como en el crecimiento y la producción de picnidios (Schutt de Varini y Bessone, 2015). Según la interacción fenotípica el aislamiento 1 presentó virulencia en Westar y Glacier, perteneciendo al GP3, tal como se muestra en la Figura 2. El aislamiento 2 no presentó virulencia, siendo entonces del PG1 y el aislamiento 3 fue virulento frente a los 3 cultivares (Schutt de Varini y Bessone, 2015). El aislamiento 1 fue el utilizado en el presente trabajo, siendo seleccionado por su capacidad de producir canchros en condiciones de invernáculo en ensayos previos (datos no publicados, Schutt, L.; comunicación personal). Estos resultados indicarían que el aislamiento no posee los alelos de avirulencia avrlm2 y avrlm3 (mostrado en la reacción contra Glacier).

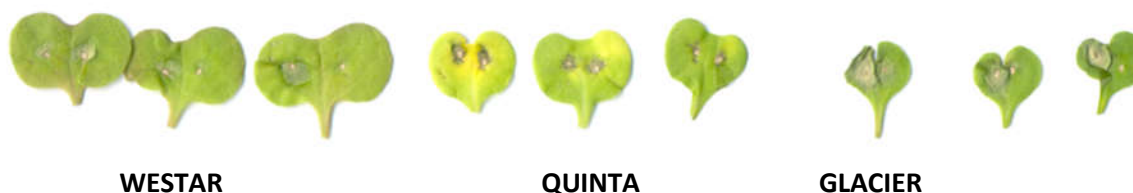


Figura 2. Resultado de las interacciones fenotípicas correspondientes a las inoculaciones de los cultivares diferenciales Westar, Quinta y Glacier, para determinar el grupo de patogenicidad del aislamiento de *Phoma lingam*.

1. 2. Evaluación de las inoculaciones artificiales de las líneas experimentales

Las evaluaciones de las inoculaciones artificiales se realizaron visualmente según la escala de Bansal (Bansal et al., 1994) a los 14 días post-inoculación. Se consideró completamente resistentes a aquellas líneas a las que le correspondieron valores de la escala entre 0 y 1 y moderadamente resistentes a aquellas cuyos valores de escala dieron entre 1 y 2, indicando la

presencia de uno o varios genes de resistencia al aislamiento utilizado (Figura 3). El resultado obtenido sobre las 469 líneas de trabajo inoculadas fue de 59 líneas resistentes a moderadamente resistentes, de las cuales el 53% resultó completamente resistente, mientras que 47% fueron moderadamente resistentes (Figura 4). En la Tabla 8 se muestran los valores promedios de la escala obtenidos para cada línea seleccionada, calculado sobre tres repeticiones de cada una. En la Tabla 8 A se muestran las líneas que resultaron completamente resistentes y en la Tabla 8 B las que fueron consideradas medianamente resistentes, con sus respectivos valores promedio. Cabe aclarar que fueron consideradas también líneas que dieron valores entre 2 y 2,5 como medianamente resistentes.

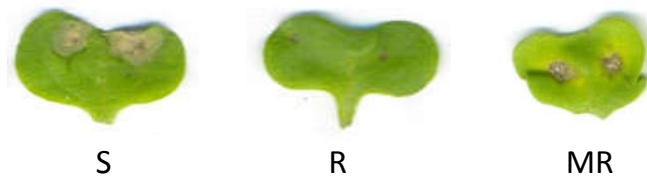


Figura 3. Evaluaciones fenotípicas correspondientes a reacciones Susceptibles (S), resistentes (R) y moderadamente resistentes (MR).

A)

Línea	Escala
32(2)C	0,00
47C	0,00
69(2)C	0,00
2C	0,25
3C	0,25
1C	0,25
1R	0,33
11L	0,33
49L	0,33
4C	0,50
42L	0,75
15L	0,75
8C	0,75
34C	0,75
26C	0,75
5L	0,75
77C	1,00
6R	1,00
7R	1,00
8R	1,00
10R	1,00
23R	1,00
53L	1,00
56L	1,00
62L	1,00
9L	1,00
32C	1,00
16C	1,00
22C	1,00
35C	1,00
32(3)C	1,00
34(3)C	1,00

B)

Línea	Escala
47(3)C	1,25
68L	1,25
15R	1,33
16C	1,33
69C	1,50
77L	1,50
32L	1,50
9C	1,50
17L	1,67
41L	1,67
49(2)L	1,67
4R	1,67
18R	1,75
38L	1,75
29C	2,00
18L	2,00
37L	2,00
52L	2,00
61C	2,00
74L	2,00
22(3)C	2,00
15(2)L	2,25
76C	2,33
16R	2,33
19R	2,33
14R	2,33
28R	2,33
71L	2,33

Tabla 8. A). Valores promedio de la escala de Bansal para las líneas que resultaron completamente resistentes (0 – 1). B). Valores promedio de la escala de Bansal para las líneas que resultaron moderadamente resistentes (1 – 2).

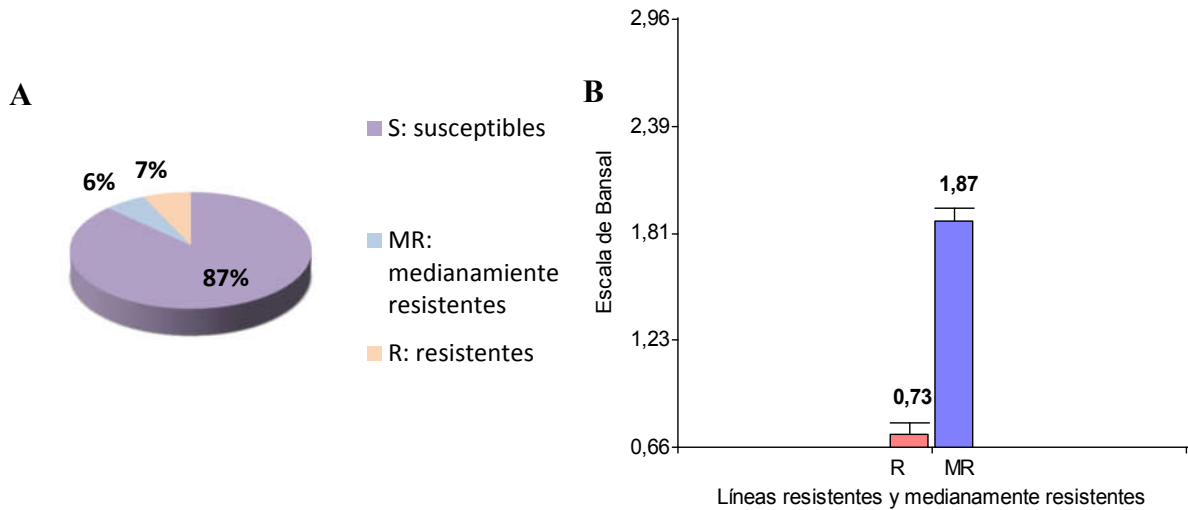


Figura 4. A) Gráfico de torta indicando las proporciones de las líneas de trabajo según las evaluaciones fenotípicas pos- inoculaciones. 87% (S) susceptibles, 7% (R) resistentes y 6% (MR) medianamente resistentes. **B)** Gráfico de barras indicando, dentro del total las líneas fenotípicamente resistentes seleccionadas, la media de la escala de Bansal para las líneas R (0.73) y MR (1.87).

Como se muestra en la Figura 4 B la media de la escala de Bansal para las líneas completamente resistentes fue de $0.73 \pm 0,06$ y para las medianamente resistentes de $1.87 \pm 0,08$. A continuación (Figura 5) se muestran las reacciones observadas para algunas líneas experimentales resistentes (R), medianamente resistentes (MR) y susceptibles (S), basándonos en la escala de Bansal.

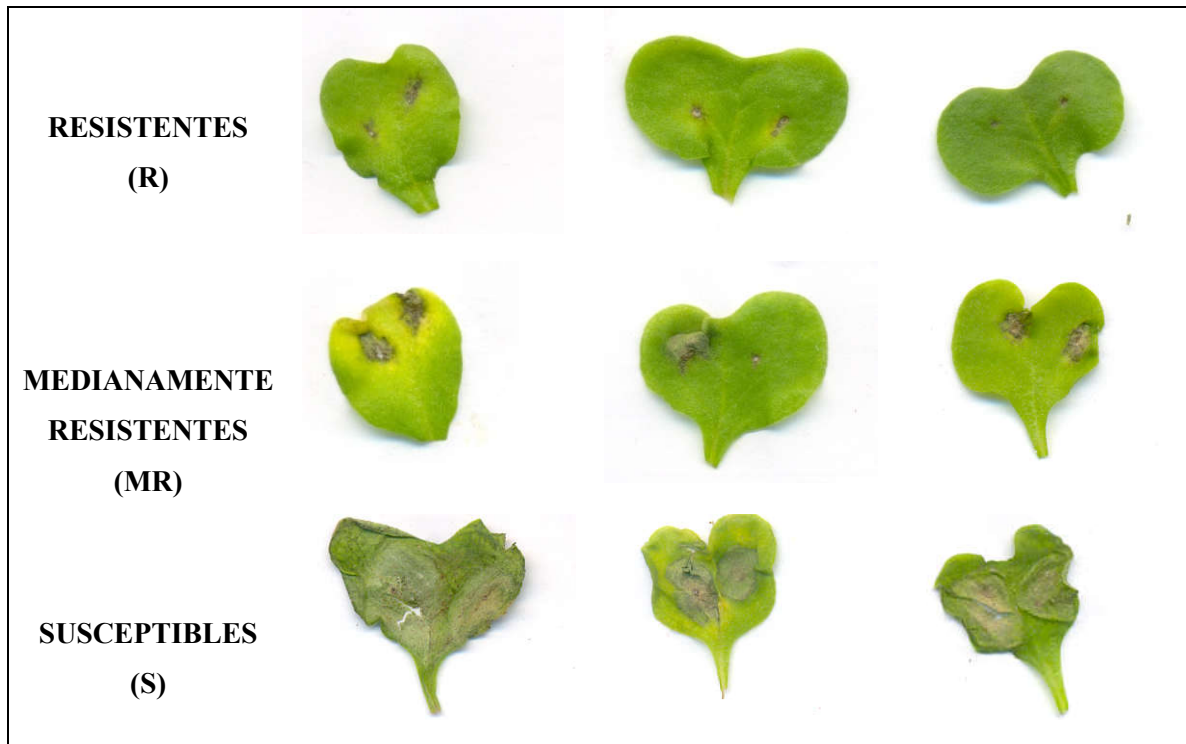


Figura 5. Interacciones fenotípicas observadas para algunas líneas de trabajo. Resistentes (izquierda a derecha): 1C, 42L y 49L. Medianamente resistentes: 15R, 16C y 41L. Susceptibles: 8L, 33C y 2L.

2. EVALUACIÓN DEL RENDIMIENTO

Los datos obtenidos de los ensayos comparativos de rendimiento (ECR) implantados en un diseño en bloques completos aleatorizados (DBCA) en las campañas 2014 y 2015, fueron analizados mediante un ANOVA ($\alpha = 0,05$) con el paquete estadístico InfoStat® (Di Rienzo et al., 2017), comprobando previamente que se cumplieran los supuestos de normalidad y homocedasticidad (datos no presentados). En la siguiente tabla se muestran los resultados obtenidos del ANOVA (Tabla 9). El modelo aplicado resultó significativo ($p < 0,0001$), con un coeficiente de variación de 13,29.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Rendimiento	355	0,52	0,25	13,29

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	32150921,17	127	253156,86	1,92	<0,0001	
Línea	17918591,89	61	293747,41	2,22	<0,0001	
Campaña	679871,22	1	679871,22	2,48	0,1901	(campaña>Bloque)
Campaña>Bloque	1094594,58	4	273648,64	2,07	0,0855	
Campaña*Línea	12457863,48	61	204227,27	1,55	0,0121	
Error	30001213,35	227	132163,94			
Total	62152134,52	354				

Tabla 9. Análisis de la varianza para la variable rendimiento.

Como puede observarse, hubo interacción significativa entre líneas y campaña ($p = 0,0121$), pero no de las repeticiones dentro de cada campaña ($p = 0,0855$). Se encontraron diferencias significativas entre líneas, es decir, tuvieron diferencias estadísticas en el rendimiento entre ellas ($<0,0001$). Debido a que el rendimiento de las líneas se vió afectado por el ambiente (campaña*línea), se procede a realizar el análisis estadístico separandolo por campañas. Se realizó también un análisis de comparación de medias DGC entre campañas (datos no mostrados) y en el mismo se observó que no hubo diferencias estadísticamente significativas entre campañas.

RENDIMIENTO CAMPAÑA 2014

El rendimiento promedio obtenido en esta campaña fue de $2686,49 \pm 339,92$ kg/ha, con un mínimo de 1093,00 kg/ha y un máximo de 3698,00 kg/ha. Como se observa en los resultados en los análisis realizados en InfoStat® (Di Rienzo et al., 2017) (Tabla 10), las líneas presentaron diferencias significativas entre ellas ($p < 0,0001$) y entre bloques ($p = 0,0011$). Cuando se realizó la prueba de comparación de medias de Fisher (anexo, Tabla A1), se obtuvo que el único cultivar que presentó significativamente menor rinde fue el testigo Legacy. Un grupo de 15 líneas experimentales superaron en rendimiento al testigo más rendidor.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
rendimiento 2014	166	0,65	0,43	9,54

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	12427916,81	64	194186,20	2,96	<0,0001
línea	11472990,81	62	185048,24	2,82	<0,0001
Bloque	954926,00	2	477463,00	7,27	0,0011
Error	6637124,66	101	65714,11		
Total	19065041,48	165			

Tabla 10. Análisis de la varianza para la variable rendimiento de la campaña 2014.

En la prueba de Fisher podemos observar que existen diferencias estadísticamente significativas entre líneas, pudiéndose destacar que las líneas 49L y 4C presentaron los valores más altos de rendimiento y que junto con 5 líneas más superan en el rinde al testigo comercial más rendidor, Bioaureo 2486.

RENDIMIENTO CAMPAÑA 2015

El rendimiento promedio obtenido en esta campaña fue de $2783,56 \pm 457,37$ kg/ha, con un mínimo de 1360,00 kg/ha y un máximo de 3814,00 kg/ha. Como puede observarse en el resultado del análisis de esta campaña (Tabla 11), la variable rendimiento presentó diferencias significativas entre líneas ($p = 0,0004$), por lo que se realizó a continuación la prueba de comparación de medias de Fisher (Tabla A2, anexo).

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
rendimiento 2015	189	0,51	0,25	14,21

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	19916250,41	64	311191,41	1,99	0,0006
línea	19701402,00	62	317764,55	2,03	0,0004
Bloque	214848,41	2	107424,21	0,69	0,5054
Error	19411316,25	124	156542,87		
Total	39327566,67	188			

Tabla 11. Análisis de la varianza para la variable rendimiento de la campaña 2015.

Para esta campaña, podemos decir que la línea experimental 77C presentó el mejor rendimiento y un grupo de líneas (7R, 4R, 8C, 9C, 16C, 62L, 1C, 49(2)L, 22(3)C, 15R, 74L y 15(2)L) mostraron buenos rendimientos, junto con los testigos Rivette, Bioaureo2486 y Hyola 76. En el

test se puede visualizar que existen diferencias estadísticamente significativas entre líneas, como por ejemplo entre 77C y 37L.

Considerando las dos campañas analizadas, se puede destacar que las siguientes líneas mostraron altos rendimientos en ambas campañas: 77C, 4R, 62L, 74L y 15(2)L.

3. DETERMINACIÓN DEL CONTENIDO ACEITE Y PERFIL DE ACIDOS GRASOS.

3.1. CONTENIDO DE ACEITE

Para analizar el contenido de aceite de las líneas seleccionadas se realizó un ANOVA, comprobado el cumplimiento de los supuestos de normalidad y homocedasticidad de residuos, mediante el análisis de Shapiro-Wilks y gráficos de dispersión entre los residuos de la variable en función de los predichos, respectivamente (datos no mostrados). El modelo resultó significativo, con un ajuste del 76% (R^2). De acuerdo a lo que se observa en el resultado del ANOVA (Tabla 12), en el análisis considerando las dos campañas de evaluación, la interacción línea*campaña resultó altamente significativa ($G \times E$, $p < 0,0001$), indicando esto que el comportamiento de las líneas no fue independiente respecto de la campaña, por lo que se analizaron los datos de cada campaña por separado.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% aceite	356	0,84	0,76	2,45

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	(Error)
Modelo.	1362,50	123	11,08	9,98	<0,0001	
Línea	616,01	59	10,44	9,40	<0,0001	
Bloque	0,97	2	0,48	0,44	0,6477	
Campaña	93,33	1	93,33	208,160	0,0048	(campaña>Bloque)
Campaña>Bloque	0,90	2	0,45	0,40	0,6683	
Línea*campaña	651,30	59	11,04	9,94	<0,0001	
Error	257,61	232	1,11			
Total	1620,11	355				

Tabla 12. Análisis de la varianza para la variable % aceite.

Mediante la prueba de comparación de medias DGC (Di Rienzo, Guzmán y Casanoves), mostrado en la siguiente Tabla (Tabla 13), puede observarse que la campaña 2014 presentó una media

mayor de la variable % de aceite, con diferencias estadísticamente significativas con la campaña 2015. La distribución de la variable para ambas campañas se muestra a continuación en el diagrama de cajas y bigotes. En el mismo se puede distinguir que la media para la campaña 2014 se encuentra en el cuantil 0,25 y para la campaña 2015 en el cuantil 0,75 (Figura 6).

Test: DGC Alfa= 0,05 PCALT= 0,1396				
Error: 0,4483 gl: 2				
Campaña	Medias	n	E.E.	
2015	42,52	179	0,05	A
2014	44,39	177	0,05	B

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tabla 13. Prueba de medias DGC entre ambas campañas para la variable % aceite.

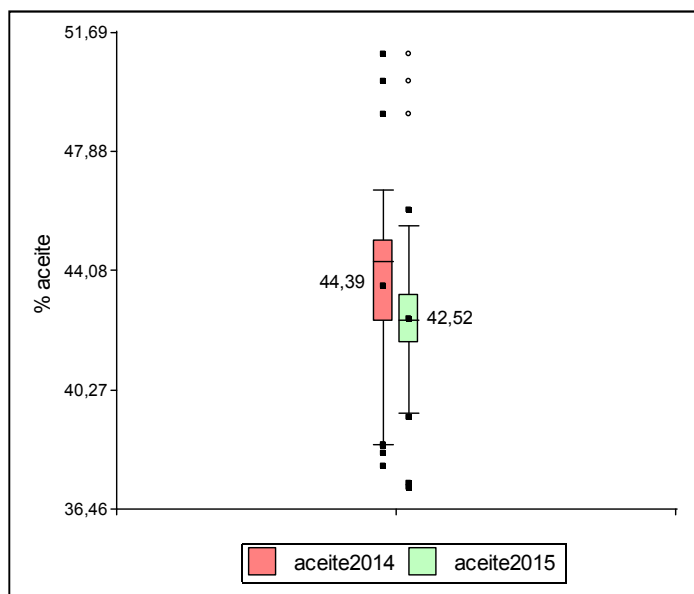


Figura 6. Diagrama de cajas y bigotes de la variable % de Aceite por campaña. En rosa se muestra el diagrama para la campaña 2014, con una media de 44,39% y en verde el correspondiente a la campaña 2015, con una media de 42,53 %.

Por lo tanto, para poder sacar conclusiones respecto a la variable contenido de aceite, se analizaron las dos campañas por separado.

Análisis de la campaña 2014

Como puede observarse en la siguiente tabla (Tabla 14), el efecto línea dentro del modelo fue altamente significativo ($p < 0,0001$), es decir, existen diferencias estadísticas entre las líneas

experimentales. El modelo aplicado resultó altamente significativo, con un ajuste del 91%. Se realizó entonces la prueba de comparación de medias de Fisher (Tabla A3, anexo). En la misma se pueden ver las diferencias entre líneas, siendo 76C, 9C, 32(3)C, 34(3)C y 32C las cinco líneas que tuvieron mayores porcentajes de aceite, y estadísticamente diferentes a 10R, 1R, 16R, 7R y 18R, las cuáles presentaron los porcentajes más bajos.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% aceite 2014	177	0,91	0,87	1,96

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	898,19		61	14,72	20,21 <0,0001
línea	897,30		59	15,21	20,87 <0,0001
Bloque	0,90		2	0,45	0,61 0,5427
Error	83,80		115	0,73	
Total	981,99		176		

Tabla 14. Análisis de la varianza para la variable % aceite 2014.

Análisis de la campaña 2015

Del mismo modo que la campaña 2014, para la variable contenido de aceite, existen diferencias estadísticamente significativas (Tabla 15) entre líneas ($p < 0,0001$), por lo que se realizó una prueba de comparación de medias Fisher (Tabla A4, anexo). La línea que se destacó para esta variable fue 6R, seguida de las líneas 19R, 18R, 1R, 8R y 9L.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
% aceite 2015	180	0,68	0,52	2,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	375,71		62	6,06	4,24 <0,0001
línea	374,44		60	6,24	4,37 <0,0001
Bloque	1,28		2	0,64	0,45 0,6413
Error	167,26		117	1,43	
Total	542,97		179		

Tabla 15. Análisis de la varianza para la variable % aceite 2015.

En líneas generales puede observarse que el contenido de aceite en grano dio resultados homogéneos entre repeticiones, con un coeficiente de variación (CV) de 1,96 y 2,83 para ambas campañas: 2014 y 2015, respectivamente.

3.2. PERFIL DE ÁCIDOS GRASOS

Se realizó la determinación del perfil completo de ácidos grasos, pero para el análisis final sólo se tuvieron en cuenta los principales ácidos grasos insaturados por su relevancia en la calidad del aceite que se obtiene: *ácido oleico*, *linoleico (leico.)*, *linolenico (nico.)* y *erúcico (eríc.)*. Se realizaron análisis descriptivos para cada variable y gráficos de caja y bigote para las dos campañas evaluadas. El perfil de los ácidos grasos considerados arrojó como resultado los valores (expresados en %) que se muestran en la Tabla 15.

En la Figura 7, se muestran diagramas de caja y bigote para los principales ácidos grasos insaturados oleico, linoleico, linolenico y erúcico, para visualizar la distribución de cada variable según la campaña (2014 y 2015). Se muestra en cada uno la media correspondiente. Como se puede ver, las medias de cada uno se distribuyeron de manera similar en las dos campañas. Para oleico, se encuentran en el cuantil 0.75, para linoleico y linolenico en el cuantil 0,25 y para erúcico en el 0,5.

LINEA	oleico.2014	leico. 2014	nico. 2014	erúc. 2014	oleico.2015	leico.2015	nico.2015	erúc.2015
10R	64,09	18,78	8,7	0	62,24	19,32	9,98	0,05
11L	61,16	19,53	10,99	0,11	62,02	19,55	10,11	0,03
14R	63,49	18,58	9,29	0,01	62,1	19,2	10,16	0,1
15L	62,55	18,85	10,01	0,1	61,81	19,24	10,46	0,1
15(2)L	61,52	19,64	10,31	0,18	61,39	19,62	10,59	0,12
15R	64,49	17,91	8,58	0,07	62,75	18,53	9,83	0,19
16C	61,15	19,41	10,88	0,23	60,91	19,95	10,77	0,14
16R	63,03	19,3	9,2	0	62,16	19,4	10,06	0,04
17L	62,53	18,53	10,11	0,2	62,12	19,09	10,16	0,14
18L	61,72	19,3	10,57	0,07	61,45	19,46	10,65	0,11
18R	63,52	18,79	9,01	0,01	61,56	19,27	10,74	0,11
19R	62,62	19,25	9,5	0,07	60,82	19,63	11,09	0,21
1C	61,34	19,52	10,68	0,14	60,99	19,92	10,77	0,11
1R	63,31	19,03	9,09	0	61,02	19,6	11	0,15
22C	60,5	19,83	11,3	0,2	60,93	20,03	10,74	0,11
22(3)C	61,85	18,95	10,44	0,22	62,05	19,09	10,14	0,19
23R	62,92	18,87	9,66	0,03	62,13	18,84	10,47	0,1
26C	61,03	19,02	11,04	0,39	61,79	18,99	10,42	0,25
28R	63,1	18,86	9,42	0,03	62,66	18,82	9,89	0,09
29C	61,42	18,99	10,8	0,29	60,89	19,52	10,97	0,27
2C	61,32	18,99	10,94	0,28	61,52	19,55	10,37	0,17
32C	60,22	19,87	11,52	0,24	61,6	19,59	10,37	0,09
32(2)C	61,09	19,35	10,85	0,29	61,24	19,51	10,67	0,2
32(3)C	61,81	18,43	10,95	0,28	62,88	18,27	9,97	0,17
32L	60,96	19,46	11,03	0,25	61,63	19,43	10,39	0,15
34C	60,67	19,77	11,08	0,23	62,06	19,27	10,07	0,13
34(3)C	62,14	18,36	10,74	0,22	63,04	18,69	9,55	0,1
35C	62,01	18,48	10,67	0,26	61,62	19,47	10,33	0,17
37L	61,35	19,93	10,47	0,07	61,43	19,82	10,48	0,04
38L	61,66	19,32	10,66	0,08	61,38	19,85	10,46	0,06
3C	61,69	18,81	10,76	0,24	62,21	19,23	9,89	0,16
41L	61,57	19,54	10,61	0,04	61,47	19,66	10,61	0,03
42L	60,92	19,77	11,01	0,12	63,14	18,45	9,72	0,07
47C	61,94	18,59	10,53	0,3	62,26	19,09	9,78	0,23
47(3)C	61,65	18,53	10,91	0,33	61,83	19	10,4	0,24
49L	61,65	19,47	10,45	0,11	61,39	19,58	10,63	0,12
49(2)L	62,7	18,27	10,19	0,19	62,3	18,5	10,42	0,2
4C	61,23	19,2	10,96	0,23	61,03	19,89	10,67	0,17
4R	63,71	18,65	8,97	0,01	61,48	19,49	10,64	0,11
52L	61,1	19,82	10,69	0,15	61,28	19,72	10,62	0,12
53L	61,46	19,41	10,5	0,22	61,09	19,94	10,65	0,1
56L	60,73	19,89	11	0,2	60,59	20,03	11,03	0,17
5L	61,64	19,77	10,29	0,05	61,31	19,66	10,71	0,07
61C	62,6	18,17	10,4	0,2	62,38	18,66	10,22	0,15
62L	61,59	19,7	10,33	0,07	61,39	19,9	10,34	0,09
68L	60,7	19,85	11,09	0,17	61,19	20,06	10,4	0,09
69C	60,93	19,64	10,99	0,19	61,18	19,78	10,65	0,13
69(2)C	61,61	19,41	10,61	0,09	61,65	19,61	10,37	0,05
6R	62,95	19,28	9,27	0,01	61,3	19,23	10,98	0,17
71L	61,81	18,94	10,35	0,29	61,87	19	10,34	0,22
74L	61,55	19,44	10,57	0,12	61,05	19,71	10,83	0,15
76C	60,88	19,35	11,02	0,34	61,62	19,21	10,45	0,22
77C	60,62	19,85	11,11	0,19	61,2	19,83	10,6	0,12
77L	61,65	19,4	10,52	0,1	61,38	19,5	10,78	0,1
7R	62,63	19,6	9,35	0	61,54	19,5	10,58	0,07
8C	60,52	19,39	11,32	0,37	61,13	19,64	10,59	0,27
8R	63,13	18,86	9,41	0,04	61,24	19,53	10,71	0,2
9C	60,97	19,35	11,14	0,24	60,87	19,73	10,95	0,19
9L	61,73	19,02	10,48	0,25	61,69	19,25	10,38	0,21

Tabla 15. Contenido de los principales ácidos grasos insaturados (%): se muestra el contenido de los principales ácidos grasos para cada línea experimental, por campaña de evaluación. Ácido oleico, linoleico (leico.), linolenico (nico.) y erúcico (erúc.). Las dos campañas evaluadas 2014 y 2015.

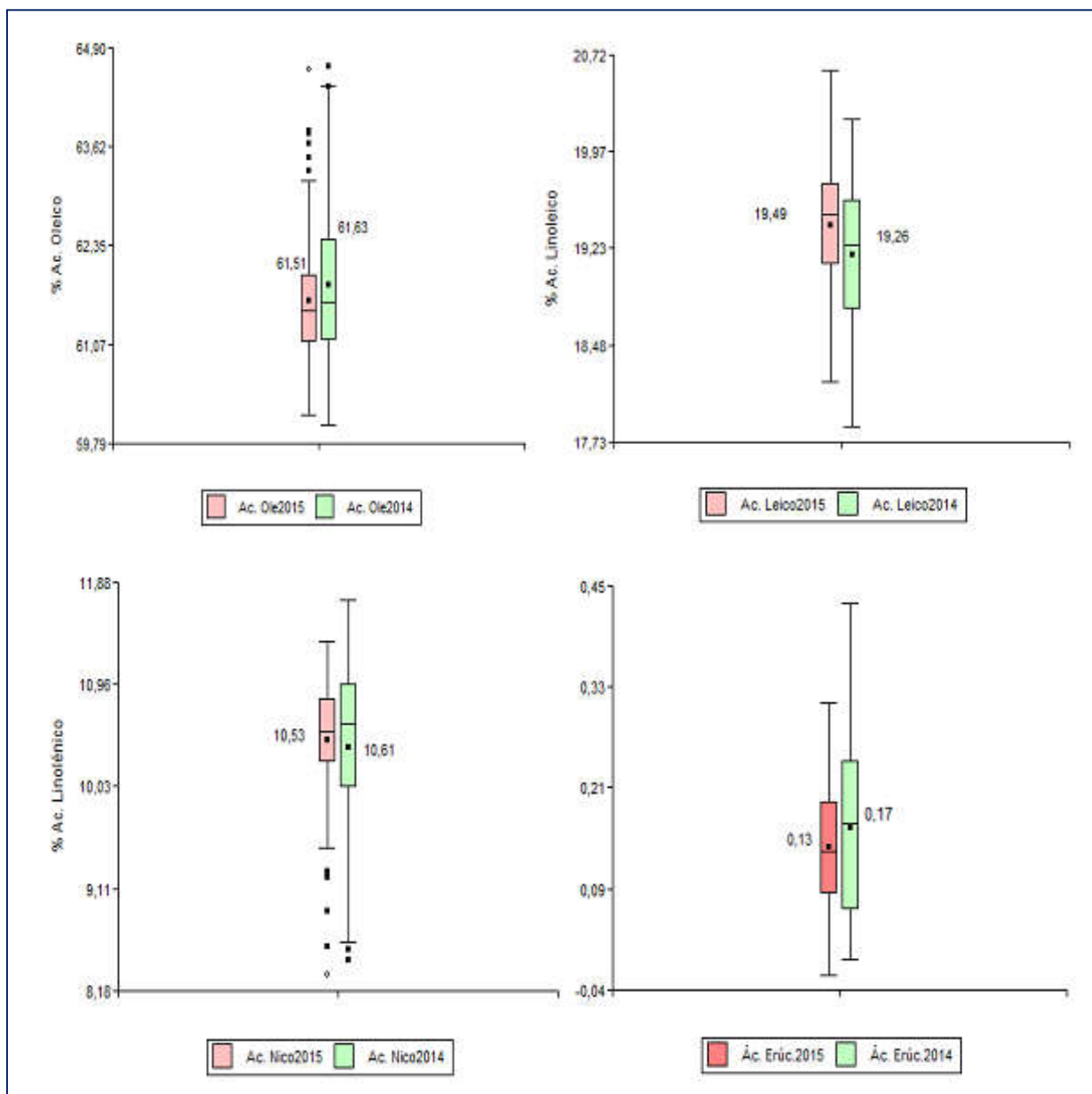


Figura 7. Diagramas de caja y bigote entre las campañas 2014 y 2015, para los principales ácidos grasos insaturados. (a) % Ácido Oleico (b) % Ácido Linoleico (c) % Ácido Linolénico (d) % Ácido Erúico. En cada caso se muestran las medias correspondientes a cada campaña (verde 2014 y rosa 2015).

Una vez comprobado que se cumplen los supuestos que establece el modelo, se realizaron los ANOVAs para cada composición de ácido graso (Ac. Ole., Ac. Nico, Ac. Leico y Ac. Eru.). Como se muestra en la Tabla 16 de resultados del análisis obtenida mediante InfoStat® (Di Rienzo et al., 2017), en todos los ácidos grasos considerados, se encontraron interacción con el ambiente (línea*campaña) significativas, por lo que se analizaron por campaña. Los CV fueron

bajos indicando baja variación y resultados homogéneos, excepto para Ac. Erúcico, cuyo contenido fue más variable (CV: 32,82).

Ácido Oleico				
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ac. Ole	353	0,80	0,70	0,79

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		224,34	118	1,90	8,00	<0,0001
CAMPAÑA		4,03	1	4,03	16,97	0,0001
LÍNEA 146,59	59	2,48	10,46			<0,0001
CAMPAÑA*LÍNEA	73,71	58	1,27	5,35		<0,0001
Error		55,59	234	0,24		
Total		279,93	352			

Ácido linoleico				
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ac. Leico	353	0,85	0,77	1,28

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		78,77	118	0,67	10,87	<0,0001
CAMPAÑA		4,45	1	4,45	72,44	<0,0001
LÍNEA 63,32	59	1,07	17,48			<0,0001
CAMPAÑA*LÍNEA	11,00	58	0,19	3,09		<0,0001
Error		14,37	234	0,06		
Total		93,14	352			

Ácido linolénico				
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ac. Nico	353	0,79	0,69	3,40

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		112,75	118	0,96	7,60	<0,0001
CAMPAÑA		0,31	1	0,31	2,44	0,1198
LÍNEA 57,76	59	0,98	7,79			<0,0001
CAMPAÑA*LÍNEA	54,69	58	0,94	7,50		<0,0001
Error		29,40	234	0,13		
Total		142,16	352			

Ácido Erúcico				
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ac. Erúc.	353	0,83	0,75	32,82

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)						
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor	
Modelo.		2,73	118	0,02	9,82	<0,0001
CAMPAÑA		0,04	1	0,04	18,82	<0,0001
LÍNEA 2,13	59	0,04	15,30			<0,0001
CAMPAÑA*LÍNEA	0,56	58	0,01	4,08		<0,0001
Error		0,55	234	2,4E-03		
Total		3,28	352			

Tabla 16. ANOVAs de los principales ácidos grasos insaturados: ácido oleico, linoleico, linolenico y erúcico.

