



**DETECCIÓN DE FUENTES NOVEDOSAS DE RESISTENCIA
GENÉTICA A FUSARIOSIS DE LA ESPIGA EN TRIGO PAN
(*Triticum aestivum* L.).**

ING. AGR. M.SC. LUCRECIA CRISTINA GIECO

**TESIS PARA OPTAR AL TÍTULO DE DOCTOR EN CIENCIAS
AGRARIAS**

**DIRECTOR
BIOL. DR. MARCELO HELGUERA**

AÑO 2018

**DETECCIÓN DE FUENTES NOVEDOSAS DE RESISTENCIA GENÉTICA A
FUSARIOSIS DE LA ESPIGA EN TRIGO PAN (*Triticum aestivum* L.).**

Lucrecia Cristina Gieco

Ingeniera agrónoma - Universidad Nacional de Entre Ríos

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Doctor en Ciencias Agrarias, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en INTA EEA Paraná e INTA EEA Marcos Juárez, durante el período comprendido entre 2012 y 2017, bajo la dirección de Dr. Marcelo Helguera.

Lucrecia Cristina Gieco

Marcelo Helguera

Defendida:de 20__.

Agradecimientos

A la Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario, a sus autoridades, Comité Académico y personal administrativo del Doctorado por admitirme como alumna de la carrera, y brindarme lo necesario para llegar a esta instancia, siempre con excelente predisposición.

Al Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria, por promover esta instancia de formación, y financiar la misma, a través del Programa de Posgrado y Perfeccionamiento, y los proyectos involucrados en la temática abordada en este trabajo de tesis.

A mi director, Marcelo Helguera, por su excelente predisposición, sugerencias y consejos durante todo el desarrollo del trabajo, y sus invalorable aportes a este manuscrito.

A Héctor Milisich, por brindarme su experiencia en mejoramiento de trigo, y sus consejos y opiniones al pensar la idea inicial de este trabajo de tesis.

A todo el 'grupo mejoramiento' de INTA Paraná, que de una forma u otra siempre estuvieron presentes, y especialmente les agradezco a Alberto Dittrich, Victoria Bessone y Ma.Gabriela Acosta, por su ayuda desinteresada en el laboratorio, y a Lorena Schutt por sus consejos sobre las inoculaciones.

A Leonardo Vanzetti, Mercedes Nisi y Lucio Lombardo, de INTA Marcos Juárez, que en diferentes etapas de este trabajo me brindaron una colaboración desinteresada, en el laboratorio y en el análisis final de los datos. Hicieron más sencillas algunas cosas.

A Belén Conde por sus sugerencias sobre el análisis estadístico de los datos, y su opinión sobre los mismos.

A mis compañeros de la cátedra de Genética y Mejoramiento Genético de la FCA UNER, que tuvieron tolerancia con mis tiempos.

A los evaluadores de la tesis, por sus valiosas sugerencias.

A César, Jazmín y Álvaro, con quienes resignamos tiempo compartido por esta tesis.

Publicaciones y presentaciones a congresos

- Gieco, L.C.; Dittrich, A.; Nisi, M.M. y Helguera, M. 2014. Detección de fuentes de resistencia a *Fusarium graminearum* SCHWABE. en trigo (*Triticum aestivum* L.). Journal of Basic & Applied Genetics, Volumen 25, Issue 1 Supp. ISSN: 1852-6233. XLIII Congreso Argentino de Genética. IV Reunión Regional SAG-La Pampa Patagonia. Sociedad Argentina de Genética. Bariloche, 19 – 20/10/2014.
- Gieco, L.C.; Dittrich, A.; Nisi, M.M. y Helguera, M. 2016. Detección de nuevas fuentes de resistencia genética a fusariosis de la espiga en trigo pan (*Triticum aestivum* L.). VIII Congreso Nacional de Trigo – VI Simposio de Cereales de siembra otoño invernal – II Reunión del Mercosur. Pergamino, Argentina – 14 al 16/09/2016.
- Schutt, L.; Gieco, L.; Milisich, H. 2016. Selección fenotípica a fusariosis de la espiga: una herramienta útil aplicada al mejoramiento genético. VIII Congreso Nacional de Trigo – VI Simposio de Cereales de siembra otoño invernal – II Reunión del Mercosur. Pergamino, Argentina – 14 al 16/09/2016.
- El instituto del CONICET de La Plata (IGEVE) entregó los datos del genotipado mediante el microarreglo de SNPs Axiom Wheat Breeder's Genotyping Array el 6 de mayo de 2017 (1 año y 5 meses después de lo acordado), motivo por el cual se debió postergar la publicación de resultados de este estudio hasta después de la presentación de este manuscrito.

Índice general

INTRODUCCIÓN	1
HIPÓTESIS	4
OBJETIVOS	4
REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA	5
Taxonomía y origen del trigo.....	5
Cultivo a nivel mundial y del país, importancia como alimento en un marco sustentable..	5
Fusariosis de la espiga, enfermedad fúngica de importancia económica para el trigo.....	7
Características del patógeno, ciclo de vida y condiciones predisponentes.....	10
Síntomas de la enfermedad.....	14
Mecanismos de resistencia.....	16
La influencia del ambiente.....	19
Fuentes de resistencia.....	20
Genética de la resistencia.....	22
Estrategias de estudio. Los marcadores disponibles.....	24
Resultados esperados.....	32
MATERIALES Y MÉTODOS	35
Material vegetal.....	35
Metodología seguida.....	36
1. Mapeo molecular. Construcción del mapa genético.....	36
1.1. Obtención de ADN.....	36
1.2. Exploración del polimorfismo de los progenitores y las RILs.....	37
1.3. Genotipado masivo de las RILs. Construcción del mapa genético.....	37
2. Caracterización fenotípica de la población: Inoculación con <i>F. graminearum</i>	38
2.1. Implantación de los ensayos.....	39
2.2. Inóculo empleado.....	39

