MAPEO DE QTL PARA LA RESISTENCIA A *Cercospora zeae-maydis* EN MAÍZ (*Zea mays* L.)

Tesina de la

Alumna

GUILLERMINA PERGENTIL

Este trabajo ha sido presentado

como requisito para la obtención del título de

LICENCIADA EN GENÉTICA

Carrera: Licenciatura en Genética

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

Pergamino, 5 de mayo de 2015-

MAPEO DE QTL PARA LA RESISTENCIA A *Cercospora zeae-maydis* EN MAÍZ (*Zea mays* L.)

Tesina de la

Alumna

GUILLERMINA PERGENTIL

Aprobada por el Tribunal Evaluador de Tesina

…… …… ……

…… ……

Ing. Agr. *MSc.* Carla Delucchi

Directora

Ing. Agr. Antonio Díaz Paleo

Co- director

Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.

Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.

AGRADECIMIENTOS

A mi familia por su apoyo, sostén y por ayudarme siempre a seguir adelante.

A Maxi por su amor y por estar siempre.

A Estefi por brindarme su alegría y amistad.

A Vero, por incitarme siempre a más.

A “las chicas”, por haberme escuchado hablar de la facu y dar siempre un mensaje de perseverancia, especialmente a Maru y Mani.

A todos los compañeros que pasaron a lo largo de estos años, en especial a Ana, Lu, Charly, Roli, Agus y Sofi, por hacer esta etapa más amena.

A los profesores de esta carrera, por darme todos sus conocimientos y hacerme crecer profesionalmente, en especial a Susana Pistorale por escucharme y aconsejarme.

A los profesionales que me ayudaron a llevar a cabo esta tesina: mi directora la Ingeniera Agrónoma *MSc.* Carla Delucchi por su ayuda y aguante, y a mi co-director el Ingeniero Agrónomo Antonio Díaz Paleo por sus aportes durante este trabajo. A ambos gracias por su confianza.

A los compañeros del Laboratorio de Biotecnología de la EEA INTA Pergamino Dani, Vivi, Ceci, Emi, Marce, Guille, Agos y Lucho, por su enseñanza, paciencia, ayuda, buena predisposición y contención.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN……..6

1 - La importancia del cultivo de maíz……6

2 - Características del maíz……7

3 - Mejoramiento genético del maíz……...8

4 - Herramientas para el mejoramiento……9

5 - Presentación de la enfermedad……..10

6 - Mapeo de QTL……...13

7 - Poblaciones de mapeo……13

8 - Evaluación fenotípica……14

9 - Marcadores moleculares……..15

10 - Análisis de QTL……...16

11 - Trabajo previo realizado referente a este proyecto……...19

12 - Hipótesis……...19

13 - Objetivos……...19

13.1 - Objetivo general……19

13.2 - Objetivos específicos……...20

MATERIALES Y MÉTODOS……21

1 - Material vegetal……21

2 - Caracterización fenotípica…….....21

3 - Caracterización genotípica……..23

3.1 - Extracción de ADN……23

3.2 - Cuantificación de ADN……...23

3.3 - Análisis de SSR……..24

3.4 - Amplificación por PCR……...24

3.5 - Visualización de los productos de amplificación……25

4 - Análisis de segregación de los marcadores……27

5 - Mapa de ligamiento……...28

6 - Estudio de asociación entre el fenotipo y el genotipo……28

RESULTADOS……30

1 - Evaluación fenotípica……30

2 - Evaluación genotípica. Identificación de polimorfismos en los parentales……..32

3 - Caracterización genotípica de la población de mapeo……33

3.1 - Análisis de segregación de marcadores……33

3.2 - Mapa de ligamiento……34

4 - Estudio de asociación entre el fenotipo y el genotipo……35

DISCUSIÓN……39

1 - Evaluación fenotípica……39

2 - Caracterización genotípica de la población de mapeo……39

2.1 - Segregación de los marcadores……...39

2.2 - Mapa de ligamiento……40

3 - Mapeo de QTL……...41

CONCLUSIÓN……42

BIBLIOGRAFÍA……..43

RESUMEN……50

ANEXOS……..51

INTRODUCCIÓN

1-La importancia del cultivo de maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es un cultivo de unos 7000 años de antigüedad. Si bien es originario de América Central, fue introducido en la región sur de América del Sur antes de la colonización europea llegando a desarrollar una gran diversidad genética (Abadie y Berreta, 2005). A fines del siglo XV el maíz se introdujo en Europa, donde se convirtió en un factor clave de la alimentación humana y animal. Debido a su gran productividad y adaptabilidad, se extendió rápidamente a lo largo de todo el planeta (Luna *et al*., 1964). Este cereal es uno de los principales cultivos a nivel mundial y el principal en área sembrada de América Latina. Los principales países productores son Estados Unidos con 353,7 millones de toneladas, China con 218,5 millones de toneladas, Brasil con 81,3 millones de toneladas, la Unión Europea con 64,0 millones de toneladas, Ucrania con 30,9 millones de toneladas y en sexto lugar se ubica Argentina con 28,0 millones de toneladas, es decir que nuestro país participa en un 3% de la producción mundial (USDA: http://www.usda.gov). Estados Unidos se destaca por ser el mayor productor con cerca del 40% de la producción total mundial, principalmente para la elaboración de biocombustibles (Regúnaga *et al*., 2008).

A nivel del bloque del Mercosur, Argentina participa con el 25,2% de la producción de maíz, siendo el área cultivada de maíz aproximadamente el 11% del área total sembrada con cereales y oleaginosas, o el 30% del área destinada a cereales (Eyhérabide *et al*., 2009). En Argentina, los cultivos de maíz y de soja son los de mayor área de siembra, lo que los convierte en los más importantes desde el punto de vista de la generación de divisas. En relación a las provincias productoras, Buenos Aires es la provincia de mayor producción de maíz en la Argentina, ya que produce el 33,2% de la producción nacional (Ministerio de Agricultura, Ganadería y Pesca de la Presidencia de la Nación Argentina,

http://www.minagri.gob.ar). El principal destino de la producción de maíz argentino es la exportación, lo que hace que este país ocupe el segundo lugar como exportador de maíz (Eyhérabide *et al*., 2009).

El maíz es un alimento fundamental de los animales, especialmente porcino y aviar, y también es básico en la producción de aceite comestible y etanol. Su condición de materia prima renovable y no contaminante resulta de particular importancia. Este grano es una importante fuente de materia prima para producir almidón y derivados, como edulcorantes, aceite, alcohol, entre otros. Estos últimos pueden ser, y en cierta medida ya lo están siendo, utilizados como materia prima en la industria química, y en algunos casos como reemplazo de los derivados del petróleo. A diferencia de este, el maíz presenta ciertas ventajas ya que es un recurso renovable, los productos finales obtenidos son biodegradables y su degradación no altera el balance de dióxido de carbono atmosférico (Robutti, 2004). El residuo producido luego de desgranar la mazorca del maíz (marlo) y los restos de tallos secos que no contienen almidón y no tienen valor alimenticio, contienen celulosa y son, por lo tanto, una fuente potencial para la producción de etanol (Elander y Russo, 1993).

2-Características del maíz

El maíz (*Zea mays* L.) pertenece a la familia de las Gramíneas (*Poáceae*) subfamilia *Panicoideae*, la cual incluye a la mayoría de los pastos de las regiones tropicales y subtropicales del mundo. Aunque la mayoría de los pastos tienen flor perfecta, el maíz y sus ancestros salvajes teosinte y *Tripsacum* son monoicas y por esta razón fueron agrupados en la tribu taxonómica *Maydeae* (Stebbins y Crampton, 1961). El maíz pertenece al género *Zea* y es la única especie cultivada del mismo. La familia de las gramíneas es probablemente la de mayor importancia económica, la mayoría de los

cereales más importantes del mundo pertenecen a ella, incluyendo arroz, trigo, maíz, sorgo, caña de azúcar entre otros.

El maíz es una planta de porte robusto y de hábito anual; el tallo es simple, erecto, de elevada longitud, alcanzando alturas de dos a seis metros, las hojas nacen en los nudos de manera alterna a lo largo del tallo. Las raíces primarias son fibrosas presentando además raíces adventicias, que nacen en los primeros nudos sobre la superficie del suelo, teniendo la misión de absorber agua y nutrientes, y mantener a la planta erecta (Jugenheimer, 1988).

Esta especie diploide que consta de diez pares de cromosomas (2n=2x=10), es una planta monoica (Allard, 1980). Se reproduce por semillas resultantes de la fecundación cruzada de óvulos dispuestos en una inflorescencia femenina (espiga o mazorca), generalmente única y ubicada en una posición axial (en las yemas axilares de las hojas), por granos de polen producidos en una inflorescencia masculina (panoja) ubicada en la posición apical terminal del tallo. La polinización es anemófila y el porcentaje de autofecundación muy reducido (Flavell *et al*., 1974).

La ubicación en la planta de estructuras florales de distinto sexo permite la aplicación de una variada gama de métodos de mejoramiento y producción de semilla. La estructura morfológica de las inflorescencias estaminadas y pistiladas del maíz y el que éstas estén distanciadas dentro de la misma planta hacen que esta especie sea excepcionalmente adecuada para controlar la autofecundación o los cruzamientos y por lo tanto para la producción de líneas puras e híbridos (Allard, 1980).

3-Mejoramiento genético del maíz

El mejoramiento genético es un proceso de incremento continuo en la búsqueda de nuevas recombinaciones de genes que permitan disponer de un cultivar que exprese mayores niveles de rendimiento, calidad, tolerancia a condiciones de estrés biótico y

abiótico, etcétera. Se basa en la aplicación de selección artificial, consistente en la selección deliberada de un grupo de individuos, que serán los progenitores de la siguiente generación (Eyhérabide, 2006).

4-Herramientas para el mejoramiento

Shull en 1908 y East en el mismo año, describieron el método para la producción de híbridos de maíz por cruzamiento de dos líneas endocriadas. La aplicación práctica del método de mejoramiento por endocría e hibridación fue dificultada por la escasa productividad de semilla de las líneas progenitoras y consecuentemente el alto costo de la semilla. Esta seria limitación práctica impidió la adopción del método hasta que en 1918 Jones propuso la producción de híbridos dobles en lugar de híbridos simples entre líneas endocriadas. El cambio de variedades de polinización abierta a híbridos dobles implicó un mejoramiento significativo en el desarrollo de maíz híbrido con una mayor estabilidad y un mayor rendimiento en granos. A partir de 1930 se cambió la producción de híbridos dobles por híbridos simples (Duvick, 1996). Cockerham (1961) demostró teóricamente que la variabilidad genética y la ganancia genética esperadas entre híbridos simples de una población podrían ser al menos el doble que para híbridos dobles.

En los últimos años, el mejoramiento vegetal ha sido testigo de una importante revolución debido a la emergencia del mejoramiento molecular de la mano del desarrollo de diferentes marcadores de Ácido Desoxirribonucleico (ADN). El mejoramiento molecular comprende diferentes áreas entre las que se encuentran: el mapeo de *Loci* de Caracteres Cuantitativos (*Quantitative Trait Loci,* QTL), la Selección Asistida por Marcadores (*Marker Assisted Selection,* MAS) y los cultivos transgénicos (Gupta *et al*., 2001).

Las técnicas que utilizan marcadores moleculares contribuyen al estudio de la diversidad genética y de las relaciones entre los materiales de mejoramiento necesarios

para el desarrollo de nuevas líneas de maíz, asignación de líneas a grupos heteróticos y la planificación de cruzamientos para la obtención de híbridos de maíz.

5-Presentación de la enfermedad

La Cercosporiosis o Mancha Gris de la Hoja (*Gray Leaf Spot*, GLS), causada por el hongo patógeno *Cercospora zeae-maydis* Tehon y Daniels, es una de las enfermedades foliares más importantes que afecta al cultivo de maíz (*Zea mays* L.) en el mundo (Gordon *et al*., 2006) y es reconocida como una de las que provoca mayores reducciones en el rendimiento. Fue descripta por primera vez en los cultivos de Illinois en 1925 (Coates y White*,* 1994). Se han reportado pérdidas en el rendimiento de hasta un 50% en Estados Unidos y de entre 30% y 60% en la República de Sudáfrica durante epidemias de GLS (Gordon *et al.,* 2004).

En Argentina fue citada por primera vez en la Provincia de Tucumán en el año 2001 y adquirió importancia a partir del 2003 (Heredia *et al.,* 2008). En el norte de la Provincia de Santa Fe se detectaron focos aislados en la campaña 2007/2008 (Sillón, 2008). En la zona norte de la Provincia de Buenos Aires fue detectada en la campaña 2008/2009 en maíces en estadio de floración sembrados en el mes de diciembre. En la Provincia de Tucumán la importancia de la mancha gris se ha incrementado en los últimos años debido al aumento de la superficie en siembra directa, el sistema de cultivo continuo de maíz y el uso de híbridos susceptibles (Heredia *et al.,* 2008).

La mancha gris o lineal del maíz es una enfermedad de zonas templadas o subtropicales, de clima húmedo. Los períodos prolongados de humedad foliar y los días nublados favorecen su desarrollo. Las áreas con estas condiciones de humedad y calidez (con temperaturas de 22°C a 30°C con períodos largos de niebla o rocío) (Gordon *et al.,* 2006) y los campos sembrados a lo largo de los cauces de los ríos u otras áreas bajas son más propensos a contraer epidemias graves (Gordon *et al.,* 2004).

Este patógeno sobrevive como saprófito en residuos de maíz, el cual es su único hospedante. La amplia adopción de prácticas de labranza reducida para disminuir la erosión del suelo, asociada a altos niveles de residuos dejados sobre la superficie, y la siembra continua de cultivares de maíz susceptibles, permitió la propagación de este hongo y aumentó la incidencia de la enfermedad (Gordon *et al.,* 2004). Su supervivencia se reduce cuando los restos de rastrojo son enterrados (Coates y White*,* 1994).

La penetración del hongo *Cercospora zeae-maydis* en la planta de maíz*,* determinada mediante exámenes de descamación epidérmica, ocurre desde los apresorios, estructuras de fijación del hongo, formados sobre los estomas de las hojas. La penetración suele ocurrir 5 días después de la inoculación. El ingreso continúa hacia la cámara subestomática donde se desarrolla el hongo para seguir colonizando la planta (Beckman y Payne, 1982).

Las lesiones comienzan como manchas necróticas pequeñas, rectangulares y alargadas, de color café grisáceo, que crecen paralelas a las nervaduras. A veces pueden llegar a medir 3,0 cm x 0,3 cm. Las lesiones iniciales se pueden observar en las hojas inferiores de la planta. En estadios próximos a floración las manchas son rectangulares, de bordes paralelos a las nervaduras, inicialmente amarillentas y finalmente grisáceas (Figura 1). Esta sintomatología varía de acuerdo a la susceptibilidad del híbrido (Díaz *et al.,* 2005). Puede causar senescencia foliar grave después de la floración, o llenado de grano deficiente (De León, 1984). La importancia de esta enfermedad se debe al hecho de que *Cercospora zeae-maydis* coloniza grandes porciones del tejido foliar, afectando el área fotosintéticamente activa, causando así una madurez anticipada del cultivo. En cultivos severamente atacados (ataques tempranos), cuando las hojas son necrosadas destruyendo el área fotosintética, los tallos se tornan débiles predisponiéndose al vuelco antes de la cosecha mecánica.

Figura 1. Síntomas de la enfermedad GLS causada por el hongo *Cercospora zeae-maydis*.