Se realizaron luego los ANOVAs para cada composición de ácido graso por campaña (2014: Tabla 17, 2015: Tabla 18). Como resultado en todos los casos el efecto de línea fue significativo (<0,0001), por lo que se realizaron las correspondientes pruebas de comparación de medias de Fisher (Tablas A5 y A6, anexo).

CAMPAÑA 2014

Ácido Oleico 2014					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Ac. Ole2014	176	0,92	0,89	0,55	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	161,99	58	2,79	24,36	<0,0001
línea	161,99	58	2,79	24,36	<0,0001
Error	13,42	117	0,11		
Total	175,40	175			
Ácido Linoleico 2014					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Ac. Leico2014	176	0,86	0,79	1,28	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	42,47	58	0,73	12,14	<0,0001
línea	42,47	58	0,73	12,14	<0,0001
Error	7,06	117	0,06		
Total	49,53	175			
Ácido Linolénico 2014					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Ac. Nico2014	176	0,92	0,89	2,45	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	91,20	58	1,57	24,33	<0,0001
línea	91,20	58	1,57	24,33	<0,0001
Error	7,56	117	0,06		
Total	98,77	175			
Ácido Erúcico 2014					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Ác. Erúc.2014	176	0,93	0,90	22,73	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	2,03	58	0,04	26,73	<0,0001
línea	2,03	58	0,04	26,73	<0,0001
Error	0,15	117	1,3E-03		
Total	2,18	175			

Tabla 17. ANOVAs de los principales ácidos grasos insaturado para la campaña 2014: ácido oleico, linoleico, linolenico y erúcico.

CAMPAÑA 2015

Ácido Oleico 2015					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Ac. Ole2015	177	0,58	0,37	0,97	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	58,32	58	1,01	2,81	<0,0001
línea	58,32	58	1,01	2,81	<0,0001
Error	42,18	118	0,36		
Total	100,50	176			
Ácido Linoleico 2015					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Ac. Leico2015	177	0,81	0,72	1,28	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	31,85	58	0,55	8,86	<0,0001
línea	31,85	58	0,55	8,86	<0,0001
Error	7,31	118	0,06		
Total	39,17	176			
Ácido Linolénico 2015					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Ac. Nico2015	177	0,49	0,24	4,12	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	21,24	58	0,37	1,98	0,0009
línea	21,24	58	0,37	1,98	0,0009
Error	21,84	118	0,19		
Total	43,08	176			
Ácido Erúcido 2015					
Variable	N	R ²	R ² Aj	CV	
Ác. Erúc.2015	177	0,62	0,44	42,49	
Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)					
F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	0,66	58	0,01	3,35	<0,0001
línea	0,66	58	0,01	3,35	<0,0001
Error	0,40	118	3,4E-03		
Total	1,06	176			

Tabla 18. ANOVAs de los principales ácidos grasos insaturado para la campaña 2015: ácido oleico, linoleico, linolenico y erúcido.

De los resultados de la prueba de comparación de medias (Tablas A5 y A6, anexo) se puede resaltar que las líneas que se destacaron en cada ácido graso y campaña fueron las siguientes (Tabla 19):

Ácido graso	Líneas destacadas 2014	Líneas destacadas 2015
Ac. Oleico	10R y 15R	11L, 22(3)C, 34C, 14R, 17L, 23R, 16R, 3C, 10R, 47C, 49(2)L, 61C, 28R, 15R, 32(3)C, 34(3)C y 42L
Ac. Linoleico	15R	32(3)C, 42L, 49(2)L, 15R, 61C, 34(3)C, 28R y 23R
Ac. Linolénico	10R y 15R	34(3)C, 42L, 47(2)L, 15R, 28R, 3C, 32(3)C, 10R, 16R, 34C, 11L, 22(3)C, 17L, 14R y 61C
Ac. Erúxico	7R, 10R, 16R, 1R, 14R, 18R, 4R, 23R, 28R, 41L, 8R y 5L	41L, 11L, 16R, 37L, 10R, 69L, 38L, 42L, 5L, 7R, 32C, 69C, 62L, 28R, 15L, 77L, 23R, 53L, 14R, 34(3)C, 18L

Tabla 19. Líneas destacadas por sus contenidos de los ácidos grasos principales. Se muestran las líneas que tuvieron mejores contenidos de cada ácido graso en ambas campañas de evaluación (2014 y 2015).

4. ANÁLISIS MULTIVARIADOS

Para observar el comportamiento entre las variables fenotípicas rendimiento, % aceite y contenido de ácidos grasos, se realizaron análisis de componentes principales (ACP), con sus respectivos gráficos biplot, para cada campaña.

CAMPAÑA 2014

Como se observa en el gráfico biplot y en la siguiente Tabla (Figura 8 y Tabla 20), la CP1 (59.9 %) opone la variable ácido oleico del resto de las variables y ésta posee el valor negativo más alto (autovectores). En cambio, la CP2 (21.8 %) explica la separación entre líneas por las variables rendimiento y ácido linoleico, las cuales tienen los pesos positivos más altos. Con estas dos componentes se explica el 81% de la variación total. Como se puede observar en la matriz de correlación (*Pearson*), hay una fuerte correlación negativa entre ácido oleico y % aceite (-0,81) y entre ácido oleico y el resto de los ácidos grasos polinsaturados. Dentro de las asociaciones positivas más fuertes, se pueden destacar las que se producen entre las variables ácido linolénico y % aceite (0.93) y entre los contenidos de ácido linolénico y ácido linoleico (0,44).

a) Matriz de correlación (Coeficientes) y Probabilidades						
	% ACEITE	Rendimiento	oleico.	leico.	nico.	erúc
% ACEITE	1,00	0,4210	<0,0001	0,1576	<0,0001	<0,0001
Rendimiento	0,11	1,00	0,5823	0,3332	0,5517	0,2007
oleico.	-0,81	-0,07	1,00	<0,0001	<0,0001	<0,0001
leico.	0,19	0,13	-0,68	1,00	0,0004	0,6420
nico.	0,93	0,08	-0,95	0,44	1,00	<0,0001
erúc.	0,77	-0,17	-0,63	-0,06	0,74	1,00

B) Autovalores				C) Autovectores		
Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum	Variables	e1	e2
1	3,59	0,60	0,60	% ACEITE	0,49	-0,16
2	1,29	0,22	0,81	Rendimiento2014	0,04	0,54
3	0,92	0,15	0,97	oleico.2014	-0,51	-0,18
4	0,17	0,03	1,00	leico. 2014	0,25	0,65
5	0,03	4,4E-03	1,00	nico. 2014	0,52	-5,9E-04
6	9,1E-04	1,5E-04	1,00	erúc. 2014	0,41	-0,48

Tabla 20. A) Matriz de correlación/probabilidades. Entre las variables rendimiento, % aceite, Ác. oleico, Ác. Linoleico (leico), Ác. Linolenico (nico) y Ác. Erúcico. Diagonal superior probabilidades, diagonal inferior coeficientes de Pearson. En verde se resaltan las correlaciones positivas más importantes y en rojo las negativas. **B) Autovalores del ACP C) Autovectores del ACP.**

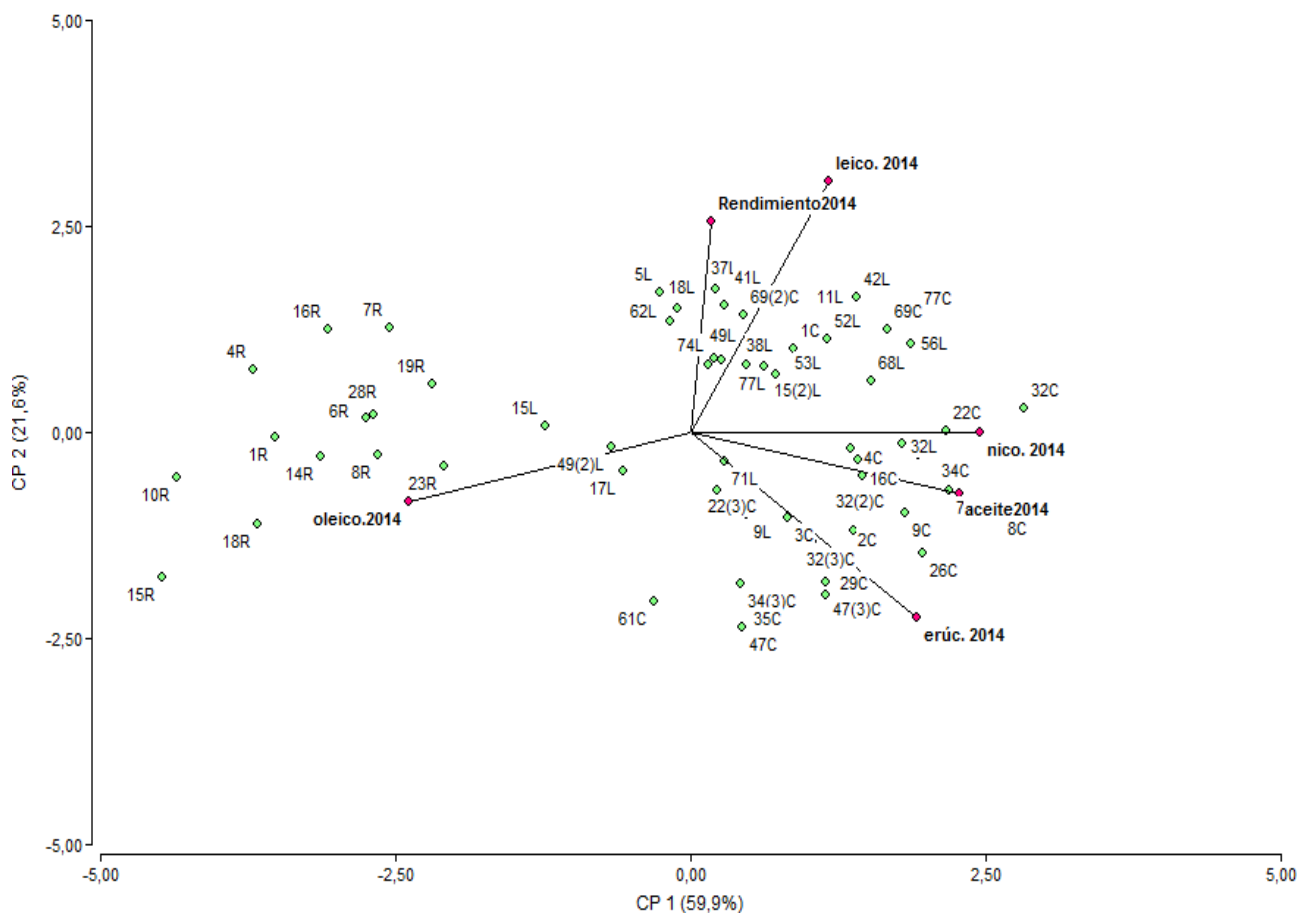


Figura 8. Biplot resultante del ACP entre las variables rendimiento, % aceite y los contenidos de ácidos grasos (leico: ácido linoleico., oleico: ácido oleico., nico: ácido linolénico y erúc: ácido erúcico.) para la campaña 2014.

CAMPAÑA 2015

Como se puede ver en la Tabla 21 y Figura 9, para la campaña 2015, la CP1 (50,9%) opone las diferencias entre ácido oleico y el resto de las variables, coincidente con lo encontrado para la campaña anteriormente analizada. En esta componente la variable ácido oleico recibe el único peso positivo y las variables ácido linolénico y ácido linoleico los pesos negativos más altos. La CP2 (21,1 %) explica las diferencias debidas a las variables rendimiento y ácido linoleico del resto, las cuáles reciben el peso negativo más alto. El peso positivo más alto para esta componente lo recibe la variable ácido erúcico. Ambas CP explican el 72% de la variación total, porcentaje menor al explicado por las dos primeras CP del mismo análisis para la campaña anterior. Entre

las correlaciones negativas más importantes (matriz de correlación Tabla 21 A) podemos destacar las de ácido linoleico (-0,88) y linolénico (-0,91) con ácido oleico y dentro de las positivas más fuertes se encuentran % aceite con el contenido de ácido linolénico (0,68) y éste mismo con ácido linoleico (0,64).

a) Matriz de correlación (coeficientes) y probabilidades						
	% ACEITE	Rendimiento	oleico	leico	nico	erúc.
% ACEITE	1,00	0,0839	0,0025	0,6689	<0,0001	0,2943
Rendimiento	0,23	1,00	0,0066	0,0268	0,0058	0,9377
oleico	-0,39	-0,35	1,00	<0,0001	<0,0001	0,3271
leico	0,06	0,29	-0,88	1,00	0,0001	0,0830
nico	0,68	0,35	-0,91	0,64	1,00	0,1958
erúc.	0,14	0,01	-0,13	-0,23	0,17	1,00

b) Autovalores				c) Autovectores		
Lambda	Valor	Proporción	Prop Acum	Variables	e1	e2
1	3,06	0,51	0,51	% ACEITE	-0,33	0,48
2	1,27	0,21	0,72	Rendimiento 2015	-0,29	-0,05
3	0,85	0,14	0,86	Oleico 2015	0,55	0,09
4	0,77	0,13	0,99	leico 2015	-0,45	-0,48
5	0,06	0,01	1,00	nico2015	-0,55	0,15
6	4,7E-04	7,8E-05	1,00	erúc.2015	-0,05	0,71

Tabla 21. A) Matriz de correlación/probabilidades: Entre las variables rendimiento, % aceite, Ác. oleico, Ác. Linoleico (leico), Ác. Linolenico (nico) y Ác. Erúcico. Diagonal superior probabilidades, diagonal inferior coeficientes de Pearson. En verde se resaltan las correlaciones positivas más importantes y en rojo las negativas. **B) Autovalores del ACP C) Autovectores del ACP.**

Como puede observarse, en ambas campañas se repite el patrón de correlación negativa entre ácido oleico y el resto de los ácidos grasos insaturados evaluados y con % aceite. Coincide también en ambas campañas, que la CP1 separa a las líneas por la variable ácido oleico, contra las demás variables y la CP2 las separa por ácido linoleico y rendimiento.

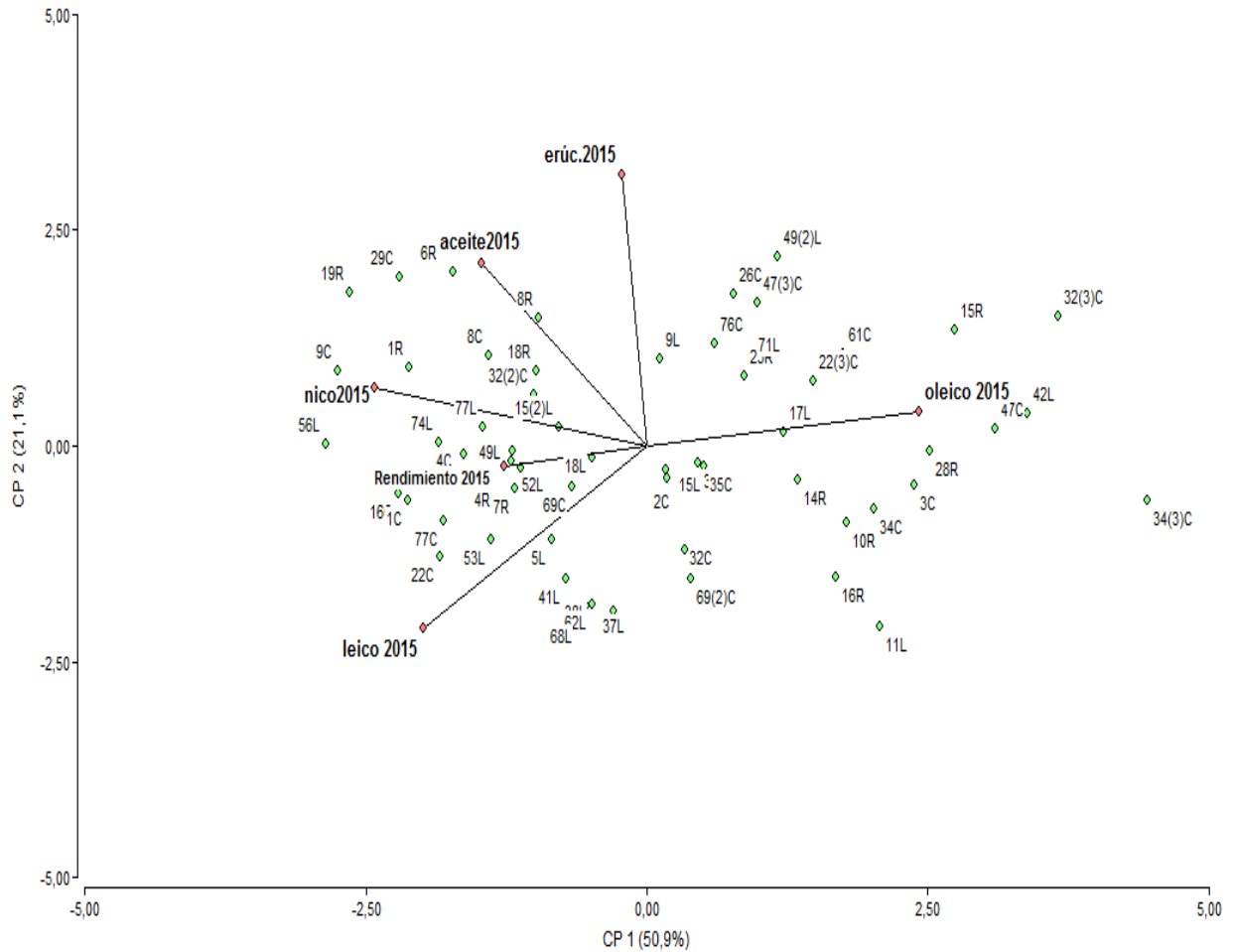


Figura 9. Biplot resultante del ACP entre las variables rendimiento, % aceite y los contenidos de ácidos grasos (leico: ácido linoleico., oleico: ácido oleico., nico: ácido linolénico y erúc: ácido erúcico.) para la campaña 2015. Cada diagonal representa las distintas variables. Los puntos verdes representan las líneas.

5. EVALUACIÓN GENOTÍPICA

5.1 Identificación de Rlm3 y BLMR2

Marcador SNP80870 para Rlm3

Según Wang (Wang, 2013) el SNP80870 presenta cambios en la secuencia de CTTTCT a CCTTTT en aquellos genotipos que posean el alelo de resistencia *Rlm3*. Mediante las PCR para este marcador sólo se lograron amplificar la banda de 1300 pb para 13 líneas experimentales, las cuáles fueron enviadas a secuenciar. En las demás líneas no se obtuvieron resultados de amplificación del fragmento de interés, pese a que se realizaron diversas modificaciones de las condiciones de PCR y ciclado. En las 13 líneas experimentales donde se pudo amplificar la banda de 1300 pb, las secuencias fueron editadas con *BioEdit Sequence Alignment Editor* 7.0.5.3

(Copyright © 1997-2005 Tom Hall), y se corroboró ausencia del SNP. Posteriormente, se realizó un alineamiento con BLASTn2.2.25 (Zhang et al., 2000) para corroborar que se tratase de la secuencia correcta. Como se muestra en la siguiente secuencia del consenso para 16C2, no posee el SNP correspondiente (resaltada). En la Figura 10 se muestra el alineamiento del mismo con la RefSeq Genome Database. El resultado muestra que con un 95% de identidad y 97% de cobertura, se alinea con la accesión: *Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1g80870*. Este resultado se repite para las secuencias restantes, los detalles de las secuencias y su correspondiente alineamiento con la accesión antes mencionada se muestran en el anexo, Figuras A1-A11, páginas 111 a 133.

Secuencia Consensus 16 C2

```
GGAGGCTCGGGGACCGTGTTTCNGAGGCATTACGAGNNNNNNNAGCTCTTCGCGGNCNNNAGACTCGACAGCCTCTCTCT  
CCAGTCCGAGACCGAGTTCCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTAC  
TGCGTCGAGAAGGATCACCACAGGTTCTTGGTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAG  
AAAGGCTCGTGCTTGAGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGCATTTCCGGT  
GTGACCCGCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTT  
GGTTTGTCTAGAGTGAAAAGTGGAGGAGGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTCAAGAGCTTCTGAGAGCACT  
CCTCAGACGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGGTTGATTTCTCTTTCGTTACAAGCTTCTTCGTTCCAAGAAC  
AGCAGGACGAGCCGTAACATTAAGGCAATGCATTTGAACTCGATGAGCTTGGCTATGGAAGAAGGTGAGGCGAAAGGGAA  
AGAGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCCGAACTCGGTTCTTGATTTGGGGAAAC  
AGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGATTATGTTAGGGAGTGGATAGG  
GAGTCAGATTCACACCGAGAATCCGGATTGGGATGATGATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTGAGCTGGG  
AGTTTCAACTAGGACAATTGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGGACTCTWGWAGAGAAGTTTGCAA  
GGAAGARACCATCGAGAARKRAGAAATCTAGWAGGAAGAAGAAGAAGCMTAGGWACATGSAGGAATGGTGGAAAGA  
GGAAGAACWTCCAAGACAAAARGAAGATTARAGTCTTGAGAATCAAGTTCAAGAACCGTTTAAAAGTCCCGATTTTTCGGG  
ACTGTTCCATGGTNAAGGCGGAAACCGGCCTGGGAAGTANAAAAGGGAAACCCNCGGCGGGGAATTTAACTAA
```

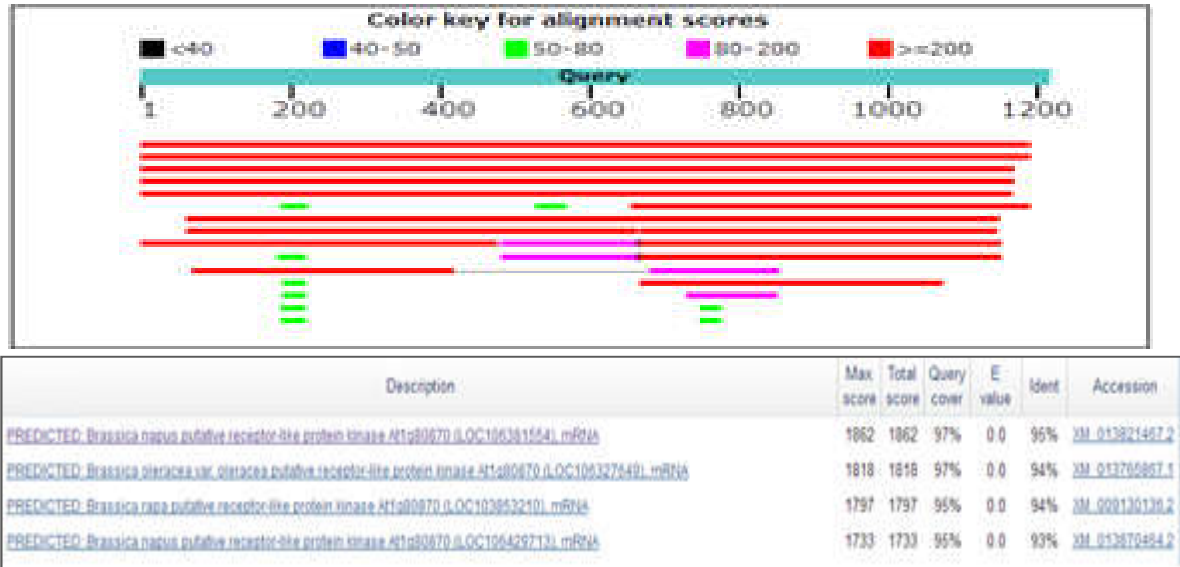


Figura 10. Alineamiento de la línea 16C2 Consensus Rlm3 con RefSeq Genome Database. A) Query: 16C2 consensus. Cada barra de color indica un alineamiento. B) Descripción de los primeros 4 alineamientos, entre 95 % a 93% de identidad.

Marcador 10B23a para BLMR2

Debido a que en la publicación original (Long et al., 2011) hay escasa información acerca del SNP para *BLMR2*, mediante la utilización de las bases de datos disponibles, se utilizó el programa *Primer Blast Software* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast>) para poder determinar cuáles son los posibles amplicones resultantes en *B. napus*. A continuación, se muestra el resultado obtenido (Figura 11).

	Sequence (5'→3')	Length	Tm	GC%	Self complementarity	Self 3' complementarity
Forward primer	GAAGTGGTAACCGAGAGACAA	21	57.34	47.62	5.00	0.00
Reverse primer	AGGCGAAACTTCATCAGAGCA	21	60.00	47.62	4.00	1.00
Products on target templates						
> XM_013856047.2 PREDICTED: Brassica napus two-component response regulator-like APRR3 (LOC106415367), transcript variant X2, mRNA						
product length = 1247						
Forward primer	1 GAAGTGGTAACCGAGAGACAA 21					
Template	421C. 441					
Reverse primer	1 AGGCGAAACTTCATCAGAGCA 21					
Template	1667 1647					
> XM_022693354.1 PREDICTED: Brassica napus two-component response regulator-like APRR3 (LOC106415367), transcript variant X1, mRNA						
product length = 1247						
Forward primer	1 GAAGTGGTAACCGAGAGACAA 21					
Template	427C. 447					
Reverse primer	1 AGGCGAAACTTCATCAGAGCA 21					
Template	1673 1653					

Figura 11. Resultado Primer Blast Software para los oligonucleótidos de 10B23a. Se muestran los oligonucleótidos correspondientes al marcador 10B23a y los productos resultantes. Estos son Brassica napus two-component response regulator-like APRR3 (LOC106415367), transcript variant X1 y X2, mRNA.

El resultado arroja un amplicón identificado como *Brassica napus two-component response regulator-like APCR3 (LOC106415367), transcript variant X2, mRNA*. A diferencia de lo esperado, con los oligonucleótidos publicados para este marcador, dieron una banda de 490 pb en geles de agarosa. Estas bandas, al ser secuenciadas en la Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG de INTA Castelar, se encontró que contenían más de una secuencia, por lo que no podían leerse correctamente. Se realizaron entonces, nuevas purificaciones de las amplificaciones, esta vez resueltas en geles de poliacrilamida al 6% p/v, obteniéndose 3 bandas de diferentes tamaños, 400 pb, 250 pb y 150 pb. Luego fueron eluidas los tres tipos de bandas para algunas de las líneas (16C2, 47C2, Y 28R) y se enviaron a secuenciar a la Unidad de Genómica/Nodo Plataforma de Genómica CATG de INTA Castelar. Las secuencias presentaron buena calidad de lectura. A continuación, se muestran los resultados de las secuenciaciones. Las secuencias consenso fueron obtenidas, editadas y analizadas con *BioEdit Sequence Alignment Editor 7.0.5.3* (Copyright © 1997-2005 Tom Hall).

Bandas de 150 pb

16C2 >Consensus

```
TTGAAGTGGTAACCGAGAGACAAACAAGACAGAGGRSATWGAGAKCTGCWCAWMKAGCTCAWGA
CTTGGCTGGTRAGCTTCAWYWRAGCTATAAACTAATCCMTAACGCARCCGCCGTTAATTAATTA
AAAGWGATATGCTTARTACKATGTTWGGTTTTGGATCCGTTGATGTTGGGGACTACCCGAGTTC
GATGAGAARCWGAGTTGKAWGCAGATTCCAGTWTTACGGGATCTCAGGCTGCACTGATGAACTT
CCAATAA
```

47C2>Consensus

```
TTGAAGTGGTAACCGAGAGACAAACAAGGACRGAGKAYRTTGAAGCTSCACAAMSTAAGCTCA
AAGACTTTCAACTTGGCTGGTAAGCTTCAACAAAGCTATAAACTAATCCMTAACGCAACCGCC
GTTAATTAATTAATAAAAGTGATATGTCTTAATACGATGTTAGTTTTGGATCCGTTGATGTT
GGGGACTACCCGAGTTCGATGAGAAGCAGAGTTKGAWGCAGWTTKYWSTWTTYWCGGGAT
CYCAGTCTGCTCTGATGAAGTTTCGCCTTA
```

Bandas 250 pb

16C2 >Consensus

```
TTAAGTGGTAACCTAGAGGCAAACCAAGCTGGGGACRTWGWAKAAGCACTWAAGTAMCTTCR
AGACTTYCWA CTTGKYTGGAAGAGTCRWYWWWGTTATAGMWSGTAATCCATTAAGCRRCY
SCSATGATTAATTAATAAA GGAKCTRSCAMTWCGTASTTCGTTTTGTTKTGGATCCGTT
GACAAGKGGKCKTWCTASMGTTYGWTGAKAA GMAWCTYRTWWGMATAYAATCTGATCCG
ARRYGCATGGAATCCCATGCTCTAATGAAGATTCTCCTACA
```

47C2 >Consensus

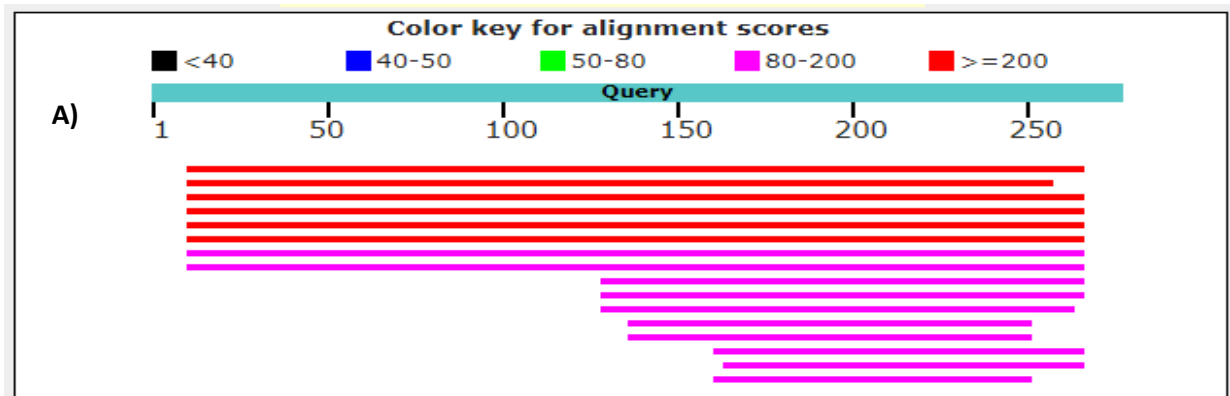
```
TGAAGTGAAGTGGTAGAGACAAGCAAAGCTGGGGACATTGRATAAGYWTCAMTASTAAACAMMTTCGWRCTC
YTRSYTGKTRRGAGWTTGTTTTTTGTTATARMTGGWYCCSSTWAAGGGCYGCCACGATTACYTYAATRARAGGAK
MAATGCCATTMRTASTTCGTTTTGKKKRGKGAWMGTGACAAKGGKGTCAATCWRMSSTTTGTTGAKGAKSRACT
YATAAGAMTWSWAWCTGCCKWKGTGCMTGMMYCCCATGCTCTGCTGAAGATTCTCCTACTAA
```

Bandas 400 pb

28R>Consensus

```
TTTAAGTGGTAACCGAGAGACAATGAGCCTACTTACAACCRGKASGRKTCRACACTCCAWAGTCSGTGSYMYGCS
WKGTTTRGGGSATGKCWWTCATGAKACGAKGAARTTAATGAKACARCRAAGTCTTGTAGKTGGGATACCATCCAT
AAACATAKAAAAGAAYGTGTGTGGTTCCTGTATGCTTGGGAAGCAAKCAAGACAGTCTTTTCCTCAKKYTACWTC
TTACAGAGCTTCTGAATTGCTAGAGCTCATAATGCTGACTTATGTGGTCCATAACGSCAAGTACACAGWKACAG
RCAATAGGTACATATTGGTACTGATTGATTGCTMRAKGTATATKTCSGMCTGCTCTGATGAAGTTTCCCCTA
AAAAA
```

A diferencia de lo esperado, los alineamientos realizados con BLASTn 2.2.25 (Zhang et al., 2000) dieron como resultado alineamientos de alta homología con: *beta-glucosidase 40-like en cultivar ZS11 chromosome C5, Bra_napus_v2.0*; y *Brassica napus cultivar ZS11 chromosome A9, Bra_napus_v2.0*. A continuación, se muestra el resultado de los mismos para la banda de 150 pb de 16C2, Figura 12), la cual, con un 87% de identidad y un 89% de cobertura, se alinea con *Brassica napus cultivar ZS11 chromosome A9, Bra_napus_v2.0*. Por otro lado, con un 85% de identidad, se produce el alineamiento con *Brassica napus cultivar ZS11 chromosome C5, Bra_napus_v2.0*. Esta región también pertenece a *beta-glucosidase 40-like*.



B)	Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
	Brassica rapa cultivar Chifu-401-42 chromosome A9_Brapa_1.0	337	337	92%	8e-88	87%	NC_024803.1
	Brassica napus cultivar ZS11 chromosome A9_Bra_napus_v2.0	326	326	89%	2e-84	87%	NC_027765.2
	Brassica oleracea var. oleracea cultivar TQ1000 chromosome C5_BOL	307	307	92%	6e-79	85%	NC_027752.1
	Brassica napus cultivar ZS11 chromosome C5_Bra_napus_v2.0	307	307	92%	6e-79	85%	NC_027771.2
	Raphanus sativus cultivar WK10039 unplaced genomic scaffold_Rs1.0	219	219	92%	3e-52	79%	NW_017353803.1
	Raphanus sativus cultivar WK10039 unplaced genomic scaffold_Rs1.0	211	211	92%	5e-50	79%	NW_017353139.1

Figura 12. Alineamiento de la línea 16C Consensus BLMR2 con RefSeq Genome Database. A) Query: 16C2 consensus. Cada barra de color indica un alineamiento. B) Se muestra la descripción de los primeros 6 alineamientos, los cuales presentaron entre 87% a 79% de identidad.