2.3. Inoculación y observación de síntomas.....	40
2.4. Tratamiento estadístico de los datos.....	42
3. Detección de QTL.....	42
RESULTADOS	44
1. Genotipado de la población.....	44
1.1. Exploración del polimorfismo entre los progenitores.....	44
1.2. Genotipado de las RILs mediante el microarreglo de SNPs.....	44
2. Caracterización fenotípica de la población.....	49
2.1. Variación en la resistencia fenotípica para fusariosis de la espiga.....	49
2.2. Correlaciones entre ensayos.....	51
2.3. Análisis estadístico de los datos de las RILs.....	51
3. Detección de QTLs.....	53
3.1. Efecto individual de los QTLs.....	54
3.2. Interacciones entre QTL.....	57
3.3. Contribución de los dos principales QTLs detectados en este estudio a la severidad de espiga.....	58
DISCUSIÓN	62
1. Genotipado de la población.....	62
2. Caracterización fenotípica de la población.....	64
3. Detección de QTLs.....	66
4. Contribución potencial al mejoramiento genético de los principales QTLs de resistencia a FE detectados en este estudio.....	69
5. Identificación de QTLs de resistencia a FE utilizando datos fenotípicos máximos.....	70
CONCLUSIONES	74
BIBLIOGRAFÍA	76
ANEXO	91

Índice de tablas

Tabla 1. SNPs utilizados en la construcción de mapa genético organizados por grupo de ligamiento. Se detalla el número de SNPs validos e informativos y la longitud de cada grupo de ligamiento (cM).....	45
Tabla 2. Análisis de variancia de los valores de síntomas de severidad (%) de infección de las espigas de las dos variedades de trigo progenitoras de la población biparental estudiada, en los 3 ensayos de inoculación con <i>Fusarium graminearum</i> realizados	49
Tabla 3. Coeficientes de correlación de Pearson entre los ensayos experimentales donde se registró la variable severidad de infección de la espiga (fila superior) de la población de mapeo de trigo de Pampeano x BioINTA 1005, inoculada en invernáculo con <i>Fusarium graminearum</i> , y el respectivo nivel de significancia (fila inferior).....	51
Tabla 4. Test de normalidad de Shapiro Wilks de los residuos de la variable severidad de infección de la espiga de la población de mapeo de trigo de Pampeano x BioINTA 1005 inoculada en invernáculo con <i>Fusarium graminearum</i>	52
Tabla 5. Medidas de ajuste del modelo y significancia (p-value) del efecto fijo (RILs) de la variable severidad de infección de la espiga de la población de mapeo de trigo de Pampeano x BioINTA 1005 inoculada en invernáculo con <i>Fusarium graminearum</i>	53
Tabla 6. QTLs para severidad a la fusariosis de la espiga, detectados en la población Pampeano x BioINTA 1005 en 3 ensayos de inoculación puntual	54
Tabla 7. Análisis de varianza donde se muestra el efecto de los QTL y las interacciones en primer grado entre ellos, con su valor de significancia.....	57
Tabla 8. Efecto individual de los alelos alternativos en los 2 QTLs detectados en los cromosomas 6A y 7A, cuantificado por la severidad observada en las líneas portadoras de cada alelo.....	59
Tabla 9. Efecto combinado de los alelos alternativos en los 2 QTLs detectados en los cromosomas 6A y 7A, cuantificado por la severidad observada en las líneas portadoras de cada alelo.....	59
Tabla 10. Región próxima a los QTLs detectados en los cromosomas 6A y 7A en 12 RILs de buen comportamiento a FE.....	61
Tabla 11. Análisis de variancia de la severidad observada en los progenitores de la población de estudio, en los tres ensayos de inoculación.....	91
Tabla 12. Análisis de variancia. Modelos lineales generales y mixtos.....	92
Tabla 13. Severidad - Medias ajustadas y errores estándares para RILs. Test <i>LSD Fisher</i>	92
Tabla 14. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados	97

en el Ensayo 1.....	
Tabla 15. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 2.....	97
Tabla 16. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 3.....	97
Tabla 17. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados con los datos promedio de los 3 ensayos (EProm).....	98
Tabla 18. Análisis de la varianza considerando el efecto de los alelos alternativos en los 2 QTLs detectados en los cromosomas 6A y 7A, cuantificado por la severidad observada en las líneas portadoras de cada alelo.....	98
Tabla 19. QTLs para severidad a la FE, detectados en la población Pampeano x BioINTA 1005 en 3 ensayos de inoculación puntual con los datos de severidad máxima de los ensayos.....	99
Tabla 20. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 1, con los datos de severidad máxima de los ensayos.....	101
Tabla 21. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 2, con los datos de severidad máxima de los ensayos.....	102
Tabla 22. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 3, con los datos de severidad máxima de los ensayos.....	102
Tabla 23. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en EProm, con los datos de severidad máxima de los ensayos.....	103
Tabla 24. Coeficientes de correlación de Pearson entre experimentos para severidad de infección (fila superior) y nivel de significancia (fila inferior). Valores máximos de cada RIL en cada ensayo.....	103

Índice de figuras

Figura 1. Superficie sembrada y producción de trigo en la subregión 3 desde la campaña 1969/70 a 2015/16. (Fuente: MINAGRO).....	9
Figura 2. Rendimiento promedio del cultivo de trigo en la subregión 3 desde la campaña 2000/01 a 2016/17. Fuente: SIBER (BCERER).....	9
Figura 3. Ciclo de vida de <i>Fusarium graminearum</i> (fase sexual, <i>Giberella zeae</i>), agente causal de la fusariosis de la espiga en trigo. Extraído y modificado de Trail. 2009	11
Figura 4. Esquema de la anatomía de la espiga de trigo y las conexiones vasculares entre espiguillas vecinas.....	16
Figura 5. Evaluación de síntomas de severidad de la fusariosis de la espiga de trigo en la población de RILs de estudio (Pampeano x BioINTA 1005).....	41
Figura 6. Gráfico que presenta el número de entrecruzamientos (<i>crossovers</i>) que presentan las RILs de la población de mapeo de trigo Pampeano x BioINTA 1005 para la construcción del mapa de ligamiento.....	44
Figura 7. Mapa de ligamiento de la población de RILs de trigo del cruzamiento de Pampeano x BioINTA 1005.....	46
Figura 8. Histograma de distribución de frecuencias de la severidad observada en los 3 ensayos de inoculación puntual de espigas sobre la población de 124 RILs, generada de la cruce de Pampeano x BioINTA 1005.....	50
Figura 9. Histograma de frecuencias de los residuos de la variable severidad de infección de la espiga de la población de mapeo de trigo de Pampeano x BioINTA 1005, inoculada en invernáculo con <i>Fusarium graminearum</i>	52
Figura 10. QTLs identificados para severidad a la FE en la población Pampeano x BioINTA 1005 en 3 ensayos de inoculación puntual.....	55
Figura 11. Representación gráfica del efecto epistático entre los marcadores AX-94547709 y AX-94759165.....	58
Figura 12. a) Severidad promedio en cada ensayo de las RILs portadoras del alelo de Pampeano (B) o BioINTA 1005 (A) para los QTL detectados en los cromosomas 6A (izquierda) y 7A (derecha). b) Severidad promedio de las RILs portadoras de los alelos de Pampeano (B) y BioINTA 1005 (A) en los 3 ensayos de inoculación.....	60
Figura 13. QTLs identificados para severidad a la FE en la población Pampeano x BioINTA 1005 en 3 ensayos de inoculación puntual. Datos máximos.....	100
Figura 14. Representación gráfica del efecto epistático entre los marcadores a) AX-94975563 y AX-94927037, b) AX-94542864 y AX-95009696, c) AX-94756419 y AX-95634516 y d) AX-94542864 y AX-94761767.....	104