Dentro de las prácticas de manejo y control de esta enfermedad se pueden mencionar el uso de fungicidas foliares, la rotación de cultivos, la labranza convencional que incluye el entierro de residuos y el empleo de híbridos resistentes o tolerantes (Coates y White, 1994).

Los trabajos para manejar GLS se han centrado en la resistencia genética. El desarrollo de germoplasma mejorado con resistencia a múltiples patógenos foliares es una de las mayores prioridades para la investigación y desarrollo de maíz (Gordon *et al.,* 2004). Muchos investigadores examinaron la base genética de la resistencia mediante análisis dialélico y mapeo molecular. La resistencia a *Cercospora zeae-maydis* es cuantitativa y parcial. Los efectos aditivos son los predominantes, pero el efecto dominante es significativo. Resistencia completa a *Cercospora zeae-maydis* no ha sido identificada (Gordon *et al.,* 2004).

La identificación de QTL mediante marcadores moleculares puede facilitar el desarrollo de germoplasma resistente a *Cercospora zeae-maydis*. Los estudios de mapeo de QTL han hecho progresos limitados en la identificación de QTL para la resistencia a cercosporiosis (Bubeck *et al.,* 1993; Saghai-Maroof *et al.,* 1996; Clements *et al.,* 2000; Lehmensiek *et al.,* 2001).

6-Mapeo de QTL

La mayoría de los caracteres más importantes para el mejoramiento vegetal son cuantitativos (poligénicos o de herencia compleja) los cuales incluyen caracteres de importancia económica como rendimiento, madurez, calidad, tolerancia a factores abióticos y algunos tipos de resistencia a enfermedades. Un carácter cuantitativo es aquel en el cual los efectos genéticos en segregación son pequeños con respecto a los ambientales y de interacción genotipo x ambiente. Los genotipos varían entre individuos sobre un rango determinado dando lugar a una distribución continua de fenotipos, en lugar de clases fenotípicas discretas (Sham *et al.*, 2002). Las regiones del genoma que contienen genes asociados con un carácter cuantitativo particular y que controlan su expresión se conocen como *Loci* de Caracteres Cuantitativos (*Quantitative Trait Loci,* QTL). La identificación de QTL basada exclusivamente en la evaluación fenotípica no es posible. El desarrollo de marcadores moleculares en la década de los 80' permitió la detección de QTL (Collard *et al.*, 2005).

La construcción de un mapa de ligamiento y, por lo tanto, el mapeo de QTL en plantas, involucra 4 pasos principales: 1) el desarrollo de una población de mapeo segregante para el carácter a evaluar, 2) la evaluación fenotípica de la población de mapeo para el carácter de interés, 3) la caracterización genotípica de dicha población mediante el uso de marcadores moleculares, es decir, la identificación de polimorfismos a nivel de ADN y 4) la identificación de marcadores moleculares ligados al carácter en estudio usando programas estadísticos (Collard *et al.*, 2005; Bernardo, 2010 y Semagn *et al.*,2010).

7-Poblaciones de mapeo

El mapeo de QTL depende del desarrollo de una población segregante derivada del cruzamiento de dos parentales. La selección de los progenitores es un punto importante debido a que no solo deben ser contrastantes para la característica en estudio, sino que

además deben presentar diferencias a nivel de las secuencias del ADN y así obtener suficientes marcadores polimórficos que permitan la construcción de un mapa genético (Cervigni *et al.*, 2010). El tamaño de la población varía entre 50 y 250 individuos, aunque cuanto mayor sea la población, mayor será la resolución del mapeo. Las poblaciones F_2, derivadas del híbrido F_1 y las poblaciones retrocruzas, derivadas por cruzamiento del híbrido F_1 con uno de los parentales, son el tipo más simple de poblaciones de mapeo derivadas de cruzamiento biparental. Su principal ventaja es el corto tiempo requerido para producirlas (Collard *et al.*, 2005).

En una población segregante, hay una mezcla de genotipos parentales y recombinantes. Analizando la segregación de los marcadores se puede determinar la distancia y el orden relativo entre los mismos (Collard *et al.*, 2005). Existen funciones de mapeo para convertir las fracciones de recombinación en unidades de mapeo llamadas centiMorgans (cM). La función más simple, derivada por Haldane (1919), asume que los entrecruzamientos (*crossing overs*) en regiones adyacentes del cromosoma ocurren en forma independiente entre ellas, es decir, sin interferencia. Aunque la función de Haldane es aún usada con frecuencia, la mayoría de los genetistas utilizan para mapeo la función desarrollada por Kosambi (1944), la cual permite modelar la interferencia. No hay una relación universal entre distancias de mapa y la distancia física entre *loci*. Un centiMorgan puede corresponder a una distancia entre 10 a 1000 kilo bases dependiendo de la especie (Lynch y Walsh, 1998).

8-Evaluación fenotípica

Si el mapa va a ser usado para estudios de QTL, la población de mapeo debe ser evaluada fenotípicamente, es decir, los datos del carácter deben ser colectados antes del mapeo de QTL (Collard *et al.*, 2005).

Un diseño experimental eficiente y bien planificado y el uso preciso de análisis estadístico son puntos críticos de la evaluación fenotípica que permiten maximizar las chances de detectar asociaciones entre los marcadores y el carácter evaluado.

9-Marcadores moleculares

Hay tres tipos de marcadores genéticos: morfológicos, bioquímicos y de ADN o moleculares. El polimorfismo puede ser considerado en diferentes niveles biológicos, desde cambios fenotípicos hasta la variación de un solo nucleótido en el ADN.

Los avances de la biología molecular han posibilitado el desarrollo de los marcadores moleculares, los cuales permiten evidenciar variaciones en la secuencia del ADN entre individuos de la misma especie o entre especies emparentadas (Ferreira y Grattapaglia, 1996; Picca *et al.,* 2004; Collard *et al*., 2005 y Rojas-Beltran, 2007). Un marcador molecular es un punto de referencia en un cromosoma que puede o no pertenecer a regiones codificantes (Cervigni *et al*., 2010). Estas diferencias en el ADN surgen de diferentes clases de mutaciones: sustituciones, inserciones y deleciones de bases simples o rearreglos cromosómicos (inserciones, deleciones y/o inversiones de grandes fragmentos). Los marcadores moleculares útiles para mapeo deben tener formas alélicas diferentes entre los parentales de la población de mapeo (Cervigni *et al*, 2010).

Entre los marcadores moleculares se encuentran los microsatélites o Repeticiones de Secuencias Simples (*Simple Sequence Repeats*, SSR) que consisten en pequeñas secuencias de 2 a 5 pares de bases repetidas en tándem, entre 10 a 100 veces, comúnmente encontradas en el genoma de los eucariotas y flanqueadas por regiones conservadas (Ferreira y Grattapaglia, 1996; Picca *et al.,* 2004). Estas regiones pueden ser amplificadas mediante la técnica de Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polimerase Chain Reaction*, PCR) que utiliza iniciadores que reconocen secuencias específicas de las regiones flanqueantes. Los fragmentos amplificados difieren en su tamaño como

consecuencia de la variación en el número de elementos simples repetidos. De este modo, cada segmento de tamaño diferente representa un alelo distinto del mismo locus (Ferreira y Grattapaglia, 1996; Picca *et al.,* 2004). Son marcadores codominantes, altamente polimórficos, y de gran reproducibilidad. Estos marcadores pueden ser usados con ventaja en maíz ya que son muy frecuentes y están distribuidos al azar en todo el genoma, siendo su ubicación cromosómica conocida. Además, no son afectados por el ambiente y se pueden detectar en cualquier estado de desarrollo de la planta (Chin *et al.,* 1996). Constituyen *loci* genéticos hipervariables pero lo suficientemente conservados como para ser heredados por varias generaciones en forma mendeliana (Morgante y Olivieri, 1993).

En el maíz la localización genómica de estos marcadores es de disponibilidad pública y se encuentra en las bases de datos de internet (*maizedatabank*: http://www.maizegdb.org).

Entre las aplicaciones de los marcadores moleculares en el mejoramiento vegetal figuran la identificación varietal, el análisis de la biodiversidad de poblaciones y estudios filogenéticos, estudios comparativos entre genomas de diferentes especies, construcción de mapas genéticos y localización de genes o regiones genómicas de interés (Ferreira y Grattapaglia, 1996; Kumar, 1999).

10-Análisis de QTL

El análisis de QTL se basa en la detección de asociación entre el fenotipo y el genotipo. La mayoría de los métodos de detección de QTL usan los marcadores moleculares para separar la población de mapeo en grupos genotípicos basados en la presencia o ausencia de un marcador de un locus dado y determinar si existe diferencia significativa entre los grupos con respecto al carácter medido (Tanksley, 1993).

El método de detección de QTL más sencillo es el análisis de marca simple o de marcadores individuales, el cual no requiere la construcción de un mapa genético. La distribución de los valores del carácter es examinada de manera separada para cada marcador (Lynch y Walsh, 1998; Kearsey, 1998).

Se puede realizar con programas estadísticos comunes como por ejemplo InfoStat (Di Rienzo *et al.,* 2010) y R (Gentleman e Ihaka, 1991). La metodología consiste en la determinación de la existencia de diferencia significativa entre medias de grupos genotípicos. Brevemente, para cada marcador, se clasifica a la población en distintos grupos genotípicos de acuerdo a qué alelo del marcador posea el individuo. Se analiza si existen diferencias significativas entre las medias fenotípicas de cada alelo del marcador mediante la prueba de t (*t-test*), análisis de la variancia (ANOVA), regresión lineal simple, y máxima verosimilitud. La hipótesis nula que se prueba es que la media del carácter es independiente del genotipo para un determinado marcador y por lo tanto no existe un QTL asociado al marcador bajo estudio. Si el marcador y el QTL están débilmente ligados o no lo están, segregarán en forma independiente y no se encontrarán diferencias significativas entre las medias fenotípicas de cada clase del marcador. En cambio, si dichas medias difieren significativamente indicaría que el marcador está asociado a un QTL que controla el carácter (Doerge, 2002; Collard *et al.*, 2005). El análisis de marca simple es útil cuando el objetivo es la detección de un QTL ligado a un marcador más que la determinación de su posición y su efecto (Lynch y Walsh, 1998; Kearsey, 1998).

El mapeo por intervalo simple (MI) fue propuesto originalmente por Lander y Botstein (1989) y es la base de todos los métodos de mapeo que se utilizan actualmente. Este método analiza el intervalo entre pares de marcadores adyacentes ligados a lo largo del cromosoma de manera simultánea, en lugar de analizar un marcador a la vez, por lo que requiere la construcción previa de un mapa genético. Usando marcadores ligados para el análisis es posible compensar la recombinación entre el marcador y el QTL,

incrementando la probabilidad de detectar estadísticamente el QTL y obtener una estimación imparcial del efecto del QTL (Tanksley, 1993). En el mapeo por intervalo la hipótesis nula H_0: ausencia de QTL y la hipótesis alternativa H_A: presencia de QTL en un intervalo entre marcadores, son contrastadas usando valores de Logaritmos de Probabilidades (*Logarithms of Odds,* LOD), un cociente de dos verosimilitudes. La presencia de un QTL es inferida cuando el máximo valor de LOD obtenido es mayor a un umbral previamente establecido. Por convención, el LOD umbral usado para declarar la presencia de un QTL es 3, el cual corresponde a una razón de 1000:1, que es la probabilidad de que el QTL esté ligado al marcador sea 1000 veces mayor que la probabilidad de que el QTL no esté ligado al marcador (Van Ooijen, 1999; Cervigni, 2010 y Bernardo, 2010). Los resultados generalmente se expresan a través de gráficas de valores LOD, que indican en escala logarítmica la razón entre la verosimilitud del modelo con QTL (probabilidad de que los datos observados hayan surgido asumiendo la presencia de un QTL) y la del modelo sin QTL. En cada posición en el genoma se estiman los parámetros para ambos modelos y se calcula el valor LOD (Van Ooijen, 1999; Cervigni, 2010 y Bernardo, 2010).

El mapeo por intervalo compuesto (MIC) involucra el uso de mapeo por intervalo junto con la regresión múltiple (Zeng, 1994). La localización de un QTL entre un par de marcadores es estimado por mapeo por intervalo, mientras que los efectos de un QTL localizado en otro lado del genoma son identificados usando regresión múltiple, con una serie de marcadores como cofactores en el análisis de regresión. El MIC es más poderoso que el MI porque corrige el efecto de los QTL que afectan el carácter en cuestión y que se encuentran distribuidos en el genoma fuera del intervalo que se está analizando (Collard *et al.*, 2005; Malosetti y Van Berloo; 2007).

Con la finalidad de hallar el nivel de significancia adecuado, tanto el MI como el MIC se pueden realizar con programas computacionales específicos de mapeo de QTL como por

ejemplo: Windows QTL Cartographer V2.5 (Wang *et al*., 2007), GQMOL (Cruz y Schuster, 2008), Map Manager QTX (Manly *et al*., 2001) y Map QTL (Van Ooijen *et al*., 2002).

11-Trabajo previo realizado referente a este proyecto

La Estación Experimental Agropecuaria del Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (EEA INTA) Pergamino posee germoplasma resistente a *Cercospora zeae-maydis* a partir del cual se desarrolló la población segregante para la búsqueda de marcadores moleculares microsatélites asociados a genes de resistencia a dicha enfermedad. En trabajos previos realizados por el Programa de Mejoramiento de Maíz, se obtuvo una población de mapeo segregante F_2 derivada de la cruza entre una línea endocriada, A485, resistente a *Cercospora zeae-maydis* según evaluaciones realizadas con anterioridad, y otra línea endocriada, CML3270014, susceptible. Se autofecundaron las plantas F_2 para la obtención de las familias $F_{2:3}$ (campaña 2010/2011), las cuales fueron evaluadas por su comportamiento frente a la enfermedad bajo infección natural en zona tropical (INTA Leales, 2012). Se dispuso, a su vez, de tejido foliar liofilizado de cada planta F_2.

12-Hipótesis

Existen marcadores moleculares microsatélites ligados a QTL asociados a la resistencia a *Cercospora zeae-maydis.*

13-Objetivos

13.1-Objetivo general

El objetivo principal de este estudio fue identificar marcadores moleculares ligados a *loci* responsables de la resistencia a *Cercospora zeae-maydis* para obtener mejores

conocimientos científicos de las bases genéticas de la resistencia y aprovechar esta información en futuros programas de mejoramiento.

13.2-Objetivos específicos

- ✓ Identificar marcadores moleculares SSR en maíz que revelen polimorfismos entre las líneas parentales.
- ✓ Identificar QTL que estén asociados a caracteres relacionados a la resistencia al patógeno *Cercospora zeae-maydis.*

MATERIALES Y MÉTODOS

1-Material vegetal

Se dispuso de una población de mapeo F_2 derivada de la cruza entre dos líneas endocriadas de maíz contrastantes para el carácter fenotípico analizado: una línea resistente y otra susceptible a *Cercospora zeae-maydis.*

La caracterización fenotípica se realizó en las familias $F_{2:3}$ derivadas de la autofecundación de las plantas F_2. Las semillas fueron obtenidas en el campo de la EEA INTA Pergamino durante la campaña 2010/2011. Se realizó el muestreo y liofilización de hojas de cada planta F_2 para la extracción de ADN y caracterización molecular empleando marcadores microsatélites.

2-Caracterización fenotípica

Se realizaron ensayos a campo a fin de obtener datos fenotípicos de resistencia a la enfermedad. Los experimentos fueron conducidos en la EEA INTA Leales (Provincia de Tucumán). Las 265 progenies $F_{2:3}$ disponibles se sembraron el 7 de enero de 2012, usando diseños de bloques incompletos alpha-látice, en parcelas de dos surcos, con dos repeticiones, y las líneas parentales como testigo (Figura 2).