A continuación, se detalla el alineamiento correspondiente a la línea 16C con *Brassica napus* cultivar ZS11 chromosome A9, Bra_napus_v2.0:

Sequence ID: [NC_027765.2](#) Length: 45943547 Number of Matches: 1
Range 1: 28471006 to 28471250

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
326 bits(176)	2e-84	214/247(87%)	2/247(0%)	Plus/Plus

Features: beta-glucosidase 40-like

```

Query 11      AACCGAGAGACAAACAAGACAGAGGRSATWGAGAKCTGCWCAMKAGCTCAWGACTTYCW 70
          ||||| ||| |||||||||||||||| || || | |||| | | ||||| ||||| |
Sbjct 28471006 AACCG-GAGTCAAACAAGACAGAGGACATTGA-AGCTGCACAAAGAGCTCAAGACTTCA 28471063

Query 71      RCTTGGCTGGTRAGCTTCAWYWRAGCTATAAACTAATCCMTAACGCARCCGCGTTAATT 130
          ||||||||| ||||| | |||||||||||||||| ||||| |||||||||
Sbjct 28471064 ACTTGGCTGGTAAGCTTCAACAAGCTATAAACTAATCCATAACGCAACCGCGTTAATT 28471123

Query 131     AATTAAAAGWGATATGTCTTARTACKATGTTWGGTTTTTGGATCCGTTGATGTTGGGG 190
          ||||||||| ||||||||| ||| |||| | |||||||||||||||| |||||||||
Sbjct 28471124 AATTAAAAGTGATATGTCTTAATACGATGTTAGGTTTTTGGATCCGTTGATGTTGGGG 28471183

Query 191     ACTACCCGAGTTCGATGAGAARCWGAGTTGKAWGCAGATTKCCAGTWTTCACGGGATCTC 250
          ||||||||||||||||||||| | ||||| | ||||| ||||| |||||||||
Sbjct 28471184 ACTACCCGAGTTCGATGAGAAGCAGAGTTGGAAGCAGATTGCCAGTATTCACGGGATCTC 28471243

Query 251     AGGCTGC 257
  
```

Por otro lado se detalla el alineamiento de la línea 16C con *Brassica napus* cultivar ZS11 chromosome C5, Bra_napus_v2.0.

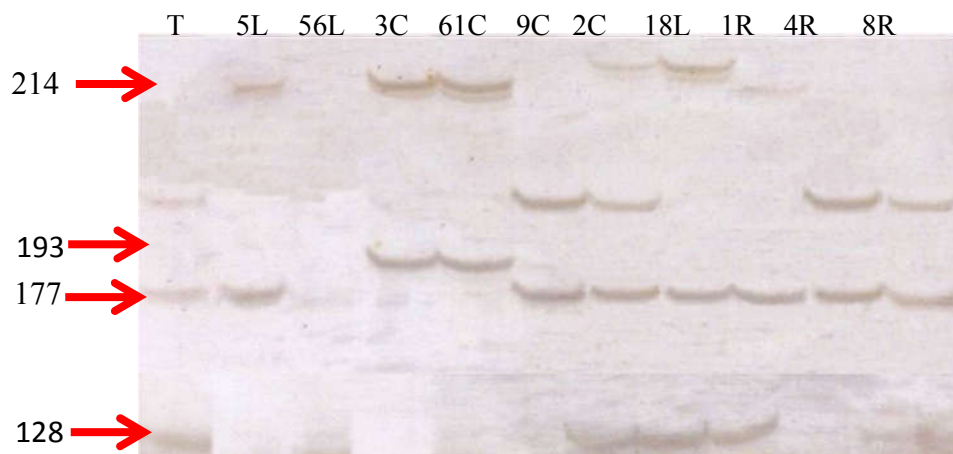


Figura 13. Amplificaciones para los marcadores *Xna12-a02a* y *Xol12-e03a* en gel de poliacrilamida 6%. *T*: testigo negativo Westar. Líneas positivas para ambos marcadores en el gel 3C, 61C (bandas 214 y 193 pb). Orden de siembra 5L, 56L, 3C (+), 61C (+), 9C, 2C, 18L, 1R, 4R, 8R. Las flechas rojas indican las bandas positivas (214 y 193 pb) y negativas (177 y 128).

Marcador BRMS075 para *Rlm4*

Para las amplificaciones realizadas con el marcador BRMS075 para *Rlm4*, se esperó como resultado alelo nulo para los que no posean el gen de resistencia y una banda de 180 pb para las líneas que sí lo posean. Como genotipos control se utilizaron los cultivares Dunkeld y Quinta, que poseen el gen *Rlm4*, y como genotipo susceptible el cultivar Westar.

-Como resultado de la evaluación llevada a cabo, las líneas 10R, 28R, 15L, 18L, 52L, 53L, 68L, 74L, 77L, 15(3)L, 17L, 32L, 1C, 2C, 4C y 8C, presentaron el amplicón de 180 pb, el cual conferiría resistencia. En la Figura 14 se muestra un gel de poliacrilamida para dicho marcador molecular para algunas de las líneas de evaluadas.

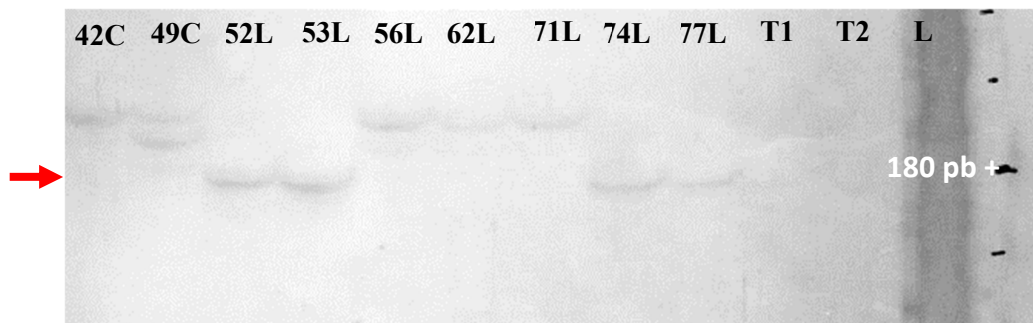


Figura 14. Amplificaciones para el marcador *BMR075* en gel de poliacrilamida 6%. *L*: leader. *T1* y *T2*: testigos negativos para el marcador, Glacier y Quinta respectivamente. *42C-77L*: algunas de las líneas experimentales. **180 pb +**: indica que el locus está presente (indicado con la flecha). Alelo **nulo** implica que no está presente. En este se muestra a las líneas 52L, 53L, 74L y 77L como positivas para *Rlm4*.

5.3 Identificación del locus *Rpg3Dun*

De acuerdo a la bibliografía, para el marcador BN204, una banda de 799 pb otorga resistencia a *Phoma*, ligado al gen *Rpg3Dun*.

Del total de líneas evaluadas, 22 presentaron el amplicón de 799 pb (5L, 11L, 15L, 18L, 37L, 38L, 41L, 42L, 49L, 52L, 53L, 56L, 62L, 68L, 77L, 32L, 32C, 1C, 22C, 14R, 18R y 23R). Como controles se utilizaron los cultivares Dunkeld (posee *Rpg3Dun*) y Westar (susceptible). En la Figura 15 puede observarse un gel de agarosa con algunos de los materiales evaluados para dicho marcador.

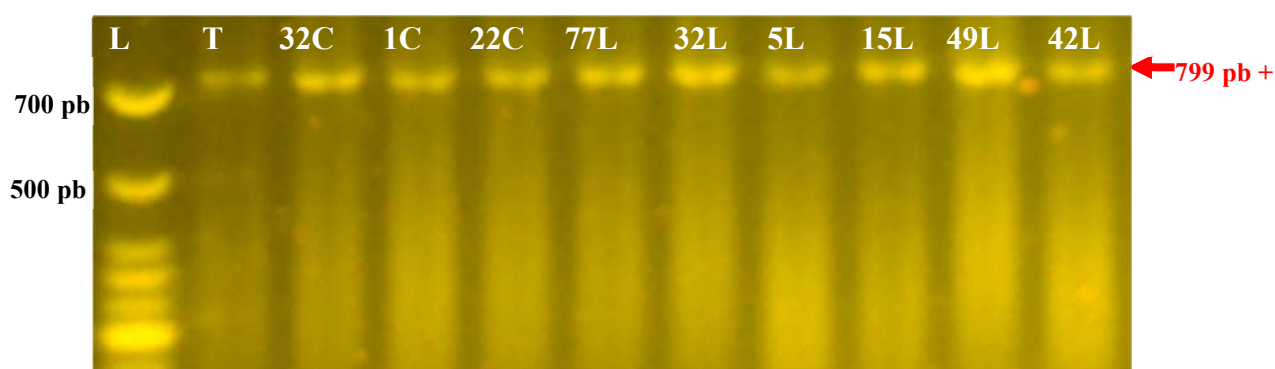


Figura 15. Amplificaciones del marcador BN204 resueltas por electroforesis en gel de agarosa 1,5%. **L:** leader (marcador de peso molecular). **T:** testigo resistente Dunckeld (*Rpg3Dun*). **32C-42L** algunas de las líneas experimentales. **799 pb +:** indica el tamaño del amplicón cuando el locus está presente (indicado con la flecha). En este gel se muestra todas líneas positivas para *Rpg3Dun*.

5.4 Identificación del locus *LepR3*

Para el marcador Ind10-12 ligado al locus *LepR3* se espera obtener bandas de 506 pb para aquellos genotipos que contengan el alelo de resistencia *LepR3* y de 794 pb para los que no lo posean. El 50% de las líneas que resultaron fenotípicamente resistentes fueron positivas (amplicón de 506 pb) para este marcador. Estas fueron: 15R, 18R y 23R 11L, 15L, 41L, 42L, 49L, 52L, 53L, 62L, 68L, 77L, 49(2)L, 32L y 71L y 32C, 69C, 2C, 3C, 4C, 16C, 26C, 32(2)C, 35C, 61C, 69(2)C, 9C, 29C, 32(3)C. Como controles se utilizaron los cultivares Surpass 400 (*LepR3*) y Westar (susceptible). En la Figura 16 se muestra un gel de agarosa al 1,5% teñido con SybSafe® con los amplicones esperados para algunas de las líneas evaluadas. De las 59 líneas evaluadas, en 12 de ellas (1C, 15L, 49L, 62L, 68L, 8C, 34C, 9C, 18L, 16C, 26C y 32C) se pudo observar una banda intermedia a las citadas en la bibliografía, de aproximadamente 600 pb.

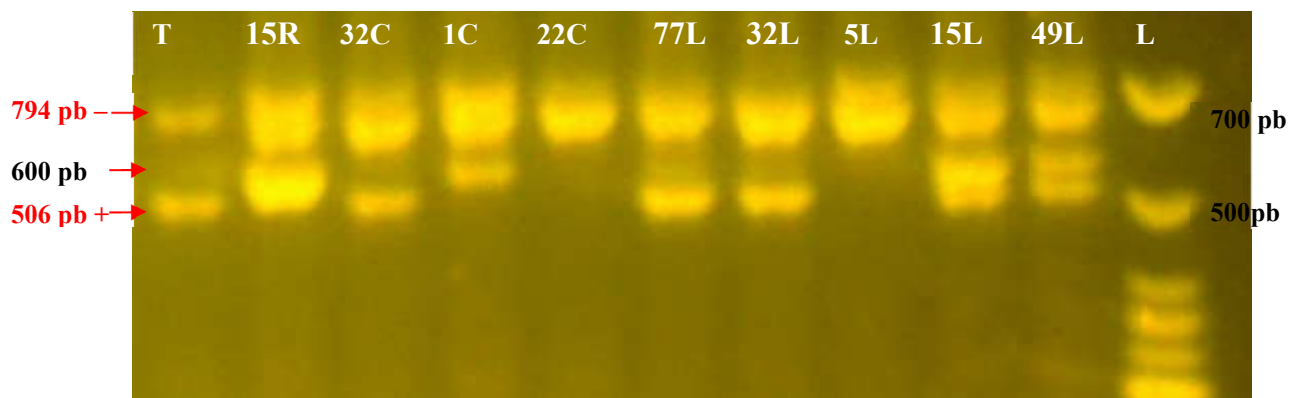


Figura 16. Amplificaciones del marcador *InDel10-12*, resuelto por electroforesis en gel de agarosa 1,5%. *T*: testigo resistente, *Surpass 400* (*LepR3*). *L*: leader. **506 pb +**: indica el tamaño del amplicón cuando el locus está presente. **794 pb -**: indica el amplicón cuando no posee el locus *LepR3*. **506 pb+** indica presencia del alelo de resistencia. **600pb** indica un amplicón intermedio no descrito previamente. En este gel se muestra que las líneas 15R, 32C, 77L, 32L, 15L Y 49L fueron positivas para *LepR3*. Las flechas indican la altura de las bandas obtenidas.

6. ANÁLISIS ESTADÍSTICOS DE LOS MARCADORES MOLECULARES

Para un correcto análisis de los marcadores genéticos, los resultados del marcador *Rlm3Rlm3* fueron omitidos del análisis, ya que presentó más de un 50 % de datos faltantes (solo amplificó en 13 de las 59 líneas evaluadas). Por su parte, el marcador *BLMR2* tampoco fue incluido en el análisis dado que los resultados antes mencionados no corresponden al alelo de resistencia esperado.

ANÁLISIS DE CONGLOMERADOS

A partir de los datos genotípicos obtenidos de los marcadores *Xna12-a02a/Xo112-e03a*, *BRNS075*, *BN204*, *Ind10-12*, se construyó la matriz de distancia de Dice y con la misma se procedió a realizar un análisis de conglomerados utilizando el método de agrupamiento jerárquico UPGMA. En la siguiente Figura (Figura 17) se muestra el dendrograma obtenido, el cual fue paginado para una mejor interpretación de los resultados (Figura 18 a y b). Se obtuvo un índice de correlación cofenética de 0,924.

Como puede observarse en el dendrograma (Figura 17), la primer separación que se produce en el nodo 0,91, lo cual agrupa por un lado un conglomerado con todas aquellas líneas que no presentaron alelos de resistencia (16R, 19R, 1R, 22(3)C, 34C, 34(3)C, 47C, 47(3)C, 4R, 76C, 77C, 7R, 8R Y 9L) para cualquiera de los marcadores utilizados (grupo 2, color azul, Figura 18a). Por el otro (grupo 1, color rojo, Figura 18b) aquellas líneas que presentaron al menos algún alelo de resistencia de los evaluados. Dentro de este último grupo se puede observar que aproximadamente a una distancia de 0,91 se separan las líneas 8C, 74L, 28R, 17L, 15(2)L y 10R del resto, formando un subgrupo (subgrupo J). Estas líneas tienen en común que sólo fueron

positivas para el alelo de resistencia *Rlm4*. El perfil molecular de la línea 23R, es el más parecido a los de 61C, 3C y 71L, ya que se encuentran a menor distancia (0,45) en este análisis. El perfil molecular de 23R indicó que posee los alelos *Rpg3Dun*, *Rlm1* y *LepR3*, mientras que 61C, 3C y 71L poseen *Rlm1* y *Lepr3*. Algo similar ocurre también a 0,45 entre 2C y 4C (*Rlm4* y *LepR3*, subgrupo G) con el subgrupo H formado por 77L, 68L, 53L, 52L, 32L y 15L, los cuáles poseen los mismos alelos que 2C y 4C más *Rpg3Dun*. Éste último agrupamiento entre los subgrupos G y H, se separa a una distancia de 0,51 del subgrupo F formado entre 18L y 1C (*Rlm4* y *Rpg3Dun*). Los detalles de cada subgrupo del grupo 1 (conglomerado) se resumen en la Tabla 22.

GRUPO	SUBGRUPO	LINEAS	ALELOS R
1	A	5L, 56L, 38L, 37L, 22C Y 14R	<i>Rpg3Dun</i>
	B	6R	<i>Rlm1</i>
	C	61C, 71L Y 3C	<i>Rlm1</i> y <i>LepR3</i>
	D	23R	<i>Rlm1</i> , <i>LepR3</i> y <i>Rpg3Dun</i>
	E	9C, 69C, 69(2)C, 49(2)L, 36C, 32(2)C, 32(3)C, 29C, 16C, 26C, 15R	<i>LepR3</i>
	F	1C Y 18L	<i>Rlm4</i> y <i>Rpg3Dun</i>
	G	2C Y 4C	<i>Rlm4</i> y <i>LepR3</i>
	H	77L, 68L, 52L, 53L, 32L Y 15L	<i>Rlm4</i> , <i>LepR3</i> Y <i>Rpg3Dun</i>
	I	62L, 49L, 42L, 41L, 32C, 18R Y 11L	<i>LepR3</i> Y <i>Rpg3Dun</i>
	J	8C, 74L, 28R, 17L, 15(2)L Y 10R	<i>Rlm4</i>

Tabla 22. Subgrupos formados en el conglomerado 1 (Figura 18). Se describen las líneas que lo forman y los alelos de resistencia de cada subgrupo.

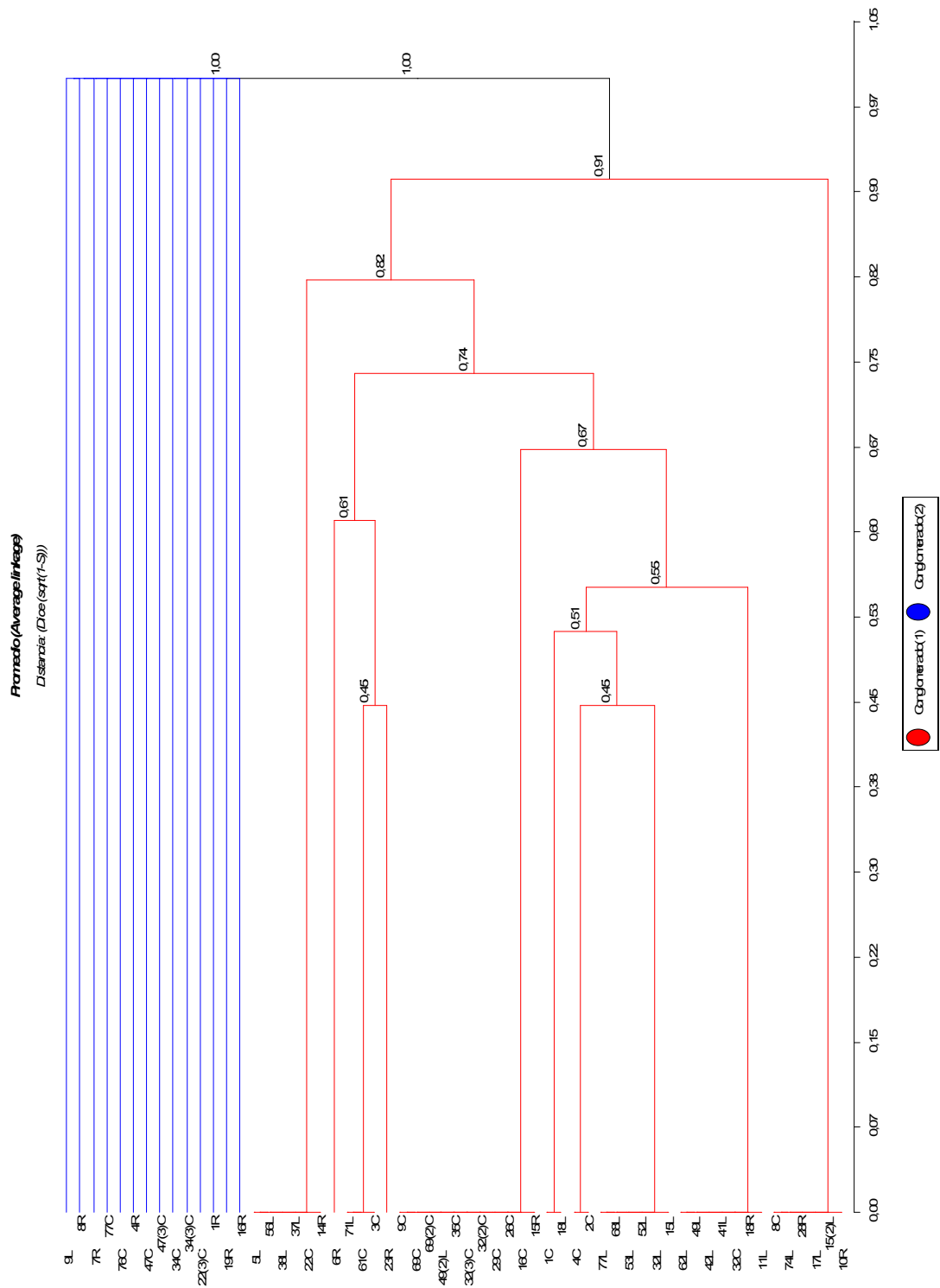


Figura 17. Dendrograma obtenido basado en el índice de similitud de Dice. Líneas rojas indican el Conglomerado 1, líneas azules el Conglomerado 2. Los valores sobre las ramas indican la distancia que separa cada subgrupo. El conglomerado 1 se separa del 2 en el nodo 0.91.

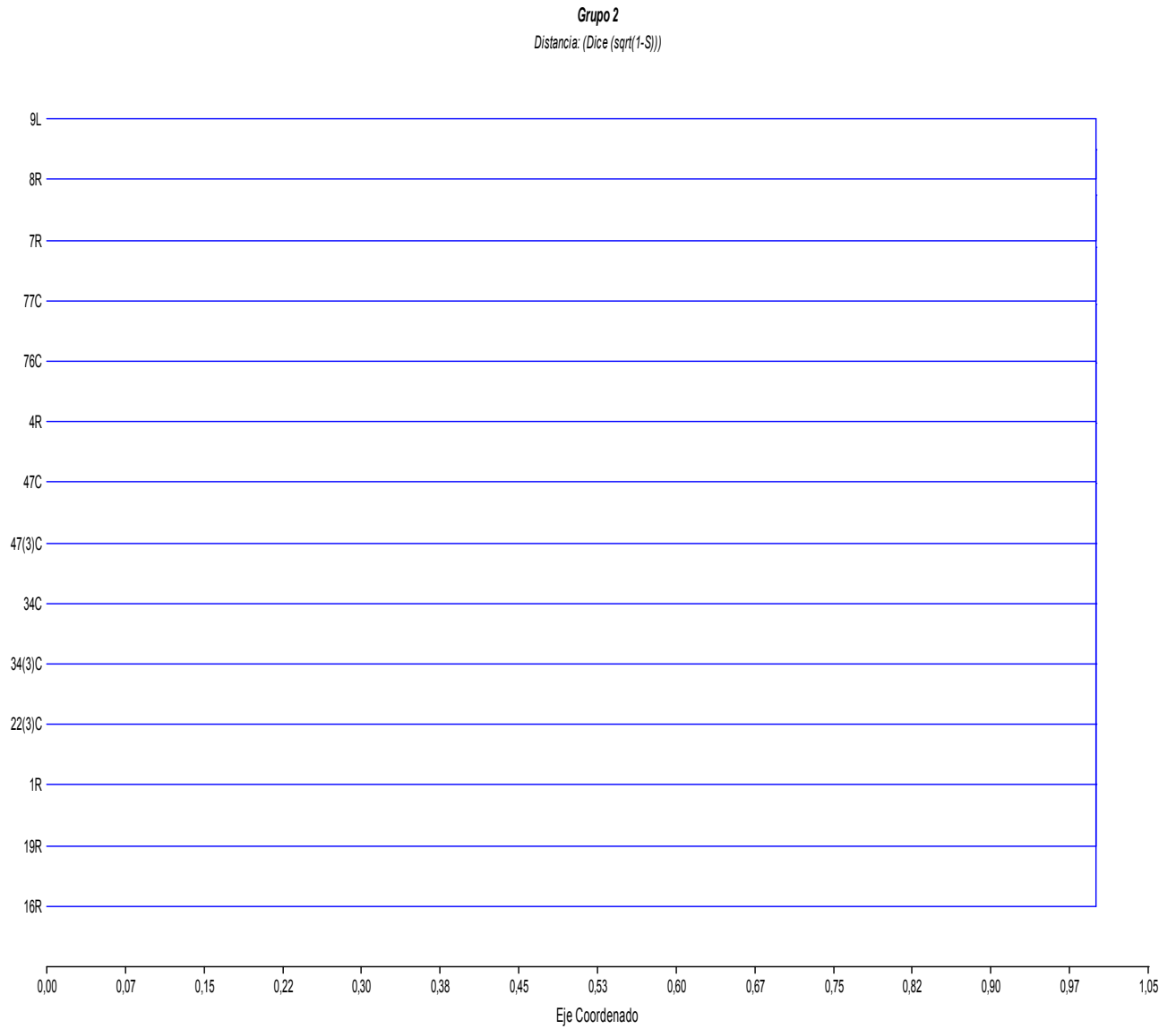


Figura 18a. Dendrograma paginado, donde se muestra el grupo 2 del dendrograma general (Figura 17).

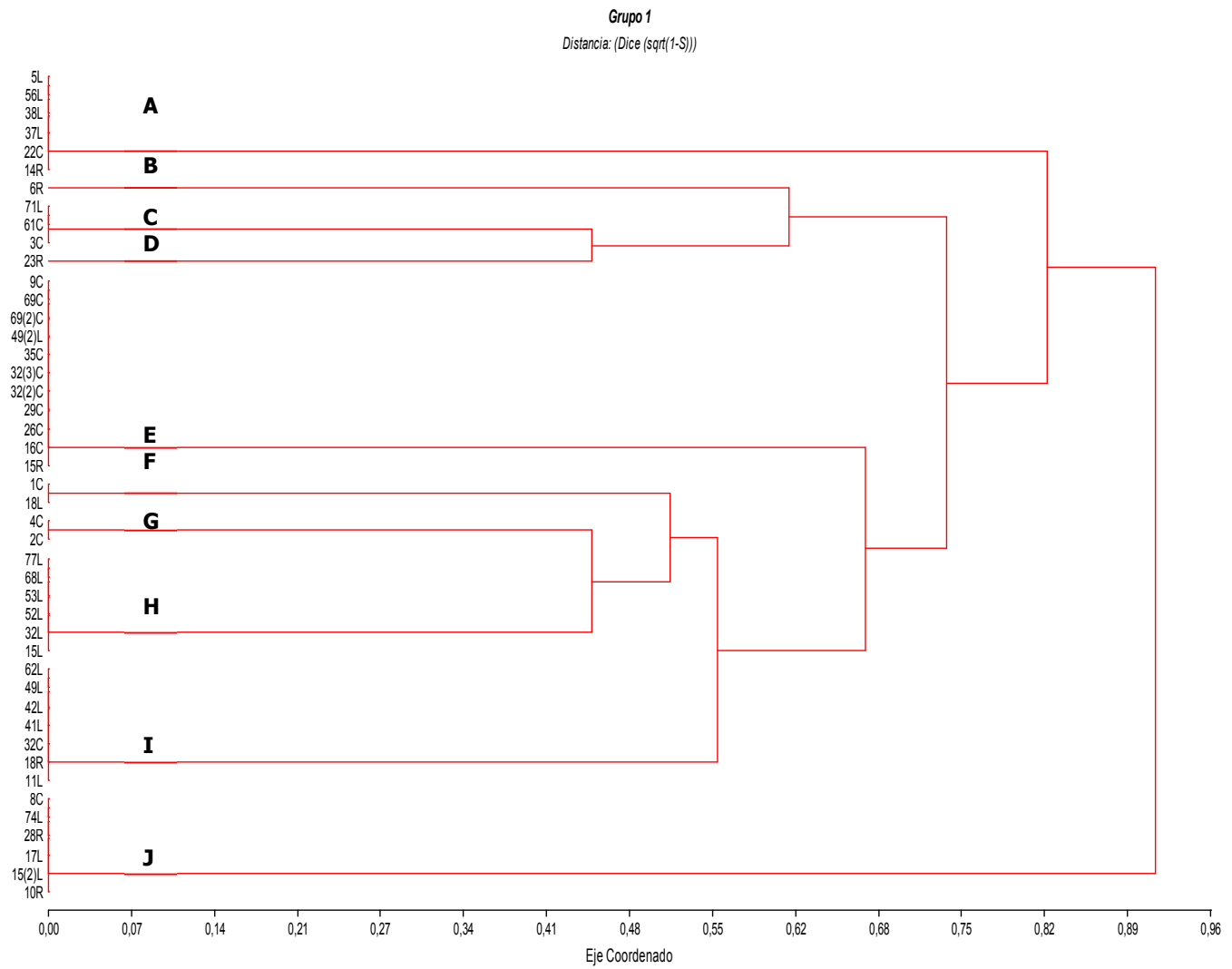


Figura 18b. Dendrograma paginado. Se muestra el grupo 1 del dendrograma general (Figura 17). Las letras (A – I) indican los subgrupos formados.

7. ANÁLISIS GENERAL PARA LA SELECCIÓN DE LÍNEAS

Como se describió anteriormente, en la sección materiales y métodos, para realizar un agrupamiento de las líneas resistentes según sus características genotípicas (*loci* de resistencia) y fenotípicas (rendimiento, % de aceite y contenido de ácidos grasos) se aplicó la técnica multivariada de Procrustes Generalizado (GPC). Los datos que se utilizaron fueron las primeras 4 componentes principales del ACP realizado para los datos promedio de las dos campañas, de rendimiento, % de aceite y contenido de ácidos grasos y las primeras cuatro coordenadas principales del análisis de coordenadas principales (AcooP) aplicado sobre los datos binarios de los marcadores moleculares. En la Tabla 23 se muestran las medidas resumen de los promedios de las variables fenotípicas utilizados y éstos últimos en la Tabla 24. El AcooP no se muestra dado que el resultado es el mismo que el análisis de conglomerados (Figura 17). En la Tabla A7 del anexo se muestran las CP y PCO (*principal coordinate*) utilizados para el análisis. Como se muestra en la Tabla 25 A, los autovalores resultantes del análisis, indican que la variabilidad explicada a través de los dos primeros ejes de la descomposición de la matriz de consenso es de 89%. En el cuadro de Análisis de la Varianza se presenta la suma de cuadrados *dentro por caso* (línea, Tabla 26) y la suma de cuadrados dentro por grupo de variables en la Tabla 25 B. El consenso entre la ordenación producida por matriz de datos genéticos y la obtenida a partir de datos fenotípicos es del 64% (proporción del consenso).

Variable	Media	D.E.	Mín.	Máx.
Rendimiento	2740,43	211,48	2331,33	3269,5
% aceite	42,94	0,95	40,27	44,69
Ac. oleico	61,74	0,65	60,66	63,62
Ac. linoleico	19,29	0,43	18,22	19,96
Ac. linolenico	10,42	0,41	9,21	11,05
Ac. erúxico	0,15	0,08	0,02	0,32

Tabla 23. Medidas resumen de los promedios de las variables fenotípicas estudiadas.

Linea	Rendimiento (Kg/Ha)	Aceite (%)	Ac. Oleico (%)	Ac. Linoleico (%)	Ac. Linolénico (%)	Ac. Erúxico (%)
10R	2407	40,65	63,17	19,05	9,34	0,02
11L	2346,6	42,59	61,59	19,54	10,55	0,07
14R	2672,2	41,49	62,8	18,89	9,73	0,05
15(2)L	2928	42,49	62,18	19,04	10,24	0,1
15L	2590,8	44,22	61,46	19,63	10,45	0,15
15R	2867,2	41,16	63,62	18,22	9,21	0,13
16C	2899,33	43,77	61,03	19,68	10,83	0,19
16R	2623	40,27	62,6	19,35	9,63	0,02
17L	2946,8	43,05	62,32	18,81	10,13	0,17
18L	2796,67	42,96	61,59	19,38	10,61	0,09
18R	2544	41,94	62,54	19,03	9,88	0,06
19R	2658	42,27	61,72	19,44	10,29	0,14
1C	3003,83	43,85	61,16	19,72	10,72	0,13
1R	2574,6	41,51	62,16	19,31	10,05	0,08
22(3)C	2734,67	43,52	60,72	19,93	11,02	0,16
22C	2620,17	42,96	61,95	19,02	10,29	0,21
23R	2548,5	42,83	62,53	18,86	10,07	0,06
26C	2575,5	43,54	61,41	19,01	10,73	0,32
28R	2781,6	41,41	62,88	18,84	9,66	0,06
29C	2629,83	44,11	61,16	19,25	10,89	0,28
2C	2686	43,17	61,42	19,27	10,66	0,23
32(2)C	2614,17	43,63	60,91	19,73	10,95	0,16
32(3)C	2773,17	43,28	61,17	19,43	10,76	0,25
32C	2583,5	43,82	62,35	18,35	10,46	0,22
32L	2616,17	43,44	61,3	19,45	10,71	0,2
34(3)C	2387,67	42,77	61,37	19,52	10,58	0,18
34C	2515,5	43,11	62,59	18,52	10,15	0,16
35C	2604,67	43,29	61,82	18,97	10,5	0,21
37L	2800,5	42,26	61,39	19,88	10,47	0,06
38L	2887,67	43,37	61,52	19,58	10,56	0,07
3C	2591	42,84	61,95	19,02	10,32	0,2
41L	2920,5	43,4	61,52	19,6	10,61	0,03
42L	2918,4	43,79	62,03	19,11	10,37	0,09
47(3)C	2331,33	42,16	62,1	18,84	10,16	0,27
47C	2494,17	43,7	61,74	18,76	10,66	0,29
49(2)L	2934,17	43,5	61,52	19,53	10,54	0,11
49L	3070	43,79	62,5	18,38	10,31	0,19
4C	2827,67	43,78	61,13	19,55	10,82	0,2
4R	3216,4	41,27	62,6	19,07	9,81	0,06
52L	2732,67	43,82	61,19	19,77	10,65	0,14
53L	2888,4	42,8	61,28	19,68	10,58	0,16
56L	2839,6	43,94	60,66	19,96	11,02	0,19
5L	2785,8	42,43	61,48	19,71	10,5	0,06
61C	2717	44,01	62,49	18,42	10,31	0,17
62L	3042,67	41,89	61,49	19,8	10,33	0,08
69(2)C	2676,5	43,67	61,06	19,71	10,82	0,16
69C	2676,5	42,26	61,01	19,95	10,67	0,12
69L	2755,8	43,17	61,63	19,51	10,49	0,07
6R	2558,2	42,62	62,13	19,25	10,13	0,09
71L	2891,33	42,26	61,84	18,97	10,35	0,25
74L	3029	43,13	61,3	19,58	10,7	0,13
76C	2476,67	43,88	61,25	19,28	10,73	0,28
77C	3269,5	43,49	60,91	19,84	10,86	0,16
77L	2887,67	43,83	61,52	19,45	10,65	0,1
7R	3079,2	41,32	62,09	19,55	9,97	0,04
8C	2912,83	43,66	60,83	19,52	10,95	0,32
8R	2342	42,44	62,18	19,2	10,06	0,12
9C	2823,67	44,69	60,92	19,54	11,05	0,21
9L	2779,2	43,23	61,71	19,14	10,43	0,23

Tabla 24. Valores promedios de las variables fenotípicas utilizados para obtener las CP para utilizar en el Análisis de Procrustes Generalizado.