Abreviaturas

3ADON	3-acetyl-deoxinivalenol
15ADON	15-acetyl-deoxinivalenol
°C	Grados centígrados
ABCPE	Área bajo la curva de progreso de la enfermedad
ADN	Ácido desoxiribonucleico
AFLP	<i>amplified fragment length polymorphism</i> , Polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados
ANOVA	<i>analysis of variance</i> , Análisis de variancia
CAPS	<i>cleaved amplified polymorphic sequence</i> , secuencia polimórfica amplificada y cortada
CIM	<i>composite interval mapping</i> , mapeo por intervalo compuesto
cM	Centimorgan
CV	Coefficiente de variación
DARTs	<i>diversity array technology</i> , tecnología de microarreglos de diversidad
DAS	diacetoxiscirpenol
DBCA	Diseño en bloques completos aleatorizados
DON	Deoxinivalenol
EE	Error estándar
EEA	Estación Experimental Agropecuaria
EProm	Severidad promedio de los ensayos
FAO	Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura
FDA	Food and Drug Administration
FE	fusariosis de la espiga
FUS	fusarenona-X
INTA	Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria
LOD	log of odds (logaritmo de probabilidades)
MAGYP	Ministerio de Agroindustria
MAS	Monoacetoxiscirpenol
NGS	<i>next generation sequencing</i> , secuenciación de última generación
NIV	Nivalenol
PCR	<i>polymerase chain reaction</i> , Reacción en cadena de la polimerasa
QTL	<i>quantitative trait loci</i> , loci de caracteres cuantitativos
R ²	Coefficiente de determinación
RAPDs	<i>random amplified polymorphic DNA</i> , polimorfismo de ADN amplificado al azar
RFLP	<i>restriction fragment length polymorphism</i> , polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción
RIL	<i>recombinant inbred lines</i> , Líneas endocriadas recombinantes
SIBER	Sistema de información de la Bolsa de Cereales de Entre Ríos
SNPs	<i>single nucleotide polymorphism</i> , polimorfismo simple de un nucleótido
SSR	<i>simple sequence repeats</i> , secuencias simples repetidas
YGC	<i>Chloramphenicol glucose agar</i> , Agar extracto de levadura, Glucosa y Cloranfenicol

RESUMEN

DETECCIÓN DE FUENTES NOVEDOSAS DE RESISTENCIA GENÉTICA A LA FUSARIOSIS DE LA ESPIGA EN TRIGO PAN (*Triticum aestivum* L.)

En el cultivo de trigo (*Triticum aestivum* L.) la fusariosis de la espiga, causada por el hongo *Fusarium graminearum* Schwabe, está muy difundida y es altamente destructiva, afectando rendimiento, calidad e inocuidad del grano. La estrategia de control de ésta patología más efectiva y sustentable desde el punto de vista ambiental es la resistencia genética. En la actualidad existen escasas fuentes de resistencia, la mayoría provenientes del cultivar chino Sumai 3 u otros cultivares del mismo origen, con escasa adaptación en otras características agronómicas para nuestras condiciones de cultivo. En trabajos previos del grupo, se ha caracterizado fenotípicamente al cultivar brasileiro Pampeano como resistente a la dispersión de la infección.

Bajo la hipótesis de trabajo que el cultivar Pampeano posee factores novedosos de resistencia genética a la fusariosis de la espiga, cuya localización genómica difiere de aquellos identificados en el cultivar chino Sumai 3, para este estudio se planteó como objetivo general determinar la base genética de la resistencia a la fusariosis de la espiga del cultivar Pampeano utilizando una población derivada del cruzamiento entre Pampeano (resistente) y BioINTA 1005 (susceptible). Para ello se fijaron los siguientes objetivos específicos: i) elaborar un mapa genético de la población, mediante marcadores moleculares, ii) caracterizar fenotípicamente la población, frente a la infección con *F. graminearum*, y iii) localizar los determinantes genéticos (QTL, *Quantitative trait loci*) responsables de la resistencia a la fusariosis de la espiga. Para cumplir con estos objetivos se generó una población de 126 RILs producto del cruzamiento de Pampeano (Resistente) y BioINTA 1005 (Susceptible), mediante el método de conducción de descendencia de semilla única (SSD) hasta Filial 8. Las RILs obtenidas fueron genotipadas mediante el microarreglo de SNPs Axiom® Wheat Breeder's Genotyping Array de 35K obteniéndose una matriz de 2093 marcadores informativos con la que se construyó un mapa de ligamiento de 2827 cM integrado por 549 loci. La caracterización fenotípica de las RILs por su comportamiento para la resistencia a la dispersión del patógeno en la espiga se realizó en ensayos de inoculación puntual de espigas en invernáculo, con un diseño en bloques completamente aleatorizados, con 3 repeticiones. Un pequeño algodón embebido con una suspensión de inóculo de *F. graminearum* (5×10^4

esporos/mL) se ubicó en la flor de una espiguilla en antesis. Se llevaron a cabo 3 ensayos: abril 2014 (Ensayo 1), octubre 2014 (Ensayo 2) y abril 2015 (Ensayo 3). Se registró la severidad 21 días pos inoculación contabilizando las espiguillas con síntomas sobre las espigas totales, desde el punto de inoculación hacía abajo. Se controlaron la temperatura y la humedad, en cada ensayo, desde el comienzo de las inoculaciones y hasta la finalización de las evaluaciones, para asegurar condiciones predisponentes para el patógeno. Los resultados obtenidos de severidad mostraron en los tres ensayos una distribución cercana a la normal ubicándose los padres Pampeano (R) y Biointa1005 (S) en posiciones cercanas a los extremos de la curva. Las correlaciones entre ensayos fueron significativas y variaron entre 0.43 y 0.64, mostrándose una herencia compleja del carácter.