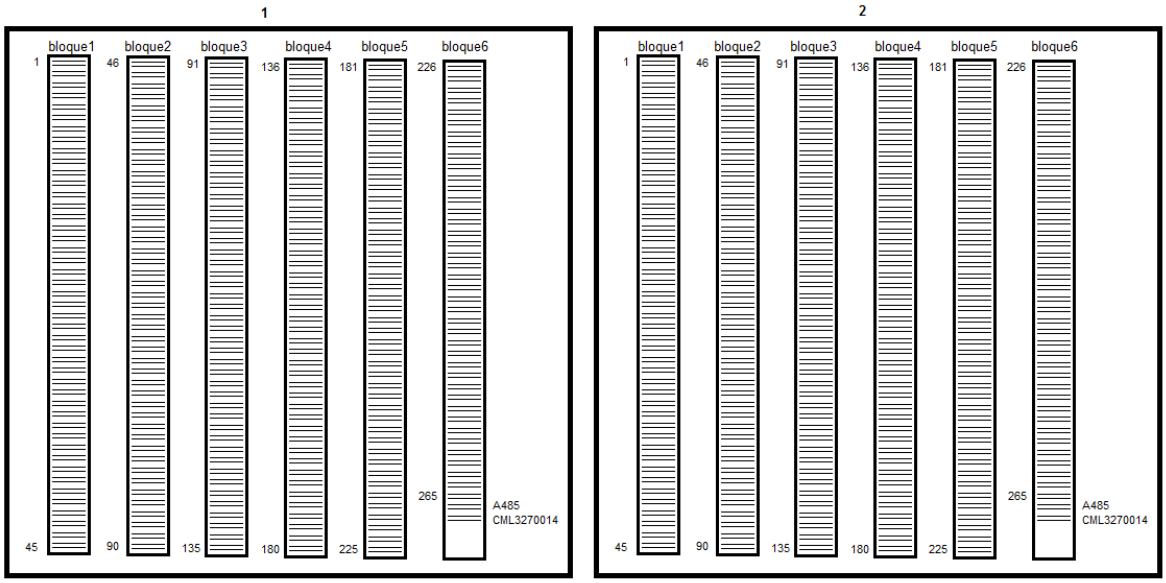


Figura 2. Diseño de bloques incompletos alpha-látice, en parcelas de dos surcos, con dos repeticiones, en que se sembraron las 265 progenies $F_{2:3}$ y los parentales A485 y CML3270014 como testigo.

Las evaluaciones fenotípicas de los parentales y las 265 familias $F_{2:3}$ se realizaron sobre plantas naturalmente infectadas en el estadio fenológico R4 (grano pastoso). Se midió severidad, medida a través del porcentaje de área foliar afectada por la enfermedad (que presenta manchas necróticas). Para ello se utilizó como referencia la escala diagramática de severidad (Agroceres, 1993) para planta entera (Anexo 1), previamente aplicada a ataques de *Puccinia sorghi*. La enfermedad afecta a la planta de maíz produciendo manchas necróticas pequeñas, rectangulares y alargadas, de color café grisáceo y paralelas a las nervaduras. La planta sufre una madurez anticipada por verse afectada el área fotosintéticamente activa y los tallos se tornan débiles.

Los resultados obtenidos se analizaron estadísticamente utilizando el programa InfoStat (Di Rienzo *et al.,* 2010). Se visualizó la distribución de los datos mediante la construcción de histogramas de frecuencia y se comprobó la normalidad de los mismos mediante la prueba de Shapiro-Wilks modificado. En el caso de falta de normalidad se realizaron transformaciones clásicas previas a la realización de los análisis.

3-Caracterización genotípica

Se caracterizaron genotípicamente 265 individuos F_2 mediante los marcadores SSR que previamente mostraron polimorfismo entre los padres contrastantes. Se extrajo el ADN genómico de cada individuo a partir de muestras de tejido foliar liofilizado y se realizó la amplificación de los microsatélites y la visualización de los productos de PCR obtenidos. Se registró el genotipo de cada individuo, asignando “A” a los homocigotas para el alelo proveniente del padre A485, “B” a los homocigotas para el alelo del padre CML3270014 y “AB” a los individuos heterocigotas.

La caracterización molecular de la población F_2 permitió construir un mapa de ligamiento localizando en forma relativa, por grupos de ligamiento, a los marcadores moleculares.

3.1-Extracción de ADN

De cada planta de la población de mapeo F_2, así como de las líneas parentales, se extrajo el material genómico (ADN) a partir de muestras de tejido foliar liofilizado según protocolo Kleinhofs *et al.,* (1993) (Anexo 2).

Los restos de hojas liofilizadas no utilizados se almacenaron en *freezer* a -20ºC para ser utilizados en caso de ser necesario una segunda extracción de ADN.

3.2-Cuantificación de ADN

Para la cuantificación y control de la integridad del ADN extraído, se realizó electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0,8% teñidos con bromuro de etidio (0,1 µg/ml). Se sembró un volumen de 2 µl de muestra con 6 µl de azul de bromo fenol (BPB) 1X por pocillo. La electroforesis se llevó a cabo a un voltaje constante de 150 Volts/cm aproximadamente durante 30 minutos. Para la misma se utilizó *buffer* TAE 1X (40 mM tris,

5 mM de ácido acético glacial (NaOAc), 0,7 mM EDTA, en un volumen final de 100 ml de agua destilada y ajustado a pH 8 con ácido acético glacial).

La visualización del ADN se realizó con luz ultravioleta en transiluminador UVP Modelo M-20. La concentración de ADN se determinó visualmente y como referencia se utilizaron muestras con concentraciones conocidas de ADN.

Se realizaron las diluciones de trabajo correspondientes y se guardó el *stock* en *freezer*.

3.3-Análisis de SSR

Se evaluaron las líneas parentales contrastantes con marcadores microsatélites distribuidos en los cromosomas 1 y 7 del genoma de maíz, disponibles en el Laboratorio de Biotecnología de la EEA INTA Pergamino, y se seleccionaron aquellos que fueron polimórficos entre las líneas parentales. Se trabajó con dichos cromosomas debido a los antecedentes bibliográficos que demostraron la presencia de dos QTL localizados cerca de los marcadores moleculares csu3 y asg71 en los cromosomas 1 y 7 respectivamente, asociados de manera significativa a la resistencia a GLS a través de distintos ambientes (Clements *et al.*, 2000; Gordon *et al.,* 2004). Luego se evaluaron los 265 individuos F_2 mediante los microsatélites polimórficos seleccionados. Los pares de cebadores de los microsatélites se sintetizaron de acuerdo a las secuencias publicadas en *Maize Genetics and Genomics Database* (MaizeGDB: *http://www.maizegdb.org/)* y las condiciones de reacción para cada SSR fueron obtenidas de dicha base de datos pública.

La lista de los iniciadores SSR utilizados se detalla en el Anexo 3.

3.4-Amplificación por PCR

La amplificación del ADN se llevó a cabo mediante la técnica de PCR utilizando los *primers* o cebadores específicos para cada microsatélite.

Las muestras fueron amplificadas en placas de 96 pocillos en un volumen de reacción de 13 µl. En cada reacción se utilizó 1,3 µl de desoxinucleótidostrifosfatos (dNTPs) 200 µM cada uno, 1,3 µl *buffer* Taq 10X, 0,78 µl de magnesio (Mg^{2+}) 2,5 mM, 250 nM de cada oligonucleótido (cebador *forward* y *reverse*), 0,5 U Taq-Polimerasa (Invitrogen®) y 30 ng de ADN templado (Protocolo del Laboratorio de Biotecnología EEA INTA Pergamino).

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research PTC-100, utilizando un perfil de ciclado de tipo *"touchdown"* según se detalla a continuación. Desnaturalización inicial: 94ºC durante 5 minutos, seguida de 15 ciclos: desnaturalización, 94ºC / 30 segundos, hibridación (decrece 1ºC / ciclo), 65-50ºC / 30 segundos, extensión, 72ºC / 30 segundos. Se adicionan 35 ciclos de amplificación a temperatura de hibridación constante: 94ºC / 30 segundos, 55ºC / 30 segundos, 72ºC / 30 segundos. Extensión final: 72ºC / 10 minutos.

Un programa *"touchdown"* es un programa de termociclado que permite optimizar la eficiencia de amplificación al incluir una subrutina inicial en la cual la temperatura de hibridación decrece en cada ciclo 1°C mientras que el resto del programa utiliza una única temperatura de hibridación (55ºC). Mediante esta metodología se minimizan las uniones inespecíficas de los cebadores al ADN molde durante la amplificación, evitando la formación de bandas extras que dificultan la interpretación de las bandas microsatélites (Don *et al.,* 1991).

3.5-Visualización de los productos de amplificación

Los productos de amplificación fueron separados en un equipo *Sequi-Gen DNA Electrophoresis Cell,* Bio-Rad, mediante electroforesis vertical en cubas de secuenciación con geles desnaturalizantes de poliacrilamida 6% (19:1 acrilamida: bisacrilamida) y urea 5 M en *buffer* TBE (11% tris base, 6% ácido bórico, 0,6% EDTA 0,5 M). El espesor de los geles fue de 0,4 mm.

El armado de los geles y preparación de los vidrios se realizó siguiendo las instrucciones del fabricante. Los vidrios recibieron un tratamiento especial con la finalidad de adherir el gel a uno solo de ellos. Para esto, se trató el vidrio con solución adherente (3 µl *BindSilane*, 5 µl ácido acético glacial 0,5%, 950 µl etanol) y la cuba se trató con solución repelente de agua, es decir, una solución hidrofóbica (Rain X®). Se colocaron espaciadores entre el vidrio y la cuba de 0,4 mm de espesor y se sujetaron con abrazaderas (*clamps)*. Se distribuyeron 60 ml de la solución fresca de poliacrilamida 6% con 330 µl de APS (persulfato de amonio 10%) y 33 µl de TEMED (N,N,N´,N´-tetrametiletilendiamina), controlando que no se formaran burbujas durante el proceso. Finalmente se colocó el peine de 97 calles con los dientes orientados hacia la parte superior del gel, para marcar el frente. El peine se sujetó con broches. Se dejó polimerizar como mínimo durante 2 horas.

El gel fue sometido a una pre-corrida en *buffer* TBE de dos concentraciones distintas (0,5X arriba y 1X abajo). Se agregó a cada una de las muestras amplificadas 3 µl de *buffer* de carga (200 µl de EDTA 0,5 M, 9,6 ml de formamida y 300 µl de colorante azul-bromofenol y xileno-cianol) y se desnaturalizaron por calentamiento a 94ºC durante 5 minutos y posterior enfriamiento rápido a 0ºC en hielo para evitar la unión de las cadenas. El volumen de siembra fue de 2,5 µl por calle.

La electroforesis de las muestras se llevó a cabo durante una hora y media aproximadamente a una potencia constante de 55 W, con un voltaje variable entre 1400 y 2000 volts y con control de temperatura (máximo: 55ºC).

Una vez finalizada la corrida electroforética, se separaron los vidrios quedando el gel adherido a uno de ellos y se procedió a su tinción. Se siguió el protocolo de Tinción con Plata para Secuenciación de Promega Corp que consiste en la reducción en medio alcalino de iones plata (Ag^{2+}) que se depositan sobre el ADN, en presencia de formaldehido (Anexo 4).

Una vez secos los geles se registraron las bandas obtenidas mediante la visualización de los productos de amplificación, colocando los vidrios sobre un transiluminador de luz blanca y las imágenes se almacenaron mediante la digitalización utilizando Scanner Astra 2400slt.

4-Análisis de segregación de los marcadores

Se evaluó el ajuste de la segregación mendeliana obtenida de cada SSR con la esperada (1:2:1) para el caso de un monohíbrido en la generación F_2, mediante la prueba de Chi Cuadrado (X^2), con dos grados de libertad, utilizando el programa GQMOL (Cruz y Schuster, 2008).

Para establecer el nivel crítico individual se empleó la Tasa de Falsos Positivos (*False Discovery Rate*, FDR) que disminuye la proporción de hipótesis nulas (H_0) rechazadas incorrectamente cuando se tienen muchas hipótesis que testear (Benjamini y Hocheberg, 1995). El FDR se define como: Q= [V/ (V+S)], donde Q es la proporción de hipótesis nulas que son rechazadas erróneamente, V son las hipótesis nulas verdaderas declaradas falsas (H_0 verdaderas declaradas significativas) y S son las hipótesis nulas falsas declaradas falsas (H_0 no verdaderas declaradas significativas).

Considerando $H_1 \ldots H_m$ las hipótesis y $P_1 \ldots P_m$ sus p valores ordenados de manera creciente, y denotándolos por $P_{(1)} \ldots P_{(m)}$. Para un nivel de significancia global dado, *q**, se encontrará el menor *k* a partir del cual: $P_k < (k/m)\ q^*$ (siendo *m*: número de hipótesis a probar; *k*: valor límite para aceptar las hipótesis). Entonces se rechazan todas las H_i para i: 1...*k* (Benjamini y Hocheberg, 1995). Se consideró un nivel de significancia global del 5%.

5-Mapa de ligamiento

El análisis de ligamiento se realizó empleando el programa GQMOL (Cruz y Schuster, 2008). Las distancias genéticas fueron estimadas mediante la función de mapeo de Kosambi (1944) y un criterio de ligamiento significativo de p=0,05, indicando la probabilidad de falsos positivos.

6-Estudio de asociación entre el fenotipo y el genotipo

Se estudió la asociación entre el fenotipo y el genotipo mediante análisis de marcadores individuales, usando Análisis de Variancia, Test LSD Fisher y Contrastes de Medias en el programa InfoStat. A su vez, se realizó un análisis de regresión de marcadores individuales y mapeo de QTL por intervalo simple y compuesto, empleando el programa Windows QTL Cartographer V2.5 (Wang *et al.,* 2007).

El análisis de marcadores individuales llevado a cabo con el programa Windows QTL Cartographer V2.5 ajusta los datos a un modelo de regresión lineal simple que estima el valor de los parámetros b_0 y b_1 bajo el modelo $y = b_0 + b_1 x + e$. Mediante el estadístico F se determinó la significancia de la pendiente de la recta modelo aplicada para cada marcador. Para establecer si el marcador estaba ligado a un QTL se determinó si b_1 era significativamente diferente de cero. A cada valor de F se asocia un valor de probabilidad (*p value* o p valor). Un p valor pequeño indica un menor riesgo de cometer el error de tipo I que consiste en rechazar la hipótesis nula cuando es cierta.

Se calcularon los efectos aditivos (a´) y de dominancia (d´) mediante las siguientes ecuaciones que contienen las medias de clases de marcadores:

$a' = (MA - MB)/2 = a\,(1-2r)$

$d' = MAB - [(MA + MB)/2] = d\,(1-2r)^2$

MA es la media para el carácter de los individuos homocigotas para el alelo A, proveniente del parental A485; MB es la media de los individuos homocigotas para el alelo

B, proveniente del parental CML3270014; MAB es la media de los individuos heterocigotas. Los efectos de aditividad a´ y de dominancia d´ son afectados por la frecuencia de recombinación r entre marcador y QTL. Cuando r es igual a 0,5, el QTL es independiente del marcador y también a´ y d´ son cero (López C., trabajo inédito).