A.) Autovalores

Lambda	Valor	Proporción	Prop. Acum.
1	0,299	0,467	0,467
2	0,271	0,424	0,891
3	0,039	0,062	0,953
4	0,03	0,047	1

B) Sumas de cuadrado por grupo

Consenso	residuo	Total	Prop Cons.
0,64	0,36	1	0,64
0,64	0,36	1	0,64
1,28	0,72	2	0,64

Tabla 25. A) Autovalores del GPC. B) Suma de cuadrados por grupo de variables, fenotípicas y genotípicas del cuadro de análisis de la varianza.

	Consenso	residuo	Total	Prop. Cons.
10R	0,097	0,008	0,105	0,926
11L	0,017	0,014	0,03	0,553
14R	0,028	0,037	0,066	0,433
15(2)L	0,004	0,005	0,009	0,46
15L	0,009	0,036	0,045	0,202
15R	0,043	0,061	0,104	0,41
16C	0,025	0,013	0,038	0,655
16R	0,038	0,013	0,051	0,74
17L	0,032	0,017	0,048	0,654
18L	0,016	0,009	0,025	0,646
18R	0,005	0,031	0,036	0,136
19R	0,005	0,001	0,006	0,843
1C	0,019	0,019	0,037	0,5
1R	0,015	0,003	0,018	0,857
22(3)C	0,043	0,013	0,056	0,766
22C	0,006	0,003	0,008	0,664
23R	0,006	0,017	0,023	0,246
26C	0,042	0,003	0,045	0,925
28R	0,067	0,004	0,071	0,943
29C	0,04	0,004	0,044	0,916
2C	0,008	0,005	0,014	0,616
32(2)C	0,028	0,003	0,031	0,918
32(3)C	0,026	0,008	0,034	0,769
32C	0,042	0,006	0,047	0,88
32L	0,004	0,004	0,008	0,516
34(3)C	0,006	0,008	0,015	0,439
34C	0,015	0,008	0,023	0,657
35C	0,024	0,005	0,03	0,819

(continuación)

37L	0,043	0,004	0,047	0,908
38L	0,034	0,008	0,042	0,818
3C	0,013	0,004	0,017	0,754
41L	0,023	0,005	0,028	0,826
42L	0,014	0,009	0,023	0,616
47(3)C	0,019	0,01	0,029	0,666
47C	0,01	0,014	0,025	0,41
49(2)L	0,018	0,004	0,021	0,831
49L	0,039	0,013	0,052	0,755
4C	0,005	0,013	0,019	0,291
4R	0,03	0,013	0,044	0,698
52L	0,008	0,003	0,01	0,756
53L	0,006	0,002	0,008	0,764
56L	0,044	0,017	0,061	0,722
5L	0,037	0,005	0,043	0,872
61C	0,027	0,006	0,033	0,832
62L	0,017	0,015	0,032	0,522
69(2)C	0,008	0,004	0,012	0,682
69C	0,01	0,028	0,038	0,256
69L	0,009	0,02	0,029	0,313
6R	0,008	0,003	0,01	0,748
71L	0,016	0,007	0,022	0,706
74L	0,014	0,033	0,047	0,296
76C	0,007	0,016	0,023	0,297
77C	0,012	0,024	0,036	0,326
77L	0,006	0,002	0,008	0,758
7R	0,022	0,009	0,031	0,706
8C	0,013	0,054	0,066	0,189
8R	0,014	0,005	0,019	0,728
9C	0,039	0,01	0,049	0,802
9L	0,003	0,005	0,008	0,402
Total	1,28	0,72	2	0,64

Tabla 26. Análisis de la varianza del consenso con la Suma de cuadrados dentro por línea.

A continuación, se muestra un ARM (árbol de recorrido mínimo) obtenido para la configuración del consenso (Figura 19) entre las variables genóticas (marcadores moleculares) y fenotípicas (rendimiento, % de aceite y contenido de ácidos grasos).

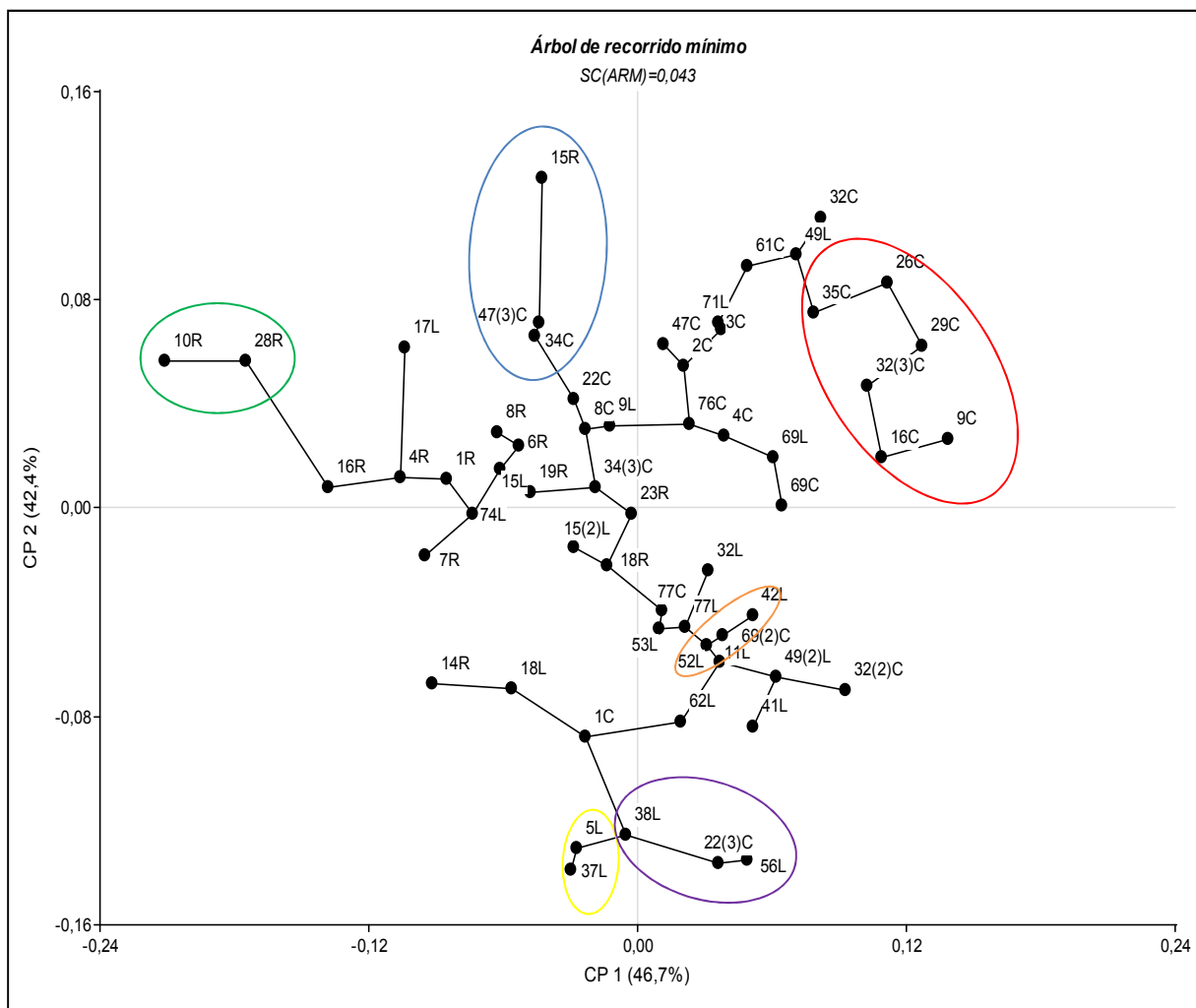


Figura 19. ARM de la configuración para el consenso. Los círculos de colores muestran asociaciones entre líneas que se describen en el texto.

Del ARM se pueden describir varias asociaciones entre líneas. Por ejemplo, las líneas que se ubican en los extremos de la rama principal del primer cuadrante (indicadas en rojo): 9C, 16C, 32(3)C, 29C, 26C Y 35C todas contienen el alelo *LepR3* y además presentaron rendimientos \geq a la media, siendo 16C la de mayor rinde. Los porcentajes de aceites de estas líneas fueron

superiores a la media, destacándose 9C como la mejor. En cuanto al contenido de ácidos grasos, todas presentaron valores aceptables, destacándose el contenido de oleico, ya que todas poseen valores superiores a la media. La línea 35C se une a 49L la cual posee, además de *LepR3*, el alelo *Rpg3Dun*, también alto rendimiento y las mismas características de calidad que para el grupo de las líneas antes mencionadas. El genotipo 49L forma, por un lado, una rama con 32C con la cual comparte el mismo perfil genético pero las características de calidad y rendimiento son más pobres, y por el otro continúa el árbol uniéndose inmediatamente con 61C (*Rlm1* y *LepR3*), la cual presentó muy buenas características fenotípicas, y ésta a 71L (mismas características que 49L) y 3C, la cual difiere en que presentó menor rendimiento. En el otro extremo, sobre el segundo cuadrante, se ubican las líneas 10R y 28R (círculo verde) y le sigue como más cercana a estas, 16R. Las dos primeras fueron positivas para el alelo *Rlm4*, mientras que 16R resultó no tener ninguno de los genes de resistencia evaluados, por ello se encuentra un poco más distante. Pero las tres se caracterizan por haber tenido muy buenos contenidos de oleico, dentro de las mejores cinco, aunque bajos porcentajes de aceite, con valores inferiores a la media. Otra rama que se destaca en este cuadrante, es aquella en la que el extremo es 15R (*LepR3*) y un poco más alejadas se unen 47(3)C y 34C (círculo azul). Ninguna de estas dos presentó alelos de resistencia de los evaluados, pero se asocian a 15R porque tuvieron excelente perfil de ácidos grasos. A diferencia de las demás, esta línea presentó buen rendimiento, por ello se encuentra más alejada. Todas tuvieron porcentajes de aceite \leq a 43%.

Si analizamos la rama inferior del ARM, entre el tercer y cuarto cuadrante, se ubican muy cerca 37L y 5L (círculo amarillo), las cuales presentaron el alelo *Rpg3Dun* y rendimientos superiores a la media, pero con valores de porcentaje de aceite menores a 43%. El perfil ácido de estas es aceptable. A continuación, un poco más alejado a estas dos líneas, se encuentra 38L, la cual tiene las mismas características, excepto que mejor porcentaje de aceite, característica por la cual se le unen el grupo de líneas 22(3)C (sin gen R) y 56L (*Rpg3Dun*), las cuáles presentaron mejores contenidos de aceite (círculo violeta). Además, la línea 38L se une a 1C y esta se conecta con 18L y 14R, compartiendo altos rendimientos y el alelo *Rpg3Dun*, y las líneas 1C y 18 L también contienen *Rlm4*. Se unen también en ese orden por poseer contenidos de aceite que van disminuyendo a medida que nos acercamos al extremo de 14R. Desde la línea 1C, se bifurca otra rama, uniéndose en primer término con 62L, con la cual comparte las características de alto rendimiento y también posee *Rpg3Dun* (*Rpg3Dun* y *LepR3*). Esta última línea se une con 11L,

compartiendo los mismos genes de resistencia. A partir de esta línea el árbol se bifurca. Hacia el extremo de la rama se une con 49(2)L y 32(2)C, líneas que también poseen *LepR3*, y los valores de rendimiento, aceite y ácidos grasos van disminuyendo hacia el extremo. Hacia el otro lado del árbol se une inmediatamente con la línea 52L (*Rpg3Dun*, *LepR3* y *Rlm4*) la cual forma una nueva rama con 69(2)C (*LepR3*) y 42L (*LepR3* y *Rpg3Dun*) (círculo anaranjado). Estas tres líneas poseen buenos rendimientos y valores de aceite y ácidos grasos similares a la media.

DISCUSIÓN

En éste trabajo se evaluaron en líneas experimentales de colza las principales características agronómicas del cultivo como rendimiento, contenido de aceite y de ácidos grasos, así como el comportamiento de las mismas frente al principal patógeno que las afecta, *P. lingam*, y los principales genes de resistencia vertical a éste patógeno, con la finalidad de seleccionar aquellas líneas que se destaquen para dar inicio a un programa de apilamiento genético. Tanto las metodologías empleadas como los principales resultados obtenidos serán discutidos en esta sección.

Para realizar las evaluaciones de las inoculaciones de las líneas en el presente trabajo, se utilizó la escala de Bansal (Bansal, 1994) la cual es ampliamente utilizada en el área de fitopatología del grupo de trabajo. Ésta es una escala adaptada de la de Williams (1985), utilizada para las evaluaciones del grupo de patogenicidad. El aislamiento utilizado para las inoculaciones artificiales fue seleccionado a partir de tres aislamientos iniciales presentes en el laboratorio de Fitopatología de INTA-EE Paraná. Los tres aislamientos fueron caracterizados previamente a fin de determinar el grupo de patogenicidad de cada uno de ellos mediante inoculaciones artificiales en cultivares diferenciales (Schutt de Varini y Bessone, 2015). El aislamiento 1 fue elegido porque mostraba más virulencia en el campo la campaña anterior (2013) al momento de realizarla presente tesis, así como también por pertenecer al GP3, lo que permite discriminar entre líneas resistentes y susceptibles al patógeno. Mientras que los otros dos aislamientos (2 y 3), no fueron seleccionados debido a que, al ser caracterizados, los mismos pertenecían al GP1 y GP4, respectivamente, no permitiendo distinguir entre líneas resistentes y susceptibles. El aislamiento 1, utilizado para las inoculaciones del presente trabajo, fue multiplicado siguiendo el protocolo de Castellanos (Castellano et al., 2011), a fin de ser conservado.

P. lingam presenta variabilidad en cuanto a su virulencia. Cunningham (1927) fue el primero en informar sobre dicha variabilidad al describir dos cepas: avirulentas (Avr) y virulentas (avr) para las crucíferas. Numerosas variedades de *Brassica* spp. fueron examinadas como potenciales candidatas para diferenciar aislamientos de *P. lingam* obtenidos a partir de ensayos a campo (Thurling y Venn, 1977; Newman, 1981; Kutcher et al., 1993). La primera diferenciación de los aislamientos se basó en síntomas en cotiledones o tallos después de inocular las variedades con

cada aislamiento. Utilizando el fenotipo producto de la interacción del patógeno con los cotiledones, los aislamientos se han clasificado en grupos de patogenicidad (GP) basados en las reacciones de las variedades Westar, Quinta y Glacier (Koch et al., 1991; Mengistu et al., 1991) y algunos investigadores han incluido una cuarta variedad, Jet Neuf (Badawy et al., 1991). El uso de Westar discrimina a *L. biglobosa* (GP1) de *L. maculans*. Las variedades Quinta y Glacier clasifican los aislamientos del patógeno como pertenecientes a GP2 si ambas variedades producen reacciones resistentes al ser inoculadas con estos; los aislamientos pertenecientes al GP3 dan una reacción resistente en 'Quinta', y susceptible en 'Glacier', y pertenecen al GP4 si en ambas variedades dan reacción susceptible (Mengistu et al., 1991; Keri et al., 2001, Kutcher et al., 2010b). Los resultados de caracterización del inóculo utilizado en la presente tesis indicaron que pertenece al GP3, información que facilitó en gran medida la interpretación de los resultados obtenidos posteriormente en el ensayo de inoculación de las líneas de colza. No obstante está claro que al utilizar un solo aislamiento nos restringimos a determinadas líneas experimentales.

Se realizó la selección de líneas resistentes y medianamente resistentes al aislamiento utilizado, a partir de las 469 líneas inéditas que actualmente cuenta el programa de mejoramiento del cultivo de INTA, mediante su clasificación según la escala de Bansal (Bansal et al., 1994). Del total de 469 líneas experimentales inoculadas, el 13% (59 líneas) resultó resistente al inóculo, dentro de las cuales el 7% (32) fue completamente resistente y el 6% (27) moderadamente resistente. Se han descrito un gran número de métodos utilizados para realizar inoculaciones artificiales, tanto en invernáculo como en el campo, y tanto en plántulas como plantas adultas (Bansal; 1994; Huang et al., 2014; Van de Wouw et al., 2016). Debido a que la resistencia cualitativa mediada por genes mayores se expresa en el estado de plántula, esta puede evaluarse fenotípicamente mediante la detección de las reacciones del patógeno en plantas jóvenes bajo condiciones controladas (Huang et al. 2014), como se realizó en la presente tesis. Es decir, la presencia de genes específicos de resistencia puede detectarse perfectamente por la reacción de la plántula inoculada y con alta precisión (McNabb et al., 1993). Este método permite realizar un *screening* de más de una generación por año y puede acelerar el desarrollo de genotipos resistentes (Bansal, 1994). Incluso Huang (Huang et al., 2014) a partir de los resultados de sus experimentos sugieren que la resistencia cuantitativa también puede detectarse en plantas jóvenes, en condiciones ambientales controladas, mediante inoculaciones en la lámina o el pecíolo de la hoja, y que existe una buena correlación con el comportamiento en planta adulta. Dada la creciente importancia de la colza

como cultivo para cubrir el déficit en la demanda mundial para alimentos, aceite y biodiesel, y el aumento de la severidad de la enfermedad del cancro del tallo, la resistencia a *P. lingam* es un objetivo importante en muchos programas de mejoramiento (Marcroft et al., 2012; Delourme et al., 2004, Fitt et al., 2006).

Las 59 líneas resistentes a moderadamente resistentes, determinadas mediante los ensayos de inoculación, fueron sometidas a análisis fenotípico y genético. El primero incluyó evaluaciones del rendimiento, determinación del contenido de aceite y perfil de ácidos grasos, mientras que las evaluaciones genéticas incluyeron la caracterización con diversos marcadores moleculares reportados para la especie para resistencia a *P. lingam*.

Las evaluaciones del rendimiento se llevaron a cabo mediante ECR en dos campañas (2014 y 2015). Se observó interacción significativa entre las líneas y las campañas (ambiente) para esta variable, lo cual podría deberse a las condiciones ambientales (Agosti y Miralles, 2011). En la campaña 2014, si bien las lluvias durante la estación de crecimiento fueron menores al promedio histórico, cabe destacar que el perfil del suelo se había recargado adecuadamente debido a las precipitaciones del mes de febrero. El rasgo característico de la campaña fueron las temperaturas más altas que las normales durante los meses de julio a octubre, que aceleraron el desarrollo del cultivo especialmente durante el periodo reproductivo, lo que podría haber provocado una disminución del contenido de aceite.

En la campaña 2015 las precipitaciones de otoño no permitieron una recarga adecuada del perfil, incidiendo negativamente en la implantación y desarrollo de la etapa inicial del cultivo. Pero debido a que las lluvias de marzo a agosto fueron mayores al promedio histórico, se redujo el estrés hídrico. Además, el promedio de temperatura media durante el período de abril – agosto fue superior al promedio histórico, lo cual aceleró la etapa vegetativa del cultivo. La temperatura media durante el mes de octubre fue menor al promedio histórico (0,5°C inferior) lo que incidiría positivamente en la longitud del período de llenado de granos (datos de la Estación Meteorológica de la Experimental INTA Paraná).

A pesar de la interacción genotipo ambiente significativa, cabe destacar que las líneas 77C, 4R, 62L, 74L y 15(2)L pertenecieron al grupo de mayores rendimientos en ambos años de evaluación, lo cual puede observarse a partir de los datos obtenidos por el análisis de comparación de medias

DGC y el test de Fisher. La prueba DGC constituye un método particionante (sin solapamiento de letras entre las medias) que es recomendable para comparar muchas medias (Di Rienzo et al., 2001). De acuerdo con Iriarte (2014), los rendimientos obtenidos en lotes de producción de las diversas regiones productoras de nuestro país son similares a los que se obtienen en los principales países productores. En los últimos años el INTA fue generando mayor información sobre la fenología y el rendimiento de genotipos adaptados a las condiciones locales, implantados en diferentes localidades de la región apta para el cultivo de esta especie, mostrando una gran variabilidad en rendimiento entre genotipos y zonas (Iriarte et al., 2013, 2014, 2015, 2016). Para nuestra localidad (Paraná, Entre Ríos), los resultados de los ensayos de esa red de evaluación mostraron rendimientos promedio de 2679 y 2024 kg/ha para las campañas 2014 y 2015, respectivamente (Iriarte et al., 2015; 2016).

Otro de los caracteres fenotípicos evaluados fue el contenido de aceite en grano. De igual modo que el rendimiento, se observó interacción significativa entre las líneas y las campañas (ambiente), lo cuál puede ser consecuencia de las condiciones ambientales antes mencionadas, afectando el contenido de aceite, principalmente por las altas temperaturas registradas durante ambos períodos agrícolas (Agosti y Miralles, 2011). Se obtuvieron promedios de 44,39% y 42,52 % para las campañas 2014 y 2015, respectivamente. En las normas de comercialización del país (VII SAGPyA, 1994) se establece un 43% como base de comercialización, y para valores inferiores a ese se establece una rebaja de 1% de cada por ciento o fracción proporcional. Cabe destacar que para la campaña 2014, un 73% de las líneas presentaron valores igual o mayor a 43% de aceite, sin superar los valores alcanzados en zonas más frías de producción del país, como Tres Arroyos, donde se han obtenido contenidos máximos de aceite de 47 % (Iriarte, 2004). En cambio, para la campaña 2015, sólo un 30,5% tuvo un contenido de aceite superiores al 43%. Esto puede atribuirse a que, en ambas campañas, las temperaturas medias estuvieron por encima del promedio histórico durante la etapa reproductiva, lo que incidiría negativamente en la acumulación de aceite. Tanto el rendimiento como la calidad del grano se reducen cuando la etapa postfloración (agosto – octubre) presenta temperaturas medias >13 °C, siendo éste el factor ambiental de mayor influencia (Agosti y Miralles, 2011). Como antecedente de nuestro país, Izquierdo et al. (2005; 2009) analizaron los efectos de la temperatura y la radiación postfloración sobre la calidad del grano de un genotipo de colza-canola cultivado en Balcarce (Buenos Aires), mostrando que ambos factores ambientales pueden modificar tanto el contenido de aceite como el perfil de ácidos

grasos, encontrándose respuestas de igual sentido pero menor magnitud que las de otras especies oleaginosas como girasol y soja. Esto explicaría la variabilidad entre las campañas debido a la interacción con el ambiente, respecto al contenido de aceite de las líneas, observada en esta tesis. Las líneas que se destacaron por su contenido de aceite en la campaña 2014, no se destacaron en 2015. Por ejemplo, la línea 32C, de mayor % de aceite en 2014 (45,79%), en 2015 presentó un valor de 41,47%, estando entre las diez de menor contenido.

En cuanto al perfil de ácidos grasos, si bien se utilizaron para el análisis los datos de los principales ácidos grasos insaturados en colza, se debe aclarar que los resultados para los ácidos grasos saturados: ácido palmítico (16:0), esteárico (18:0), araquídico (20:0), behénico (22:0) y lignocérico (24:0), estuvieron dentro de los niveles esperables en todas las líneas (~ 7,7% en total). Además, el contenido de glucosinolatos también estuvo en el rango requerido, < 20 μ moles/g, (datos no mostrados) para que sea considerada colza-canola. Las proporciones de los tres principales ácidos grasos insaturados, ácido oleico (C18:1), ácido linoleico (C18:2) y ácido linolénico (C18:3) en semillas son importantes para el aprovechamiento desde el punto de vista nutricional y de procesamiento de la colza. El perfil de ácidos grasos del grano, promedio para todos los genotipos en ambos años, fue semejante al encontrado en países de larga trayectoria de producción, como Canadá (Canola Council 2017). En líneas generales puede observarse que este contenido dio resultados homogéneos para los ácidos oleico, linoleico y linolénico, con CV pequeños, entre 0,55 y 2,45 para 2014 y de 0,97 a 4,12 para 2015. En cambio, CV más altos fueron obtenidos para ácido erúico, siendo 22,73 y 42,49 respectivamente, mostrando mayor variabilidad en los resultados. De todos modos, los valores de éste contenido fueron cercanos a cero en todas las líneas experimentales para ambos ciclos (bien por debajo del límite de 2% requerido para consumo comestible).

El alto contenido de C18:1 en el aceite de colza es deseable por su larga vida útil y estabilidad a altas temperaturas durante la fritura (Warner & Knowlton 1997; Matthäus, 2006). Además, el aceite con alto contenido de ácido oleico es también una materia prima ideal para la producción de biodiesel (Pinzi et al., 2009). En el presente trabajo las líneas 10R y 15R tuvieron porcentajes superiores al 64%. En la campaña 2015, estas dos líneas también se encuentran entre las primeras 10 que tuvieron mejores contenidos de ácido oleico, aunque con valores menores (62,75 y 62,24 %, respectivamente). Por otro lado, el ácido linolénico (C18:3) es un ácido graso altamente

insaturado; es sensible a la oxidación en el aire y por lo tanto inestable durante la fritura. Por lo tanto, un nivel reducido de C18:3 en aceite de colza es beneficioso para el almacenamiento y prolonga su vida útil (Scarth y Tang 2006). Si bien pueden diferenciarse estadísticamente, todas las líneas en ambos años presentaron valores nutricionales aceptables, < 11%). El ácido linoleico ha sido reconocido durante mucho tiempo como un ácido graso esencial, ya que los animales, inclusive los humanos, no lo pueden sintetizar. En el organismo, el ácido linoleico se convierte en ácido araquidónico y otros miembros de la familia de ácidos grasos omega-6. El ácido araquidónico es importante en las estructuras de la membrana y es el material de partida para la síntesis de sustancias "similares a las hormonas", como prostaglandinas. Estas sustancias están íntimamente involucradas en una amplia variedad de reacciones fisiológicas que van desde la coagulación de la sangre hasta la respuesta inmune (Canola Council 2017). Los resultados obtenidos para ambas campañas muestran que las líneas presentan valores nutricionales aceptables. Para 2014, podemos destacar que nuevamente 10R y 15R son las que mejores porcentajes obtuvieron. El contenido de ácido erúrico (22:1) fue cercano a cero en la mayoría de los materiales (< 0,39% para los dos años). Cabe destacar que para la campaña 2014, las líneas 7R, 16R y 10R tuvieron 0 % de ácido erúrico, resultado altamente deseado por sus características anti-nutricionales.

Como se mostró en las Tablas 25 y 26 de Resultados', en ambas campañas se repite el patrón de correlación negativa entre el contenido de ácido oleico y el resto de los ácidos grasos insaturados evaluados y con la variable % aceite en grano. Este tipo de correlación es similar a la encontrada en la literatura para colza (Werteker et al., 2010; Agosti y Miralles, 2011; Hua et al., 2016,) como para diferentes oleaginosas como ser girasol y soja (Izquierdo et al., 2006; Werteker et al., 2010; Onemli, 2012). Otro patrón común encontrado y consistente con lo informado es la asociación positiva entre el % de aceite y el contenido de ácido linolénico (Adamska et al., 2004; Agosti y Miralles, 2011).

A partir de los datos fenotípicos para los tres caracteres evaluados en cada campaña, se llevó a cabo un análisis de componentes principales y su respectivo biplot. En los gráficos biplot obtenidos para cada campaña se pueden diferenciar las líneas con los comportamientos más extremos. Por ejemplo, para la campaña 2014, las líneas 15R y 10R son las que presentaron mayor contenido de ácido oleico, la línea 32C es la destacada en cuanto al contenido de ácido linolénico,

y la línea 8C también presentó el mayor contenido de este ácido y del contenido de aceite (Figura 8). La misma interpretación se puede realizar para la línea 77C, la cual se ubica como el punto más extremo entre las variables ácidos linolénico y ácido linoleico, y en el medio de ambas. Esta línea estuvo dentro de las que tuvieron mayores valores para estas variables. Para la campaña 2015 se puede destacar, por ejemplo, a la línea 56L la cual tuvo el mayor contenido de ácido linolénico y un rendimiento intermedio, posicionándose como un vértice del polígono entre las dos variables. La línea 11L, la cual se posiciona en un extremo medio entre las variables ácido oleico y ácido linoleico, presentó valores intermedios-altos para ambas variables. Este análisis simplemente ayuda a la interpretación de los resultados en cómo las componentes principales separan o agrupan las líneas experimentales según sus comportamientos.

Agosti (2011) demostró que bajo las condiciones ambientales de Buenos Aires y con los genotipos disponibles en el país, es posible obtener granos de colza-canola de muy buena calidad para uso alimentario, como ser alto contenido de aceite, bajo contenido de ácidos grasos saturados y alto contenido de monoinsaturados, y niveles menores al máximo de tolerancia de ácido erúrico (< 2 %) y glucosinolatos (< 20 μ moles g⁻¹). En el presente trabajo, se observó también, que pese a algunas condiciones ambientales adversas (*i.e.* altas temperaturas medias durante gran parte del ciclo del cultivo), algunas líneas inéditas del programa de mejoramiento mostraron valores de calidad adecuados como los previamente mencionados.

Las mismas líneas experimentales evaluadas fenotípicamente fueron sometidas a análisis genotípico. De todos los genes de resistencia a *Phoma* conocidos hasta el momento (Raman, 2012; Larkan et al., 2013), en el presente trabajo se eligieron 6 de ellos (*Rlm1*, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rpg3Dun*, *BLMR2* y *LepR3*) para detectar mediante marcadores moleculares su presencia en las líneas experimentales ensayadas. Para caracterizar las líneas, se debió optimizar todos los protocolos de los marcadores que se amplificaron mediante PCR.

Para el caso de los marcadores SNP (10B23a para *BLMR2* y SNP80870 para *Rlm3*) se presentaron algunos resultados no esperados. Para el marcador del alelo de resistencia *Rlm3*, SNP80870, la bibliografía sugiere como resultado amplicones de 1300 pb, y dentro de los mismos cambios en la secuencia de CTTTCT a CCTTTT indicaría que el genotipo es resistente al alelo *Avrlm3* (Wang, 2013). Para este marcador sólo se lograron amplificar 13 de las 59 líneas experimentales ensayadas. Se descartó que sea un problema de calidad o concentración del ADN molde, ya que

se realizaron los controles necesarios y el mismo fue utilizado para la amplificación de los restantes marcadores moleculares propuestos en la presente tesis, obteniendo resultados satisfactorios. No obstante, el bajo número de muestras amplificadas, las mismas se enviaron a secuenciar. Los resultados de tales secuenciaciones mostraron que en todos los casos el SNP de interés estaba ausente, indicando que las líneas no presentan resistencia contra el alelo *Avrlm3* de *P. lingam*. Cuando se realizaron los alineamientos de las secuencias obtenidas utilizando BLASTn2.2.25 (Zhang et al., 2000), con la *RefSeq Genome Database*, los resultados de los mismos indicaron, con altos porcentajes de identidad (91-96%), que se trata de *Brassica napus putative receptor-like protein kinase Atlg80870*, mRNA. Se ha demostrado que los receptores *protein-kinase* están implicados en respuesta a patógenos. En *A. thaliana*, varias de las proteínas pertenecientes a la super-familia de *Cysteine-rich Receptor-Like Protein Kinase (CRK)*, una de las más numerosas en esta especie (Chen, 2001), están involucradas en mecanismos de defensa de la planta (Acharya et al, 2007; Chen et al., 2003; Ederli et al., 2011; Rayapuram et al., 2012). En *B. napus*, se encontró que varias CRK están involucradas en la regulación positiva de varios procesos de defensa durante la infección de cotiledones por *P. lingam* (Haddadi et al., 2015). Además, la detección extracelular de elicitores de patógenos a menudo se logra mediante el despliegue de proteínas del huésped con motivos de repetición rica en leucina extracelular (LRR) capaces de facilitar las interacciones proteína-proteína, especialmente las proteínas similares a receptores de membrana celular (LRR-RLP) y a receptores quinasas (LRR-RLK) (Kruijt et al., 2005; Stotz et al., 2014; Yang et al., 2012). Esto podría sugerir que los amplicones presentes en las 13 líneas podrían corresponder a la presencia de una CRK involucrada en la defensa contra el aislamiento ensayado.

Para el marcador del alelo *BLMR2*, 10b23a (Long et. al, 2011) como se comentó en Resultados, la información sobre el SNP y sobre las reacciones de PCR logradas fue insuficiente. Por esto, utilizando la plataforma *Primer Blast Software* se obtuvieron los posibles amplicones del correspondiente par de oligonucleótidos publicado (Long et al., 2011). Como resultados se obtuvieron dos posibles bandas: *Brassica napus two-component response regulator-like APRR3 (LOC106415367)*, y *transcript variant X1 y X2, mRNA*. Este alelo se encuentra en el cromosoma A10 y su producto participa en el control del ritmo circadiano de la planta (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/106415367>). Las reacciones de PCR se pusieron a punto utilizando el mismo protocolo que para el SNP80870. Se obtuvieron como resultado 3 bandas de

diferente tamaño: 400 pb, 250 pb y 150 pb. Luego de la edición de las secuencias obtenidas para los tres amplicones, se realizaron los alineamientos con BLASTn 2.2.25 (Zhang et al., 2000), dando como resultado alineamientos de alta homología con: *beta-glucosidase 40-like en cultivar ZS11 chromosome C5, Bra_napus_v2.0*; y *Brassica napus cultivar ZS11 chromosome A9, Bra_napus_v2.0*. Si bien la *beta-glucosidase 40-like* (LOC106347125) está implicada en vías metabólicas como la biosíntesis de metabolitos secundarios, el metabolismo de cianoaminoácidos, la biosíntesis de fenilpropanoides y el metabolismo del almidón y sacarosa, según el reporte de la secuencia brindado por NCBI (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene?cmd=Retrieve&dopt=full_report&list_uids=106347125), en *A. thaliana*, organismo de alta similaridad con *B. napus*, esta subunidad proteica es esencial para la acumulación estable del receptor EFR que determina la percepción específica del factor de elongación bacteriano Tu (EF-Tu). Este es un potente inductor de la respuesta de defensa a los patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP). En este organismo es requerido para la activación sostenida de la señalización mediada por EFR (UniProtKB - Q9FM96). Se podría asociar entonces, que al ser un inductor de respuesta a PAMPs, podría participar en la vía de defensa contra los de *P. lingam*. De todos modos, debido a que los resultados no se condicen con el alelo para *BLMR2*, éste marcador no pudo ser tenido en cuenta para los análisis posteriores.