La integración de la información genotípica y fenotípica previa permitió la detección de QTLs de resistencia utilizándose para ello el programa Windows QTL Cartographer, y un LOD umbral 2, en función del tamaño de la población de estudio. Se identificaron QTLs de resistencia en 4 grupos de ligamiento, todos ellos de efecto menor en cuanto al porcentaje de variación fenotípica explicada. Los QTLs detectados en los cromosomas 2B y 3A (ambos provistos por Pampeano), mostraron baja estabilidad, ya que fueron identificados sólo en 1 ambiente de evaluación cada uno. Los QTLs detectados sobre los cromosomas 6A (Biointa1005) y 7A (Pampeano) mostraron mayor estabilidad, ya que fueron detectados en mayor número de ambientes cada uno. Los QTLs aportados por Pampeano coinciden con QTLs para la fusariosis de la espiga descritos en trabajos previos, mientras que el QTL presente en el cromosoma 6A y aportado por BioINTA 1005 es inédito. Por último, la combinación alélica favorable de los dos principales QTLs detectados en este estudio (6A y 7A) redujo un 7% la severidad en la población de estudio, lo que posiciona esta combinación de QTLs como una importante contribución al mejoramiento genético.

ABSTRACT

DETECTION OF NOVEL SOURCES OF GENETIC RESISTANCE TO FUSARIUM HEAD BLIGHT IN WHEAT BREAD (*Triticum aestivum* L.)

Scab is a destructive disease of wheat and Fusarium head blight (FHB) caused by *Fusarium graminearum* is one of the most important wheat (*Triticum aestivum* L.) diseases in the warm and humid regions of the world. At present, there are few sources of resistance, most of them from the Chinese cultivar Sumai 3 or other cultivars of the same origin, with limited adaptation to our growing conditions. Previously, in our working group the Brazilian cultivar Pampeano was characterized phenotypically as resistant to the dispersion of the infection in the spike.

The general objective of this study was to determine the genetic basis of the resistance to FHB observed in Pampeano cultivar using a population of RILs derived from the cross between Pampeano (resistant) and BioINTA 1005 (susceptible). The following specific objectives were set: i) to develop a genetic map of the population using molecular markers; ii) to characterize the population phenotypically against *Fusarium graminearum* infection; and iii) to locate the genetic determinants responsible for resistance to FHB. The genotypic characterization was performed using the Axiom® Wheat Breeder's Genotyping Array 35K obtaining 2093 informative loci that were used to build a 2827 cM genetic map. The phenotypic characterization was assessed by single floret inoculation in a greenhouse in three trials realized in 2014 y 2015. Obtained severity data showed a close to normal distribution with Pampeano (R) and BioINTA 1005 (S) flanking both edges. Correlation among trials was between 0.43 and 0.64 confirming the complex inheritance of the trait.

Integration of phenotypic and genotypic data allowed us the identification of four genomic regions associated with resistance to FHB on chromosomes 2B, 3A, 6A and 7A. The QTLs identified on chromosomes 2B and 3A (provided by Pampeano) were less stable as both were detected only in one evaluation environment, whereas the QTLs detected on chromosomes 6A (BioINTA 1005) and 7A (Pampeano) showed more stability as they were identified in more than one evaluation environment. Interesting, QTLs provided by Pampeano share similar location with previous studies while the 6A QTL coming from BioINTA 1005 is the first report. The favorable allelic combination of the two major QTLs detected in this study (6A and 7A) reduced 7% severity in the study population, so stacking the two QTLs in new cultivars by marker-assisted selection can be an important contribution to the breeding program.

INTRODUCCIÓN

El trigo (*Triticum aestivum* L.) es uno de los cereales más importantes a nivel mundial por su aporte, desde el punto de vista energético, a la alimentación mundial, tanto humana como animal.

Debido al incremento de la población mundial, es imperiosa la necesidad de incrementar la producción de alimentos. Considerando que la superficie destinada a la misma no podrá aumentar significativamente, es necesario optimizar la productividad por unidad de superficie.

No escapa a nuestro conocimiento los cambios ambientales a nivel global, con consecuencias en detrimento de los cultivos que se encuentran adaptados al crecimiento en determinadas áreas geográficas. Estos cambios, como aumento de las temperaturas medias o mayor ocurrencia de eventos meteorológicos extremos, traen aparejado cambios en cuanto a la presencia y presión de determinadas plagas y enfermedades, que encuentran condiciones predisponentes para su desarrollo.

El trigo se ve afectado durante su ciclo de cultivo por una serie de plagas y enfermedades, incidiendo en distinta medida y con distinta frecuencia sobre su potencial de rendimiento y calidad. Las enfermedades fúngicas son quizá las causantes de las mayores pérdidas de rendimiento por factores bióticos, afectando el área foliar (royas y manchas) o bien colonizando la espiga (fusariosis, carbones y caries). Sin dudas, en nuestra región, la fusariosis de espiga (FE), ocasionada por *Fusarium graminearum* es la principal enfermedad de la espiga, por los daños que ocasiona ante ataques severos, ya que coloniza los órganos florales, disminuyendo el número de granos viables y el desarrollo y llenado de los granos formados.

Para el aumento de la productividad de los cultivos, éstos deben protegerse frente a los patógenos. Existen fungicidas con diferente modo de acción y eficacia en el control de la FE, pero con el inconveniente de poseer este patógeno una ventana de aplicación muy reducida, y el agravante de que las condiciones predisponentes para la infección en cuanto a humedad, condicionan la posibilidad de hacer una aplicación del producto en el momento oportuno. Por otra parte, debemos pensar en afianzar una estrategia de producción agrícola sustentable, minimizando el uso de agroquímicos.