El programa Windows QTL Cartographer V2.5, estima para cada posición en el genoma (cada 1 centiMorgan), los efectos de aditividad y de dominancia del QTL putativo, y la función de verosimilitud de la presencia de un QTL segregando. Para determinar la presencia de un QTL ligado, se comparó esta última con la verosimilitud para la situación en que no hay QTL segregando a través del valor LOD (logaritmo en base diez del cociente de las respectivas verosimilitudes) (Churchill y Doerge, 1994). El LOD *score* para mapear genes, es un método de estimación de distancias genéticas, cuyo objetivo fundamental es determinar r, la frecuencia de recombinación. Este método se lleva a cabo mediante 4 pasos básicos: 1) determinar las frecuencias esperadas de los fenotipos de las F_2 para cada valor de r, 2) determinar la probabilidad, “L”, de que los datos observados se deban a un valor r dado: la mayor probabilidad es la mejor estimación de r para los datos dados, usando la distribución multinomial, 3) determinar la proporción de probabilidades (*Odds Ratio*) y el logaritmo de la proporción de probabilidades (LOD *score*) mediante la comparación de la probabilidad para cada valor de r con la probabilidad de genes no ligados (r=0,5). Un LOD *score* total de 3 para un cierto valor r es considerado como prueba suficiente de ligamiento entre los dos genes. En el caso que varias familias fueran usadas, los LOD *scores* de cada una de ellas pueden ser sumados para aumentar el valor y eventualmente mejorar la estimación de r.

RESULTADOS

1-Evaluación fenotípica

Se presenta el histograma de frecuencia de los valores para la variable severidad, medida a través del porcentaje de área foliar afectada por la enfermedad observado en las familias $F_{2:3}$, obtenidas del cruzamiento A485 x CML3270014 evaluadas en INTA Leales, Provincia de Tucumán, en el año 2012 (Figura 3).

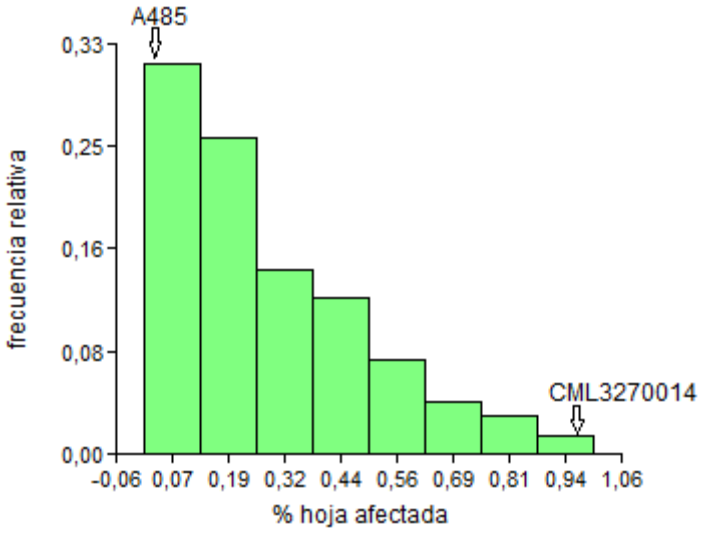


Figura 3. Frecuencia relativa de los porcentajes de área foliar afectada. Familias $F_{2:3}$ obtenidas del cruzamiento A485 x CML3270014 evaluadas en INTA Leales, Provincia de Tucumán, en el año 2012. Las flechas indican la posición de los parentales según sus medias de los porcentajes de área foliar afectada mostrando su comportamiento.

El parental A485 se destacó por su buen comportamiento frente al patógeno, con 1,75% del área foliar afectada en promedio, mientras que CML3270014 se consideró susceptible con una media de 97%.

Los parámetros estadísticos descriptivos del área foliar afectada en las 265 familias $F_{2:3}$ evaluadas mostraron una media igual a 29,14%, con un desvío estándar de 23,22% y valores mínimo y máximo de 0,50% y de 97% respectivamente.

La variable medida no presentó distribución normal ($p<0,01$), por lo que se aplicó la transformación Escores normales con el programa InfoStat para continuar con los análisis. Esta transformación consiste en que a la variable seleccionada se le asocia un valor de rango. Luego, cada valor de rango es dividido por (*n*+1), siendo *n* el total de datos de la muestra. Para cada cociente se obtiene la función de distribución inversa correspondiente a una Normal (0; 1). En la figura 4 se presenta el histograma de frecuencias con los valores transformados.

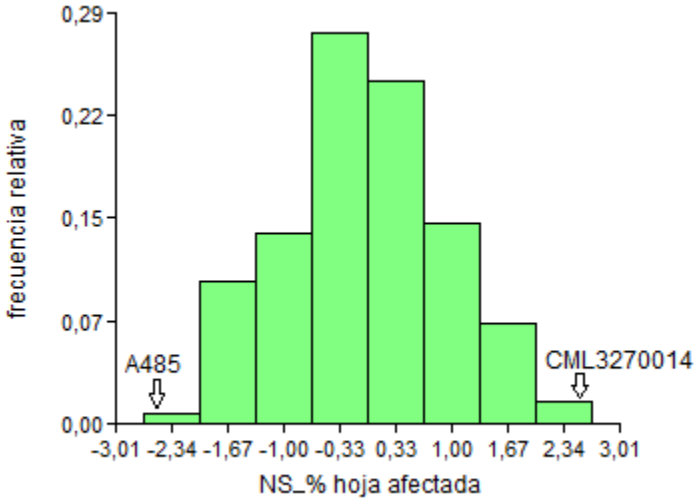


Figura 4. Frecuencia relativa de los porcentajes de área foliar afectada en función de la variable transformada. Familias $F_{2:3}$ obtenidas del cruzamiento A485 x CML3270014 evaluadas en INTA Leales, Provincia de Tucumán en 2012, con transformación Escores normales. Las flechas indican la posición de los parentales. NS_% hoja afectada: porcentaje de área foliar afectada con transformación Escores normales.

2-<u>Evaluación genotípica. Identificación de polimorfismos en los parentales</u>

En el cromosoma 1 se evaluaron 97 SSR, de los cuales 86 generaron productos de amplificación. De estos, 53 presentaron patrones de bandas diferentes en los genotipos parentales siendo polimórficos y 33 resultaron monomórficos.

En el cromosoma 7 se evaluaron 45 SSR, de los cuales 24 generaron productos de amplificación. De estos, 20 fueron polimórficos y 4 monomórficos (Figura 5. Tabla 1).

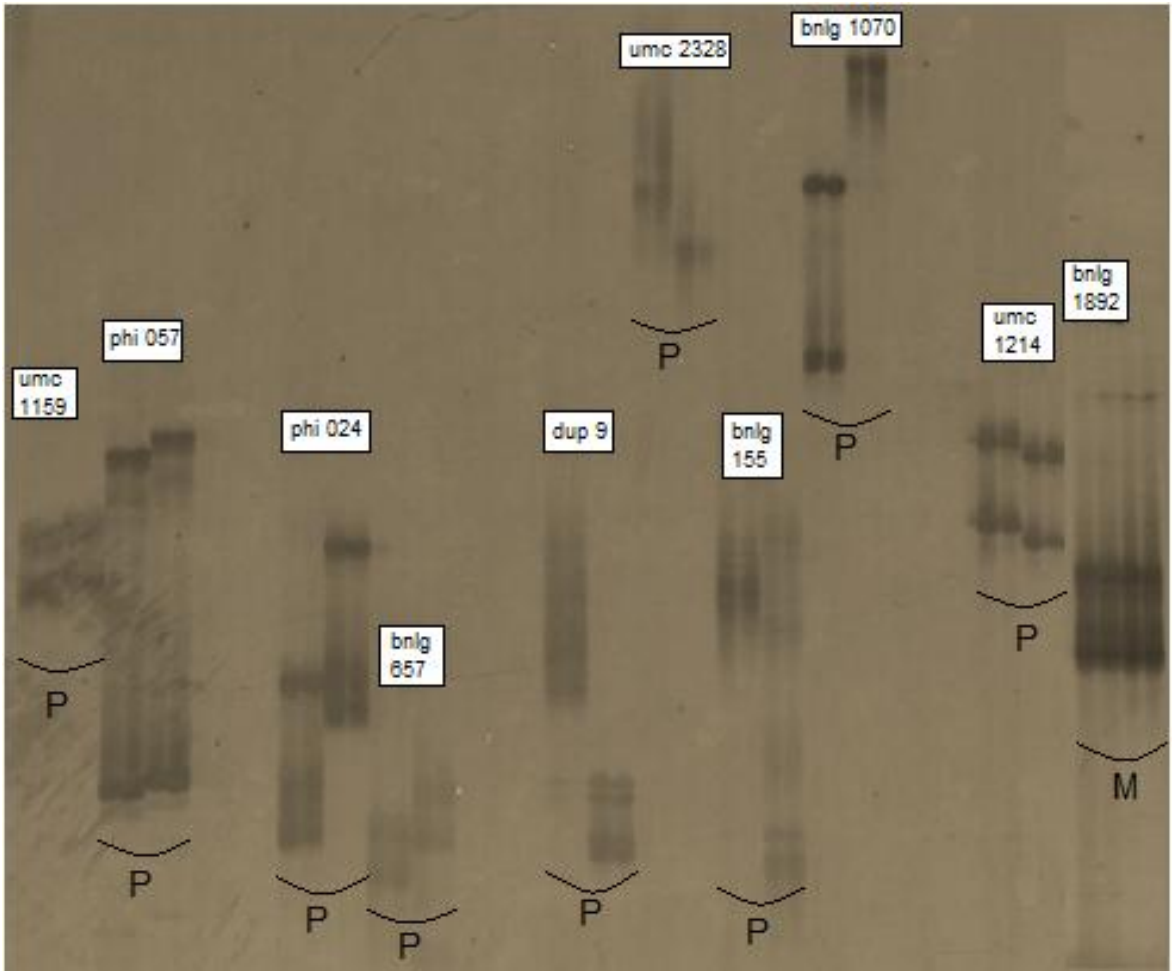


Figura 5. Productos de amplificación de los SSR ensayados en los parentales A485 y CML3270014. A modo de ejemplo se observan las bandas obtenidas para el cromosoma 7 con los marcadores SSR umc1159, phi057, phi024, bnlg657, dup9, umc2328, bnlg155, bnlg1070, umc1214 y bnlg1892. Para cada SSR se sembró en orden: dos calles del genotipo CML3270014 y dos calles de A485. *P: Polimórfico; M: Monomórfico.* Los detalles del procedimiento se pueden consultar en la sección Materiales y Métodos.

Tabla 1. Marcadores SSR usados en A485 y CML3270014.

Cromosoma	Marcadores moleculares						
	Polimórficos		Monomórficos		Sin amplificación		Total
	N°	%	N°	%	N°	%	N°
1	53	54,64	33	34,02	11	11,34	97
7	20	44,44	4	8,89	21	46,67	45
Total	73	51,41	37	26,07	32	22,56	142

3-Caracterización genotípica de la población de mapeo

3.1-Análisis de segregación de marcadores

La población F_2 se caracterizó genotípicamente con 11 marcadores para el cromosoma 1 y 5 para el cromosoma 7, que previamente revelaron polimorfismo entre los parentales y que presentaron bandas nítidas en el gel (Figura 6). Se evaluó la segregación 1:2:1 de los 16 marcadores polimórficos corrigiendo el nivel de significación 5% a través del *False Discovery Rate* (FDR) (Tabla 2). Ocho de los SSR presentaron distorsión de la segregación.

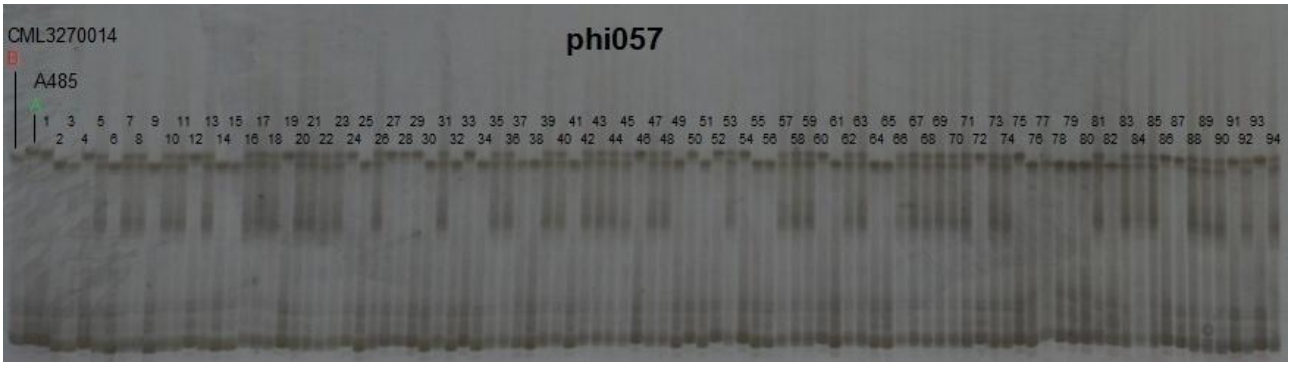


Figura 6. Caracterización genotípica en la población de mapeo F_2. A modo de ejemplo se observan las bandas obtenidas con el SSR phi057 (cromosoma 7) en parte de los individuos segregantes. Para cada SSR se sembró en orden: una calle del genotipo CML3270014, una calle de A485 y en las siguientes calles los individuos de la población F_2.

Tabla 2. Análisis de segregación en F_2 de 16 marcadores SSR utilizando el criterio FDR. Nivel de significancia de 5%. Nivel crítico q*= 0,81%; sd: sin determinar; ns: no significativo.

Marcador SSR	Bin	Segregación observada en las clases				Chi-Cuadrado	Probabilidad (%)	
		A	AB	B	sd			
phi097	1.01	50	129	77	9	5,71	57,53	ns
umc2217	1.03-1.04	55	139	71		2,57	276,68	ns
bnlg1811	1.04	51	89	111	14	49,92	0	*
umc1917	1.04	57	131	75	2	2,47	291,17	ns
umc1395	1.05	65	87	110	3	45,02	0	*
bnlg1884	1.05	53	108	104		28,69	0,00	*
umc2233	1.05	68	110	87		10,37	0,56	*
umc2234	1.06	46	136	81	2	9,62	0,81	ns
umc1128	1.07	54	136	75		3,53	17,26	ns
umc1358	1.07	98	127	40		25,85	0,00	*
phi039	1.08	48	56	156	5	173,97	0	*
phi057	7.01	57	140	68		1,76	414,31	ns
bnlg657	7.02	29	60	176		242,43	0	*
bnlg398	7.02	56	150	58	1	4,94	84,61	ns
umc1214	7.03	62	135	59	9	0,84	658,38	ns
bnlg1070	7.03	22	45	183	15	309,77	0	*

Se continuó con el análisis de ligamiento con los SSR que no diferían significativamente de una segregación mendeliana 1:2:1.

3.2-Mapa de ligamiento

El análisis de ligamiento que se realizó para el cromosoma 1 involucró 5 marcadores moleculares que ajustaron a lo esperado en su segregación en la progenie F_2. El mapa de ligamiento obtenido empleando el programa GQMOL se muestra en la Figura 7.

De los 5 marcadores, 4 se agruparon en un grupo de ligamiento, quedando un marcador no ligado, phi097. El grupo de ligamiento cubrió un total de 122,8 cM, con una densidad promedio de un marcador cada 30,7 cM.

Para el análisis de ligamiento del cromosoma 7 se usaron 3 marcadores moleculares, de los cuales 2 formaron un grupo de ligamiento, quedando uno no ligado, umc1214. El grupo de ligamiento abarcó una distancia total de 12,56 cM.