Resultados de mapeo genético y físico confirmaron que *Rlm1* y *Rlm4* están localizados en diferentes regiones genómicas ubicados a ~ 1 Mb de distancia en el cromosoma A7 de *B. napus* y, por lo tanto, representan diferentes genes (Delourme et al., 2004). Raman et al. (2012a) encontraron que los marcadores SSR Xol12-e03 y Xna12-a02a flanquean el gen de resistencia *Rlm1*, generando bandas de 190 pb (resistente) y alelo nulo (no resistente) para el primero y alelos nulo y de 214 pb (resistente), y los alelos de 128 y 177 pb (no resistente) para el segundo. En el presente trabajo, al utilizarse ambos marcadores, sólo se consideraron poseedoras de la resistencia contra avrlm1 aquellas líneas que hayan dado los alelos resistentes para ambos marcadores. Las que reunieron estas condiciones fueron las líneas 23R, 3C, 61C, 6R y 71L. Debido a que el inóculo utilizado resultó ser GP3, es de esperar encontrar genotipos que posean *Rlm1* (y *Rlm4*). A diferencia de Delourme et al., (2004), quienes desarrollaron un marcador tipo RAPD para el locus *Rlm1*, los marcadores SSR utilizados en este trabajo poseen la ventaja de ser altamente polimórficos, reproducibles, abundantes y más adecuados para análisis genéticos de alto rendimiento en comparación con los RAPD. En cuanto al marcador SSR utilizado para identificar

el alelo *Rlm4*, BMR075, fue mapeado a 0.8 cM por Raman et al., (2012b). Aquellas líneas que poseen dicho alelo dieron una banda de 180 pb. Estas fueron: 10R, 28R, 15L, 18L, 52L, 53L, 68L, 74L, 77L, 15(3)L, 17L, 32L, 1C, 2C, 4C y 8C. El alelo de avirulencia de *P. lingam*, AvrLm4-7, codifica una proteína rica en cisteína de 143 aminoácidos, destinada para ser secretada y fuertemente inducida durante las primeras etapas de la infección de la planta. Este alelo confiere una doble especificidad de reconocimiento por los genes de resistencia *Rlm4* y *Rlm7* (Parlange et al., 2009) y evita el reconocimiento mediado por *Rlm4* a través de un único cambio de aminoácidos. Parlange et al. (2009), comprobaron que una única mutación puntual, que conduce al cambio de una glicina a un residuo de arginina, es responsable de la pérdida de la especificidad de AvrLm4 mientras que el reconocimiento de AvrLm7 no se modifica. Por el momento, no está claro si *Rlm4* y *Rlm7* representan formas alélicas del mismo gen de resistencia ya que estos genes, junto con *Rlm3* y *Rlm9*, se encuentran en el mismo grupo de ligamiento (Delourme et al., 2004). Además, *Rlm3* y *Rlm4*, o *Rlm7* y *Rlm3* nunca se encuentran juntos en las mismas líneas puras de *B. napus*, pero si se pueden encontrar en genotipos híbridos (Balesdent, datos no publicados). Como demostró Delourme et al (2004), la falta de aislamientos con especificidad AvrLm4 solamente, hace imposible evaluar la presencia de *Rlm4* en genotipos de *B. napus* que expresan *Rlm7*. Entonces, *Rlm3*, *Rlm4*, *Rlm7* y *Rlm9* podrían corresponder a un grupo de genes estrechamente ligados, a un gen único con alelos diferentes, o a una combinación de estas dos hipótesis (Delourme et al., 2004).

Como demostró Dusabenyagasani y Fernando (2008), el marcador SCAR BN204 vinculado al gen de resistencia *Rpg3Dun* se puede utilizar en la selección asistida por marcadores de resistencia contra el cancro del tallo causada por *P. lingam* de GP3. El análisis de ligamiento realizado por los autores, identificó un grupo de ligamiento en el que el gen de resistencia 'Dunkeld' (*Rpg3Dun*) estaba estrechamente relacionado con el marcador SCAR BN204 y cuatro marcadores SRAP. El experimento de selección de resistencia reveló que 'Dunkeld' era resistente contra aislamientos de GP3, pero era susceptible a GP2 y GP4, sugiriendo la presencia de al menos un gen de resistencia mayor, además de la resistencia poligénica, en este cultivar. En el presente trabajo, se utilizó este marcador para identificar las líneas que posean este gen de resistencia. De las líneas evaluadas, 22 presentaron el amplicón de 799 pb, indicando la presencia del alelo de resistencia. En el cromosoma A7, la colza posee varios genes que codifican proteínas quinasas o dominios LRR. Se informó que el marcador SCAR (BN204), que mostró co-

segregación con el *locus* RpgDun, se deriva de una región que muestra 92% de identidad de aminoácidos con la proteína serina treonina 20 (ste-20) quinasa relacionada con la defensa en *Arabidopsis thaliana* (Dusabenyagasani y Fernando, 2008).

En el caso del marcador para *LepR3*, InDel10-1 (Larkan et al., 2013) los resultados fueron satisfactorios, obteniéndose las bandas esperadas según los autores, 506 pb para aquellos genotipos que contengan el alelo de resistencia y de 794 pb para los que no lo posean. El 50% de las líneas dio resultado positivo para este marcador. Además, se pudo observar una banda intermedia a las citadas en la bibliografía, de aproximadamente 600 pb, la cuál podría ser otro alelo del gen en estudio, lo cual será comprobado en trabajos posteriores a esta tesis. Como demostraron Larkan et al. (2013), el alelo *LepR3* ofrece resistencia contra el alelo avrlm1. En algunas regiones de Australia, en 2004, ocurrió una rápida pérdida de resistencia efectiva de *LepR3* en materiales de *B. napus*, incluido 'Surpass400' poco después de su implantación (Sprague et al., 2006). Dado que las variedades con el gen *Rlm1* ya estaban en el mercado en Australia antes del lanzamiento de 'Surpass400' (Rouxel et al., 2003) y que coincidió con una disminución de la frecuencia de Avrlm1 (Van de Wouw et al., 2010), es posible que una gran población de *P. lingam* se haya dirigido hacia una alta proporción de patotipos avrLm1 virulentos, por previa exposición a *Rlm1*. Estos hallazgos implican que las reacciones fenotípicas de *Rlm1* y *LepR3* no pueden actualmente ser diferenciadas. Esto también se condice con los resultados de las inoculaciones artificiales ya que, en la determinación del grupo de patogenicidad, el cultivar Quinta (*Rlm1-4* y 3) mostró resistencia intermedia frente al aislamiento utilizado, implicando la presencia del alelo virulento avrlm1 en el mismo. *LepR3* fue el primer gen de resistencia a la enfermedad en ser clonado (Larkan et al., 2013) y codifica una proteína de tipo receptora rica en repeticiones de leucina (LRR-RLP). Por otro lado, Larkan et al. (2014) encontraron que éste gen co-localiza con Rlm2 en el cromosoma A10 de *B. napus*. Recientemente se descubrió que Rlm2, el cuál fue el segundo alelo en ser clonado, es una variante alélica del locus *LepR3* (LRR-RLP), que transmite la resistencia específica a los aislamientos de *P. lingam* que posean AvrLm2 (Larkan et al., 2015), demostrando la adaptabilidad de la especificidad del gen LRR-RLP en la señalización durante la defensa contra el patógeno.

Debido a los resultados incompletos para *Rlm3* y la falta de información para el alelo *BLMR2*, no fueron tenidos en cuenta para el análisis de conglomerados ni para el análisis conjunto final de

todos los resultados. Dado que hoy se conoce el genoma completo de varios cultivares de *B. napus* (Chalhoub et al., 2014; Sun et al., 2017), estos alelos serán re estudiados en un futuro, así como también los amplicones obtenidos que no se corresponden con la bibliografía citada.

Por su parte, los datos de los marcadores genéticos Xna12-a02a/Xo112-e03a (*Rlm1*), BRNS075 (*Rlm4*), BN204 (*Rpg3Dun*), Ind10-12 (*LepR3*), fueron estudiados mediante un análisis de conglomerados a partir de la matriz de distancias de Dice generada, considerando que es una de las medidas de distancia recomendada para datos binarios (Bruno y Balzarini, 2010). Para construir la matriz de datos, se asignó el valor 1 a la presencia del alelo y 0 para ausencia, sin discriminar entre alelos de cada marcador. Se realizó el agrupamiento a través de un método jerárquico UPGMA, ya que se pretenden encontrar particiones jerarquizadas, esto es, consecutivamente más finas (o menos finas), luego los objetos son unidos (o separados) en grupos paso por paso (Balzarini et al., 2011). Se obtuvo un coeficiente de correlación cofenética de 0.942, cuyo valor implica una muy buena descripción del agrupamiento de los datos. La primera separación importante que se muestra en el dendrograma (Figura 17, página 58), a 0,91, se da entre el grupo de líneas que no presentaron ningún alelo de resistencia de los genes considerados (16R, 19R, 1R, 22(3)C, 34C, 34(3)C, 47C, 47(3)C, 4R, 76C, 77C, 7R, 8R Y 9L) y el grupo de líneas que presentó al menos un alelo de resistencia. En éste último grupo podemos encontrar 10 subgrupos (A-J) según los alelos de resistencia que presentaron. Si bien el presente trabajo tiene como objetivo la selección de líneas con buena performance y con diferentes *loci* de resistencia, esta clasificación dada por el análisis de conglomerados, es muy útil como análisis *a priori* para establecer cuáles podrían ser las líneas candidatas para iniciar un programa de apilamiento genético teniendo en cuenta solo su composición genética. Varias pueden ser las combinaciones de líneas interesantes. Por ejemplo, líneas experimentales del subgrupo C (*Rlm1*, *LepR3*) podrían cruzarse con líneas experimentales del F (*Rlm4*, *Rpg3Dun*) para lograr genotipos en la progenie portadores de los 4 genes de resistencia, aumentando la durabilidad de la resistencia. Otra combinación interesante podría darse entre el subgrupo D (*Rlm1*, *LepR3* y *Rpg3Dun*) con el J (*Rlm4*) con un objetivo similar. Respecto a las líneas que no presentaron ningún alelo de resistencia de los estudiados, probablemente tengan otro gen de resistencia diferente, cuyo análogo avirulento esté presente en el aislamiento utilizado. Esto podría comprobarse realizando inoculaciones sobre otros cultivares diferenciales con genes de resistencia conocidos, para

dilucidar la identidad del patógeno y así poder establecer los posibles genes de resistencia en estas líneas (Marcroft et al., 2012a, Rouxel et al., 2003).

El desarrollo de la genética molecular y la tecnología asociada como MAS ha llevado a la aparición de la piramidización génica (Raj Kumar et al., 2010), que implica apilar múltiples genes que conducen a la expresión simultánea de más de un gen en una variedad para desarrollar resistencia duradera. La piramidización de genes está ganando considerable importancia ya que mejoraría la eficiencia del desarrollo de nuevos genotipos. El éxito de la piramidización de genes depende de varios factores críticos, incluido el número de genes que se transferirán, la distancia entre los genes diana y los marcadores asociados, el número de genotipos seleccionados en cada generación, y la naturaleza del germoplasma, entre otros. Una forma estadística de analizar datos de naturaleza diferente, como ser marcadores moleculares (binarios) con variables continuas, tales como rendimiento, % de aceite y perfil de ácidos grasos, puede ser realizar análisis Procrustes generalizado (APG) (Bramardi, 2005, Balzarini, 2011; Balzarini y Di Renzo 2016; Di Rienzo, 2017) Las dos primeras componentes del análisis de Procrustes generalizado realizado en este trabajo explican el 89% de la variación total del consenso y el consenso obtenido entre ambos tipos de variables fue del 64%.

En el ARM del consenso se pueden diferenciar muy bien las distancias entre líneas ya sea debido a las distancias establecidas por los marcadores moleculares como por las variables fenotípicas. Se podría entonces elegir el grupo de líneas adecuadas para iniciar el programa de apilamiento genético, según los perfiles genéticos que tuvieron y las características fenotípicas evaluadas. Dentro de uno de los grupos descriptos, las líneas seleccionadas son 62L (*LepR3*, *Rpg3Dun*) y 52L (*Rpg3Dun*, *LepR3*, *Rlm4*) que tuvieron muy buenos rendimientos y porcentajes de aceite y perfil ácido, con valores similares a la media. Por su parte, dentro de las líneas descriptas en el segundo cuadrante, se encuentran las líneas 61C y 71L las cuales contienen los alelos *Rlm1* y *LepR3* y presentaron muy buenas características fenotípicas. Realizando cruzamientos entre este grupo de líneas se puede lograr incorporar los genes de resistencia *Rpg3Dun*, *LepR3*, *Rlm4* y *Rlm1* en un solo genotipo, luego de varias rondas de selección tanto por marcadores moleculares como por sus características agronómicas.

CONCLUSIONES

- El aislamiento de *P. lingam* utilizado para el presente trabajo de tesis pertenece al GP3.
- De las 469 líneas experimentales ensayadas, 59 resultaron resistentes o medianamente resistentes al aislamiento de *P. lingam* utilizado en las inoculaciones.
- Las variables fenotípicas evaluadas, rendimiento, porcentaje de aceite y contenido de ácidos grasos, mostraron interacción significativa con el ambiente ($\alpha = 0.05$) y a su vez diferencias significativas entre líneas en ambas campañas de evaluación ($p < 0.0001$)
- El porcentaje de aceite promedio fue $42,52 \pm 0,05\%$ para 2014 y $44,39 \pm 0,05\%$ para 2015. Las líneas 76C, 9C, 32(3)C, 34(3)C y 32C fueron las de mayor porcentaje de aceite para 2014 y 6R, 19R, 18R, 1R, 8R y 9L para 2015. El perfil de ácidos grasos promedio para todos los genotipos en ambos años estuvo dentro de los valores nutricionales aceptables.
- El rendimiento promedio obtenido en la campaña 2014 fue de $2686,49 \pm 339,92$ kg/ha y de $2783,56 \pm 457,37$ kg/ha para 2015. Se puede destacar que las siguientes líneas dieron altos rendimientos en ambas campañas: 77C, 4R, 62L, 74L y 15(2)L.
- Dentro de las 59 líneas evaluadas, 24 tuvieron un único alelo de resistencia, seis fueron positivas para el alelo *Rpg3Dun*, una para *Rlm1*, 11 para *LepR3* y seis para *Rlm4*. Otras presentaron dos alelos de resistencia, tres tienen la combinación *Rlm1* y *LepR3*, dos *Rlm4* y *Rpg3Dun*, otras dos *Rlm4* y *LepR3* y siete presentaron los *lociLepR3* y *Rpg3Dun*. Más notorio aun, hubo líneas que fueron positivas para tres alelos de resistencia, seis para *Rlm4*, *LepR3* y *Rpg3Dun* y 1 para *Rlm1*, *LepR3* y *Rpg3Dun*.

- En el programa de mejoramiento de colza de INTA existen líneas inéditas que poseen diferentes genes de resistencia específica a *P. lingam* y que además presentan buena *performance* para las otras características evaluadas.
- Mediante un análisis de Procrustes generalizado se eligió a las líneas 62L, 52L, 61C y 71L como parentales para iniciar un programa de apilamiento genético, ya que mediante diferentes cruzamientos entre estas líneas se podrían piramidizar los genes de resistencia *Rlm4*, *LepR3*, *Rlm1* y *Rpg3Dun* y además presentan buenas características agronómicas.

BIBLIOGRAFÍA

- ACHARYA B. R., RAINA S., MAQBOOL S. B., JAGADEESWARAN G., MOSHER S. L., APPEL H. M. (2007). Overexpression of CRK13, an Arabidopsis Cysteine-rich receptor-like kinase, results in enhanced resistance to *Pseudomonas syringae*. *Plant J.* 50, 488–499.
- ADAMSKA E, CEGIELSKA-TARAS T, KACZMAREK Z, SZALA L (2004). Multivariate approach to evaluating the fatty acid composition of seed oil in a doubled haploid population of winter oilseed rape (*Brassica napus* L.). *J. Appl. Genet.* 45(4):419-25.
- AGOSTI, M. B., & MIRALLES, D. (2011). Fertilización nitrógeno-azufrada y variabilidad genotípica en el rendimiento y la calidad de grano en colza-canola (*Brassica napus* L.). Magister tesis. Escuela para Graduados, Facultad de Agronomía, Universidad de Buenos Aires, 169.
- AHMAD R., FARHATULLAH, C. F. QUIROS, H. REHMAN AND Z. A. SWATI. (2014). Genetic diversity analyses of *Brassica napus* accessions using SRAP molecular markers. *Plant Genet. Resour.* 12(1): 14–21.
- AL-SHEHBAZ, I. (2012). A generic and tribal synopsis of the Brassicaceae (Cruciferae). *Taxon*, 61(5), 931-954.
- ANSAN-MELAYAH, D., M.H. BALESDENT, R. DELOURME, M.L. PILET, M. RENARD, X. TANGUY & T. ROUXEL. (1998). Genes for race-specific resistance against blackleg disease in *Brassica napus* L. *Plant Breed.* 117:373–378.
- AUBERTOT JN; WEST JS; BOUSSET-VASLIN L; SALAM MU; BARBETTI MJ; DIGGLE AJ (2006). Improved Resistance Management for Durable Disease Control: A Case Study of *Phoma* Stem Canker of Oilseed Rape (*Brassica napus*). *European J. of Plant Pathology*, 114: 91-106.
- AZAM, S.M., FARHATULLAH, A. NASIM, S. SHAH AND S. IQBAL (2013). Correlation studies for some agronomic and quality traits in *Brassica napus* L. *Sarhad J. Agric.* 29(4): 547-550.
- BADAWY, H.M.A., HOPPE, H.H., & KOCH, E. (1991). Differential reactions between the genus *Brassica* and aggressive single spore isolates of *Leptosphaeria maculans*. *J. Phytopathol.*, 131, 109–119.

- BAI J., PENNILL L. A., NING J., LEE S. W., RAMALINGAM J., WEBB C. A., ZHAO B., SUN Q., NELSON J. C., LEACH J. E., HULBERT S. H. (2002). Diversity in nucleotide binding site leucine-rich repeat genes in cereals. *Genome Res.* 12, 1871–1884.
- BALESDENT M.H., FUDAL I., OLLIVIER B., BALLY P., GRANDAUBERT J., EBER F, et al. (2013). The dispensable chromosome of *Leptosphaeria maculans* shelters an effector gene conferring avirulence towards *Brassica rapa*. *New Phytol.* 2013;198(3):887-98.
- BALESDENT M-H, LOUVARD K, PINOCHET X, ROUXEL T. (2006). A large-scale survey of races of *Leptosphaeria maculans* occurring on oilseed rape in France. *European J. of Plant Pathology*, 114, 53–65.
- BALESDENT M-H., ATTARD A., KÜHN ML., ROUXEL T. (2002). New avirulence genes in the phytopathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *Phytopathology*, 92, 1122–1133.
- BALZARINI M.G. y DI RIENZO J.A. (2016). InfoGen versión 2016. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>
- BALZARINI, M.; TEICH, I.; BRUNO, C.; PEÑA, A. (2011). Making genetic biodiversity measurable: a review of statistical multivariate methods to study variability at gene level. *Revista de la Facultad de Ciencias Agrarias. Universidad Nacional de Cuyo. Mendoza. Argentina.* 43(1): 261-275.
- BANSAL, VK; BLENIS, P; STRINGAM, GR; THIAGARAJAH, MR; TEWARI, JP (2002). Screening of *Brassica napus* against blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*: effects of inoculum concentration, sub culturing of the pathogen, and time of disease screening. *Canadian J. of Plant Pathology*, 24, 3: 323-326.
- BANSAL, VK; KHARBANDA, PD; STRINGAM, GR; THIAGARAJAH, MR y TEWARI, JP (1994). A Comparison of Greenhouse and Field Screening Methods for Blackleg Resistance in Doubled Haploid Lines of *Brassica napus*. *Plant Disease* 78: 276-281.
- BARBETTI, M.J.; KHANGURA, R.K. (1999). Managing blackleg in the disease-prone environment of Western Australia. In *Proceedings of the 10th International Rapeseed Congress, Canberra, Australia, 26–29 September 1999.*
- BASSAM BJ, CAETANO-ANOLLÉS G, GRESSHOFF PM. (1991). Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, 198(1):217.
- BENT A.F., MACKEY D. (2007). Elicitors, effectors, and R genes: the new paradigm and a life time supply of questions. *Annual Review of Phytopathology*, 45,399–436.

- BOYD L.A. (2006). Can the durability of resistance be predicted? *J. Sci. Food Agric.* 86:2523–2526.
- BRENT, KJ y HOLLOMON, DW (2007). Fungicide Resistance in Crop Pathogens: How Can It Be Managed Fungicide Resistance Action Committee, Monograph N1, 2nd ed.: 60.
- BROWN J., DAVIS J.B., LAUVER M. AND WYSOCKI D. (2008). USCA Canola Growers' Manual. University of Idaho & Oregon State University.
- BRUN, H; CHÈVRE A-M; FITT, BDL; POWERS, S; BESNARD, A-L; ERMEL M; HUTEA, U V; MARQUER, B; EBER, F; RENARD, M (2010). Quantitative resistance increases the durability of qualitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *New Phytol.* 185:285–299.
- BRUNO C. Y BALZARINI M. (2010). Ordenaciones de material genético a partir de información multidimensional. *Rev. FCA UNCUyo*, 42: 183-200.
- BUZZA G, EASTON A. (2002). A new source of blackleg resistance from *Brassica sylvestris*. In: GCIRC Technical Meeting. Poznan, Poland. Bulletin No.18.
- CASTELLANOS G., JARA C., MOSQUERA G. (2011). Guías prácticas de laboratorio para el manejo de patógenos del frijol. Centro Internacional de Agricultura Tropical (CIAT), Cali, CO. 232.
- CATANZARITI, A. M., DODDS, P.N, LAWRENCE, G. J, AYLIFFE, M. A, AND ELLIS, J. G. (2006). Historically Expressed Secreted Proteins from Flax Rust Are Highly Enriched for Avirulence Elicitors. *The Plant Cell* 18(1): 243–256.
- CATANZARITI, A. M., DODDS, P.N., VE, T., KOBE, B., ELLIS, J. G, AND STASKAWICZ, B.J. (2010). The AvrM Effector from Flax Rust Has a Structured C-Terminal Domain and Interacts Directly with the M Resistance Protein. *Molecular Plant-Microbe Interactions: MPMI* 23(1): 49–57.
- CHALHOUB, B. et al. (2014). Early allopolyploid evolution in the post-Neolithic *Brassica napus* oilseed genome. *Science* 345, 950.
- CHEN K., DU L., CHEN Z. (2003). Sensitization of defense responses and activation of programmed cell death by a pathogen-induced receptor-like protein kinase in *Arabidopsis*. *Plant Mol. Biol.* 53, 61–74.
- CHEN Z. X. (2001). A superfamily of proteins with novel Cysteine-rich repeats. *Plant Physiol.* 126, 473–476.

CHISHOLM S.T., COAKER G., DAY B., STASKAWICZ B.J. (2006) Host-microbe interactions: shaping the evolution of the plant immune response. *Cell* 124:803–814.

COLLIER, SARAH M., AND MOFFETT, PETER. (2009). NB-LRRs Work a “Bait and Switch” on Pathogens. *Trends in Plant Sci.* 14 (10): 521–529.

CROUCH JH, LEWIS BG, MITHEN RF. (1994). The effect of A genome substitution on the resistance of *Brassica napus* to infection by *Leptosphaeria maculans*. *Plant Breeding* 112:265–278.

CUNNINGHAM, G.H. (1927). Dry-rot of swedes and turnips: Its cause and control. N. Z. Dept. Agric. Bull., 133.

DANGL JL, HORVATH DM, STASKAWICZ BJ (2013). Pivoting the plant immune system from dissection to deployment. *Sci.* 341:746–51.

DATOS ABIERTOS AGROINDUSTRIA. <http://www.minagri.gob.ar>

DE SOUZA, J.C.; GIECO, L.C.; MILISICH, H.J (2014). Caracterización fenotípica de cultivares y líneas de colza (*Brassica napus*) por su resistencia a *Leptosphaeria maculans*. 1º Simposio Latinoamericano de Canola, 19-21 de agosto de 2014. Passo Fundo, RS, Brasil.

DELOURME R., PIEL N., HORVAIS R., POUILLY N., DOMIN C., VALLEE P., FALENTIN C., MANZANARES-DAULEUX MJ., RENARD M. (2008). Molecular and phenotypic characterization of near isogenic lines at QTL for quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape (*Brassica napus* L.). *Theor. Appl. Genet* 117:1055–1067.

DELOURME, R; BOUSSET, L; ERMEL, M; DUFFÉ, P; BESNARD, AL; MARQUER, B; FUDAL, I; LINGLIN, J; CHADŒUF, J Y BRUN H (2014). Quantitative resistance affects the speed of frequency increase but not the diversity of the virulence alleles overcoming a major resistance gene to *Leptosphaeria maculans* in oilseed rape. *Infection, Genetics and Evolution*, in press.

DELOURME, R; CHÈVRE, AM; BRUN, H; ROUXEL, T; BALESSENT, MH; DIAS, JS; SALISBURY, P; RENARD, M y RIMMER, SR (2006). Major gene and polygenic resistance to in oilseed rape (*Brassica napus*). *European J. of Plant Pathology*, 114: 41-52.

DELOURME, R; PILET-NAYEL, ML; ARCHIPIANO, M; HORVAIS, R; TANGUY, X; ROUXEL, T; BRUN, H; RENARD, M y BALESSENT, MH (2004). A cluster of major specific resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Phytopathology*, 94: 578-583.

DEPARTAMENTO DE AGRICULTURA DE ESTADOS UNIDOS (2016). www.usda.gov.

- dE SOUSA J., GIECO L., MLISICH H. (2014). Caracterización fenotípica de cultivares y líneas de colza (*Brassica napus*) por su resistencia a *Leptosphaeria maculans*. 1er simposio Latino Americano de Canola. Passo Fundo, RS, Brasil.
- DI RIENZO J.A., CASANOVES F., BALZARINI M.G., GONZALEZ L., TABLADA M., ROBLEDO C.W. (2017). InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- DI RIENZO, J.; CASANOVES, F.; GONZALEZ, L.; TABLADA, E.; DÍAZ M.; ROBLEDO, C.; BALZARINI, M. (2001). Estadística para las Ciencias Agropecuarias. 4ta Ed. Triunfar. Córdoba, Argentina.
- DIEPENBROCK, W. Y G. GEISLER. (1979). Compositional changes in developing pods and seed of oilseed rape (*Brassica napus* L.) as affected by pod position on the plant. Canadian J. of Plant Science 59: 819-830.
- DION, Y; GUGEL, RK; RAKOW, GFW; SÉGUIN-SWARTZ, G; LANDRY, BS (1995). RFLP Mapping of Resistance to the Blackleg Disease [Causal Agent, *Leptosphaeria maculans* (Desm.) Ces. Et De Not.] in Canola (*Brassica napus* L.). Theor. and Applied Genetics; 91(8): 1190-1194.
- DODDS, PETER N, AND RATHJEN, JOHN P. (2010). Plant Immunity: Towards an Integrated View of Plant-Pathogen Interactions. Nature reviews. Genetics 11(8): 539–548.
- DUSABENYAGASANI, M; AND FERNANDO, W (2008). Development of a SCAR marker to track canola resistance against blackleg caused by *Leptosphaeria maculans* pathogenicity group 3. Plant Dis. 92:903-908.
- EDERLI L., MADEO L., CALDERINI O., GEHRING C., MORETTI C., BUONAURO R. (2011). The *Arabidopsis thaliana* Cysteine-rich receptor-like kinase CRK20 modulates host responses to *Pseudomonas syringae* pv. tomato DC3000 infection. J. Plant Physiol. 168, 1784–1794.
- ELLIS J., DODDS P., PRYOR T. (2000). Structure, function and evolution of plant disease resistance genes. Curr. Opin. Plant Biol. 3, 278–284.

- FAYYAZ L., FARHATULLAH M. ASHIQ RABBANI, SIDRA IQBAL, MEHWISH KANWAL AND IFFAT NAWAZ (2014). Genetic diversity analysis of *Brassica napus*/*Brassica campestris* progenies using microsatellite markers. Pak. J. Bot., 46(3): 779-787.
- FITT B.D.L., BRUN H., BARBETTI M.J. AND RIMMER S.R. (2006). World-wide importance of *phoma* stem canker (*L. maculans* and *L. biglobosa*) on oil seed rape (*Brassica napus*). European J. of Plant Pathology, 114:3–15.
- FLOR HH (1971). The Current Status of the Gene-for-Gene Concept. Annu. Rev. Phytopathol. 9:275-96.
- FOPA FOMEJU B., FALENTIN C., LASSALLE G., MANZANARES-DAULEUX MJ. AND DELOURME R. (2014) Homoeologous duplicated regions are involved in quantitative resistance of *Brassica napus* to stem canker. BMC Genomics 2014 15:498.
- FORMENTO A.N. 2014. Manual de enfermedades de colza (*Brassica napus*). Reconocimiento, diagnóstico y manejo. INTA EEA Paraná, 34 – 53.
- FOWLER, D.B. and R.K. Downey. (1970). Lipid and morphological changes in developing rapeseed, *Brassica napus*. Canadian J. of Plant Science 50: 233–247.
- FRIEDT W, SNOWDON RJ (2010) Oilseed rape. In: Vollmann J, Istvan R (eds) Handbook of Plant Breeding, Vol. 4: Oil crops breeding. Springer Verlag, Berlin/Heidelberg, 91-126.
- FUDAL I., ROSS S., GOUT L., BLAISE F., KUHN ML., ECKERT MR., CATTOLICO L., BERNARD SAMAIN S., BALESDENT MH., ROUXEL T. (2007). Heterochromatin-like regions as ecological niches for avirulence genes in the *Leptosphaeria maculans* genome: map-based cloning of AvrLm6. Molecular Plant Microbe Interactions, 20:459–470.
- GABRIEL J, INDACOCHEA B, AYÓN F, VALVERDE A, MÁXIMO V, CASTRO C, MANOBANDA M (2017). Principios básicos de la resistencia genética a patógenos, plagas y factores abióticos. Grupo COMPAS, Universidad Estatal del Sur de Manabí(UNESUM), Jipijapa, Ecuador. 116 p.
- GAETÁN, S (2006). Epidemia de canchros y lesiones en base de tallo de blackleg (*Phoma lingam*) en cultivos de canola en la Argentina. XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 28- 30 junio de 2006. Catamarca. Resúmenes: 262-263.
- GAETÁN, S y MADIA, M (2006). Incidencia de enfermedades foliares de origen fungoso en cultivares comerciales de canola en la Argentina. XII Jornadas Fitosanitarias Argentinas. 28-30 junio de 2006. Catamarca. Resúmenes: 344-345.

GAETÁN, S; MADIA, M y RODRÍGUEZ, A (2001). Pie negro o Necrosis del cuello (*Phoma lingam* (Tode: Fr.) Desmaz.) en cultivos de colza canola en la Argentina. Boletín Sanidad Vegetal. Plagas, 27: 159-168.

GHANBARNIA K., LYDIATE DJ., RIMMER SR., LI G., KUTCHER HR. LARKAN NJ. MCVETTY PBE., FERNANDO WGD. (2012). Genetic mapping of the *Leptosphaeria maculans* avirulence gene corresponding to the LepR1 resistance gene of *Brassica napus*. Theor. and Appl. Genetics 124:505–513.

MCVETTY, P.B.E., MIETKIEWSKA, E., OMONOV, T., CURTIS, J., 2016. TAYLOR, D.C., WESELAKE, R.J.(2016). Brassica spp. Oils. In: McKeon, T.A., Hayes, D.G., Hildebrand, D.F., Weselake, R.J. Industrial Oil Crops. Academic Press and AOCS, pp. 113–156.

GOUT L., FUDAL I., KUHN ML., BLAISE F., ECKERT M., CATTOLICO L., BALESSENT MH., ROUXEL T. (2006). Lost in the middle of now here: the *AvRlm1* avirulence gene of the Dothideomycete *Leptosphaeria maculans*. Molecular Microbiology 60:67–80.

HADDADI P, MA L, WANG H, BORHAN MH (2015). Genome-wide transcriptomic analyses provide insights into the lifestyle transition and effector repertoire of *Leptosphaeria maculans* during the colonization of *Brassica napus* seedlings. Molecular Plant Pathology, 17: 1196-1210.

HADDADI, P., MA, L., WANG, H. AND BORHAN, M. H. (2016), Genome wide transcriptomic analyses provide insights into the lifestyle transition and effector repertoire of *Leptosphaeria maculans* during the colonization of *Brassica napus* seedlings. Mol. Plant Pathol., 17: 1196-1210.

HALL TA (1999). “BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT”. Nucl. Acids. Symp. Ser. 41: 95-98.

HALL, R.; PETERS, R.D.; ASSABGUI, R.A (1993). Occurrence and impact of blackleg on oilseed rape in Ontario. Can. J. Plant Pathol., 15, 305–313.

HAYWARD, A; MCLANDERS, J; CAMPBELL, E; EDWARDS, D Y BATLEY, J (2012) Genomic advances will herald new insights into the *Brassica: Leptosphaeria maculans* pathosystem. J. Plant Biology 1-11.

HOWLETT B.J. (2004). Current knowledge of the interaction between *Brassica napus* and *Leptosphaeria maculans*. Canadian J. of Plant Pathology, 26,245–252.

HUA W, LIU J, WANG H (2016). Molecular regulation and genetic improvement of seed oil content in *Brassica napus* L. Agr. Sci. Eng. 3(3):186–194.