De lo anteriormente expuesto, se desprende que el desarrollo de cultivares con resistencia genética a la enfermedad es clave para lograr una estrategia efectiva para el control. En la actualidad, no poseemos en el mercado germoplasma adaptado a las condiciones locales, de buen rendimiento y resistencia a la fusariosis de la espiga.

Para desarrollar germoplasma resistente, es necesario contar con un método de *screening* capaz de diferenciar los genotipos por su nivel de resistencia, minimizando la variación ambiental, de modo que se vean maximizadas y se expresen las diferencias genéticas.

Como la resistencia del trigo a éste patógeno está regida por múltiples loci, es parcial e inespecífica, es necesario identificar regiones cromosómicas que posean genes asociados a la misma. Hace aproximadamente cuatro décadas que se llevan adelante investigaciones en este sentido mediante la utilización de marcadores moleculares de ADN, que han permitido avanzar en el conocimiento de la herencia de la resistencia.

Los primeros estudios, basados en tecnologías que aprovechan la propiedad de las enzimas de restricción para detectar polimorfismo de ADN entre genotipos diferentes combinada con la hibridación de hebras complementarias (RFLP por sus siglas en inglés), rápidamente fueron superados por otras técnicas más sencillas y económicas basadas en la reacción en cadena de la polimerasa, conocida como PCR por sus siglas en inglés o una combinación de ambas tecnologías, con las cuales se avanzó en la construcción de mapas de ligamiento por análisis de recombinaciones y con ellos la detección de regiones portadoras de alelos favorables para la resistencia.

A partir del siglo 21 se producen desarrollos tecnológicos que potencian de forma exponencial la capacidad de secuenciación y análisis de ADN combinado con una reducción muy significativa en los costos de estas tecnologías. Junto al desarrollo de la secuenciación masiva florecen las tecnologías de genotipado de alto caudal de marcadores que facilitan enormemente las estrategias de mapeo de genes de interés agronómico. De este modo, son numerosos los trabajos publicados de detección de factores de resistencia a FE, mediante el genotipado masivo con estas plataformas.

A pesar de la tecnología disponible para detectar regiones con genes de resistencia, no ha sido posible hasta el presente obtener un genotipo resistente a la enfermedad, de buen comportamiento agronómico, sanidad frente a otros patógenos importantes, y adaptado a las condiciones de nuestra región de cultivo.

El presente trabajo de tesis pretende investigar la base genética de un cultivar con características agronómicas similares al germoplasma difundido a nivel local, y seleccionado por su resistencia a la FE.

Se espera que los resultados alcanzados sean un aporte al programa de mejoramiento de trigo del INTA. La detección de QTL inéditos de resistencia a FE y la identificación de marcadores estrechamente ligados a esos QTLs puede contribuir a la piramidización de distintas fuentes de resistencia aditivas en nuevos genotipos como estrategia de desarrollo de resistencia durable frente a esta enfermedad.

HIPÓTESIS

El cultivar Pampeano posee factores novedosos de resistencia genética a FE, cuya localización genómica difiere de aquellos identificados en el cultivar chino Sumai 3.

OBJETIVO GENERAL

Determinar la base genética de la resistencia a FE del cultivar Pampeano utilizando una población derivada del cruzamiento entre Pampeano (resistente) y BioINTA 1005 (susceptible).

Objetivos específicos

1. Elaborar un mapa genético de la población, mediante marcadores moleculares.
2. Caracterizar fenotípicamente la población, frente a la infección con *Fusarium graminearum*.
3. Localizar los determinantes genéticos (QTL) responsables de la resistencia a FE.

REVISIÓN BIBLIOGRÁFICA

Taxonomía y origen del trigo

El trigo pan, *Triticum aestivum* es un alohexaploide ($2n = 4x = 42$ AABBDD), perteneciente a la Familia *Poaceae*, Tribu *Triticeae*, Sub-tribu: *Triticinae* y Género *Triticum*. El genoma hexaploide del trigo pan, es el resultado evolutivo de la hibridación de tres especies ancestrales diploides: *Triticum urartu* (aporta el genoma A), *Aegilops speltoides* (aporta el genoma B) y *Aegilops tauschii* (aporta el genoma D) (Petersen y col., 2006).

Se cree que la agricultura se originó en el Medio Oriente, cuando el trigo se cultivó por primera vez en la antigüedad. Existen varias evidencias arqueológicas para mostrar la presencia de granos de trigo carbonizados en los sitios neolíticos de Jarmo, en el norte de Irak, y en Europa Central y del Nordeste, que data del período 6.750 a. A 7.500 A.C. Estas y otras observaciones sugieren que el trigo se propagó rápidamente y ampliamente por toda Asia y Europa después de su domesticación en el Medio Oriente (Usha Rao y Pandei, 2007).

En la actualidad *T. aestivum* representa la mayor parte de la cosecha mundial de trigo y se cultiva desde Noruega y Rusia a 65 °N hasta Argentina a 45 °S (Dubcovsky y Dvorak, 2007).

El cultivo a nivel mundial y del país, importancia como alimento en un marco de sustentabilidad

El trigo pan tiene una producción mundial de 729 millones de toneladas (últimos datos publicados por la FAO en 2014, <http://faostat3.fao.org/download/Q/QC/E>), proporcionando junto al arroz, maíz y papa aproximadamente el 60 % del aporte calórico de la dieta en la población mundial (<http://www.fao.org/biodiversity/components/plants/en/>).

En Argentina, el área sembrada en el ciclo agrícola 2016/17 fue de 6,4 millones de hectáreas, cosechándose 5,6 millones de hectáreas, con una producción de 18,4 millones de toneladas (MINAGRO, 2016 <https://datos.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>).

Aunque se necesitan más alimentos debido al rápido crecimiento de la población humana, la calidad de los alimentos debe ser mejorada, particularmente por el incremento en el contenido de nutrientes. En adición, los insumos agrícolas deben ser reducidos (Tester y Langridge, 2010)

El mejoramiento y las prácticas agronómicas han alcanzado, en promedio, un incremento lineal en la producción de alimentos globales, a una tasa promedio de 32 millones de toneladas métricas por año. Sin embargo, para alcanzar el objetivo de un 70% más de alimento en 2050, de la declaración de la Cumbre mundial sobre seguridad alimentaria, se requiere un incremento promedio anual en la producción de 44 millones de toneladas métricas por año. Esta escala de aumento sostenido de la producción mundial de alimentos no tiene precedentes y requiere cambios sustanciales en los métodos de manejo agronómico y mejoramiento de los cultivos. El logro de este aumento en la producción de alimentos en un entorno estable sería un reto, pero es, sin duda, mucho más teniendo en cuenta las presiones adicionales generadas por los cambios ambientales globales (Tester y Langridge, 2010).