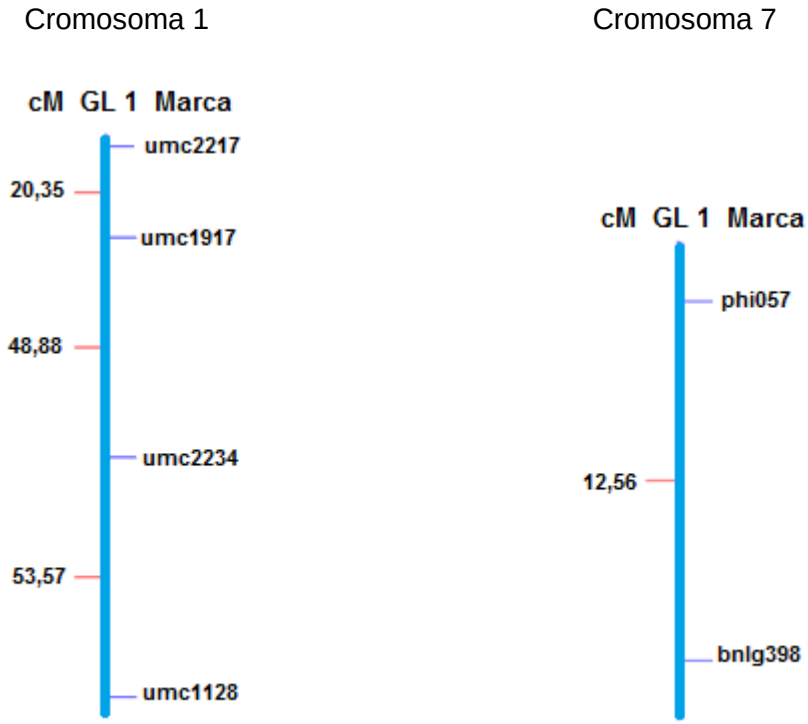


Figura 7. Mapas de ligamiento correspondientes a los cromosomas 1 y 7 del maíz. A la izquierda se indican las distancias en centiMorgans (cM) y a la derecha el nombre de los marcadores. GL: grupos de ligamiento.

4-Estudio de asociación entre el fenotipo y el genotipo

En el análisis de variancia realizado (Tabla 3) se observó que los marcadores umc1917 ($p<0,05$), phi097 ($p<0,05$), umc1214 ($p\leq0,06$) mostraron diferencias significativas entre medias de grupos genotípicos y, por lo tanto, asociación a un QTL que controla el carácter. El marcador umc2217, si bien mostró un valor de probabilidad $p>0,05$, también se encontró asociado a un QTL, determinado por la diferencia de medias significativa ($p<0,05$) en el Test LSD (Tabla 4). Por otro lado, los marcadores umc2217 y umc1917 (Tabla 3) presentaron un contraste de medias con una tendencia lineal

significativo (p<0,05) y una diferencia también significativa (p<0,05) entre las medias de las clases genotípicas homocigota para el alelo del padre resistente y homocigota para el alelo del padre susceptible, sugiriendo la presencia de un efecto aditivo. En cambio, los marcadores phi097 y umc1214 (Tabla 3) exhibieron un contraste con tendencia cuadrática significativo (p<0,05) y una diferencia significativa (p<0,05) entre las medias de las clases genotípicas homocigota para el alelo del padre susceptible y heterocigota en el caso del primero, y homocigota para el alelo del padre resistente y heterocigota en el caso del segundo, sugiriendo un efecto de dominancia. Los marcadores umc2234, umc1128, phi057 y bnlg398 no mostraron diferencias significativas (p>0,05) entre medias de grupos genotípicos en el análisis de variancia y, por lo tanto, no se pudo determinar asociación a un QTL que controla el carácter (Tabla 3). Tampoco mostraron tendencia hacia algún tipo de contraste (p>0,05), por lo que no sugirieron efecto aditivo o de dominancia (Tabla 3).

Tabla 3. Estudio de asociación entre la variable severidad y los marcadores SSR. ANOVA de Marcadores Individuales. *valor significativo al 5%; ns: valor no significativo.

Marcador SSR	Bin	Análisis de Variancia		Contraste	
		F	p valor	Efecto lineal (p valor)	Efecto cuadrático (p valor)
phi097	1.01	3,94	0,02*	0,34^{ns}	0,02*
umc2217	1.03-1.04	2,17	0,12^{ns}	0,04*	0,78^{ns}
umc1917	1.04	3,48	0,03*	0,01*	0,97^{ns}
umc2234	1.06	0,62	0,54^{ns}	0,58^{ns}	0,29^{ns}
umc1128	1.07	0,23	0,79^{ns}	0,50^{ns}	0,87^{ns}
phi057	7.01	0,33	0,72^{ns}	0,74^{ns}	0,47^{ns}
bnlg398	7.02	0,14	0,87^{ns}	0,95^{ns}	0,61^{ns}
umc1214	7.03	2,84	0,06*	0,27^{ns}	0,04*

En la tabla 4 se muestran los efectos de aditividad y dominancia para los marcadores umc2217, umc1917, phi097 del cromosoma 1 y del marcador umc1214 del cromosoma 7.

Tabla 4. Estudio de asociación entre la variable severidad y los marcadores SSR. Efectos de aditividad (a´) y de dominancia (d´), y Test LSD de Fisher. *Medias transformadas con una letra común no son significativamente diferentes (p>0,05).

SSR	Bin	a´	d´	Test LSD Fisher*		
				AA	Aa	aa
phi097	1.01	0,09	0,31	-0,06 AB	0,16 B	-0,23 A
umc2217	1.03-1.04	-0,18	0,04	-0,21 A	0,01 A B	0,15 B
umc1917	1.04	-0,23	0,01	-0,24 A	-0,01 A B	0,21 B
umc1214	7.03	-0,10	0,26	-0,2 A	0,12 B	-0,04 A B

El análisis de regresión lineal simple realizado con el programa Windows QTL Cartographer V2.5 mostró que tanto para el cromosoma 1 como para el cromosoma 7 en el mapeo de QTL por análisis de marca simple se detectaron marcadores SSR que presentaron asociación significativa (p<0,05) con el carácter fenotípico evaluado coincidiendo con los resultados obtenidos con el programa InfoStat (no se muestran los resultados).

El mapeo por intervalo simple y compuesto, llevado a cabo con el programa Windows QTL Cartographer V2.5, se realizó con los microsatélites localizados en el grupo de ligamiento del cromosoma 1. No se realizó en el cromosoma 7, debido a que sólo 2 marcadores se localizaron en el grupo de ligamiento. Los marcadores no superaron el valor de LOD umbral (LOD=3) en el cromosoma 1, por lo que no se detectaron QTL mediante estos métodos (Figura 8).

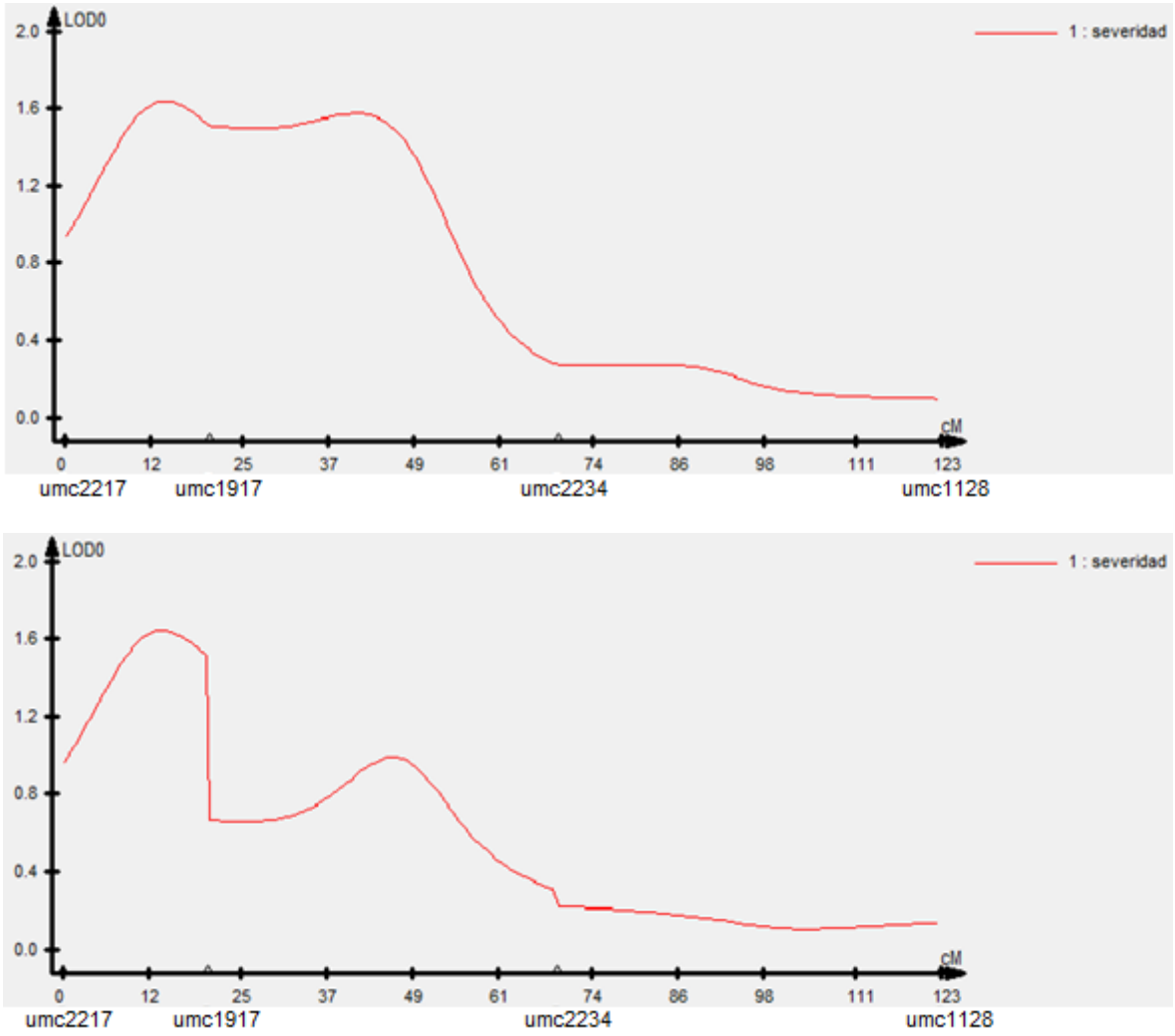


Figura 8. Mapeo por intervalo simple (arriba) y compuesto (abajo) con SSR del grupo de ligamiento en cromosoma 1. Familias $F_{2:3}$ obtenidas del cruzamiento A485 x CML3270014 evaluadas en INTA Leales, Provincia de Tucumán en 2012, para la variable severidad. LOD umbral=3.

DISCUSIÓN

1-Evaluación fenotípica

Se estudió la respuesta al hongo patógeno *Cercospora zeae-maydis* en plantas de maíz naturalmente infectadas. La variable analizada (severidad) permitió establecer diferencias entre los genotipos sometidos a la infección. Los genotipos que mejor se comportaron frente al patógeno no presentaron síntomas observables. Los genotipos que peor se comportaron, es decir, los susceptibles al patógeno, mostraron senescencia foliar después de la floración, hojas necrosadas y tallos débiles. Estas observaciones coinciden con las expuestas en trabajos anteriores (Coates y White, 1994; Díaz *et al*., 2005; Gordon *et al*., 2006).

Se pudo confirmar que el germoplasma utilizado fue útil para el estudio de la genética de la resistencia al hongo *Cercospora zeae-maydis* ya que la población de familias $F_{2:3}$ mostró variabilidad genotípica para el carácter estudiado.

En cuanto a los parentales, se observó que tuvieron comportamientos opuestos: la línea A485 presentó porcentajes de área foliar afectada mucho menores (1,75%), casi nulos, mientras que el parental CML3270014 se vio muy afectado por el hongo mostrando porcentajes extremadamente altos de área foliar afectada (97%), confirmando las evaluaciones anteriores de este germoplasma (Iglesias J., trabajo inédito).

2-Caracterización genotípica de la población de mapeo

2.1-Segregación de los marcadores

La distorsión de la segregación influye en las frecuencias de recombinación y, por lo tanto, en la precisión del mapeo y análisis de QTL (Wu *et al.,* 2010). De los 16 SSR analizados en este trabajo 8 mostraron distorsión en la segregación. En el cromosoma 1, los marcadores bnlg1811, umc1395, bnlg1884, umc2233 y phi039 presentaron una

distorsión en la frecuencia de segregantes con aumento del genotipo parental CML3270014, mientras que el marcador umc1358 presentó distorsión hacia el parental A485. En el cromosoma 7, los marcadores SSR bnlg657 y bnlg1070 presentaron una distorsión en las frecuencias con aumento del genotipo del parental CML3270014.

La mayoría de los *loci* distorsionados tienden a formar *clusters* definiendo Regiones de Segregación Distorsionada (*Segregation Distortion Regions,* SDRs). Estas SDRs se han encontrado en muchas especies de importancia agronómica como arroz, trigo y sorgo entre otros (Tai *et al.,* 2000; Xu, 2008 y Li *et al.,* 2010). Lu *et al.* (2002) detectaron 18 SDRs en maíz utilizando cuatro poblaciones de mapeo diferentes: tres SDRs fueron halladas en el cromosoma 1 abarcando desde el bin 1.02 al 1.11 y una en el cromosoma 7 abarcando desde el bin 7.01 al 7.03. La distorsión observada en este trabajo de tesis en el cromosoma 1 coincide con SDRs citadas del cromosoma 1, que abarcan los bin 1.04 al 1.05 y 1.07 al 1.08, y con las del cromosoma 7, que abarcan los bin 7.02 al 7.03.

Asimismo la segregación distorsionada podría estar provocada por otros factores como mutaciones, genes gametofíticos, genes deletéreos y genes citoplasmáticos, aún desconocidos (Liu *et al.,* 2010).

2.2-Mapa de ligamiento

Mediante el análisis de ligamiento de los marcadores moleculares en base a su segregación en la progenie F_2 se construyeron los mapas genéticos correspondientes a cada cromosoma (1 y 7). Los microsatélites localizados permitieron asociar un grupo de ligamiento en cada cromosoma.

Los mapas de los cromosomas 1 y 7 cubren 122,8 cM y 12,56 cM, respectivamente. La longitud del cromosoma 1 coincide con Mandolino *et al.* (2014) quienes construyeron un mapa de ligamiento a partir de una población de Líneas Recombinantes Endocriadas (*Recombinant Inbred Lines,* RILs) generadas mediante el cruzamiento de las líneas B100

x LP2 y obtuvieron un tamaño de 123,6 cM para el cromosoma 1. El tamaño de los mismos es menor en comparación a los presentados en mapas genéticos construidos por otros investigadores, que figuran en la base de datos pública MaizeGDB (http://www.maizegdb.org), indicando que la cobertura del genoma fue incompleta, por lo que se debería saturar aún más las regiones de los cromosomas estudiadas con nuevos marcadores.

3-Mapeo de QTL

El análisis de marcadores individuales permitió detectar regiones en los cromosomas 1 y 7 asociadas al carácter resistencia a *Cercospora zeae-maydis*, sugiriendo la presencia de posibles QTL. Clements *et al.* (2000), Saghai-Maroof *et al.* (1996) y Lehmensiek *et al.* (2001), usando diversas fuentes de resistencia, encontraron marcadores asociados a este carácter en el brazo largo del cromosoma 1, así como también Clements *et al.* (2000) encontró un marcador asociado a un QTL en el brazo corto del cromosoma 7. Los cruzamientos de las líneas parentales que utilizaron fueron O61 x FR1141, Val14 x B73 y un cruzamiento de líneas patentadas privadas. Estos tres estudios utilizaron en conjunto 3 líneas endocriadas resistentes con distintos orígenes (O61, Val14 y una de las líneas patentadas) y coincidieron en que en el cromosoma 1, más precisamente en el bin 1.05-1.06, se encontraba un QTL asociado con la resistencia a cercosporiosis.