- HUANG Y-J, QI A, KING GJ, FITT BDL (2014) Assessing Quantitative Resistance against *Leptosphaeria maculans* (*Phoma* Stem Canker) in *Brassica napus* (Oilseed Rape) in Young Plants. PLoS ONE 9(1): e84924.
- HULBERT S. H., WEBB C. A., SMITH S. M., SUN Q. (2001) Resistance gene complexes: Evolution and utilization. Annu. Rev. Phytopathol. 39 285–312.
- HUTCHESON, SW. (1998). Current Concepts of active defense in plants. Annu. Review Phytopathology 36: 59-90.
- HWANG, S.-F., STRELKOV, S. E., PENG, G., AHMED, H., ZHOU, Q., AND TURNBULL, G. (2016). Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) severity and yield loss in canola in Alberta, Canada. Plants 5:31.
- IRIARTE, L y VALETTI, O (2008) Eds. Cultivo de Colza. Chacra Experimental Integrada Barrow. Convenio MAAyP-INTA: 152.
- Iriarte, L.B. (2004). Evaluación cultivares de colza en distintas fechas de siembra campaña 2004/05. Estación Experimental Integrada Barrow (INTA-MAA). <<http://www.inta.gov.ar/barrow/info/indices/tematica/colza.htm>>
- IRIARTE, LB (2012). Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Colza. Campaña 2012. Convenio MAA-INTA. <http://inta.gov.ar/documentos/red-nacional-de-cultivares-decolza-campana-2012/>
- IRIARTE, LB y LÓPEZ, ZB (2013). Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Colza. Campaña 2013. INTA- MAGPyA. <http://inta.gov.ar/documentos/red-nacional-deevaluacion-de-cultivares-de-colza.-campana-2013/>
- IRIARTE, LB y LÓPEZ, ZB (2014). Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Colza. Campaña 2015. INTA- MAGPyA. <http://inta.gov.ar/documentos/red-nacional-deevaluacion-de-cultivares-de-colza.-campana-2014/>
- IRIARTE, LB y LÓPEZ, ZB (2015). Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Colza. Campaña 2015. INTA- MAGPyA. <http://inta.gov.ar/documentos/red-nacional-deevaluacion-de-cultivares-de-colza.-campana-2015/>
- IRIARTE, LB y LÓPEZ, ZB (2016). Red Nacional de Evaluación de Cultivares de Colza. Campaña 2016. INTA- MAGPyA. <http://inta.gov.ar/documentos/red-nacional-deevaluacion-de-cultivares-de-colza.-campana-2016/>

IZQUIERDO N.G., AGUIRREZABAL L., ANDRADE F.H. AND CANTARERO M.G (2006). Modeling the Response of Fatty Acid Composition to Temperature in a Traditional Sunflower Hybrid. *Agron. J.* 98:451–46.

IZQUIERDO, N.; PEREYRA IRAOLA M.; NOLASCO S. Y AGUIRREZÁBAL L. (2005). Porcentaje y calidad de aceite en canola. Efecto de la radiación solar interceptada por planta. XI Congreso Latinoamericano de Grasas y Aceites. Rosario, Argentina.

IZQUIERDO, N.G.; AGUIRREZÁBAL L.A.N.; ANDRADE F.H.; GEROUDET C.; VALENTINUZ O. AND PEREYRA IRAOLA M. (2009). Intercepted solar radiation affects oil fatty acid composition in crop species. *Field Crops Res.* 114: 66–74.

JACKSON S, CHEN ZJ (2010). Genomic and expression plasticity of polyploidy. *Curr. Opin Plant Biol.*, 13 (2): 153-159.

JOSHI RK. AND NAYAK S. (2010). Gene pyramiding-A broad spectrum technique for developing durable stress resistance in crops. *Biotechnology and Molecular Biology Review* Vol. 5(3), 51-60.

KAMOUN S. (2007). Groovy times: lamentous pathogen effectors revealed. *Current Opinion in Plant Biology*, 10,358–365.

KAUR S., COGAN N., YE G., BAILLIE R., HAND M., LING A., MCGEAREY A., KAUR J., HOPKINS C., TODOROVIC M., MOUNTFORD H., EDWARDS D., BATLEY J., BURTON W., SALISBURY P., GORORO N., MARCROFT S., KEARNEY G., SMITH K., FORSTER J., SPANGENBERG G. (2009). Genetic map construction and QTL mapping of resistance to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) disease in Australian canola (*Brassica napus* L.) cultivars. *Theor. Appl. Genet.* 120:71–83.

KEEN NT (1990). Gene-for-Gene Complementarity in Plant-Pathogen Interactions. *Annual Rev. Genet.*, 24:447-63

KERI, M., KUTCHER, H.R., & RIMMER, S.R. (2001). Virulence of isolates of *Leptosphaeria maculans* from western Canada on *Brassica napus* differentials. *Can. J. Plant Pathol.*, 23, 199.

KLOPPHOLZ, S., KUHN, H., AND REQUENA, N. (2011). A secreted fungal effector of *Glomus intraradices* promotes symbiotic biotrophy. *Curr. Biol.* 21,1204–1209.

KOCH E, SONG K, OSBORN TC, WILLIAMS PH. (1991). Relationship between pathogenicity and phylogeny based on restriction fragment length polymorphism in *Leptosphaeria maculans*. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 4,341–349.

KRUIJT, M., DEKOCK, M. J. D. AND DEWIT, P. J. G. M. (2005). Receptor like proteins involved in plant disease resistance. *Mol. Plant Pathol.* 6, 85–97.

KUTCHER HR, YU F, BRUN H (2010). Improving blackleg disease management of *Brassica napus* from knowledge of genetic interactions with *Leptosphaeria maculans*. *Can J. Plant Pathol.*, 32:29–34.

KUTCHER, H.R., VAN DEN BERG, C.G.J., & RIMMER, S.R. (1993). Variation in pathogenicity of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica* spp. based on cotyledon and stem reactions. *Can. J. Plant Pathol.*, 15, 253–258.

KUTCHER, HR; CROSS, DJ; MARQUER, B; KIRKHAM, CL; CHÈVRE, AM; DELOURME, R; BALESSENT, MH; ROUXEL, T y BRUN, H (2010). The Race Structure of *Leptosphaeria maculans* in Western Canada in Western Canada. Agriculture and Agri-Food Canada.

LARKAN, N. J., RAMAN, H., LYDIATE, D. J., ROBINSON, S. J., YU, F., BARBULESCU, D. M., BORHAN, M. H. (2016b). Multi-environment QTL studies suggest a role for Cysteine-rich protein kinase genes in quantitative resistance to blackleg disease in *Brassica napus*. *BMC Plant Biology*, 16(1), 183.

LARKAN, N. J., YU, F., LYDIATE, D. J., RIMMER, S. R., & BORHAN, M. H. (2016a). Single *R* Gene Introgression Lines for Accurate Dissection of the *Brassica-Leptosphaeria* Pathosystem. *Frontiers in Plant Science*, 7, 1771.

LARKAN, N.J., LYDIATE, D.J., YU, F., RIMMER, S.R. AND BORHAN, M.H. (2014) Co-localization of the blackleg resistance genes *Rlm2* and *LepR3* on *Brassica napus* chromosome A10. *BMC Plant Biol.* 14,1595.

LARKAN, NJ; LYDIATE, DJ; PARKIN, IAP; NELSON, MN; EPP, D; COWLING, WA; RIMMER SR Y BORHAN M. H. (2013). The *Brassica napus* blackleg resistance gene *LepR3* encodes a receptor-like protein triggered by the *Leptosphaeria maculans* effector *AVRLMI*. *New Phytologist*, 197:595–605.

LEFLON, M; BRUN, H; EBER, F; DELOURME, R; LUCAS, MO; VALLEE, P (2007). Detection, Introgression and Localization of Genes Conferring Specific Resistance to *Leptosphaeria maculans* from *Brassica rapa* into *B. napus*. *Theoretical and Applied Genetics*; 115(7):897-906.

LEVITUS, G; ECHENIQUE, V; RUBINSTEIN, C; HOPP, E Y MROGINSKI, L (2010). *Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II*. Ediciones Instituto Nacional de Tecnología

Agropecuaria. Consejo Argentino para la Información y el Desarrollo de la Biotecnología (ArgenBio).

Li, F., Chen, B., Xu, K., Wu, J., Song, W., Bancroft, I., Wu, X. (2014). Genome-Wide Association Study Dissects the Genetic Architecture of Seed Weight and Seed Quality in Rapeseed (*Brassica napus* L.). *DNA Research: An International Journal for Rapid Publication of Reports on Genes and Genomes*, 21(4), 355–367.

LO PRESTI L, LANVER D, SCHWEIZER G, TANAKA S, LIANG L, TOLLOT M, ZUCCARO A, REISSMANN S, KAHMANN R. (2015). Fungal effectors and plant susceptibility. *Annual Review of Plant Biology*, 66, 513–545.

LONG, Y.; WANG, Z.; SUN, Z.; FERNANDO, D.; MCVETTY, P. y LI, G. (2011). Identification of two blackleg resistance genes and fine mapping of one of these genes in a *Brassica napus* canola cultivar ‘Surpass 400’. *Theoretical and Applied Genetics* 122:1223–1231.

MARCROFTS J, VANDEWOUW A P, SALISBURY P A, POTTER T D, HOWLETT B J (2012b). Rotation of canola (*Brassica napus*) cultivars with different complements of blackleg resistance genes decreases disease severity. *Plant Pathol.*, 61:934-944.

MARCROFT, S.J., ELLIOTT, V.L., COZIJNSEN, A.J., SALISBURY, P.A., HOWLETT, B.J., AND VAN DEWOUW, A.P. (2012a). Identifying resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in Australian *Brassica napus* cultivars based on reactions to isolates with known avirulence genotypes. *Crop Pasture Sci.* 63,338–350.

MATTHÄUS B (2006). Utilization of high-oleic rapeseed oil for deep-fat frying of French fries compared to other commonly used edible oils. *Eur. J. Lipid Sci. Technol.* 108:200–211.

MAYERHOFER R, BANSAL VK, THIAGARAJAH MR, STRINGAM GR, GOOD AG (1997) Molecular mapping of resistance to *Leptosphaeria maculans* in Australian cultivars of *Brassica napus*. *Genome*, 40:294–301

MAYERHOFER, R; WILDE, K; MAYERHOFER, M; LYDIATE, D; BANSAL, VK; GOOD, AG Y PARKIN, IA (2005). Complexities of chromosome landing in a highly duplicated genome: 12 toward map-based cloning of a gene controlling blackleg resistance in *Brassica napus*. *Genetics*, 171(4):1977-88.

McDONALD, B.E. (1995). Oil properties of importance in human nutrition. En: *Brassica Oilseed. Production and Utilization*. D. Kimber and D.I. McGregor (Eds). CAB International, 394.

McNABB W.M., C.G.J. BERG AND S.R. RIMMER, (1993). Comparison of inoculation methods for selection of plant resistant to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. Canadian J. of Plant Science 73, 1199–1207.

MENGISTU A, RIMMER SR, KOCH E & WILLIAMS PH, (1991). Pathogenicity grouping of isolates of *Leptosphaeria maculans* on *Brassica napus* cultivars and their disease reaction profiles on rapid-cycling Brassicas. Plant Dis., 75, 1279-1282.

MEYERS B. C., KOZIK A., GRIEGO A., KUANG H., MICHELMORE R. W. (2003) Genome-wide analysis of NBS-LRR-encoding genes in *Arabidopsis*. Plant Cell 15, 809–834.

MICHELMORE, RW; PARAN, I; KESSELI, RV (1991). Identification of Markers Linked to Disease-Resistance Genes by Bulk Segregant Analysis: A Rapid Method to Detect Markers in Specific Genomic Regions by Using Segregating Populations (Random Amplified Polymorphic DNA/Restriction Fragment Length Polymorphism). PNAS USA, 88: 9828-9832.

MIKOLAJCZYK K. (2007) Development and practical use of DNA markers. Advances in Botanical Research: Incorporating Advances in Plant Pathology, 45,99–138.

MUN J. H., YU H. J., PARK S., PARK B. S. (2009). Genome-wide identification of NBS encoding resistance genes in *Brassica rapa*. Mol. Genet. Genomics, 282, 617–631.

NEWMAN, P.L. (1981). A method of screening for resistance to canker in oilseed rape seedlings. Crucifer Newsletter, 6, 57–59.

NORMA VII SAGPyA (1994). Resolución-1075-1994-sAGPYA - Secretaría de Agricultura, Ganadería, Pesca y Alimentos. <http://www.senasa.gob.ar/normativas/resolucion-1075-1994-sagpya-secretaria-de-agricultura-ganaderia-pesca-y-alimentos>.

ONEMLI F. (2012). Changes in Oil Fatty Acid Composition During Seed Development of Sunflower. Asian J. of Plant Sciences 11(5):241-245.

ORDEÑANA, KM. (2002). Mecanismos de defensa en las interacciones planta-patógeno. Revista Manejo Integrado de Plagas. Costa Rica 63: 22-32.

OVERBER AGRI® (2015). URL www.overbergagri.ca.za, Canola Manual 2015.

PARLANGE, F; DAVERDIN, G; FUDAL, I; KUHN, M-L; BALESDENT, M-H; NE (2009). *Leptosphaeria maculans* Avirulence Gene *AvRlm4-7* Confers a Dual Recognition Specificity by the *Rlm4* and *Rlm7* Resistance Genes of Oilseed Rape, and Circumvents *Rlm4*-Mediated Recognition through a Single Amino Acid Change. Molecular Microbiology, 71:851-63.

PINZI S, GARCIA I, LOPEZ-GIMENEZ F, LUQUE DE CASTRO M, DORADO G, DORADO M (2009). The ideal vegetable oil-based biodiesel composition: a review of social, economical and technical implications. *Energy Fuels* 23:2325–2341.

PLISSONNEAU C., DAVERDIN G., OLLIVIER B., BLAISE F., DEGRAVE A., FUDAL I., ROUXEL T., BALESIDENT MH. (2016) A game of hide and seek between avirulence genes *AvRlm4-7* and *AvrLm3* in *Leptosphaeria maculans*. *New Phytologist*, 209, 1613-1624.

POLAND J.A., BALINT-KURTI P.J., WISSER R.J., PRATT R.C., NELSON R.J. (2009). Shades of gray: the world of quantitative disease resistance. *Trends in Plant Sciences* 14:21–29.

RABBANI M.A., M. S. MASOOD, Z. K. SHINWARI AND K. Y. SHINOZAKI (2010) Genetic analysis of basmati and nonbasmati Pakistani rice (*Oryza Sativa L.*) cultivars using microsatellite markers. *Pak. J. Bot.*, 42(4): 2551-2564.

RAKOW, G. AND MCGREGOR D.I. (1975). Oil, fatty acid and chlorophyll accumulation in developing seed of two “linolenic acid lines” of low erucic acid rapeseed. *Canadian J. of Plant Science* 55: 197-203.

RAMAN R., TAYLOR B., MARCROFT S., STILLER J., ECKERMANN P., COOMBES N., REHMAN A. LINDBECK K., LUCKETT D., WRATTEN N., BATLEY J., EDWARDS D., WANG X. Y RAMAN H. (2012). Molecular mapping of qualitative and quantitative *loci* for resistance to *Leptosphaeria maculans* causing blackleg disease in canola (*Brassica napus L.*) *Crop & Pasture Sci.*, 63: 1007–1017.

RAMAN, H (2012). Molecular mapping and validation of *Rlm1* gene for resistance to *Leptosphaeria maculans* in canola (*Brassica napus L.*). *Crop and Pasture Science* 63, 1007–1017.

RAMAN, H; RAMAN, R AND LARKAN, N (2013). Genetic Dissection of Blackleg Resistance *Loci* in Rapeseed (*Brassica napus L.*). *Plant Breeding from Laboratories to Fields*. Chapter 4.Ed: Andersen SB. ISBN 978-953-51-1090-3.

RAMAN, R; TAYLOR, B; LINDBECK, K; COOMBES, N; BARBULESCU, D; SALISBURY, P AND RAMAN, R; RAMAN, H; JOHNSTONE, K; LISLE, C; SMITH, A; MARTIN, P Y ALLEN, H (2005) Genetic and in silico comparative mapping of the polyphenol oxidase gene in bread wheat (*Triticum aestivum L.*) *Funct. Integr. Genomics*. 5(4):185-200.

RAYAPURAM, C., JENSEN, M. K., MAISER, F., SHANIR, J. V., HORNSHØJ, H., RUNG, J. H. (2012). Regulation of basal resistance by a powdery mildew-induced Cysteine-rich receptor-like protein kinase in barley. *Mol. Plant Pathol.* 13, 135–147.

RICHLY E., KURTH J., LEISTER D. (2002) Mode of amplification and reorganization of resistance genes during recent *Arabidopsis thaliana* evolution. *Mol. Biol. Evol.* 19, 76–84.

RIMMER SR (2006) Resistance genes to *Leptosphaeria maculans* in *Brassica napus*. *Can. J. Plant Pathol.* 28: s288-s297.

RIMMER, S.R. AND VAN DEN BERG C.G.J. (1992). Resistance of oilseed *Brassica* spp. To blackleg caused by *Leptosphaeria maculans*. *Can. J. Plant Pathol.*, 14:56–66.

RONDANINI D., GÓMEZ N., VILARIÑO P., BOTTO J. Y MIRALLES D. (2015). La colza avanza a pasos firmes. Reporte técnico. Revista técnica cultivos invernales, edición 2015, Aapresid, 91-96.

RONDANINI, D.P.; GÓMEZ N.V.; MENÉNDEZ Y.; BOTTO J. Y MIRALLES D.J. (2017). La colza se adapta a nuevos escenarios. Revista Técnica de AAPRESID, Cultivos Invernales SD.

ROUXEL T., GRANDAUBERT J., HANE J.K., HOEDE C., VAN DE WOUW A.P., COULOUX A., DOMINGUEZ V., ANTHOUARD V., BALLY P., BOURRAS S. (2011). Effector diversification within compartments of the *Leptosphaeria maculans* genome affected by Repeat-Induced Point mutations. *Nature Communications* 2:202.

ROUXEL, T., PENAUD, A., PINOCHET, X., BRUN, H., & GOUT, L. (2003a). A 10-year survey of populations of *Leptosphaeria maculans* in France indicates a rapid adaptation towards the Rlm1 resistance gene of oil seed rape. *European J. of Plant Pathology*, 109, 871–881.

ROUXEL, T., WILLNER, E., COUDARD, L. AND BALESSENT, M.H. (2003b). Screening and identification of resistance to *Leptosphaeria maculans* (stem canker) in *Brassica napus* accessions. *Euphytica*, 133, 219–231.

SASEK, V; NOVAKOVA, M; JINDRICOVA, B; BOKA, K; VALENTOVA, O; BURKETOVA, L (2012). Recognition of avirulence gene AvrLm1 from hemibiotrophic Ascomycete *Leptosphaeria maculans* triggers salicylic acid and ethylene signaling in *Brassica napus*. *Molecular Plant–Microbe Interactions*, 25:1238–1250.

SCARTH RT, TANG JH (2006) Modification of oil using conventional and transgenic approaches. *Crop Sci.*, 46:1225–1236.

SCHUTT de VARINI LS, BESSONE, V (2015) Identificación de Grupos de Patogenicidad de aislamientos de *Phoma lingam*, agente causal del cancro del tallo en colza (F 115). XV JORNADAS FITOSANITARIAS ARGENTINAS. Ciudad de Santa Fe, Santa Fe, Argentina. ISSN: 2451 – 8069.

SIVASITHAMPARAM K, BARBETTI MJ (2008) Expression of quantitative resistance to *Leptosphaeria maculans* in spring-type oilseed rape (*Brassica napus*) doubled haploid lines in France and Australia can be influenced by pathogen population and differences in environmental conditions between the two countries. *Ann. Appl. Biol.* 153: 259-269.

SNOWDON, R.; FRIEDRICH, T.; FRIEDT, W. Y KÖHLER, W. (2002). Identifying the chromosomes of the A- and C-genome diploid *Brassica* species *B. rapa* (syn. *campestris*) and *B. oleracea* in their amphidiploid *B. napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 104(4): 533-538.

SOYER, J.L., ELGHALID, M., GLASER, N., OLLIVIER, B., LINGLIN, J., GRANDAUBERT, J., ET AL. (2014). Epigenetic control of effector gene expression in the plant pathogenic fungus *Leptosphaeria maculans*. *PLoS Genet.*, 10:e1004227.

SPRAGUE SJ, BALESIDENT M, BRUN H, HAYDEN HL, MARCROFT SJ, PINOCHET X, ROUXEL T, HOWLETT BJ (2006). Major gene resistance in *Brassica napus* (oilseed rape) is overcome by changes in virulence of populations of *Leptosphaeria maculans* in France and Australia. *European J. of Plant Pathology*, 114:33-40. 13.

STANGE, C., E. BRICEÑO, B. LATORRE Y P. ARCE. (2007). Interacción planta patógeno. *Fisiología vegetal*. 13 ed. Ediciones Universidad de la Serena, La Serena, Chile.

STOTZ, H.U., MITROUSIA, G.K., de Wit, P.J.G. M. and Fitt, B.D.L. (2014) Effector-triggered defense against apoplastic fungal pathogens. *Trends Plant Sci.*, 19,491–500.

STUKENBROCK E. H., MCDONALD B. A. (2009). Population genetics of fungal and oomycete effectors involved in gene-for-gene interactions. *Mol. Plant Microbe Interact.* 22 371–380.

SUN, F., FAN, G., HU, Q., ZHOU, Y., GUAN, M., TONG, C., LI, J. ET AL. (2017). The high quality genome of *Brassica napus* cultivar ‘ZS11’ reveals the introgression history in semi winter morphotype. *Plant J.* 92,452–468.

SUTTON, B C (1980). *The Coelomycetes*. Commonwealth Mycological Institute. Kew, Surrey, England. 386-388.

THURLING, N., & VENN, L.A. (1977). Variation in the responses of rapeseed (*Brassica napus* and *B. campestris*) cultivars to blackleg (*Leptosphaeria maculans*) infection. *Aust. J. Exp. Ag. Anim. Husb.*, 17, 445–451.

TSUDA K, KATAGIRI F. 2010. Comparing signaling mechanisms engaged in pattern-triggered and effector-triggered immunity. *Current Opinion in Plant Biology* 13: 459–465.

- VAN DER HOORN, R. A. & KAMOUN, S (2008). From guard to decoy: a new model for perception of plant pathogen effectors. *Plant Cell* 20, 2009–2017.
- VAN DE WOUW AP., ELLIOTT V., WARE A., Lindbeck K., HOWLETT BJ., Marcroft S. (2016). Infection of canola pods by *Leptosphaeria maculans* and subsequent seed contamination. *Eur. J. Plant Pathol.*, 45:687–695.
- VAN DE WOUW AP., LOWE RGT., CE., DUBOIS DJ., HOWLETT BJ. (2014). An avirulence gene, AvrLmJ1, from the blackleg fungus, *Leptosphaeria maculans*, confers avirulence to *Brassica juncea* cultivars. *Molecular Plant Pathology*, 15:523–530.
- VAN DE WOUW, A.P., STONARD, J.F., ATKINS, S.D., HOWLETT, B.J., WEST, J.S., FITT, B.D.L. (2010). Determining frequencies of avirulent alleles in airborne *Leptosphaeria maculans* inoculum using quantitative PCR. *Plant Pathol.* 59 (5), 809–818.
- VICENTE J. G., KING G. J. (2001) Characterization of disease resistance gene-like sequences in *Brassica oleracea* L. *Theor. Appl. Genet.*, 102, 555–563.
- WAN H., YUAN W., YE Q., WANG R., RUAN M., LI Z, ZHOU G., YAO Z., ZHAO J., LIU S., YANG Y. (2012). Analysis of TIR- and non-TIR-NBS-LRR disease resistance gene analogous in pepper: Characterization, genetic variation, functional divergence and expression patterns. *BMC Genomics*, 13, 502.
- WANG, Z. (2013). Development of High-throughput Molecular Markers for Blackleg (*Leptosphaeria maculans*) Resistance Genes in *Brassica napus* for Gene Stacking. *Universal J. of Plant Science*, 1(4): 118-124.
- WARNER K, KNOWLTON S (1997). Frying quality and oxidative stability of high-oleic corn oils. *J. Am Oil Chem. Soc.*, 74:1317–1322.
- WERTEKER, M.; A. LORENZ; H. JOHANNES; E. BERGHOFER AND C.S. FINDLAY (2010). Environmental and varietal influences on the fatty acid composition of rapeseed, soybeans and sunflowers. *J. of Agronomy and Crop Science*, 196: 20-27.
- WEST JS, KHARBANDA PD, BARBETTI MJ, FITT BDL (2001). Epidemiology and management of *Leptosphaeria maculans* (*phoma* stem canker) on oilseed rape in Australia, Canada and Europe. *Plant Pathol.* 50: 10-27.
- WILLIAMS, H P. (1985). *Crucifer Genetics Cooperatives (CrGC) Resource Book*. University of Wisconsin, Madison, USA, 160.

- WILLIAMS, P.H. & DELWICHE P.A. (1979). Screening for resistance to blackleg of crucifers in the seedling stage. In: Proc Eucarpia Conference on the Breeding of Cruciferous Crops, Wagen in gen, The Net herlands, 164–170.
- WINDAUER L. Y E.L. PLOCHUK. (2006). Cultivos productores de aceite. En: Cultivos industriales. Eds. de la Fuente. Editorial Facultad de Agronomía, Buenos Aires, 63-94.
- YANG, X., DENG, F. AND RAMONELL, K.M. (2012) Receptor-like kinases and receptor-like proteins: keys to pathogen recognition and defense signaling in plant innate immunity. *Front. Biol.*, 7, 155–166.
- YU F, LYDIATE DJ, RIMMER SR. (2005). Identification of two novel genes for blackleg resistance in *Brassica napus*. *Theoretical and Applied Genetics*, 110:969–979.
- YU F, LYDIATE DJ, RIMMER SR. (2008). Identification and mapping of a third blackleg resistance locus in *Brassica napus* derived from *B. rapa* subsp. *sylvestris*. *Genome*, 51:64–72.
- ZEB, A., Z.K. SHINWARI AND T. MAHMOOD (2011). Molecular markers assisted genetic characterization of some selected Wild *Poaceae* species. *Pak. J. Bot.*, 43(5): 2285-2288.
- ZHANG X, PENG P, KUTCHER R, BALESIDENT MH, DELOURME R, AND FERNANDO DWG. (2016). Breakdown of *Rlm3* resistance in the *Brassica napus*–*Leptosphaeria maculans* pathosystem western Canada. *European j. Plant Pathology*, 145: 659–674.
- ZHANG, Z., SCHWARTZ, S., WAGNER, L., MILLER, W., (2000). A greedy algorithm for aligning DNA sequences. *J. Comput. Biol.*, 7 (1/2).
- ZHOU, Y.; FITT, B.D.L.; WELHAM, S.J.; GLADDERS, P.; SANSFORD, C.E.; WEST, J.S. (1999). Effects of severity and timing of stem canker (*Leptosphaeria maculans*) symptoms on yield of winter oilseed rape (*Brassica napus*) in the UK. *Eur. J. Plant Pathol*, 105, 715–728.

ANEXO

Tabla A1. Prueba de Fisher para la variable rendimiento 2014.

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=451,51717
Error: 65714,1056 gl: 101

línea	Medias	n	E.E.	
49L	3217,33	3	148,00	A
4R	3041,00	2	181,27	A
74L	3031,00	3	148,00	A B
69C	3004,00	3	148,00	A B
17L	2994,50	2	181,27	A B C
18L	2984,67	3	148,00	A B C
53L	2982,50	2	181,27	A B C
Bioaureo2486	2982,50	2	181,27	A B C
42L	2953,50	2	181,27	A B C D
11L	2942,00	2	181,27	A B C D
62L	2926,33	3	148,00	A B C D
77C	2926,33	3	148,00	A B C D
37L	2918,67	3	148,00	A B C D
1C	2903,00	3	148,00	A B C D
69L	2901,00	2	181,27	A B C D E
41L	2895,33	3	148,00	A B C D E
71L	2895,33	3	148,00	A B C D E
32C	2853,00	3	148,00	A B C D E
5L	2848,50	2	181,27	A B C D E F
15 (2) L	2837,00	2	181,27	A B C D E F G
77L	2833,33	3	148,00	A B C D E F G
38L	2829,67	3	148,00	A B C D E F G
16R	2819,50	2	181,27	A B C D E F G
56L	2808,00	2	181,27	A B C D E F G H
15L	2802,50	2	181,27	A B C D E F G H
49 (2) L	2790,67	3	148,00	B C D E F G H
4C	2756,00	3	148,00	B C D E F G H
28R	2744,50	2	181,27	B C D E F G H
19R	2709,00	2	181,27	B C D E F G H I
14R	2692,00	2	181,27	B C D E F G H I
52L	2686,00	3	148,00	B C D E F G H I
22C	2682,00	3	148,00	B C D E F G H I
3C	2674,33	3	148,00	B C D E F G H I
32L	2662,67	3	148,00	B C D E F G H I
76C	2659,00	3	148,00	B C D E F G H I
7R	2657,00	2	181,27	B C D E F G H I
HYOLA	2635,67	3	148,00	B C D E F G H I
32 (3) C	2620,00	3	148,00	B C D E F G H I
15R	2616,00	2	181,27	B C D E F G H I
34C	2616,00	3	148,00	B C D E F G H I
61C	2612,33	3	148,00	B C D E F G H I
47C	2608,33	3	148,00	B C D E F G H I
26C	2604,67	3	148,00	B C D E F G H I
16C	2589,33	3	148,00	B C D E F G H I
8R	2581,50	2	181,27	B C D E F G H I
9L	2576,00	2	181,27	B C D E F G H I
32 (2) C	2573,67	3	148,00	C D E F G H I
2C	2573,33	3	148,00	C D E F G H I
69 (2) C	2570,00	3	148,00	C D E F G H I
8C	2562,00	3	148,00	C D E F G H I
35C	2535,00	3	148,00	C D E F G H I
23R	2492,33	3	148,00	D E F G H I
1R	2465,00	2	181,27	D E F G H I
10R	2459,50	2	181,27	D E F G H I
6R	2459,50	2	181,27	D E F G H I
Rivette	2453,67	3	148,00	E F G H I
22 (3) C	2422,67	3	148,00	F G H I
34 (3) C	2395,67	3	148,00	F G H I
9C	2395,33	3	148,00	F G H I
47 (3) C	2376,00	3	148,00	G H I
29C	2345,00	3	148,00	H I
18R	2232,50	2	181,27	I
Legacy	1472,67	3	148,00	J

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tablas A5. Pruebas de Fisher para los contenidos de los principales ácidos grasos 2014

A5. 1. Ácido oleico, campaña 2014

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,54986

Error: 0,1147 gl: 117

línea	Medias	n	E.E.	
15R	64,49	3	0,20	A
10R	64,09	3	0,20	A B
4R	63,71	3	0,20	B C
18R	63,52	3	0,20	C D
14R	63,49	3	0,20	C D E
1R	63,31	3	0,20	C D E F
8R	63,13	3	0,20	D E F G
28R	63,10	3	0,20	D E F G
16R	63,03	3	0,20	D E F G H
6R	62,95	3	0,20	E F G H
23R	62,92	3	0,20	F G H
49(2)L	62,70	3	0,20	G H
7R	62,63	3	0,20	G H I
19R	62,62	3	0,20	G H I
61C	62,60	3	0,20	G H I
15L	62,55	3	0,20	H I J
17L	62,53	3	0,20	H I J
34(3)C	62,14	3	0,20	I J K
35C	62,01	3	0,20	J K L
47C	61,94	3	0,20	K L M
22(3)C	61,85	3	0,20	K L M N
32(3)C	61,81	3	0,20	K L M N
71L	61,81	3	0,20	K L M N
9L	61,73	3	0,20	K L M N O
18L	61,72	3	0,20	K L M N O
3C	61,69	3	0,20	K L M N O P
38L	61,66	3	0,20	K L M N O P
77L	61,65	3	0,20	K L M N O P
49L	61,65	3	0,20	K L M N O P
47(3)C	61,65	3	0,20	K L M N O P
5L	61,64	3	0,20	K L M N O P Q
69(2)C	61,61	3	0,20	K L M N O P Q
62L	61,59	3	0,20	K L M N O P Q
41L	61,57	3	0,20	L M N O P Q R
74L	61,55	3	0,20	L M N O P Q R
15(2)L	61,52	3	0,20	L M N O P Q R
53L	61,46	3	0,20	M N O P Q R S
29C	61,42	3	0,20	M N O P Q R S T
37L	61,35	3	0,20	N O P Q R S T
1C	61,34	3	0,20	N O P Q R S T
2C	61,32	3	0,20	N O P Q R S T
4C	61,23	3	0,20	O P Q R S T U
11L	61,16	3	0,20	P Q R S T U W
16C	61,15	3	0,20	P Q R S T U W
52L	61,10	3	0,20	Q R S T U W
32(2)C	61,09	3	0,20	Q R S T U W
26C	61,03	3	0,20	R S T U W X
9C	60,97	3	0,20	S T U W X
32L	60,96	3	0,20	S T U W X
69C	60,93	3	0,20	S T U W X
42L	60,92	3	0,20	S T U W X
76C	60,88	3	0,20	T U W X
56L	60,73	3	0,20	U W X Y
69L	60,70	2	0,24	U W X Y
34C	60,67	3	0,20	W X Y
77C	60,62	3	0,20	W X Y
8C	60,52	3	0,20	X Y
22C	60,50	3	0,20	X Y
32C	60,22	3	0,20	Y

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

Tablas A6. Pruebas de Fisher para los contenidos de los principales ácidos grasos 2016

A6. 1. Ácido oleico, campaña 2015

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,96664
 Error: 0,3574 gl: 118

línea	Medias	n	E.E.	
42L	63,14	3	0,35	A
34(3)C	63,04	3	0,35	A B
32(3)C	62,88	3	0,35	A B C
15R	62,75	3	0,35	A B C D
28R	62,66	3	0,35	A B C D E
61C	62,38	3	0,35	A B C D E F
49(2)L	62,30	3	0,35	A B C D E F G
47C	62,26	3	0,35	A B C D E F G H
10R	62,24	3	0,35	A B C D E F G H I
3C	62,21	3	0,35	A B C D E F G H I J
16R	62,16	3	0,35	B C D E F G H I J K
23R	62,13	3	0,35	B C D E F G H I J K L
17L	62,12	3	0,35	B C D E F G H I J K L
14R	62,10	3	0,35	B C D E F G H I J K L
34C	62,06	3	0,35	C D E F G H I J K L M
22(3)C	62,05	3	0,35	C D E F G H I J K L M N
11L	62,02	3	0,35	C D E F G H I J K L M N
71L	61,87	3	0,35	D E F G H I J K L M N O
47(3)C	61,83	3	0,35	D E F G H I J K L M N O P
15L	61,81	3	0,35	D E F G H I J K L M N O P
26C	61,79	3	0,35	D E F G H I J K L M N O P
9L	61,69	3	0,35	E F G H I J K L M N O P Q
69(2)C	61,65	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q
32L	61,63	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q
35C	61,62	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q
76C	61,62	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q
32C	61,60	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q
18R	61,56	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q
7R	61,54	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
2C	61,52	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
4R	61,48	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
41L	61,47	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
18L	61,45	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
37L	61,43	3	0,35	F G H I J K L M N O P Q R
15(2)L	61,39	3	0,35	G H I J K L M N O P Q R
49L	61,39	3	0,35	G H I J K L M N O P Q R
62L	61,39	3	0,35	G H I J K L M N O P Q R
38L	61,38	3	0,35	G H I J K L M N O P Q R
77L	61,38	3	0,35	G H I J K L M N O P Q R
5L	61,31	3	0,35	H I J K L M N O P Q R
6R	61,30	3	0,35	H I J K L M N O P Q R
52L	61,28	3	0,35	I J K L M N O P Q R
32(2)C	61,24	3	0,35	J K L M N O P Q R
8R	61,24	3	0,35	K L M N O P Q R
77C	61,20	3	0,35	K L M N O P Q R
69L	61,19	3	0,35	L M N O P Q R
69C	61,18	3	0,35	L M N O P Q R
8C	61,13	3	0,35	M N O P Q R
53L	61,09	3	0,35	N O P Q R
74L	61,05	3	0,35	O P Q R
4C	61,03	3	0,35	O P Q R
1R	61,02	3	0,35	O P Q R
1C	60,99	3	0,35	O P Q R
22C	60,93	3	0,35	O P Q R
16C	60,91	3	0,35	O P Q R
29C	60,89	3	0,35	P Q R
9C	60,87	3	0,35	P Q R
19R	60,82	3	0,35	Q R
56L	60,59	3	0,35	R