Ante el cambio ambiental global, son evidentes los efectos deletéreos, tales como eventos de daños por altas temperaturas, patrones alterados de sequías y nuevas presiones de plagas y enfermedades (Tester y Langridge, 2010).

El incremento estable en la productividad desde la revolución verde está asociado con el mejoramiento genético del potencial de rendimiento, resistencia a enfermedades y adaptación a estrés abiótico (Reynolds y col., 2009). Este potencial puede verse afectado por diversos factores, entre los que se pueden destacar los abióticos (fertilidad del suelo, disponibilidad hídrica, etc.) y los bióticos (plagas, enfermedades, etc.). Entre las enfermedades, las que provocan mayores pérdidas en rendimiento son aquellas causadas por hongos patógenos. El trigo posee un limitado número de patógenos fúngicos que tienen suficiente área de difusión y presión de inóculo para provocar limitantes en el rendimiento y la calidad del grano.

En este sentido se debe mencionar como enfermedades foliares a *Puccinia triticina* con efecto importante a moderado sobre el rendimiento, *Drechslera tritici-repentis* y *Septoria tritici* con efecto moderado a importante (Cordó, 2014), en enfermedades del tallo *P. graminis*, es la que provoca mayores daños de las royas que afectan al cultivo (Campos, 2014) y en la espiga *Fusarium graminearum* con un efecto importante sobre los

rendimientos, y *Ustilago tritici* y *Tilletia foetida*, con efectos bajos y moderados a importantes, sobre el rendimiento, respectivamente (Cordó, 2014).

Fusariosis de la espiga, enfermedad fúngica de importancia económica para el trigo

La FE es una enfermedad destructiva de cereales de grano pequeño como trigo, cebada, avena, centeno y maíz (Brown y col., 2010; Boutigny y col., 2011), reduciendo el rendimiento y la calidad (Kolb y col., 2001; Pritsch y col., 2000; Goswami y Kistler, 2004), lo cual causa dificultades para comercializar, exportar y procesar el grano infectado (Goswami y Kistler, 2004).

El hongo ascomicete *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo: *Gibberella zeae* (Schwein) Petch) es uno de los principales agentes causales de la enfermedad en Europa, Asia y América (Brown y col., 2010), aunque hay al menos 17 especies de *Fusarium* asociadas a esta enfermedad, de acuerdo a lo descrito por Parry y col. (1995). Del trabajo de revisión del mencionado autor, se desprende que son 3 las especies que predominan a nivel internacional: *F. graminearum* (*Gibberella zeae*), *F. culmorum* y *F. avenaceum* (*G. avenacea*). La distribución geográfica y la predominancia de las diferentes especies está relacionada con los requerimientos de temperatura: en regiones cálidas del mundo, *F. graminearum* es generalmente la especie más importante causal de la FE. En las regiones más frías, *F. culmorum* tiende a predominar, y *F. poae* y *Microdoctium nivale* asumen mayor importancia que en otras regiones. *F. avenaceum* ha sido aislado de espigas enfermas de zonas de un amplio rango climático, pero representa sólo una pequeña proporción de aislados de *Fusarium* (Parry, 1995).

En trigo, esta patología afecta el cultivo en Estados Unidos (Bourdoncle y Ohm, 2003; Argyris y col., 2005), Canadá (Argyris y col., 2005) y en otras partes cálidas y húmedas del mundo (McMullen y col., 1997, Rudd, 2001; Buerstmayr y col., 2002; Han y col., 2005; Klahr, y col., 2007, Tunali y col., 2012;). Se han producido epidemias graves y frecuentes en todo el mundo en los últimos 25 años, siendo esta enfermedad una amenaza creciente para la producción mundial de alimentos. Recientes brotes se informaron en Estados Unidos, Canadá, Europa, Asia, Australia y América del Sur (Kikot y col., 2010).

Los estudios de severidad de FE en Latinoamérica se han realizado principalmente en el cono sur, en las regiones templadas del norte de Argentina, sur de Brasil y Uruguay, que son las principales zonas productoras de cereales (van der Lee y col., 2015).

En la Argentina, las epifitias se registraron en las décadas de 1960, 1970, 1980 y 1990, registrándose pérdidas importantes en los años 1992, 1993, 1994, 2000 y, particularmente en el año 2001, en especial en la Subregión Triguera III (Entre Ríos) con pérdidas de rendimiento en grano de entre un 30 y 80% (Formento y Firpo, 2002). Esta zona tiene una probabilidad de ocurrencia de epifitias 30% mayor que en cualquier otra zona triguera del país (Canú, 2008). En las campañas agrícolas 2012 y 2014 las condiciones ambientales fueron predisponentes para el desarrollo de la enfermedad, observándose alta incidencia y severidad en cultivares susceptibles.

En trigo candeal (*Triticum dicoccoides* var. Durum) hubo epidemias severas en 1963, 1976, 1978 y 1985, en el sureste de la provincia de Buenos Aires (principal región productora de trigo candeal de Argentina), con pérdidas de hasta 70%, ocasionando en parte la reducción del área cultivada con esta especie, reemplazándola con trigo pan, de acuerdo a la revisión de Bainotti y col. (2013).

La región de cultivo de trigo en el país se subdivide en 7 sub regiones, cada una de ellas con sus características particulares de clima y suelos. En la sub región III (que comprende la provincia de Entre Ríos) las condiciones ambientales conductivas para el desarrollo de la FE se dan con mayor frecuencia e intensidad que en las demás subregiones. Debido a esto, a continuación se presentan datos de superficie sembrada y producción en esta subregión desde la campaña 1969/70 hasta el presente (Figura 1).