Uno de los factores que podría haber afectado el resultado negativo en la detección de QTL a través del mapeo por intervalo, fue que tanto en el cromosoma 1 como en el 7, se utilizaron pocos marcadores y por ese motivo el grupo de ligamiento finalmente definido fue muy impreciso. En este caso el análisis de marca simple consiguió ser el más efectivo para señalar un QTL posible. Por lo tanto, para una estimación más precisa de los efectos de aditividad y de dominancia, como así también la localización de los QTL, sería necesario aumentar el número de marcadores utilizados.

CONCLUSIÓN

La variable fenotípica analizada, porcentaje de área foliar afectada, relacionada con la resistencia al hongo patógeno *Cercospora zeae-maydis* en el maíz, se comportó como un carácter cuantitativo.

Los marcadores moleculares SSR permitieron identificar regiones cromosómicas asociadas a la resistencia al hongo patógeno *Cercospora zeae-maydis* en el maíz, provenientes del parental resistente A485. Se detectaron posibles QTL en los cromosomas 1 y 7 relacionados a este carácter, cercanos a los marcadores phi097, umc2217, umc1917 en el caso del primero y umc1214 en el caso del segundo.

La búsqueda de nuevas regiones genéticas, QTL, asociadas al carácter en los restantes cromosomas del maíz, más la saturación del mapa de ligamiento con una mayor cantidad de marcadores moleculares SSR en las regiones donde se detectaron posibles QTL, completaría este trabajo.

Toda esta información obtenida con el mapeo de QTL relacionado con la resistencia al hongo *Cercospora zeae-maydis* en el maíz, permitirá aumentar los conocimientos de las bases genéticas de este carácter y contribuir con los programas de mejoramiento para llevar a cabo la Selección Asistida por Marcadores.

BIBLIOGRAFÍA

Abadie, T. y Berreta, A. (2005). Desarrollo de colecciones núcleo de maíz en el Cono Sur de América Latina: Argentina, Bolivia, Brasil, Chile, Paraguay y Uruguay. Montevideo: PROCISUR; IICA. p 90. Editor: Ramiro Suárez Venturini.

AGROCERES (1993). Guia Agroceres de Sanidade. São Paulo, p. 56.

Allard, R. W. (1980). Variedades Híbridas. En: 'Principios de la mejora genética de las plantas'. Cuarta edición. Editorial Omega, S.A. Capítulo 22.

Beckman, P. M. y Payne, G. A. (1982). External growth, penetration, and development of *Cercospora zeae-maydis* in corn leaves. Phytopathology, 72:810-815.

Benjamini, Y. y Hocheberg, Y. (1995). Controlling the False Discovery Rate: a practical and powerful approach to multiple testing. Journal of the Royal Statistical Society. Serie B 57(1): 289-300.

Bernardo, R. (2010). Mapping Quantitative Trait *Loci*. En: 'Breeding for Quantitative Trait in Plant'. Capítulo 5. Ed Bernardo, R.

Bubeck, D. M.; Goodman, M. M.; Beavis, W. D. y Grant, D. (1993). Quantitative trait *loci* controlling resistance to gray leaf spot in maize. Crop Science, 33:838–847.

Cervigni, D. L.; Ortiz, J. P. y Feingold, S. E. (2010). Construcción de mapas de ligamiento genético, localización de genes y regiones cromosómicas asociadas a caracteres de interés en plantas. En: 'Biotecnología y Mejoramiento Vegetal II'. Ed: Levitus, G.; Echenique, V.; Rubinstein, C.; Hopp, E. y Mroginski, L. ArgenBio. 86-99.

Chin, E.; Senior, M. L.; Shu, H. y Smith, J. S. C. (1996). Maize simple repetitive DNA sequence: abundance and allele variation. Genome, 39:866-873.

Churchill, G. A. y Doerge, R. W. (1994). Empirical Threshold Values for Quantitative Trait Mapping. Genetics, 138: 963-971.

Clements, M. J.; Dudley, J. W. y White, D. G. (2000). Quantitative trait *loci* associated with resistance to gray leaf spot of corn. Phytopathology, 90:1018–1025.

Coates, S. T. y White, D. G. (1994). Sources of resistance to gray leaf spot of corn. Plant Disease, 78:1153-1155.

Cockerham, C. C. (1961). Implications of genetic variances in a hybrid breeding program. Crop Science, 1: 47-52.

Collard, B. C. Y.; Jahufer, M. Z. Z.; Brouwer, J. B. y Pang, E. C. K. (2005). An introduction to markers, quantitative trait *loci* (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. Euphytica, 142: 169-196.

Cruz, C. D. y Schuster, I. (2008). GQMOL V2008 6.1. Genética Quantitative e Molecular. Universidade Federal de Viçosa. Laboratorio de Bioinformática. www.ufv.br/dbg/gmol.htm.

De León, C. (1984). Enfermedades del maíz. Una guía para su identificación en el campo. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo. Ed: CIMMYT. Tercera edición.

Díaz, C. G.; Yasem, M. G.; Ploper, L. D. y Virla (2005). Principales enfermedades del maíz en Tucumán y su manejo. Maíz en siembra directa. Revista de la Asociación Argentina de Productores en Siembra Directa. Agosto 2005, p. 51-55.

Di Rienzo, J. A.; Casanoves, F.; Balzarini, M. G.; González, L.; Tablada, M. y Robledo, C. W. (2010). InfoStat versión 2010. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina.

Doerge, R. W. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait *loci* in experimental populations. Nature Reviews Genetics, 3: 43-52.

Don, R. H.; Cox, P. T.; Wainwrigt, H. B. J.; Baker, K. y Mattick, J. S. (1991). “Touchdown” PCR to circumvent spurious priming during gene amplification. Nucleic Acid Research, 19, 4008.

Duvick, D. N. (1996). Plant breeding, an evolutionary concept. Crop Science, 36: 539-548.

East, E. M. (1908). Inbreeding in corn. Report, Connecticut Agricultural Experiment Station: 419-428.

Elander, R. T. y Russo, L. J. (1993). Production of ethanol from corn fiber. First Biomass Conference of the Americas: Energy, Environment, Agriculture and Industry. Burlington, VT, USA.

Eyhérabide, G. H. (2006). Mejoramiento genético de maíz y su trayectoria en la Argentina. En: 'Maíz y Nutrición'. Informe sobre los usos y las propiedades nutricionales del maíz para la alimentación humana y animal. Ed: Maizar. Recopilación de ILSI Argentina. Vol. II, 14-21.

Eyhérabide, G. H.; Giorda, L. M.; Livore, A. B.; Nisi, J. y Tomaso, J. C. (2009). Programa Nacional Cereales. Documento Base. PMP 2009-2011. Versión 16 de mayo de 2009.

Ferreira, M. E. y Grattapaglia, D. (1996). Introdução ao uso de Marcadores Moleculares em Análise Genética. MA EMBRAPA-CENARGEN, Brasilia, p. 220.

Flavell, R. B.; Bennett, M. D.; Smith, J. B.; Smith, D. B. (1974). Genome size and proportion of repeated nucleotide sequence DNA in plants. Biochemical Genetics, 12:257–269.

Gentleman, R. e Ihaka, R. (1991). R: Un entorno de programación para Análisis de datos y gráficos. Version 2.0: Free Software Foundation, Inc., Boston. Programa computacional.

Gordon, S. G.; Bartsch, M.; Matthies, I.; Gevers, H. O.; Lipps, P. E. y Pratt, R. C. (2004). Linkage of Molecular Markers to *Cercospora zeae-maydis.* Resistance in Maize. Crop Science, 44:628–636.

Gordon, S. G.; Lipps, P. E. y Pratt, R. C. (2006). Heritability and components of resistance to *Cercospora zeae-maydis* derived from maize inbred VO613Y. Phytopathology, 96:593-598.

Gupta, P. K.; Roy, J. K.; Prasad, M. (2001). Single nucleotide polymorphisms: A new paradigm for molecular marker technology and DNA polymorphism detection with emphasis on their use in plants. Current Science, 80 (4): 524-535.

Haldane, J. B. S. (1919). The Combination of Linkage Values, and the Calculation of Distances between the *Loci* of Linked Factors. Journal Genetics, 8: 299-309.

Heredia, A. M.; Díaz, C.; Aguaysol, C.; Britos, M.; Cáseres, F. y Ramallo, J. C. (2008). Distribución y progreso temporal de la mancha gris del maíz en Tucumán, Argentina. Primer Congreso Argentino de Fitopatología. Libro de Resúmenes: 185. Ciudad de Córdoba, Córdoba, 30 de mayo.

Jugenheimer, R. W. (1988). Maíz, variedades mejoradas, métodos de cultivo e introducción de semillas. Limusa, México, p. 841.

Kearsey, M. J. (1998). The principles of QTLs analysis (a minimal mathematics approach). Journal of Experimental Botany, 49 (327): 1619-1623.

Kleinhofs, A.; Kilian, A.; Saghai-Maroof, M.; Biyashev, R. M.; Hayes, P.; Chen, F. Q.; Lapitan, N.; Fenwick, A. y Steffenson, B. J. (1993). A Molecular isozyme and morphological map of the barley (*Hordeum vulgare*) genome. Theoretical and Applied Genetics, 86: 705-712.

Kosambi, D. D. (1944). The Estimation of Map Distances from Recombination Values. Annals of Eugenics 12: 172–175.

Kumar, L. S. (1999). DNA markers in plant improvement: An overview. Biotechnology Advances, 17: 143-182.

Lander, E. y Botstein, D. (1989). Mapping Mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. Genetics, 121:185–199.

Lehmensiek, A.; Esterhuizen, A. M.; van Staden, D.; Nelson, S. W. y Retief A. E. (2001). Genetic mapping of gray leaf spot (GLS) resistance genes in maize. Theoretical and Applied Genetics, 103:797–803.

Li, H. B.; Kilian, A.; Zhou, M. X.; Wenzl, P. y Huttner, E. (2010). Construction of a high-density composite map and comparative mapping of segregation distortion regions in barley. Molecular Genetics Genomics, 284:319-331.

Liu, X.; Guo, L.; You, J.; Liu, X.; He, Y.; Yuan, J.; Liu, G. y Feng, Z. (2010). Progress of segregation distortion in genetic mapping of plants. Research Jounal of Agronomy 4(4): 78-83.

Lu, H.; Romero-Severson, J. y Bernardo, R. (2002). Chromosomal regions associated with segregation distortion in maize. Theoretical and Applied Genetics, 105:622–628.

Luna, J. T.; Kugler, W. F.; Godoy, E. F. y Mazzoni, L. E. (1964). Maíz. Enciclopedia Argentina de Agricultura y Jardinería. Ed: L. Parodi. Capítulo 5, p. 553-589.

Lynch, M. y Walsh, B. (1998). Genetics and Analysis of Quantitative Traits. Sinauer Associates, Inc. Sunderland, Massachusetts, 01375 USA.

Malosetti, M. y Van Berloo, R. (2007). Construcción de mapas genéticos y detección de QTLs en plantas. Ed: Danial, D. L. Curso sobre uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de plantas. PREDUZA-WU. Quito, Ecuador, p. 42-63.

Mandolino, C. I. (2014). Mapeo de QTL en maíz para la eficiencia del uso del Nitrógeno mediante SSRs y SNPs. (Tesis doctoral). Universidad Nacional de Rosario. Rosario, Argentina.

Mandolino, C. I.; D'Andrea, K. E.; Olmos, S. E.; Otegui, M. E. y Eyhérabide, G. H. (2014). Mapeo de QTLs para caracteres relacionados a eficiencia de uso de nitrógeno en maíz mediante marcadores SSRs y SNPs. X Congreso Nacional de Maíz. Rosario, Argentina, 5 de mayo.

Manly, K. F.; Cudmore, H.; Robert, J. R. y Meer, J. M. (2001). Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. Mamm. Genome, 12: 930–932.

Morgante, M. y Olivieri, A. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant breeding. The Plant Journal, 3: 175-182.

Picca, A.; Helguera, M.; Salomón, N. y Carrera, A. (2004). Marcadores Moleculares. En: 'Biotecnología y Mejoramiento Vegetal'. Eds: Echenique, V.; Rubinstein, C. y Mroginski, L. Ed. INTA, Bs. As., p. 61-68.

Regúnaga, M.; Baez, G.; Ganduglia, F. y Massot, M. (2008). Diagnóstico y estrategias para la mejora de la competitividad de la agricultura argentina (CARI/FAO/IICA), p.458.

Robutti, J. L. (2004). Calidad y Usos del maíz. Revista Idia XXI. N° 6, año IV. Ed. INTA.

Rojas-Beltran, J. A. (2007). Tecnología de los marcadores moleculares. En: 'Curso sobre uso de marcadores moleculares en el mejoramiento genético de plantas PREDUZA-WU'. Editor: Danial, D. L. Quito, Ecuador, p. 20-33.

Saghai-Maroof, M. A.; Yue, Y. G.; Xiang, Z. X.; Stromberg, E. L. y Rufener, G. K. (1996). Identification of quantitative trait *loci* controlling resistance to gray leaf spot. Theoretical and Applied Genetics, 93:539–546.

Semagn, K.; Bjørnstad, A. y Xu, Y. (2010). The genetic dissection of quantitative traits in crops. Electronic Journal of Biotechnology, 13 (5): 1-45.

Sham, P.; Bader, J. S.; Craug, I.; O`Donovan, M. y Owen, M. (2002). DNA pooling: a tool for large-scale association studies. Nature Review of Genetics, 3, (11): 862-87.

Shull, G. H. (1908). The composition of a field of maize. Report, American Breeders' Association, 4: 296-301.

Sillón, M. (2008). Impacto y manejo de las principales enfermedades del maíz en siembra directa. Ciclo 2007/2008. Revista AAPRESID Maíz.

Stebbins, G. L. y Crampton, B. (1961). A suggested revision of the grass genera of temperate North America. Recent Advances in Botany, 1: 133-144.

Tai, G. C. C.; Seabrook, J. E. A. y Aziz, A. N. (2000). Linkage analysis of another derived monoploids showing distorted segregation of molecular markers. Theoretical and Applied Genetics, 101: 126-130.

Tanksley, S. D. (1993). Mapping polygenes. Annual Review of Genetics, 27: 205–233.

Van Ooijen, J. W. (1999). LOD significance thresholds for QTL analysis in experimental populations of diploid species. Heredity, 83: 613-624.

Van Ooijen, J. W.; Boer, M. P.; Jansen, R. C. y Maliepaard, C. (2002). Map QTL®, Software for the calculation of QTL positions on genetics maps. Versión 4.0: Plant Research International, Wageningen, the Netherlands. Programa computacional.

Wang, S.; Basten, C. J. y Zeng, Z. B. (2007). Windows QTL Cartographer V2.5. Department of Statistics. North Carolina State University. Raleigh. NC. http://statgen.ncsu.edu/qtlcart/WQTLCart.htm

Wu, Y. P.; Ko, P. Y.; Lee, W. C.; Wei, F. J. y Kuo, S. C. (2010). Comparative analyses of linkage maps and segregation distortion of two F_2 populations derived from japonica crossed with indica rice. Hereditas, 147:225-236.

Xu, S. (2008). Quantitative trait locus mapping can benefit from segregation distortion. Genetics, 180: 2201-2208.

Zeng, Z. B. (1994). Precision mapping of quantitative trait *loci*. Genetics 136: 1427-1468.