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$)

A6. 2.Ácido linoleico, campaña 2015

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=0,40247

Error: 0,0620 gl: 118

línea Medias n E.E.

línea	Medias	n	E.E.
69L	20,06	3	0,14 A
22C	20,03	3	0,14 A B
56L	20,03	3	0,14 A B
16C	19,95	3	0,14 A B C
53L	19,94	3	0,14 A B C D
1C	19,92	3	0,14 A B C D E
62L	19,90	3	0,14 A B C D E F
4C	19,89	3	0,14 A B C D E F G
38L	19,85	3	0,14 A B C D E F G H
77C	19,83	3	0,14 A B C D E F G H I
37L	19,82	3	0,14 A B C D E F G H I
69C	19,78	3	0,14 A B C D E F G H I J
9C	19,73	3	0,14 A B C D E F G H I J
52L	19,72	3	0,14 A B C D E F G H I J K
74L	19,71	3	0,14 A B C D E F G H I J K
41L	19,66	3	0,14 A B C D E F G H I J K L
5L	19,66	3	0,14 A B C D E F G H I J K L
8C	19,64	3	0,14 B C D E F G H I J K L M
19R	19,63	3	0,14 C D E F G H I J K L M N
15(2)L	19,62	3	0,14 C D E F G H I J K L M N O
69(2)C	19,61	3	0,14 C D E F G H I J K L M N O
1R	19,60	3	0,14 C D E F G H I J K L M N O P
32C	19,59	3	0,14 C D E F G H I J K L M N O P
49L	19,58	3	0,14 C D E F G H I J K L M N O P
11L	19,55	3	0,14 C D E F G H I J K L M N O P
2C	19,55	3	0,14 D E F G H I J K L M N O P
8R	19,53	3	0,14 E F G H I J K L M N O P
29C	19,52	3	0,14 E F G H I J K L M N O P
32(2)C	19,51	3	0,14 F G H I J K L M N O P
77L	19,50	3	0,14 F G H I J K L M N O P
7R	19,50	3	0,14 F G H I J K L M N O P
4R	19,49	3	0,14 G H I J K L M N O P Q
35C	19,47	3	0,14 H I J K L M N O P Q R
18L	19,46	3	0,14 H I J K L M N O P Q R
32L	19,43	3	0,14 I J K L M N O P Q R
16R	19,40	3	0,14 J K L M N O P Q R S
10R	19,32	3	0,14 K L M N O P Q R S T
18R	19,27	3	0,14 L M N O P Q R S T
34C	19,27	3	0,14 L M N O P Q R S T
9L	19,25	3	0,14 M N O P Q R S T
15L	19,24	3	0,14 M N O P Q R S T U
3C	19,23	3	0,14 N O P Q R S T U
6R	19,23	3	0,14 O P Q R S T U
76C	19,21	3	0,14 P Q R S T U W
14R	19,20	3	0,14 P Q R S T U W
17L	19,09	3	0,14 Q R S T U W
47C	19,09	3	0,14 R S T U W X
22(3)C	19,09	3	0,14 R S T U W X
71L	19,00	3	0,14 S T U W X Y
47(3)C	19,00	3	0,14 T U W X Y
26C	18,99	3	0,14 T U W X Y
23R	18,84	3	0,14 U W X Y Z
28R	18,82	3	0,14 W X Y Z
34(3)C	18,69	3	0,14 X Y Z
61C	18,66	3	0,14 Y Z a
15R	18,53	3	0,14 Z a
49(2)L	18,50	3	0,14 Z a
42L	18,45	3	0,14 Z a
32(3)C	18,27	3	0,14 Z a

Medias con una letra común no son significativamente diferentes (p > 0,05)

Tabla A7. CP y PCO utilizadas para el análisis de Procrustes Generalizado

Línea	CP 1	CP 2	CP 3	CP 4	PCO 1	PCO 2	PCO 3	PCO 4
10R	-4,54	-0,35	-1,52	-0,08	-0,46	-0,39	-0,46	-0,39
11L	-0,15	-0,19	-2,11	0,62	0,19	0,34	0,19	0,34
14R	-3,21	-0,31	-0,15	0,11	-0,28	0,51	-0,28	0,51
15(2)L	-1,12	-0,49	0,91	0,10	-0,05	0,12	-0,05	0,12
15L	1,08	0,22	-0,67	0,83	-0,46	-0,39	-0,46	-0,39
15R	-4,89	0,82	1,57	-0,60	0,47	-0,12	0,47	-0,12
16C	2,06	-0,42	0,38	-0,13	0,47	-0,12	0,47	-0,12
16R	-3,52	-1,44	-1,17	-0,73	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
17L	-1,03	0,49	1,52	0,00	-0,46	-0,39	-0,46	-0,39
18L	0,26	-0,70	-0,01	0,42	-0,45	0,15	-0,45	0,15
18R	-2,50	-0,05	-0,74	0,37	0,19	0,34	0,19	0,34
19R	-0,43	-0,28	-0,65	-0,44	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
1C	1,70	-1,12	0,71	0,34	-0,45	0,15	-0,45	0,15
1R	-1,84	-0,53	-1,05	-0,30	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
22(3)C	2,46	-0,75	-0,73	-0,06	-0,28	0,51	-0,28	0,51
22C	-0,39	1,15	-0,05	-0,27	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
23R	-1,95	0,44	-0,37	1,12	0,15	0,22	0,15	0,22
26C	1,30	2,18	-0,03	-0,77	0,47	-0,12	0,47	-0,12
28R	-3,36	-0,41	0,37	-0,10	-0,46	-0,39	-0,46	-0,39
29C	2,06	1,56	-0,04	-0,19	0,47	-0,12	0,47	-0,12
2C	0,95	0,79	-0,08	-0,49	0,06	-0,28	0,06	-0,28
32(2)C	2,05	-0,15	-0,96	0,24	0,19	0,34	0,19	0,34
32(3)C	1,58	0,53	0,13	-0,76	0,47	-0,12	0,47	-0,12
32C	-0,61	2,54	0,73	0,71	0,47	-0,12	0,47	-0,12
32L	1,24	0,53	-0,55	-0,08	-0,05	0,12	-0,05	0,12
34(3)C	0,57	0,60	-1,72	-0,25	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
34C	-1,67	1,83	0,08	0,68	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
35C	0,11	1,33	-0,03	0,02	0,47	-0,12	0,47	-0,12
37L	0,20	-1,86	-0,72	-0,12	-0,28	0,51	-0,28	0,51
38L	0,57	-1,22	0,23	0,70	-0,28	0,51	-0,28	0,51
3C	-0,46	1,10	-0,22	-0,24	0,32	-0,14	0,32	-0,14
41L	0,53	-1,61	0,27	1,04	0,19	0,34	0,19	0,34
42L	-0,20	-0,29	1,06	1,09	0,19	0,34	0,19	0,34
47(3)C	-1,12	2,27	-1,10	-1,03	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
47C	0,66	2,58	-0,07	-0,17	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
49(2)L	0,73	-0,91	0,58	0,44	0,19	0,34	0,19	0,34
49L	-0,81	1,21	2,66	0,53	0,47	-0,12	0,47	-0,12
4C	1,87	0,01	0,25	-0,07	0,06	-0,28	0,06	-0,28
4R	-2,61	-1,77	1,82	-0,69	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
52L	1,52	-0,52	-0,42	0,43	-0,05	0,12	-0,05	0,12
53L	0,94	-0,88	0,12	-0,56	-0,05	0,12	-0,05	0,12
56L	2,90	-0,68	-0,18	-0,12	-0,28	0,51	-0,28	0,51
5L	0,10	-1,53	-0,56	0,12	-0,28	0,51	-0,28	0,51
61C	-0,90	1,85	1,20	1,13	0,32	-0,14	0,32	-0,14
62L	-0,13	-2,23	0,32	-0,72	0,19	0,34	0,19	0,34
69(2)C	1,78	-0,23	-0,63	0,23	-0,05	0,12	-0,05	0,12

69C	1,00	-1,29	-1,28	-0,60	0,47	-0,12	0,47	-0,12
69L	0,17	-0,87	-0,26	0,71	0,47	-0,12	0,47	-0,12
6R	-1,21	-0,01	-0,78	0,46	-0,09	-0,17	-0,09	-0,17
71L	-0,31	0,70	0,97	-1,33	0,32	-0,14	0,32	-0,14
74L	1,11	-1,18	0,80	-0,11	-0,46	-0,39	-0,46	-0,39
76C	1,61	1,80	-0,71	-0,26	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
77C	2,25	-1,79	1,58	-0,47	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
77L	0,91	-0,67	0,51	0,86	-0,05	0,12	-0,05	0,12
7R	-1,70	-2,34	0,65	-0,66	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
8C	2,70	0,69	0,75	-1,27	-0,46	-0,39	-0,46	-0,39
8R	-1,45	0,71	-1,58	0,28	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13
9C	2,80	0,34	0,42	0,51	0,47	-0,12	0,47	-0,12
9L	0,37	0,83	0,52	-0,45	-0,14	-0,13	-0,14	-0,13

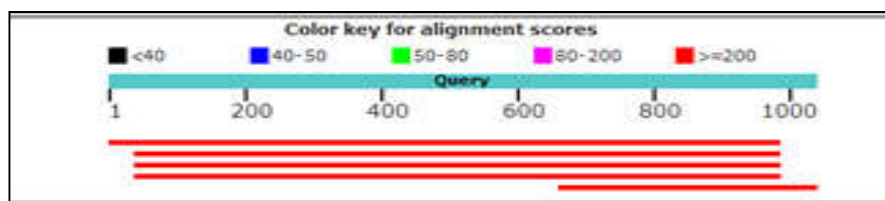
Sbjct	1265	 TTGGGATGATGATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTGAGCTGGGAGTTTC	1324
Query	901	AACTAGGACAATTGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACTCTwgv 	960
Sbjct	1325	AACTAGGACAATTGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACTCTAGA	1384
Query	961	agagaagtttgcaaaggaagaraccatcgagaakragaaatctagwaggaagaagaagaa 	1020
Sbjct	1385	AGAGAAGTTTGCAAAGGAAGAGACCAGCGAGAAGAAGAAATCTAGAAAGAAGAAGAAGA	1444
Query	1021	gaagcmtaggwacatgsaggaatggtggaaagaggaagaaCWTCCAAGACAAAARGAAGA 	1080
Sbjct	1445	GAAGCATAGGAACATGGAGGAATGGTGGAAAGAGGAAGAACAT-CAAGACAAAAGAAGA	1503
Query	1081	TTARAGTCCTTGAGAATCAAGTTCAAGAACCGTTTAAAAGTCCCGATTTTTTCGGGACTGT 	1140
Sbjct	1504	TTAGAGT-CTTGAGAATCAAGTTCAAGAACCGTTTAAAAGTCCACATTTTTCGGTACTGT	1562
Query	1141	TTCCATGGTNAAGGCGGAAAACCGGCCTGGGAAG-TANAAAAGG-GAA 1185 	
Sbjct	1563	TTCCATGGTAAAGGCGAAAAC-GGCGTGG-AAGATAGAGAAGGAGAA 1607	

Figura A2. Secuencia consenso y alineamiento para la línea 3C.

>Consensus

```

GGAGGNTCGNGGACCGNGNTCNAGAGNNTNNGAGNNACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCN
TNNNTCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCCAGAACGAGCTGCAGATCTCGGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGAC
GCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACCACAGTTCTTGGTCTACGAGTACNTGCCCAACAAGAGCCTCCAA
GAGCTTCTTTCAACGAANAAGGNTCNGGCTTGAGCTGGGAGAGGAGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAA
GCTCTCGACTTTATGCATTCGGGTGTGACCCGCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGAT
TCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCCGACTTGGTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGAGGAGGGAGTAGGTTATGGTGGG
GTTGATCTGTTCAAGAGCTTTNTGAGAGCACTCTCAGACGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGG
TTGATTTCTCTTGCCTTACAAGCTTCTTCGTTCCAAGAACAGCAGGACGAGCCGTAACATTAAGGCAATTGCAT
TNGANCTCGATGAGCTTGNNTATGGAAAGAAGGTGAGGCGAAAGGGAAAGAGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTT
GAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGNGAGCCCCGAAGTTCGTTTCNTGATTTGGNGAAACAGTGGGGGAGAGATTGGTG
GTGGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGNNNGTAGTAAAGATTATGNTAGGGAGTGGATAGGGAGTCAAGTTCAC
ACCGAGAATCCGGATNGGATGATGATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCNTTNNNNNNNTGANCTGGGAGTTTCA
ACTAGGACAATTGATAAGGCAGANTCTGGNTTGGATGAAGNTNGGTTTGNCNTNTAGAAGAGAAGTTTGCAA
    
```



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1g80870 (LOC106381554). mRNA	1439	1439	94%	0.0	92%	XM_013821467.2
PREDICTED: Brassica oleracea var. oleracea putative receptor-like protein kinase At1g80870 (LOC109327549). mRNA	1402	1402	91%	0.0	92%	XM_013765867.1
PREDICTED: Brassica rapa putative receptor-like protein kinase At1g80870 (LOC103853210). mRNA	1397	1397	91%	0.0	92%	XM_009130136.2
PREDICTED: Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1g80870 (LOC109429713). mRNA	1330	1330	91%	0.0	91%	XM_013870464.2
PREDICTED: Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1g80870 (LOC106422401). partial mRNA	486	486	36%	1e-135	86%	XM_013863197.2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1439 bits(779)	0.0	900/981(92%)	20/981(2%)	Plus/Plus

Query	1	GGAGGNTCGNGGACCGNGNTGAGGNNNTNNGAGNNACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAG	60
Sbjct	441		500
Query	61	AGACTCGACAGCNTNNNTCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCAGAACGAGCTGCAGATCCTC	120
Sbjct	501		560
Query	121	GGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCAC	180
Sbjct	561		620
Query	181	CACAGGTTCTTGGTCTACGAGTACNTGCCCAACAAGAGCCTCAAGAGCTTCTTTTCAAC	240
Sbjct	621		680
Query	241	GAANAAGGNTCNNGCTTGAGCTGGGAGAGGAGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAA	300
Sbjct	681		740
Query	301	GCTCTCGACTTTATGCATTTTCGGGTGTACCCGCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCG	360
Sbjct	741		800
Query	361	AGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCCGACTTTGGTTTGTCTAG	420
Sbjct	801		859
Query	421	AGTGAAAGTGGAGGAGGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTCAAGAGCTTTT	480
Sbjct	860		919
Query	481	NTGAGAGCACTCCTCAGACGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGGTTGATTTCT	540
Sbjct	920		978
Query	541	CTCTTGCGTTACAAGCTTCTTCGTCTTCCAAGAACAGCAGGACGAGCCGTAACATTAAGG	600
Sbjct	979		1038
Query	601	CAATTGCATTNGANCTCGATGAGCTTGNNATGGAAGAAGGTGAGGCGAAAGGGAAAAGA	660
Sbjct	1039		1081
Query	661	GGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTNGAGCCCGAACTCGGT	720
Sbjct	1082		1141
Query	721	TCNTGATTTGGNGAAACAGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGA	780
Sbjct	1142		1201
Query	781	GNNNNGTAGTAAAGATTATGNTAGGGAGTGGATAGGGAGTCAGATTACACCGAGAATCC	840
Sbjct	1202		1261
Query	841	GGATNGNGATGATGATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCNTTNNNNNNN-TGANCTGGGAGT	899
Sbjct	1262		1321
Query	900	TTCAACTAGGACAATTGATAAGGCAGANTCTGGNTTGGATGAAGNTNGGTTTGNCNNNT	959


```

Query 225 AGAGTGTCAAACCTAGCTTCATTCAAACCAGACTCATCTTTATCTACTGTCCTAGTTGAA 284
          |||
Sbjct 1339 AGAGTGTCAAACCTAGCTTCATTCAAACCAGACTCTACTTTATCTACTGTCCTAGTTGAA 1280

Query 285 ACTCCCAGCTCAGGAGTGTACTGCTAACGGTGATCTTCTTCCCATCATCATCCCAATCC 344
          |||
Sbjct 1279 ACTCCCAGCTCAGGAGTGTACTGCTAACGGTGATCTTCTTCCCATCATCATCCCAATCC 1220

Query 345 GGATTCTCGGTGTGAATCTGACTCCCTATCCACTCCCTAACGTAATCTTTACTACACAAC 404
          |||
Sbjct 1219 GGATTCTCAGTGTGAATCTGACTCCCTATCCACTCCCTAACGTAATCTTTACTACACAAC 1160

Query 405 TCGCCACTCCCTTCTTGCTTCCACCACCAATCTCTCCCCACTGTTTCCCCAAATCAAGA 464
          |||
Sbjct 1159 TCCCCACTCCCTTCTTGCTTCCACCACCAATTTCTCCCCACTGTTTCCCCAAATCAAGA 1100

Query 465 ACCGAGTTCGGACTCACACTCATCTCCTTGCTCTGCTCAAACCTCATCTCCTCCT-CAAC 523
          |||
Sbjct 1099 ACCGAGTTAGGACTCACACTCATCTCCTTACTCTGCTCAAACCTCATCTCCTCCTNCAAN 1040

Query 524 CTCTTTC--CCTTTCGCCTCACTTTCTTCCATAGCCAAACTCATCGAGCTCAGATGCATT 581
          |||
Sbjct 1039 NNNNNNNNNCCTTTCGCCTCACCTTCTTCCATAGCTAAACTCATCGAGTTCAAATGCATT 980

Query 582 CCCTTGATGTTACGGCTCGTCTACTATTCTTAGAAGACGAAGAAGCTTGTAACGCAAGA 641
          |||
Sbjct 979 CCCTTGATGTTACGGCTCGTCTACTATTCTTAGAAGACGAAGAAGCTTGTAACGCAAGA 920

Query 642 GAGAAATCAACCTCATGATGATGTGTGGAGTGCCAACGCCGTCTGAGGAGTGCTCTCA 701
          |||
Sbjct 919 GAGAAATCAACCTCATGATGATGCGTGGAGTGCCACGCCGTCTGAGGAGTGCTCTCA 860

Query 702 GAGAGCTCTTGACTGAACAAATCAACCCACCATAACCTCCTCCATCCTCCACTTTCACT 761
          |||
Sbjct 859 GAAAGCTCTTGACTGAACAGATCAACCCACCATAACCTCCTCCCTCCTCCACTTTCACT 800

Query 762 CTAGACAAACCAAAGTCAGAGATCTTGGCCCTNANCTCAGAATCAAGAAGAACATTACTC 821
          |||
Sbjct 799 CTAGACAAACCAAAGTCAGAGATCTTGCCTTAAACTCAGAATCAAGAAGAACATTACTC 740

Query 822 GGCTTGATATCTCCGTGAATCACCGGCGGGTCACACCCGAAATGCATAAAGTCGAGAGCT 881
          |||
Sbjct 739 GGCTTGATATCTCCGTGAATCACCGGCGGGTCACACCCGAAATGCATAAAGTCGAGAGCT 680

Query 882 TTCGCCACATCNNGAATGATACCAAANCNTCTCTCCAGCTNNANNACGANNCTTNCTT 941
          |||
Sbjct 679 TTGGCAACATCAAGAATGATCCAAA-CCTCCTCTCCAGCTCAAGCACGAGCCTT-CTT 622

Query 942 CGTTGAAA 949
          |||
Sbjct 621 CGTTGAAA 614

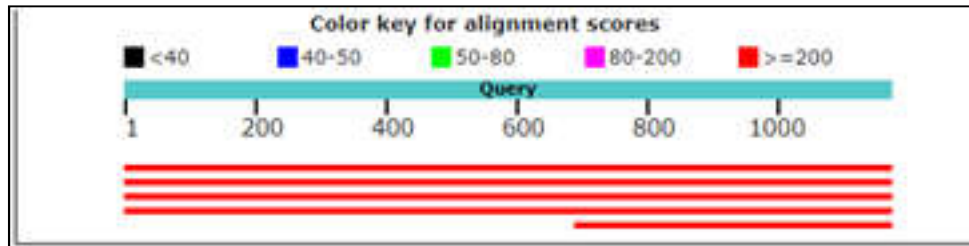
```

Figura A4. Secuencia consenso y alineamiento para la línea 9C.

>Consensus

```

CAACGACTTCGACGAGTCCNACGNNNNNNNNAAGGAGGCTCGGGGACCGTGTTCAGAGGCATTACGAGGG
NNGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTCTCCAGTCCGAGACCGAGTCCAGAACGAGCT
GCAGATCCTCGGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACCACA
GGTTCTTGGTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTCGTGCTTG
AGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGCATTTCCGGTGTGACCC
GCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTT
TGTTTTGTCTAGAGTGAAAAGTGGAGGAGGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTCAAGAGCTTTCT
GAGAGCACTCCTCAGACGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGGTTGATTTCTCTTTCGTTACAAGC
TTCTTCGCTTCCAAGAACAGCAGGACGAGCCGTAACATTAAGGCAATGCATTTGAACTCGATGAGCTTGCTA
TGGAAGAAGGTGAGGCGAAAAGGGAAAAGAGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGAGCAGAGCAAGGAGATGAG
TGTGAGCCCGAAGTTCGTTCTTGATTGGGAAACAGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAG
TGCGGAGTTGTGTAGTAAAGATTATGTTAGGGAGTGGATAGGGAGTCAGATTCACACCGAGAATCCGGAWTK
GGATGATGATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACAATTGAT
AAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACTCTAGAAGAGAAGTTTGCAAAGGAAGAGACCATCG
AGAAGAAGAAATCTAGAAAGAAGAAGAAGAAGCATAGGAACATGGAGGAATGGTGGAAAGAGGAAGA
NCATCAAGACAAAAGAAGATTAGAGTCTTGAGAATCNANNNCNGAACC GTTTAAAAGTCCACATTTTCGG
    
```



Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
Brassica napus cultivar ZS11 chromosome C2_Bra_napus_v2.0	1938	1938	99%	0.0	96%	NC_027788.2
Brassica oleracea var. oleracea cultivar TO1000 chromosome C2_BOL	1888	1888	99%	0.0	95%	NC_027749.1
Brassica rapa cultivar Chifu-401-42 chromosome A2_Brapa_1.0	1866	1866	99%	0.0	95%	NC_024795.1
Brassica napus cultivar ZS11 chromosome A2_Bra_napus_v2.0	1818	1818	99%	0.0	94%	NC_027788.2
Brassica napus cultivar ZS11 chromosome C8_Bra_napus_v2.0	821	821	41%	0.0	97%	NC_027774.2

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1938 bits(1049)	0.0	1124/1168(96%)	15/1168(1%)	Plus/Minus

Query	1	CAACGACTTCGACGAGTCCNACGNNNNNNNNAAGGAGGCTCGGGGACCGTGTTCAGAGG	60
Sbjct	49629147	CAACGACTTCGACGAGTCCAACGTGATCGGC AAAGGAGGCTCGGGGACCGTGTTCAGAGG	49629088
Query	61	CATTACGAGGGNNGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTCTCCAGTC	120
Sbjct	49629087	CATTACGAGGGACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTCTCCAGTC	49629028
Query	121	CGAGACCGAGTTCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGCTAAAATCGTCTTTCTCGT	180
Sbjct	49629027	CGAGACCGAGTTCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGCTAAAATCGTCTTTCTCGT	49628968
Query	181	GACGCTTTTGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACCACAGGTTCTTGGTCTACGAGTACAT	240
Sbjct	49628967	GACGCTTTTGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACCACAGGTTCTTGGTCTACGAGTACAT	49628908
Query	241	GCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTCGTGCTTGAGCTGGGA	300
Sbjct	49628907	GCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTCGTGCTTGAGCTGGGA	49628848
Query	301	GAGGAGGTTTGGTATCATCTTGTATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGCATTCGGGTG	360
Sbjct	49628847	GAGGAGGTTTGGTATCATCTTGTATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGCATTCGGGTG	49628788
Query	361	TGACCCGCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTT	420
Sbjct	49628787	TGACCCGCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTT	49628728
Query	421	TAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGAGGAGGAGTAGGTTA	480
Sbjct	49628727	TAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGAGGAGGAGTAGGTTA	49628668
Query	481	TGGTGGGGTTGATCTGTTCAGTCAAGAGCTTTCTGAGAGCACTCCTCAGACGGGCGTTGG	540
Sbjct	49628667	TGGTGGGGTTGATCTGTTCAGTCAAGAGCTTTCTGAGAGCACTCCTCAGACGGGCGTTGG	49628608
Query	541	CACTCCGACGCATCATCATGAGGTTGATTTCTCTCTTGCCTTACAAGCTTCTTCGTCTTC	600
Sbjct	49628607	CACTCCGACGCATCATCATGAGGTTGATTTCTCTCTTGCCTTACAAGCTTCTTCGTCTTC	49628548
Query	601	CAAGAACAGCAGGACGAGCCGTAACATTAAGGCAATGCATTTGAACTCGATGAGCTTGGC	660
Sbjct	49628547	CAAGAACAGCAGGACGAGCCGTAACATTAAGGCAATGCATTTGAACTCGATGAGC--GGC	49628490
Query	661	TATGGAAGAAGGTGAGGGCAAAGGGAAAGAGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGAAGCAGAG	720
Sbjct	49628489	-A-GTTATATG-TCCT-C-----AGAGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGAAGCAGAG	49628443
Query	721	CAAGGAGATGAGTGTGAGCCCGAACTCGGTTCTTGATTTGGGAAACAGTGGGGGAGAGA	780
Sbjct	49628442	CAAGGAGATGAGTGTGAGCCCGAACTCGGTTCTTGATTTGGGAAACAGTGGGGGAGAGA	49628383
Query	781	TTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGATTATGTTAGGGAGTG	840
Sbjct	49628382	TTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGATTATGTTAGGGAGTG	49628323
Query	841	GATAGGGAGTCAGATTCACACCGAGAATCCGGAWTKGGATGATGATGGGAAGAAGATCAC	900
Sbjct	49628322	GATAGGGAGTCAGATTCACACCGAGAATCCGGATTGGGATGATGATGGGAAGAAGATCAC	49628263
Query	901	CGTTAGCAGTAACACGCCTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACAATTGATAAGGCAGAGTC	960
Sbjct	49628262	CGTTAGCAGTAACACGCCTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACAATTGATAAGGCAGAGTC	49628203
Query	961	TGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGCACACTCTagaagagaagtttgcaaggaagacat	1020
Sbjct	49628202	TGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGCACACTCTAGAAGAGAAGTTTGCAAGGAAGAGACCAG	49628143
Query	1021	cgagaagaagaatctagaagaagaagaagaagaagCATAGGAACATGGAGGAATGGTG	1080

```

Sbjct 49628142 |||||CGAGAAGAAGAAATCTAGAAAGAAGAAGAAGAAGCATAGGAACATGGAGGAATGGTG 49628083
Query 1081      GAAAGAGGAAGANCATCAAGACAAAAAGAAGATTAGAGTCTTGAGAATCNANNNCNNGAA 1140
          |||||
Sbjct 49628082 GAAAGAGGAAGAACATCAAGACAAAAAGAAGATTAGAGTCTTGAGAATCAAGTTCAAGAA 49628023
Query 1141      CCGTTTAAAAGTCCCACATTTTCGGTAC 1168
          |||||
Sbjct 49628022 CCGTTTAAAAGTCCCACATTTTCGGTAC 49627995

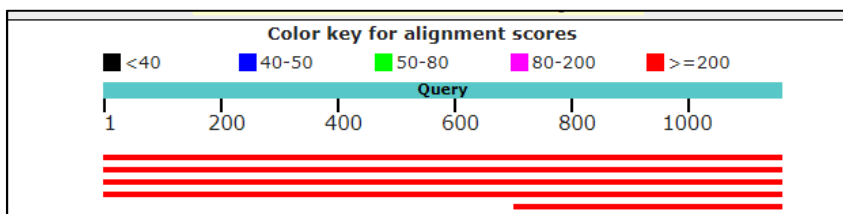
```

Figura A5. Secuencia consenso y alineamiento para la línea 22C.

>Consensus

```

ACTCNAGCTCGCAACCNACGACTTCGNCGAGTCCAACGTGATCGGCAAAGGAGGCTCGGGGACCGTGTTTCAGAGGCA
TTACGAGGGACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCAGAACG
AGCTGCAGATCCTCGGGGGCTAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACCACA
GGTTCTTGGTCTACGAGTACATGCCAAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTCGTGCTTGAGCTG
GGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGCATTTTCGGGTGTGACCCGCCGGTGAT
TCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCTAGA
GTGAAAGTGGAGGAGGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTTCAGTCAAGAGCTTTCTGAGAGCACTCCTCAGAC
GGCGCTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGGTTGATTTCTCTTTCGCTTACAAGCTTCTTCGTCTCCAAGAACAGCA
GGACGAGCCGTAACATTAAGGCAATGCATTTGAACTCGATGAGCTTGGCTATGGAAGAAGGTGAGGCGAAAGGGAA
AGAGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGGAGCAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCCCAACTCGGTTCTTGATTTGGGG
AAACAGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGGAAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGATTATGTTAGGGAGT
GGATAGGGAGTCAGATTCACACCGAGAATCCCGGATTGGGATGATGATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACAC
GCCTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACAATTGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACTCTAGA
AGAGAAGTTTGAAAGGAAGAGACCATCGAGAAGAAGAAATCTAGAAAGAAGAAGAAGAAGCATAGGAACATG
GAGGAATGGTGGAAAGAGGAAGAACATCAAGACAAAAAGAAAGATTAGAGTCTTGAGAATCAAGTTCAAGAACCG
    
```



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1982 bits(1073)	0.0	1132/1159(98%)	16/1159(1%)	Plus/Minus

Description	score	score	cover	value	Ident	Accession
PREDICTED: Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1q80870 (LOC106381554), mRNA	1692	1809	89%	0.0	97%	gil923760216 XM_013821467.1
PREDICTED: Brassica oleracea var. oleracea putative receptor-like protein kinase At1q80870 (LOC106327649), mRNA	1665	1778	89%	0.0	97%	gil922430515 XM_013765867.1
PREDICTED: Brassica rapa putative receptor-like protein kinase At1q80870 (LOC103853210), mRNA	1651	1755	89%	0.0	96%	gil1079376641 XM_009130136.2
PREDICTED: Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1q80870 (LOC106429713), mRNA	1599	1703	89%	0.0	95%	gil923912454 XM_013870464.1
PREDICTED: Raphanus sativus putative receptor-like protein kinase At1q80870 (LOC108842632), mRNA	1202	1290	89%	0.0	85%	gil1072921032 XM_018615612.1

Query	1	ACTCNAGCTCGCAACCNACGACTTCGNCGAGTCCAACGTGATCGGCAAAGGAGGCTCGGG 	60
Sbjct	49629162	ACTCAAGCTCGCAACCAACGACTTCGACGAGTCCAACGTGATCGGCAAAGGAGGCTCGGG	49629103
Query	61	GACCGTGTTGAGGACATTACGAGGGACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAG 	120
Sbjct	49629102	GACCGTGTTGAGGACATTACGAGGGACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAG	49629043
Query	121	CCTCTCTCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGCTAAA 	180
Sbjct	49629042	CCTCTCTCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGCTAAA	49628983
Query	181	ATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACCACAGGTTCTT 	240
Sbjct	49628982	ATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACCACAGGTTCTT	49628923
Query	241	GGTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTC 	300
Sbjct	49628922	GGTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTC	49628863
Query	301	GTGCTTGAGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTT 	360
Sbjct	49628862	GTGCTTGAGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTT	49628803
Query	361	TATGCATTTTCGGGTGTGACCCGCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCT 	420
Sbjct	49628802	TATGCATTTTCGGGTGTGACCCGCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCT	49628743
Query	421	TCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGA 	480
Sbjct	49628742	TCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGA	49628683
Query	481	GGAGGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTTCAGTCAAGAGCTTTCTGAGAGCACTCC 	540
Sbjct	49628682	GGAGGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTTCAGTCAAGAGCTTTCTGAGAGCACTCC	49628623
Query	541	TCAGACGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGGTTGATTTCTCTCTTTCGCTTACA 	600
Sbjct	49628622	TCAGACGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGGTTGATTTCTCTCTTTCGCTTACA	49628563
Query	601	AGCTTCTTCGTCTTCCAAGAACAGCAGGACGACCCGTAACATTAAGGCAATGCATTTGAA 	660
Sbjct	49628562	AGCTTCTTCGTCTTCCAAGAACAGCAGGACGACCCGTAACATTAAGGCAATGCATTTGAA	49628503
Query	661	CTCGATGAGCTTGGCTATGGAAGAAGGTGAGGCGAAAGGGAAAGAGGTTGAGGAGGAGAA 	720
Sbjct	49628502	CTCGATGAGC--GGC-A-GTTATATG-TCCT-C-----AGAGGTTGAGGAGGAGAA	49628458
Query	721	TGAGTTTGGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCCGAACTCGGTTCTTGATTTGGGGAA 	780
Sbjct	49628457	TGAGTTTGGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCCGAACTCGGTTCTTGATTTGGGGAA	49628398
Query	781	ACAGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGA 	840
Sbjct	49628397	ACAGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGA	49628338
Query	841	TTATGTTAGGGAGTGGATAGGGAGTCAGATTACACCCGAGAATCCCGGATTGGGATGATG 	900
Sbjct	49628337	TTATGTTAGGGAGTGGATAGGGAGTCAGATTACACCCGAGAATCCCGGATTGGGATGATG	49628279
Query	901	ATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACAA 	960
Sbjct	49628278	ATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACAA	49628219
Query	961	TTGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACTCTagaagagaagtttg 	1020
Sbjct	49628218	TTGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACTCTAGAAGAGAAGTTTG	49628159
Query	1021	caaaggaagagaccatcgagaagaagaatctagaagaagaagaagaagaagcatagga 	1080

```
Sbjct 49628158 CAAAGGAAGAGACCAGCGAGAAGAAGAAATCTAGAAAGAAGAAGAAGAAGCATAGGA 49628099
Query 1081      acatggaggaatggtggaagaggaagaacatcaagaCAAAAAGAAGATTAGAGTCTTGA 1140
          |||
Sbjct 49628098 ACATGGAGGAATGGTGGAAAGAGGAAGAACATCAAGACAAAAAGAAGATTAGAGTCTTGA 49628039

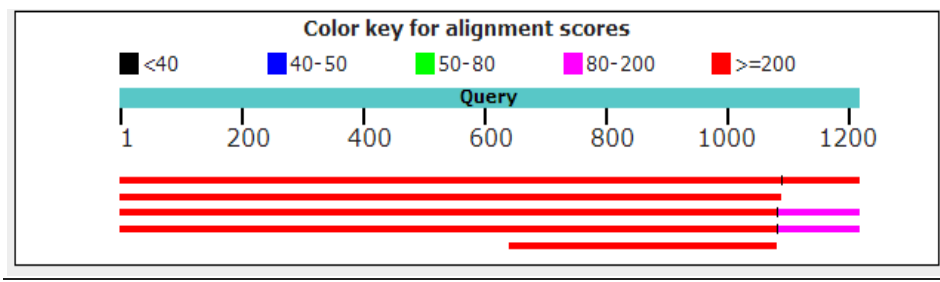
Query 1141      GAATCAAGTTCAGAACCG 1159
          |||
Sbjct 49628038 GAATCAAGTTCAGAACCG 49628020
```

Figura A6. Secuencia consenso y alineamiento para la línea 22(3)C.