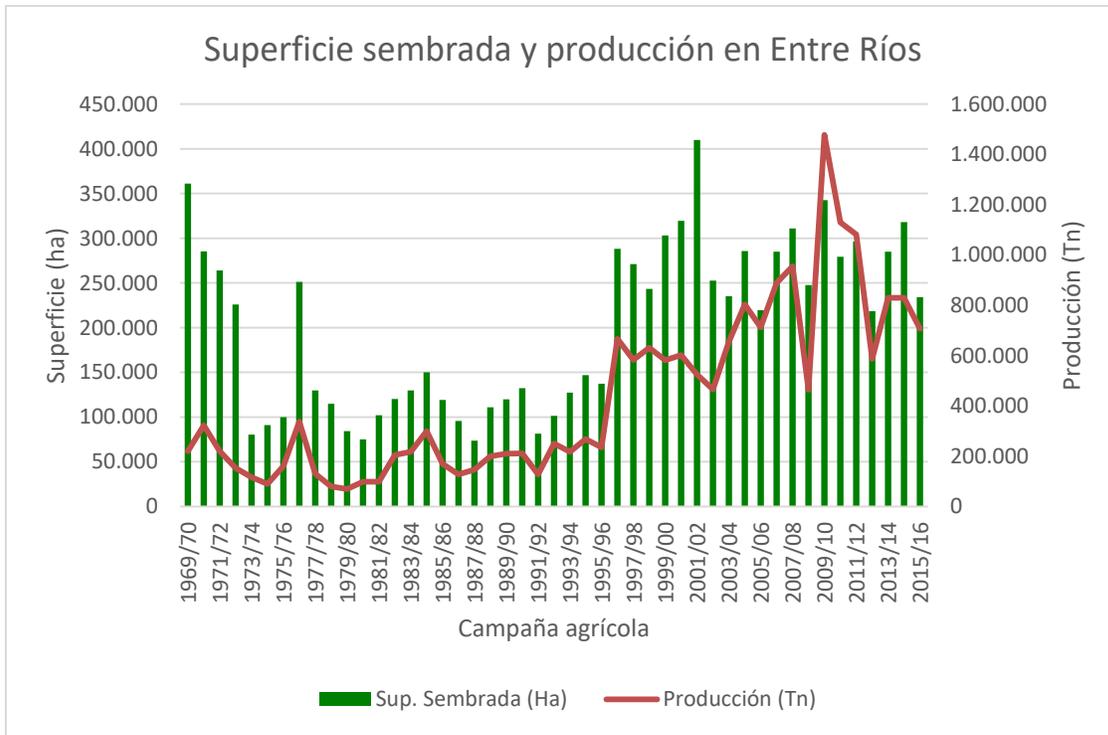


Figura 1. Superficie sembrada y producción de trigo en la subregión 3 desde la campaña 1969/70 a 2015/16. (Fuente: MINAGRO).

Y en la siguiente figura (Figura 2) se presenta el rendimiento promedio para la subregión desde la campaña 2000/01.

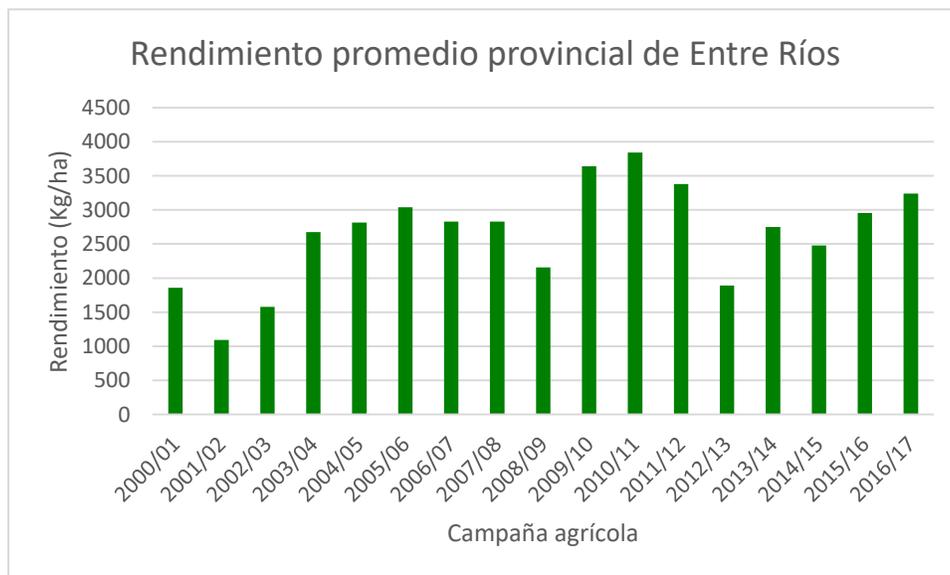


Figura 2. Rendimiento promedio del cultivo de trigo en la subregión 3 desde la campaña 2000/01 a 2016/17. Fuente: SIBER (BCERER).

De la información presentada en ambos gráficos se desprende que en la campaña 2001/02 la superficie sembrada fue la máxima (409.850 ha) de los últimos 47 años (Serie histórica de la Dirección de Estimaciones Agrícolas y Delegaciones del Ministerio de Agroindustria, <https://datos.magyp.gob.ar/reportes.php?reporte=Estimaciones>) y el rendimiento promedio para la subregión fue el mínimo (1092 kg/ha) de los últimos 17 años.

Las condiciones ambientales durante el ciclo de cultivo en esa campaña fueron predisponentes para que la enfermedad se presente como una epifitía. El Sistema de Información de la Bolsa de cereales de Entre Ríos (SIBER), indicaba que debido a las condiciones de excesos hídricos y alta humedad ambiente durante todo el desarrollo del cultivo de trigo, y especialmente al momento de espigazón, los ataques de enfermedades fúngicas (fusarium de espiga) fueron los determinantes de una disminución muy importante en los rendimientos de todos los cultivares (Informe Final Campaña 2001/02, http://centrales.bolsacer.org.ar/informes/campanias/2001_02/Informe_Final_2001_02.pdf).

Los resultados de esa campaña repercutieron negativamente en la siguiente, con una reducción de la superficie sembrada de un 38% y una disminución del 11% en la producción obtenida.

Características del patógeno, ciclo de vida y condiciones predisponentes

Los conidios de *Fusarium graminearum* y ascosporas de *Gibberella* transportados por el viento pueden depositarse sobre las anteras, germinar, colonizar el ovario, otras estructuras florales y el resto de las espigas (Formento y de Souza, 2004).