RESUMEN

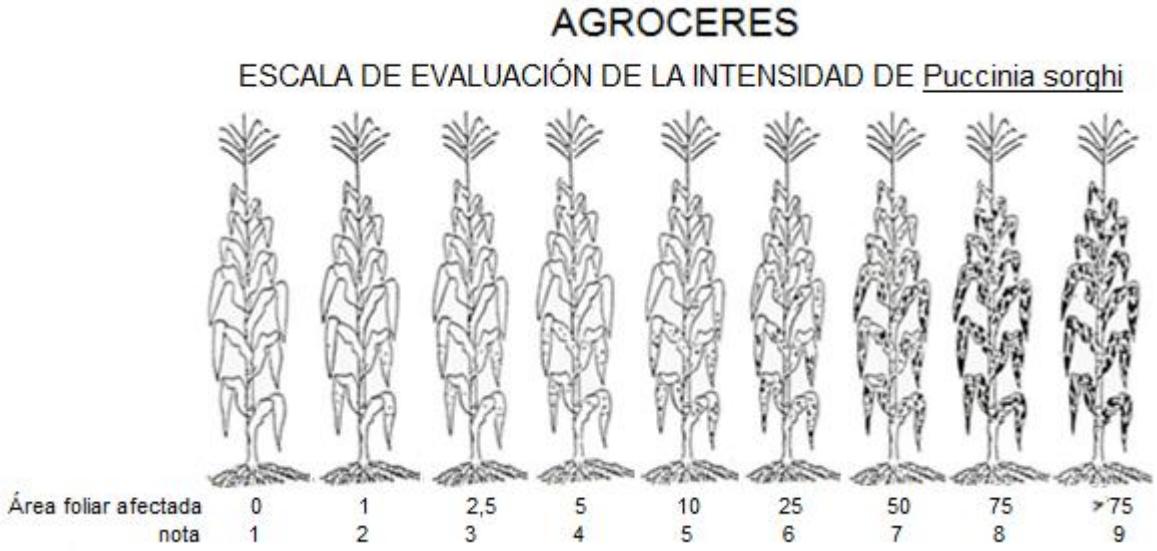
En las últimas décadas adquirió gran importancia el uso de marcadores moleculares para ubicar *Loci* de Caracteres Cuantitativos (QTL) asociados a caracteres de interés, como son aquellos responsables de la tolerancia a distintos estreses. El propósito general de los trabajos desarrollados es encontrar las bases genéticas de estos caracteres complejos que indirectamente afectan el rendimiento y la calidad. El objetivo de este estudio fue identificar marcadores moleculares ligados a *loci* responsables de la resistencia a *Cercospora zeae-maydis* en los cromosomas 1 y 7 de la planta de maíz.

Se llevó a cabo el cruzamiento de dos líneas endocriadas, A485 y CML3270014, fenotípicamente contrastantes para la resistencia a *Cercospora zeae-maydis.* Luego se realizó la evaluación fenotípica de las 265 familias derivadas $F_{2:3}$, encontrándose diferencias significativas entre dichas familias para la variable porcentaje de área foliar afectada por el hongo (severidad).

Seguidamente se efectuó la caracterización genotípica de las familias segregantes mediante el uso de marcadores moleculares microsatélites polimórficos. Se obtuvo un mapa de ligamiento y finalmente se llevó a cabo el mapeo de posibles QTL. Este último se realizó por el método de análisis de marcadores individuales, encontrándose asociaciones significativas entre el fenotipo y los marcadores: umc1917, phi097 y umc2217 en el cromosoma 1 y umc1214 en el cromosoma 7. La escasa cantidad de marcadores usados comprometió la realización efectiva de otros procedimientos de análisis de QTL, por ejemplo mapeo por intervalo simple y compuesto.

ANEXO 1

Escala diagramática de severidad para planta entera traducida al castellano. Tomado de Guia Agroceres de Sanidade, São Paulo, p. 56 (1993).



ANEXO 2

Protocolo Kleinhofs *et al.,* (1993) para la extracción de ADN.

1- Colocar la muestra de tejido foliar liofilizado y molido en microtubos de 2 ml.

2- Agregar 600 µl de *buffer* de extracción (Tabla A1).

3- Incubar en baño de agua a 65°C durante 30 minutos.

4- Agregar 750 µl de cloroformo.

5- Mezclar suavemente mediante inversiones durante 10 minutos.

6- Centrifugar a 12000 rpm, durante 30 minutos.

7- Extraer la fase acuosa y colocarlo en un microtubo.

8- Agregar volumen igual de cloroformo.

9- Mezclar suavemente mediante inversiones, durante 10 minutos.

10- Centrifugar a 12000 rpm, durante 30 minutos.

11- Extraer la fase acuosa y colocarlo en un nuevo microtubo.

12- Precipitar el ADN con isopropanol frío, agregar un 60% del volumen. Mezclar suavemente.

13- Centrifugar 10 minutos a 12000 rpm.

14- Descartar la fase acuosa.

Lavados del pellet:

15- Agregar 1 ml de etanol al 70%.

16- Centrifugar.

17- Descartar la fase acuosa y realizar el segundo lavado con etanol al 70%.

18- Centrifugar y descartar la fase acuosa.

19- Dejar secar el pellet hasta evaporación total del etanol al 70%.

20- Resuspender el ADN con 40 µl de TE 1X (10 mM Tris pH 8 y 1 mM EDTA).

Tabla A1. Composición del *buffer* de extracción. TrisClH: Tris-hidroximetil-aminometano (pH=8, ajustado con ácido clorhídrico); NaCl: Cloruro de sodio; EDTA: Ácido etildiaminotetraacético; SDS: Dodecilsulfato sódico; CTAB: Bromuro de hexadeciltrimetilamonio.

* Agregado después de calentar a 65°C.

Componentes	Concentración final	1X
1M TrisClH (pH 8)	100mM	75µl
5M NaCl	700mM	105µl
0.5M EDTA (pH 8)	50mM	75µl
SDS 20% *	2%	75µl
CTBA 10% *	1%	75µl
H_2O		345µl
Volumen total		*750µl*

ANEXO 3

Marcadores microsatélites utilizados para el análisis, su localización en los cromosomas del maíz (bin) y sus secuencias de oligonucleótidos.

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos	
1	bnlg149	F: 5' CATCCTCCAAAAGCACTACGT 3'	R: 5' CAGCTGTCCGACACTTATTCTGTA 3'
1	umc1106	F: 5' CATCCAGTCATCGGTAATACGACA 3'	R: 5' AACTGTTGCCTTCTTTTTCCCTTC 3'
1.01	umc2157	F: 5' GACAACGGACGTCAACCATAGC 3'	R: 5' ATCGAAGACCTCAAGGCAAAGTG 3'
1.01	phi056	F: 5'ACTTGCTTGCCTGCCGTTAC 3'	R: 5' CGCACACCACTTCCCAGAA 3'
1.01	phi097	F: 5' TGCTTCACATTCAGTCACCGTCAG 3'	R: 5' CCACGACAGATGATTACCGACC 3'
1.02	bnlg1429	F: 5' CTCCTCGCAAGGATCTTCAC 3'	R: 5' AGCACCGTTTCTCGTGAGAT 3'
1.02	bnlg109	F: 5' GCCAGCTGATGTCTGATGAACAGCACA 3'	R: 5' GATCGGGCCAGATTTCTCAAGTCGTCA 3'
1.02	umc2225	F: 5' TCGGCTGACATAATAAAACCATAGC 3'	R: 5' ATGCGAATTTTACCGGGTTTTT 3'
1.02	bnlg1953	F: 5' CCTCGGAGCTCGATTTACAC 3'	R: 5' AACATTTAACCGCCGTCATC 3'
1.03	phi339017	F: 5' ACTGCTGTTGGGGTAGGG 3'	R: 5' GCAGCTTGAGCAGGAAGC 3'
1.03	bnlg1484	F. 5' GTAAAAGACGACGACATTCCG 3'	R: 5' GACGTGCACTCCGTTTAACA 3'
1.03	umc1514	F: 5' TGCTGTCTGACGATCTCTCAAATC 3'	R: 5' TGCCACCAAATAGACCATCTATCA 3'
1.03	umc2096	F: 5'AACGTACCATCCTTGTGCCTGTAT 3'	R: 5' CATTATTAGTACGGAGCGCTGGTC 3'
1.03	umc1479	F: 5' CTGGCTCTTCAAGTGTAAAGGAGG 3'	R: 5' GGCCTTTTTCTTAGCTTCCTCATC 3'
1.03	umc1403	F: 5' GTACAACGGAGGCATTCTCAAGTT 3'	R: 5' TGTACATGGTGGTCTTGTTGAGGT 3'
1.03	umc1021	F: 5' AGCCTCCTGAGACCTCTCGATT 3'	R: 5' ACTTCGCCACCTTACATTCTTGA 3'
1.03	umc1880	F: 5' CGCATCCGCCTAGCTCTATACTAA 3'	R: 5' GCATCGAACAGCTGAGATTGTAGA 3'
1.03	bnlg1866	F: 5' CCCAGCGCATGTCAACTCT 3'	R: 5' CCCCGGTAATTCAGTGGATA 3'
1.03	bnlg1458	F: 5' GAAAGGCTCGCTAGTCGCTA 3'	R: 5' AATTCCTATCGATCCTGGCC 3'
1.03	umc2397	F: 5' CGCATATATACTTGTGCGCACTTT 3'	R: 5' TATGTATGTTCGTGTGCCTGTGTG 3'
1.03	umc1452	F: 5' GATCCTAGCCTTGAAGGGGAACT 3'	R: 5' AAGAGGAACCATTCTGCTATCGTG 3'
1.03	umc2097	F: 5' AGATTTGACTGCAAGAAAAGGCTG 3'	R: 5' GTCCCTCGTCCTGCAAGATTC 3'
1.03	phi001	F: 5' TGACGGACGTGGATCGCTTCAC 3'	R: 5' AGCAGGCAGCAGGTCAGCAGCG 3'
1.03	bnlg2180	F: 5' ACAAGGGCGTACCAACCAC 3'	R: 5' TGACCAGAGGCTTCCATACC 3'
1.03	bnlg2204	F: 5' AGGCGACTTAGCTGCAGAAG 3'	R: 5' CGACTTTCGGTTTGGAAAAG 3'
1.03	umc1598	F: 5' CACGTAATAATCCTTTTCCCCAGA 3'	R: 5' TTTTCTGCAAATGCTCAGAATGAT 3'
1.03	bnlg176	F: 5' AGTTCACGTCCAGCTGAATGACAG 3'	R: 5' CGCGCATCGCATGCTTATCCTA 3'
1.03	umc1397	F: 5' GTTACACTTGCAGACAAACAACCG 3'	R: 5' GTCATGTGATCCGGGAGTAAATCT 3'
1.03	umc2171	F: 5' ACATAATCCCTCGGTACAGGACAA 3'	R: 5' GCCCTTGTGTGTCTATTTAGGGTG 3'
1.03-1.04	umc2217	F: 5' AAGACCTGTTCGTCAACCATGTTC 3'	R: 5' ATGTCCCATTTACCAAGGTCTGTG 3'
1.03	bnlg439	F: 5' TTGACATCGCCATCTTGGTGACCA 3'	R: 5' TCTTAATGCGATCGTACGAAGTTGTGGAA 3'
1.03	phi095	F: 5' CCGATCGGCTTTATCACTGTTTAGC 3'	R: 5' ATGCACCATTCTAGCACTATAGCAACACT 3'
1.03	phi109275	F: 5' CGGTTCATGCTAGCTCTGC 3'	R: 5' GTTGTGGCTGTGGTGGTG3'
1.03	umc1073	F: 5' CACCAACGCCAATTAGCATCC3'	R: 5' GTGGGCGTGTTCTCCTACTACTCA 3'
1.03	umc1044	F: 5' CACCAACGCCAATTAGCATCC3'	R: 5' GTGGGCGTGTTCTCCTACTACTCA 3'
1.03	bnlg1203	F: 5' GACCCGTCTCTCTTGAGTGC 3'	R: 5' GTCTGTCTGCACCCGTTTTT 3'
1.04	umc2227	F: 5' ACCTTGAGCGTGGAGTCGGT 3'	R: 5' AGCTGAGCCTTCTCTTCTTGGCT 3'
1.04	bnlg2238	F: 5' TGCCACTCAAGCCTTCTTTT 3'	R: 5' TTCTGATTGCAGTGCAGACC 3'
1.04	umc2229	F: 5' GAGAAGGGCGGGAGGAATAAC 3'	R: 5' CGAAGAGCACGATGTTGACG 3'
1.04	umc1917	F: 5' ACTTCCACTTCACCAGCCTTTTC 3'	R: 5' GGAAAGAAGAGCCGCTTGGT 3'
1.04	dup26	F: 5' GTCGGAGCACTCCAAGAC 3'	R: 5' CTTCTCGCTCATCAGCTTAAA 3'
1.04	bnlg1811	F: 5' ACACAAGCCGACCAAAAAAC 3'	R: 5' GTAGTAGGAACGGGCGATGA 3'