>Consensus

```

G TTCAGAGGCATTACGAGGNNNGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTCTCCAGTCCGAGACCGAG
T TCCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGA
T CACCACAGGTTCTTGGTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTTCGTGC
N TGAGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGCATTTGCGGTGTGACCCGCC
G GTGATTACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCT
T AGAGTGAAAGTGGAGGAGGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTCAAGAGCTTTCTGAGAGCACTCCTCAG
A CGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATGAGGTTGATTTCTCTTGCCTTACAAGCTTCTTGCCTTCCAAGAACAGC
A AGGACGAGCCGTAACATTAAGGCAATGCATTTGAACTCGATGAGCTTGGCTATGGAAGAAGGTGAGGCGAAAGGGAAA
G AGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCCGAACTCGGTTCTTGATTTGGGGAAA
C AGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGCGAGTTGTGTAGTAAAGATTATGTTAGGGAGTGGAT
A GGGAGTCAGATTCACCCGAGAATCCGGANNGGATGATGATGGGGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTG
A GCTGGGAGTTTCAACTAGGACAATTGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACTCTAGAAGAGAA
G TTTGCAAAGGAAGAGACCATCGAGAAGAAGAAATCTAGAAAGAAGAAGAAGAAGAAGCATAGGAACATGGAGGAAT
G GTGAAAAGAGGAAGANCAATCAAGACAAAAGAAGATTAGAGTGGCTTGATATCTCCGTGAATCACCGGCGGGTCACA
C CCGAAATGCATAANGTCGAGAGCTTTCNNCACATCAAGANTGATACNAAACCTCTCTCCAGCTCANGCACGAANCC
    
```



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1792 bits(970)	0.0	1042/1077(97%)	19/1077(1%)	Plus/Minus

```

Query 1      GTTCAGAGGCATTACGAGGNNNGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTC 60
      |||
Sbjct 49629096 GTTCAGAGGCATTACGAGGACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTC 49629037

Query 61     TCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGGCTAAAATCGTC 120
      |||
Sbjct 49629036 TCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGGCTAAAATCGTC 49628977

Query 121    TTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACACAGGTTCTTGGTCTA 180
      |||
Sbjct 49628976 TTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACACAGGTTCTTGGTCTA 49628917

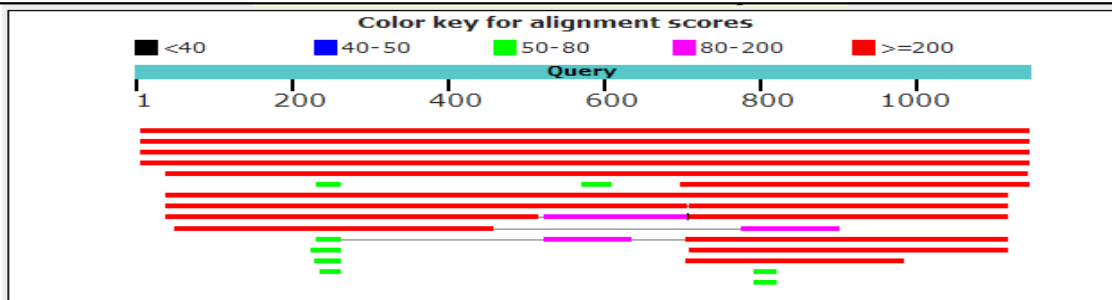
Query 181    CGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTTCGTGCN 240
      |||
Sbjct 49628916 CGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCT-CGTGCT 49628858

Query 241    TGAGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGC 300
    
```


Figura A7. Secuencia consenso y alineamiento para la línea 26C.

>Consensus

```
GCNCNCGACTTCGACGAGTCCAACGNGNNTCNNNNNNAAAGGAGGCTCGNGGGACCGTGTTCCAGAGGCATTACG
AGGNNACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCCAGAACGAGC
TGCAGATCCTCGGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTGGGGTACTGCGTTCGAGAAGGATCACCACAGGT
TCTTGGTCTACGAGTACATGCCAACAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTTCGTGCTTGAGCTGG
GAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTATGCATTCGGGTGTGACCCGCCGGTGATT
CACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCTAGAG
TGAAAGTGGAGGANGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTCAAGAGCTTTCTGAGAGCACTCCTCAGACG
GGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGGGTTGATTTCTCTTTCGTTACAAGCTTCTTCGTCTTCCAAGAACAGC
AGGACGAGCCGTAACNTNNNNNCAATGCATTTGAACTCGATGAGCTTGGCTATGGAAAGAAGGTGAGGCGAAAGG
GAAAAGAGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGAAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCGAACCTCGTTCTTCTGATT
TGGGAAACAGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTTGTGTAGTAAAGATTATGTT
AGGGAGTGGATAGGGAGTCAAGTTCACNCCGAAGAATCCGGAATTGGGATGATGATGGGAAGAAGATCNCCTTGA
CAGTAACNCTCNTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACAATTGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTG
ACACTNTAGAAGAGAAGTTTGCAAAGGAAGAGACCATCGAGAAGAAGAAATNTANAAAGAAGAAGANGAAGAAGC
ATAGGAACATGGAGGAATGGTGGAAAGAGGAAGAATCAAGACAAAAAGAAGATTAGAGTCTTGAGAATCNA
```



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1751 bits(948)	0.0	1074/1143(94%)	17/1143(1%)	Plus/Minus

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
PREDICTED: Brassica oleracea var. oleracea putative receptor-like protein kinase At1g080870 (LOC106327649). mRNA	1155	1295	85%	0.0	95%	gi 922430515 XM_013765867.1
PREDICTED: Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1g080870 (LOC106381554). mRNA	1148	1288	85%	0.0	94%	gi 923760216 XM_013821467.1
PREDICTED: Brassica rapa putative receptor-like protein kinase At1g080870 (LOC103853210). mRNA	1141	1272	85%	0.0	94%	gi 1079376641 XM_009130136.2
PREDICTED: Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1g080870 (LOC106429713). mRNA	1088	1219	85%	0.0	93%	gi 923912454 XM_013870464.1
PREDICTED: Raphanus sativus putative receptor-like protein kinase At1g080870 (LOC106842632). mRNA	794	898	82%	0.0	84%	gi 1072921032 XM_018815612.1

Query	7	CGACTTCGACGAGTCCAACGNNGNNTCNNNNNAAAGGAGGCTCGNGGGACCGTGTTCAGA	66
Sbjct	49629144	CGACTTCGACGAGTCCAACGTG-ATC---GGCAAAGGAGGCTCG-GGGACCGTGTTCAGA	49629090
Query	67	GGCATTACGAGGNNACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTCTCTCCA	126
Sbjct	49629089	GGCATTACGAGG-GACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTCTCTCCA	49629031
Query	127	GTCCGAGACCGAGTTCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCT	186
Sbjct	49629030	GTCCGAGACCGAGTTCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCT	49628971
Query	187	CGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACCACAGGTTCTTGGTCTACGAGTA	246
Sbjct	49628970	CGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGATCACCACAGGTTCTTGGTCTACGAGTA	49628911
Query	247	CATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTCTTTTCAACGAAGAAGGCTTCGTGCTTGAGCT	306
Sbjct	49628910	CATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTCTTTTCAACGAAGAAGGCT-CGTGCTTGAGCT	49628852
Query	307	GGGAGAGGAGGTTTGGTATCATCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGCATTTCTG	366
Sbjct	49628851	GGGAGAGGAGGTTTGGTATCATCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGCATTTCTG	49628792
Query	367	GGTGTGACCCGCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTG	426
Sbjct	49628791	GGTGTGACCCGCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTG	49628732
Query	427	AGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGAGGANGGAGTAG	486
Sbjct	49628731	AGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGAGGANGGAGTAG	49628672
Query	487	GTTATGGTGGGGTTGATCTGTTTCAGTCAAGAGCTTTCTGAGAGCACTCCTCAGACGGGCG	546
Sbjct	49628671	GTTATGGTGGGGTTGATCTGTTTCAGTCAAGAGCTTTCTGAGAGCACTCCTCAGACGGGCG	49628612
Query	547	TTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGGGTTGATTTCTCTCTTGCGTTACAAGCTTCTTCG	606
Sbjct	49628611	TTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGG-TTGATTTCTCTCTTGCGTTACAAGCTTCTTCG	49628553
Query	607	TCTTCCAAGAACAGCAGGACGAGCCGTAACNTNNNNCAATGCATTTGAACTCGATGAGC	666
Sbjct	49628552	TCTTCCAAGAACAGCAGGACGAGCCGTAACATTAAGGCAATGCATTTGAACTCGATGAGC	49628493
Query	667	TTGGCTATGGAAGAAGGTGAGGCGAAAGGGAAAAGAGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTG	726
Sbjct	49628492	--GGC-A-GTTAT-ATG-TCCT-C-----AGAGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTG	49628450
Query	727	AGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCGAACTCGGTTCCTTGATTTGGGAAACAGTGG	786
Sbjct	49628449	AGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCGAACTCGGTTC-TTGATTTGGGAAACAGTGG	49628391
Query	787	GGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTTGTGTAGTAAAGATTATGT	846
Sbjct	49628390	GGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTT-GTGTAGTAAAGATTATGT	49628332
Query	847	TAGGGAGTGGATAGGGAGTCAGATTCACNCCGAAGAATCCGGAATTGGGATGATGATGGG	906
Sbjct	49628331	TAGGGAGTGGATAGGGAGTCAGATTCACACCGA-GAATCCGG-ATTGGGATGATGATGGG	49628274
Query	907	AAGAAGATCNCGGTTAGCAGTAACNCTCNTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACAATTGAT	966
Sbjct	49628273	AAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACAATTGAT	49628214
Query	967	AAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACTNTagaagagaagtttgcaaag	1026
Sbjct	49628213	AAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACTCTAGAAGAGAAGTTTGCAAAG	49628154

```
Query 1027      gaagagaccatcgagaagaagaatntanaaagaagaangaagaagcataggaacatg 1086
|||||          |||||||          || |||||||          |||||||          ||
Sbjct 49628153  GAAGAGACCAGCGAGAAGAAGAAATCTAGAAAGAAGAAGAAGAAGCATAGGAACATG 49628094

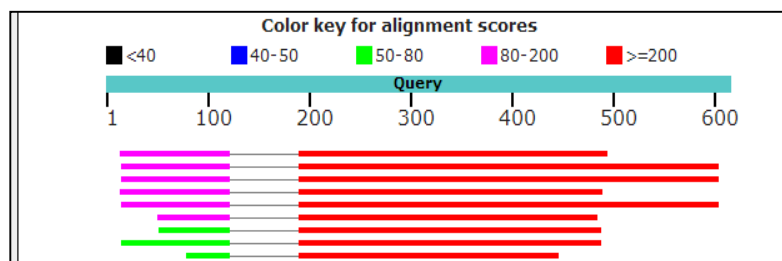
Query 1087      gaggaatggtggaagaggaagaacatcaagaCAAAAAGAAGATTAGAGTCTTGAGAATC 1146
|||||          |||||||          |||||||          |||||||          ||
Sbjct 49628093  GAGGAATGGTGGAAAGAGGAAGAACATCAAGACAAAAGAAGATTAGAGTCTTGAGAATC 49628034
```


Query	121	AGATCCTCGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGA	180
Sbjct	49629001	AGATCCTCGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGA	49628942
Query	181	AGGAATCACCACAGGTTTCTTGGTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTTCCAAGAGC	240
Sbjct	49628941	AGGA-TCACCACAGG-TTCTTGGTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCT-CCAAGAGC	49628885
Query	241	TTCTTTTCAACGAAGAAGGCTCGTGCTTGAGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTG	300
Sbjct	49628884	TTCTTTTCAACGAAGAAGGCTCGTGCTTGAGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTG	49628825
Query	301	ATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGCATTTCCGGGTGTGACCCGCCGGTGATTCACGGAG	360
Sbjct	49628824	ATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTTATGCATTTCCGGGTGTGACCCGCCGGTGATTCACGGAG	49628765
Query	361	ATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTG	420
Sbjct	49628764	ATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTG	49628705
Query	421	GTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGAGGAGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTTCAGTC	480
Sbjct	49628704	GTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGAGGAGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTTCAGTC	49628645
Query	481	AAGAGCTTCTGAGAGCACTCCTCAGACGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGG	540
Sbjct	49628644	AAGAGCTTCTGAGAGCACTCCTCAGACGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGG	49628585
Query	541	TTGATTTCTCTCTTGCCTTACAAGCTTCTTCGCTTCCAAGAACAGCAGGACGAGCCGTA	600
Sbjct	49628584	TTGATTTCTCTCTTGCCTTACAAGCTTCTTCGCTTCCAAGAACAGCAGGACGAGCCGTA	49628525
Query	601	ACATTAAGGCAATGCATTTGAACTCGATGAGCTTGGCTATGGAAGAAGGTGAGGCGAAAG	660
Sbjct	49628524	ACATTAAGGCAATGCATTTGAACTCGATGAGC--GGC-A-GTTATATG-TCCT-C-----	49628476
Query	661	GGAAAGAGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCCGA	720
Sbjct	49628475	---AGAGGTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCCGA	49628420
Query	721	ACTCGGTTCTTGATTTGGGGAAACAGTGGGGAGAGATTGGTGGTGGGAAGCAAGAAGGGA	780
Sbjct	49628419	ACTCGGTTCTTGATTTGGGGAAACAGTGGGGAGAGATTGGTGGTGGGAAGCAAGAAGGGA	49628360
Query	781	GTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGATTATGTTAGGGAGTGGATAGGGAGTCAGATTACACCCG	840
Sbjct	49628359	GTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGATTATGTTAGGGAGTGGATAGGGAGTCAGATTACACCCG	49628300
Query	841	AGAATCCGGAATTGGGATGATGATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTGAG	900
Sbjct	49628299	AGAATCCGGA-TTGGGATGATGATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTGAG	49628241
Query	901	CTGGGAGTTTCAACTAGGACAATTGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTT	960
Sbjct	49628240	CTGGGAGTTTCAACTAGGACAATTGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTT	49628181
Query	961	GACACTCTagaagagaagtttgcacaaaggaagagaccatcgagaagaagaatctagaag	1020
Sbjct	49628180	GACACTCTAGAAGAGAAGTTTGCAAAAGGAAGAGACCAGCGAGAAGAAGAAATCTAGAAAG	49628121
Query	1021	aagaagaagaagaagcataggaacatggaggaatggtggaaagaggaagaacatcaagaC	1080
Sbjct	49628120	AAGAAGAAGAAGAAGCATAGGAACATGGAGGAATGGTGGAAAGAGGAAGAACATCAAGAC	49628061
Query	1081	AAAAAGAAGATTAGAGTCTTGAGAA 1105	
Sbjct	49628060	AAAAAGAAGATTAGAGTCTTGAGAA 49628036	

Figura A9. Secuencia consenso y alineamiento para la línea 47C.

```

ACCGAAAATGNGNNANTTTTAAACGNNNNNNNNNNNGATTCTCAAGACTCTAATCTTCTTTTGTCTTGANN
NCTTCCTCTTCCACCATTCTCCATGTTCTATGCTTCTTCTTCTTCTTCTAGATTCTTCTTCTCGATGGNCTC
TTCCTTTGCAAACCTTCTTCTAGAGTGTCAAACCTAGCTTCATCCAAACCAGACTCTGCCTTATCAATTGTCTAGT
TGAAACTCCCAGCTCAGGCGTGTTACTGCTAACGGTGATCTTCTTCCATCATCATCCAATCCGGATTCTCGGTGT
GAATCTGACTCCCTATCCACTCCCTAACATAATCTTTACTACACAACCTGCCACTCCCTTCTTGCTCCACCACCAAT
CTCTCCCCACTGTTTCCCNANNAAGAACCGAGTTCGGGCTCANNNTCATCTCCTTGNNCTGCTCAAACCTNATT
CTCCTCTCAANCTCTTCCCTTTCGCCNNNNNTCTTCCATANNNNANNNNNNNNGAGTTCAAAATGNNTTGN
TTAATGTTACNNCTCGNCCNGCTGTTCTNTGNAANNANNAANAANCTTGAAACGCNNNNANNA
    
```



Description	score	score	cover	value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1g08070 (LOC106381554), mRNA	508	633	67%	1e-139	96%	gi 923760216 XM_013821467.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Brassica oleracea var. oleracea putative receptor-like protein kinase At1g08070 (LOC106327649), mRNA	502	624	84%	4e-138	85%	gi 922430515 XM_013765867.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Brassica rapa putative receptor-like protein kinase At1g08070 (LOC103853210), mRNA	493	606	84%	2e-135	85%	gi 1079376641 XM_009130136.2
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1g08070 (LOC106422401), mRNA	470	595	66%	3e-128	94%	gi 923895857 XM_013863197.1
<input type="checkbox"/> PREDICTED: Brassica napus putative receptor-like protein kinase At1g08070 (LOC106429713), mRNA	444	558	84%	1e-120	82%	gi 923912454 XM_013870464.1

Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
508 bits(562)	1e-139	292/303(96%)	0/303(0%)	Plus/Minus

```

Query 190 AGAGTGTCAAACCTAGCTTCATCCAAACCAGACTCTGCCTTATCAATTGTCTAGTTGAA 249
      |||
Sbjct 1345 AGAGTGTCAAACCTAGCTTCATCCAAACCAGACTCTGCCTTATCAATTGTCTAGTTGAA 1286

Query 250 ACTCCCAGCTCAGGCGTGTTACTGCTAACGGTGATCTTCTTCCATCATCATCCAATCC 309
      |||
Sbjct 1285 ACTCCCAGCTCAGGCGTGTTACTGCTAACGGTGATCTTCTTCCATCATCATCCAATCC 1226

Query 310 GGATTCTCGGTGTGAATCTGACTCCCTATCCACTCCCTAACATAATCTTTACTACACAAC 369
      |||
Sbjct 1225 GGATTCTCGGTGTGAATCTGACTCCCTATCCACTCCCTAACATAATCTTTACTACACAAC 1166

Query 370 TGCCACTCCCTTCTTGCTTCCACCACCAATCTCTCCCCACTGTTTCCCNANNAAGA 429
      |||
Sbjct 1165 TGCCACTCCCTTCTTGCTTCCACCACCAATCTCTCCCCACTGTTTCCCAAATCAAGA 1106

Query 430 ACCGAGTTCGGGCTCANNNTCATCTCCTTGNNCTGCTCAAACCTNATTCTCCTCTCAANC 489
      |||
Sbjct 1105 ACCGAGTTCGGGCTCACACTCATCTCCTTGCTCTGCTCAAACCTCATCTCCTCTCAACC 1046

Query 490 TCT 492
      |||
Sbjct 1045 TCT 1043
    
```

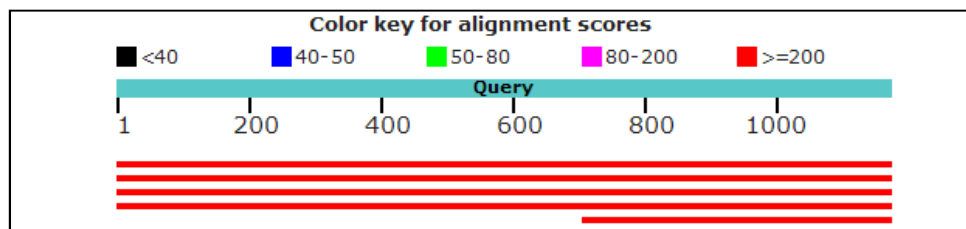

Sbjct	49629056	 AAGAGACTCGACAGCCTCTCTCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCAGAACGAGCTGCAGATC	49628997
Query	130	CTCGGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGAT	189
Sbjct	49628996	CTCGGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTCGAGAAGGAT	49628937
Query	190	CACCACAGGTTCTTGGTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTC	249
Sbjct	49628936	CACCACAGGTTCTTGGTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTC	49628877
Query	250	AACGAAGAAGGCTCGTGCTTGAGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCG	309
Sbjct	49628876	AACGAAGAAGGCTCGTGCTTGAGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCG	49628817
Query	310	AAAGCTCTCGACTTTATGCATTTCCGGGTGTGACCCGCCGGTGATTACCGGAGATATCAAG	369
Sbjct	49628816	AAAGCTCTCGACTTTATGCATTTCCGGGTGTGACCCGCCGGTGATTACCGGAGATATCAAG	49628757
Query	370	CCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCT	429
Sbjct	49628756	CCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCCGACTTTGGTTTGTCT	49628697
Query	430	AGAGTGAAAGTGGAGGAGGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTTCAGTCAAGAGCTT	489
Sbjct	49628696	AGAGTGAAAGTGGAGGAGGGAGTAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTTCAGTCAAGAGCTT	49628637
Query	490	TCTGAGAGCACTCCTCAGACGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGGTTGATTTTC	549
Sbjct	49628636	TCTGAGAGCACTCCTCAGACGGGCGTTGGCACTCCGACGCATCATCATGAGGTTGATTTTC	49628577
Query	550	TCTCTTGCGTTACAAGCTTCTTCTCGTCTTCCAAGAACAGCAGGACGAGCCGTAAACATTAAG	609
Sbjct	49628576	TCTCTTGCGTTACAAGCTTCTTCTCGTCTTCCAAGAACAGCAGGACGAGCCGTAAACATTAAG	49628517
Query	610	GCAATGCATTTGAACTCGATGAGCTTGGCTATGGAAGAAGGTGAGGCGAAAGGGAAAGAG	669
Sbjct	49628516	GCAATGCATTTGAACTCGATGAGC--GGC-A-GTTATATG-TCCT-C-----AGAG	49628472
Query	670	GTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCCGAACTCGGTT	729
Sbjct	49628471	GTTGAGGAGGAGAATGAGTTTGGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGCCCGAACTCGGTT	49628412
Query	730	CTTGATTGGGGAAACAGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAG	789
Sbjct	49628411	CTTGATTGGGGAAACAGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAG	49628352
Query	790	TTGTGTAGTAAAGATTATGTTAGGAGTGGATAGGGAGTCAAGTTCACACCGAGAATCCG	849
Sbjct	49628351	TTGTGTAGTAAAGATTATGTTAGGAGTGGATAGGGAGTCAAGTTCACACCGAGAATCCG	49628292
Query	850	GAATTGGGATGATGATGGGAAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTGAGCTGGGAG	909
Sbjct	49628291	GA-TTGGGATGATGATGGGAA-GAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTGAGCTGGGAG	49628234
Query	910	TTTCAACTAGGACAATTGGATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACT	969
Sbjct	49628233	TTTCAACTAGGACAATTG-ATAAGGCAGAGTCTGGTTTGGATGAAGCTAGGTTTGACACT	49628175
Query	970	CTagaagagaagtttgcaaaggaagagaccatcgagaagaagaatctagaagaagaag	1029
Sbjct	49628174	CTAGAAGAGAAGTTTGCAAAGGAAGAGACCAGCGAGAAGAAGAAATCTAGAAAGAAGAAG	49628115
Query	1030	aagaagaagcataggaacatggaggaatggtggaagaggaagaacatcaagaCAAAAAG	1089
Sbjct	49628114	AAGAAGAAGCATAGGAACATGGAGGAATGGTGGAAAGAGGAAGAACATCAAGACAAAAAG	49628055
Query	1090	AAGATTAGAGTCTTGAGAATCAAGTTCAAGA 1120	
Sbjct	49628054	AAGATTAGAGTCTTGAGAATCAAGTTCAAGA 49628024	

Figura A11. Secuencia consenso y alineamiento para la línea 69(2)C.

>Consensus

```

CTCAAGCTCGCAACCAACGACTTCGACGAGTCCAACGTGATCGGCAAAGGAGGCTCGGGGACCGTGTTTCNGA
GGCATTACGAGGGACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGCCTCTCTCTCCAGTCCGAGACCGAG
TTCCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGGCTAAAATCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTTCG
AGAAGGATCACCACAGTTCTTGGTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTCTTTTCAACGA
AGAAGGCTCGTGCTTGAGCTGGGAGAGGAGGTTTGGTATCATTCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTAT
GCATTTGCGGTGTGACCCGCCGGTGATTCACGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTTCTTGATTCTGAGTTT
AGGGCCAAGATCTCNGACTTTGGTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGAGGANGGAGNAGGTTATGGTGGGGTTGA
TNTGTTCACTCAAGAGCTNTCTGAGAGCACTCCTCAGACGGGCGTTGGCACTCCNACNCATCATCATGAGGTT
GATTTCTCTTTCGTTACAAGCTTCTTCGTCTTCNNGANNANNAGGACGAGCCGTAACNTNAGGCAATG
CATNTGANCTCGATGAGCTTGCTATGGAAGAANGTGAGGCGAAAGGGAAAGAGGTTGAGGAGGAGAATG
AGTTTGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTANNCCGAACTCGGTTCTTGATTTGGGAAACAGTGGGGGAGA
GATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGATTANGTTAGGGAGTGGATAGGGA
GTCAGATTCACACCGAGAATCCGGATTGGGATGATGATGGGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACNCNTG
AGCTGGGAGTTTCACTAGGACANTNGATAANNNGAGTCTGGTNNGNANGAAGCTAGGTTTGACTCTA
GAAGAGAAGTTTGCAAAGGAAGAGANCATCGAGAAGAAGAAATCNANAANGAAGAAGAAGAAGCAT
AGGAACATGGAGGAATGGTGGAAAGAGGAAGANCATCAAGACAAAAAGAAGATTAGAGTCNTGAGAATCA
    
```



Score	Expect	Identities	Gaps	Strand
1905 bits(1031)	0.0	1109/1169(95%)	3/1169(0%)	Plus/Minus

Description	Max score	Total score	Query cover	E value	Ident	Accession
<input type="checkbox"/> Brassica oleracea var. oleracea cultivar TO1000 chromosome C2_BOL	1905	1905	100%	0.0	95%	NC_027749.1
<input type="checkbox"/> Brassica rapa cultivar Chilifu-401-42 chromosome A2_Brapa_1.0	1860	1860	100%	0.0	94%	NC_024796.1
<input type="checkbox"/> Brassica napus cultivar ZS11 chromosome C2_Bra_napus_v2.0	1853	1853	100%	0.0	94%	NC_027768.2
<input type="checkbox"/> Brassica napus cultivar ZS11 chromosome A2_Bra_napus_v2.0	1807	1807	100%	0.0	93%	NC_027758.2
<input type="checkbox"/> Brassica napus cultivar ZS11 chromosome C8_Bra_napus_v2.0	750	750	40%	0.0	94%	NC_027774.2

```

Query 1          CTCAAGCTCGCAACCAACGACTTCGACGAGTCCAACGTGATCGGCAAAGGAGGCTCGGGG 60
                |||
Sbjct 26936604  CTCAAGCTCGCGACCAACGACTTCGACGAGTCCAACGTGATCGGCAAAGGCGGCTCGGGG 26936545

Query 61         ACCGTGTTTCNGAGGCATTACGAGGGACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGC 120
                |||
Sbjct 26936544  ACCGTGTTTCAGAGGCATTACGAGGGACGGGAAGCTCTTCGCGGTCAAGAGACTCGACAGC 26936485

Query 121        CTCTCTCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGCTAAAA 180
                |||
Sbjct 26936484  CTCTCTCTCCAGTCCGAGACCGAGTTCAGAACGAGCTGCAGATCCTCGGGGGCTAAAA 26936425

Query 181        TCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGGTACTGCGTTCGAGAAGGATCACCACAGGTTCTTG 240
                |||
Sbjct 26936424  TCGTCTTTTCTCGTGACGCTTTTGGGATACTGCGTTCGAGAAGGATCACCACAGGTTCTTG 26936365

Query 241        GTCTACGAGTACATGCCCAACAAGAGCCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTCG 300
                |||
Sbjct 26936364  GTTACGAGTATATGCCCAACAAGAGTCTCCAAGAGCTTCTTTTCAACGAAGAAGGCTCG 26936305

Query 301        TGCTTGAGCTGGGAGAGAGGTTTGGTATCATCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTT 360
                |||
Sbjct 26936304  TGCTTGAGCTGGGAGAGAGGTTTGGTATCATCTTGATGTGGCGAAAGCTCTCGACTTT 26936245

Query 361        ATGCATTTCCGGTGTGACCCGCCGGTGATTACCGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTT 420
                |||
Sbjct 26936244  ATGCATTTTGGATGTGACCCGCCGGTGATTACCGGAGATATCAAGCCGAGTAATGTTCTT 26936185

Query 421        CTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCNGACTTTGGTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGAG 480
                |||
Sbjct 26936184  CTTGATTCTGAGTTTAGGGCCAAGATCTCNGACTTTGGTTTGTCTAGAGTGAAAGTGGAG 26936125

Query 481        GANGGAGNAGGTTATGGTGGGGTTGATNTGTTTCAGTCAAGAGCTNTCTGAGAGCACTCCT 540
                |||
Sbjct 26936124  GAGGGAGGAGGTTATGGTGGGGTTGATCTGTTTCAGTCAAGAGCTTCTGAGAGCACTCCT 26936065

Query 541        CAGACGGGCGTTGGCACTCCNACNCATCATCATGAGGTTGATTTCTCTCTTGGCTTACAA 600
                |||
Sbjct 26936064  CAGACGGGCGTTGGCACTCCAACGCATCATCATGAGGTTGATTTCTCTCTTGGCTTACAA 26936005

Query 601        GCTTCTTCGTCTTCNNGANNANNAGGACGAGCCGTAAACNTNAGGCAATGCATNTGANC 660
                |||
Sbjct 26936004  GCTTCTTCGTCTTCTAAGAATAGTAGGACGAGCCGTAAACATCAAGGGAATGCATCTGAGC 26935945

Query 661        TCGATGAGCTTGGCTATGGAAGAANGTGAAGCGAAAGGGAAAGAGGTTGAGGAGGAGAAT 720
                |||
Sbjct 26935944  TCGATGAGTTTGGCTATGGAAGAANGTGAAGCGAAAGGGAAAGAGGTTGAGGAGGAGAAT 26935885

Query 721        GAGTTTGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGANCCGAACCTCGGTTCTTGATTTGGGGAAA 780
                |||
Sbjct 26935884  GAGTTTGAGCAGAGCAAGGAGATGAGTGTGAGTCCGAACCTCGGTTCTTGATTTGGGGAAA 26935825

Query 781        CAGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGAT 840
                |||
Sbjct 26935824  CAGTGGGGGAGAGATTGGTGGTGAAGCAAGAAGGGAGTGGCGAGTTGTGTAGTAAAGAT 26935765

Query 841        TANGTTAGGGAGTGGATAGGGAGTCAGATTCACACCGAGAATCCGGATTGGGATGATGAT 900
                |||
Sbjct 26935764  TACGTTAGGGAGTGGATAGGGAGTCAGATTCACACCGAGAATCCGGATTGGGATGATGAT 26935705

Query 901        GGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACNCNTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACANTN 960
                |||
Sbjct 26935704  GGAAGAAGATCACCGTTAGCAGTAACACGCCTGAGCTGGGAGTTTCAACTAGGACAGTA 26935645

Query 961        GATAANNNGAGTCTGGTNNGNANGAAGCTAGGTTTGACACTCTagaagagaagtttgca 1020
                |||
Sbjct 26935644  GATAAAGATGAGTCTGGTTGAATGAAGCTAGGTTTGACACTCTAGAAGAGAAGTTTGCA 26935585

Query 1021       aaggaagagancatcgagaagaagaaatcnanaangaagaagaagaag---catagg 1077
                |||
Sbjct 26935584  AAGGAAGAGAACAACGAGAAGAAGAAATCTAGAAAGAAGAAGAAGAAGAAGCATAGG 26935525

```

```
Query 1078      aacatggaggaatggtggaaagaggaagaNCATCAAGACAAAAAGAAGATTAGAGTCNTG 1137
|||||
Sbjct 26935524 AACATGGAGGAATGGTGGAAAGAGGAAGAACATCAAGACAAAAAGAAGATTAGAGTCTTG 26935465

Query 1138      AGAATCAAGTTCANGANCCGTTTAAAAGT 1166
|||||
Sbjct 26935464 AGAATCAAGTTCAGAACCAGTTTAAAAGT 26935436
```