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos	
1.04	bnlg1016	F: 5' CCGACTGACTCGAGCTAACC 3'	R: 5' CCGTAACTTCCAAGAACCGA 3'
1.04	umc1770	F: 5' GAGGGATCATGGCTCTCTTCC 3'	R: 5' GTCCATCATCAGCCTGTCACC 3'
1.04	umc1849	F: 5' TCCTTGTTGAAGATTTTATTTCTGCT 3'	R: 5' GGCTTTAAGTGATGCTCAAACGTA 3'
1.04	umc1169	F: 5' TAGCCAACAGTCCAACATTTTTCA 3'	R: 5' CAGGCTAGAATAACATCCCGAAGA 3'
1.04	bnlg2295	F: 5' CGGAGGAGTGGTTCTTGAAA 3'	R: 5' GGTTAGTGAAAGGGTTGCCA 3'
1.04	umc1243	F: 5' AACTGCAGAGTCGCCTGATCC 3'	R: 5' AAGCAGACTATGCTATGCTACGCC 3'
1.04	umc1144	F: 5' ATGGCCCACTCATCATATCTCTGT 3'	R: 5' TGTGTTGATTAGCAGCGGATAAAA 3'
1.04	umc2112	F: 5' AGCTCTACCAAACACGAGCTTCAT 3'	R: 5' CAAATGCAGAAAGATAACGCGAAT 3'
1.04	umc2124	F: 5' ATGCGGAGGGGTCTACTACACATA 3'	R: 5' CTGTGTCTCACTGGAAATGACGAT 3'
1.04	umc2390	F: 5' GAAATGGCAGGGAAACTTGTTTAT 3'	R: 5' AAGAGGCAAGCAAGTGTACAGTGA 3'
1.04	umc2228	F: 5' GTGAGGTGAAAATGAAGCTGGAAC 3'	R: 5' ACCATACCTCTCTGAACATGAGCC 3'
1.04	bnlg2086	F: 5' CGGAACCTGCTGCAGTTAAT 3'	R: 5' GAGATGCAGGAATGGGAAA 3'
1.04	umc1472	F: 5' TTTTTCTTCTCACCATCACCTTCA 3'	R: 5' TGGCTTCAAAGAAGAGGAAACATC 3'
1.05	umc2025	F: 5' CGCCGTAGTATTTGGTAGCAGAAG 3'	R: 5' TCTACCGCTCCTTCGTCCAGTA 3'
1.05	umc1734	F: 5' TTGTGCATTTTGCAGAAACTAGGA 3'	R: 5' AGTACTTGTCGGTGGAGACTGGAG 3'
1.05	phi323152	F: 5' TCAGGGAGCTCACCTACTACGG 3'	R: 5' CACGACTGCACCGATTAGC 3'
1.05	umc1395	F: 5' TGAATGAGTGGCATTCAAAATCTG 3'	R: 5' CAGATTGCATGTGTGAGTGTGTGT 3'
1.05	bnlg1886	F: 5' TCTCTCTCACATGCACGCC 3'	R: 5' TTTGATTTGGGGAACCAGAG 3'
1.05	umc2233	F: 5' ACACCACGCTCTACCTCCTCCT 3'	R: 5' TTATTTACAGAAACCATGGCGTGC 3'
1.05	bnlg1884	F: 5' TTCGGATGCATGTGTAACGT 3'	R: 5' CGGAAGTCCCATCTGTTTGT 3'
1.05	bnlg652	F: 5' CGCACGTCGGGAGAGAGGGAGA 3'	R: 5' GCCGCAAACATAGCCGCCAAAAAT 3'
1.05	umc2232	F: 5' CATTCATCCACCATAAATATCCTGC 3'	R: 5' CTAGATTGCCTCGGACCTGTAAGA 3'
1.06	bnlg421	F: 5' GGGGCAAGGACTTGTCGGT 3'	R: 5' AGCCAGTTGCCCAGCATCT 3'
1.06	umc2234	F: 5' CAAGATCGTTAGGTTCTAGGCGTC 3'	R: 5' GACGGACTATAGAGGGCGATGAG 3'
1.06	bnlg1273	F: 5' AAACACCAAACGTCACGTGG 3'	R: 5' GGCGACGAGATACAGGATGT 3'
1.06-1.07	umc1335	F: 5' ATGGCATGCATGTGTTTGTTTTAC 3'	R: 5' ACAGACGTCGCTAATTCCTGAAAG 3'
1.07	umc1499	F: 5' TTTAAACTGCCCATTCATCGAACT 3'	R: 5' AAAGTCATGTTCAACCTCTAGGCG 3'
1.07	bnlg1025	F: 5'TGGTGAAGGGGAAGATGAAG 3'	R: 5' CCGAGACGTGACTCCTAAGC 3'
1.07	umc2237	F: 5' CTCAGCTACAGGAGCGAAGAGG 3'	R: 5' GTCACTGCACGATCCATCACAT 3'
1.07	umc2064	F: 5' CGAGAGGGGAGAGAGAGAGAGAGA 3'	R: 5' AGTCGCTGAGTCTACGGTCCCTAC 3'
1.07	umc2238	F: 5' CACCTGCTCAAGCACCATCC 3'	R: 5' TCATGGAGTACCACCATTTGATCC 3'
1.07	umc1147	F: 5' GAGAAACCATCGACCCTTCCTAAC 3'	R: 5' TTCCTATGGTACAGTTCTCCCTCG 3'
1.07	umc1356	F: 5' ATACATTTTTACGTCCACGCCG 3'	R: 5' CTAGGATAGTAGGAGTGCAGGGCA 3'
1.07	umc1706	F: 5' ATCGAGAGGGGTAAATAAGGACGA 3'	R: 5' ACCAACCACGAGGCGATGTA 3'
1.07	bnlg1556	F: 5' ACCGACCTAAGCTATGGGCT 3'	R: 5' CCGGTTATAAACACAGCCGT 3'
1.07	bnlg615	F: 5' CTTCCCTCTCCCCATCTCCTTTCCAA 3'	R: 5' GCAACCTGTCCATTCTCACCAGAGGATT 3'
1.07	umc2387	F: 5' GTCAGGCGATACAACTACAAGCCT 3'	R: 5' GCTGATCCGGTACACGAACG 3'
1.07	umc1245	F: 5' TGGTTATGTGCATGATTTTTCCTG 3'	R: 5' CATGCGTCTGATCTTCAGAATGTT 3'
1.07	umc1358	F: 5' AGAACCTCCCGCTTGACGAC 3'	R: 5' ACCTCAACCTCGACCTCTGCAT 3'
1.07	umc1278	F: 5' GTCGGAGGATGATCCCCTATCTAT 3'	R: 5' TGCCATAGTACATGTCCGTCATTC 3'
1.07	umc1661	F: 5' ACGAGACTCCCTCCTCTCCTCTC 3'	R: 5' GGAGTAAACTGTTGAAAGGCCCAT 3'
1.07	umc1833	F: 5' TTACATGTACCCACATCCTTGCAG 3'	R: 5' CAGGGATCTGGGAGTATCCTCTTT 3'

Bin	SSR	Secuencia de oligonucleótidos	
1.07	umc1128	F: 5' TCAATTTTGAGCTATCACTTTCCG 3'	R: 5' ATTGGTTCCATTGGTTTTGTTGAT 3'
1.07	umc1486	F: 5' CTTCCAGTTCCAGCCTATTGACAC 3'	R: 5' TTAAGATCTGGCTGGGAAGAAAGC 3'
1.07	umc1848	F: 5' TCAGCTTTATCTCTACCCATTGCTTT 3'	R: 5' TCCATCATCTCCCTCCAGACTTTA 3'
1.07	phi002	F: 5' CATGCAATCAATAACGATGGCGAGT 3'	R: 5' TTAGCGTAACCCTTCTCCAGTCAGC 3'
1.07	bnlg1564	F: 5' ACGGGAGAACAAAAGGAAGG 3'	R: 5' CTCTCCCTCACATCCGCC 3'
1.07	umc2239	F: 5' ACTAGCACTTGCTGATGAGTGCAG 3'	R: 5' TTGTACCTCTTCCTACGTACCCCA 3'
1.07	bnlg257	F: 5' TCGAGAGACGAGCGTTTGAATGCT 3'	R: 5' GCTCTGAGGTTTTCATACGGGGTT 3'
1.08	dup12	F: 5' CAGGTACTACGTGCCGTG 3'	R: 5' CTAGAGACAAACGAGGCTAGG 3'
1.08	umc2116	F: 5' CGGTCGATATAATCTTGGCTGATT 3'	R: 5' GGCGCAGAGATCATTTGTTTAAT 3'
1.08	bnlg1044	F: 5' GACTCTCCAGTCTCCGTTGC 3'	R: 5' ACATGAAAACGAGCAATGCA 3'
1.08	umc1013	F: 5' TAATGTGTCCATACGGTGGTGG 3'	R: 5' AGCTGGCTAGTCTCAGGCACTC 3'
1.08	phi037	F: 5' CCCAGCTCCTGTTGTCGGCTCAGAC 3'	R: 5' TCCAGATCCGCCGCACCTCACGTCA 3'
1.08	phi039	F: 5' ACCGTGTCTAATGTGTCCATACGG 3'	R: 5' CGTTAGGAGCTGGCTAGTCTCA 3'
7	umc1583	F: 5' AAAGGGCGACTTGTTTTTGTTTTT 3'	R: 5' GCCTGCTTTTGTGTATCTTAGGCA 3'
7	umc1545	F: 5' GAAAACTGCATCAACAACAAGCTG 3'	R: 5' ATTGGTTGGTTCTTGCTTCCATTA 3'
7	bnlg1686	F: 5' GAATCCGTACGTTCTTCCCA 3'	R: 5' TTCAGCTAGCTCACGGGATT 3'
7.01	bnlg1292	F: 5' GGCGCGCACATAGCTC 3'	R: 5' GCCTGGGCTGGCTTCA 3'
7.01	umc1159	F: 5' TTCCCATGTTCATTTCAGGTTCTT 3'	R: 5' TCATGGGTTTTGAGGCTGTATTTT 3'
7.01	phi057	F: 5' CTCATCAGTGCCGTCGTCCAT 3'	R: 5' CAGTCGCAAGAAACCGTTGCC 3'
7.02	bnlg398	F: 5' CGTCGGCCAACAGGGTATC 3'	R: 5' CTCGCACGCGGTCTTCTTC 3'
7.02	phi034	F: 5' TAGCGACAGGATGGCCTCTTCT 3'	R: 5' GGGGAGCACGCCTTCGTTCT 3'
7.02	bnlg657	F: 5' TCTGAGGATGCCCAATCATGCGC 3'	R: 5' CGTTTCCGTTCGTCACCAGCTCG 3'
7.02	bnlg1759	F: 5' AGACGGAGTCCTCGTTTGC 3'	R: 5' ACCGGTTCGTACCACTCACT 3'
7.02-7.03	dup9	F: 5' GATGTCGTGTGAGTGACCTG 3'	R: 5' GTGTTGCTATTGCAGTGAGAC 3'
7.03	bnlg155	F: 5' ACCGAGTAGCCGAGACACG 3'	R: 5' AGAGTCCTGGAGCCACATGAG 3'
7.03	bnlg1070	F: 5' TTCCAGTAAGGGAGGTGCTG 3'	R: 5' TAAGCAACATATAGCCGGGC 3'
7.03	umc2328	F: 5' CTTCATTTCCAAACTGCGAAACTA 3'	R: 5' GCTTCTGAGCTGAGGATTAATTAGC 3'
7.03	phi114	F: 5' CCGAGACCGTCAAGACCATCAA 3'	R: 5' AGCTCCAAACGATTCTGAACTCGC 3'
7.03	umc1214	F: 5' ACTAGCAACAAAACAAGCCCCA 3'	R: 5' ATACTTGGGAGCCACACTCCAA 3'
7.04	umc2331	F: 5' CGGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAGT 3'	R: 5' AAGAACTGCAAAAAGGTACCCACA 3'
7.04	umc1710	F: 5' ACTTTGCAACTACCGTACATGGGT 3'	R: 5' TTCGACTGCACGTGAAAATCTATC 3'
7.04	umc1251	F: 5' GGTAGTGCTTGGTATTGACATCAGA 3'	R: 5' CTCTTGAAGATGGTCCTAGCATTG 3'
7.04	bnlg1666	F: 5' GCTGGTAGCTTTCAGATGGC 3'	R: 5' TGTCCCTCCTCCAGTTTCAC 3'
7.04	umc1342	F: 5' TCTAATCCAATCGACATCGACAGA 3'	R: 5' TCGCCCTCTTTTCTTTTCTTTTCT 3'
7.04	umc1029	F: 5' AACACCTGCTGGATATGGATCACT 3'	R: 5' GGAAGAAAAATGTCGACCTGCTC 3'
7.04	bnlg1892	F: 5' ACGCCATCACTCTCGCTC 3'	R: 5' TGGCATCCATCAATCCAAC 3'
7.04	umc1782	F: 5' CGTCAACTACCTGGCGAAGAA 3'	R: 5' TCGCATACCATGATCACTAGCTTC 3'
7.04	umc1543	F: 5' TTCCTCTACCAGCTGCCCGT 3'	R: 5' GTGAGCAGAAGCTTGAGGCG 3'
7.04	umc1944	F: 5' GAAGAAGGATCGCACACATGG 3'	R: 5' AGACTGTCGCGCTGTACTATACCC 3'
7.04	umc1708	F: 5' GATATGTCGAGCTTCGCTGGAG 3'	R: 5' CGCACACTAAAGCATCCTTAACCT 3'
7.04	umc2332	F: 5' GTCGGAGAAGGAGCTACTGAGCTA 3'	R: 5' CACAGGTACGTCTGGATGCTGT 3'
7.04	phi328175	F: 5' GGGAAGTGCTCCTTGCAG 3'	R: 5' CGGTAGGTGAACGCGGTA 3'
7.04	dup13	F: 5' TCGTTCGGTCCATGAAAT 3'	R: 5' CAAATATCTCTCATCTTTGCTGAC 3'
7.04	umc1768	F: 5' ATTCCATTTCCCGGAGCCTACTA 3'	R: 5' CAGAGCACACACTCACGAGTCAC 3'
7.04	bnlg2259	F: 5' ACCATTGATTTCATGGTATTGG 3'	R: 5' GCGGATAATGACATTGGGTC 3'
7.04	umc1103	F: 5' TGGAGAGAGCTCAACTGGTAGCTT 3'	R: 5' AATTTTCAGGGTGTTACGTGGATG 3'
7.04	umc1295	F: 5' GTCGATCTTCCTCCCCATCA 3'	R: 5' CGTTTCTATCTATGGAGGAGTGCG 3'
7.04	umc1412	F: 5' ACTAGCAACAAAACAAGCCCCA 3'	R: 5' ATACTTGGGAGCCACACTCCAA 3'
7.04	umc1125	F: 5' CGTCCGACATCTTGCTTTTCTATC 3'	R: 5' TTTTACTTCTCAGCGGTAGATCGG 3'
7.04	umc1799	F: 5' GTGAGGAGAGGAGACGGAGAGAG 3'	R: 5' GAAGCTCCTGTGGAACGTGTG 3'
7.04	umc1684	F: 5' GAGCTAGCTTTTTGCTTTGCTCAC 3'	R: 5' AAGGGGCCCAGGTACTTGAC 3'
7.04	umc2330	F: 5' CGGTGAGTGAGTGAGTGAGTGAGT 3'	R: 5' AAGAACTGCAAAAAGGTACCCACA 3'
7.04	umc2062	F: 5' CATGATCATCCTTAGCGACTCCTC 3'	R: 5' CATCGAGCTCAAGGAGCAGGT 3'
7.04-7.05	umc1359	F: 5' GCAGAGCCAGAATTCGACCTT 3'	R: 5' CATCGTCATCATTCGAGCAGAG
7.05	phi082	F: 5' CACAGCACAGGCAGTTCG 3'	R: 5' CGCGGCAAAAGATCTTGAACACCT 3'
7.05	umc1671	F: 5' AGCGGAGGAGAGGGAGGTTAT 3'	R: 5' AAGTCCAGGTACCTCAGCTTCG 3'
7.06	umc2190	F: 5' GATCCGTTGAGGTCGATCCTTT 3'	R: 5' GAGGAGTTCCTGCAGTTTCTTGAC 3'
7.06	phi116	F: 5' GCATACGGCCATGGATGGGA 3'	R: 5' TCCCTGCCGGGACTCCTG 3'

ANEXO 4

Protocolo de Tinción con Plata para Secuenciación de Promega Corp.

1- Colocar el vidrio con el gel en una bandeja de plástico y cubrir con solución fijadora (10% ácido acético glacial) para prevenir la difusión de los fragmentos de ADN. Agitar bien durante 20 minutos o hasta que no queden rastros de colorante azul-bromofenol y xileno-cianol, usado en la corrida electroforética.

2- Enjuagar el gel con agitación 3 veces durante 2 minutos por vez con agua bidestilada para remover el exceso de urea, *buffer* TBE y ácido acético. Dejar el gel fuera del agua unos segundos escurriéndose.

3- Colocar el gel en otra bandeja con la solución de tinción (2 l de agua bidestilada + 2 gr de nitrato de plata $AgNO_3$ + 3 ml de formaldehído al 37%) y agitar suavemente durante 30 minutos. Sacar el gel de la bandeja y dejar escurrir unos segundos.

4- Colocar brevemente (entre 5 y 10 segundos) en una bandeja limpia con agua bidestilada y enjuagar. Repetir este paso 3 veces para remover el exceso de plata.

5- Colocar inmediatamente en la bandeja con solución de revelado fría (1 l de agua bidestilada + 30 gr de carbonato de sodio (Na_2CO_3), a 10ºC. Inmediatamente antes de usar, agregar 1,5 ml de formaldehído al 37% y 200 µl de tiosulfato). Proceder a la detención de la reacción una vez que se visualizaron nítidamente las bandas. Para ello, agregar ácido acético 10%. Finalmente enjuagar el gel dos veces con agua destilada durante 2 minutos y dejar secar a temperatura ambiente.