F. graminearum es un hongo homotático haploide que tiene tanto un ciclo de vida asexual como sexual (Figura 3). Wang (2015) describe este ciclo en forma detallada: En el ciclo asexual, este hongo produce esporas conocidas como macroconidios. Esos conidios son delgados, de paredes gruesas, curvados a recto, cónicos en ambos extremos, con cinco a siete septos o particiones. Se producen en clamidosporas globosas que son esporas de pared gruesa, aunque también se forman sobre el micelio. Las clamidosporas permiten que *F. graminearum* sobreviva a condiciones desfavorables y, por lo tanto, permite que el hongo permanezca en el suelo o sobre rastrojos hasta que la temperatura y la humedad adecuadas faciliten un nuevo ciclo de infecciones.

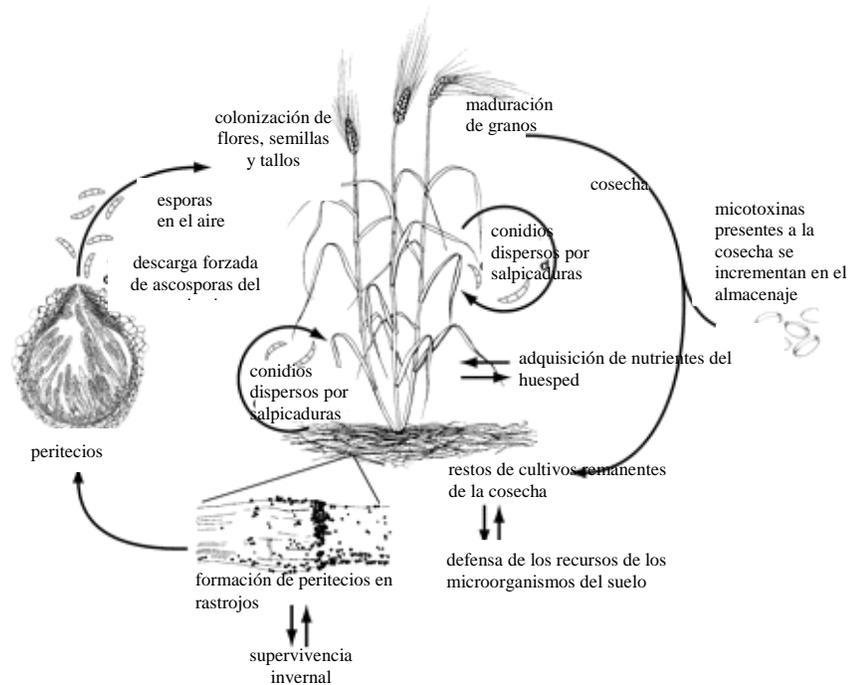


Figura 3. Ciclo de vida de *Fusarium graminearum* (fase sexual, *Gibberella zeae*), agente causal de la fusariosis de la espiga en trigo (extraído y modificado de Trail, 2009).

Generalmente, mientras que los macroconidios desempeñan un papel importante en la diseminación del agente patógeno por el viento, los microconidios y las clamidosporas son esenciales para la infección de los tejidos del huésped. Los macroconidios pueden ser transportados desde el suelo o las hojas infectadas a las espigas en floración por salpicado de lluvias o dispersión por el viento, lo que causa la FE.

De acuerdo con Del Ponte y col. (2007), ésta es la manera en que *F. graminearum* puede infectar los tejidos de la espiga desde la floración hasta las últimas etapas del desarrollo del grano. La infección de la flor se manifiesta inicialmente en lesiones acuosas que más tarde se convierten en un color rojo amarillento. Los puntos anaranjados formados en la superficie de la espiguilla infectada se denominan *sporodochium* y contienen muchos macroconidios. Además del crecimiento interno del micelio en los tejidos del huésped, la dispersión de macroconidios también puede iniciarse a partir de otras infecciones en la misma planta o de plantas vecinas.

La etapa sexual comienza a partir de pequeños cuerpos redondos negro-azulados sobre los rastrojos, denominados peritecios. Se ha reportado que los peritecios mantienen la viabilidad por más de 16 meses y son abundantes en la primavera y en condiciones

húmedas y cálidas favorables para su maduración ocasionando la liberación de ascosporas. Las ascosporas son las esporas sexuales que serán dispersadas por el viento, la lluvia o los insectos y causan la enfermedad inicial de las partes aéreas de las plantas (Agrios, 2004).

El riesgo de epidemias por FE adquieren mayor importancia cuando se encuentra una abundante cantidad de inóculo en el rastrojo y el suelo, acompañado con ambiente cálido y húmedo en el momento (Buerstmayr y col., 2002) y posterior a la antesis (Bai y Shaner, 2004). Son necesarias 48 horas de precipitación pluvial consecutivas y una temperatura de entre 20 y 25 °C (Parry, 1995, Canú, 2008). McMullen y col. (1997), concluyen que un ambiente cálido y húmedo durante la antesis y maduración del cultivo puede favorecer el desarrollo de la FE.

Según Del Ponte y col. (2007) hay falta de consenso sobre el tamaño exacto de la ventana fenológica de vulnerabilidad a la enfermedad, y especialmente para la acumulación de DON en los granos. Algunos autores demostraron que la infección ocurre principalmente en antesis, con las anteras como el sitio principal de infección (Parry, 1995).

Sin embargo, otros autores han observado una ventana de infección más extendida, con el pico de mayor susceptibilidad luego de antesis (Andersen, 1948; Schroeder and Christensen, 1963). En una publicación mucho más reciente, Reis y col. (2016), concluyen que el período predisponente a la infección abarca desde el inicio de la floración hasta estado masoso, es decir, estados 60 a 75 de la escala de Zadoks (1974). De acuerdo a lo descrito por Reis y col. (2016) durante todo este período, las anteras se encuentran expuestas o parcialmente expuestas al inicio del período y parcialmente expuestas al final del período considerado.

La FE ocasiona pérdidas económicas por la disminución del rendimiento como y también por la reducción en la calidad del grano (Shroeder y Christensen, 1963; Bai y Shaner, 1994). La calidad se ve afectada tanto por la degradación del almidón y otras proteínas (Snijders, 2004) como por la contaminación con diversas micotoxinas (metabolitos secundarios de ciertos géneros de hongos).

Las principales toxinas asociadas al género *Fusarium* son los tricotecenos, que son metabolitos sesquiterpenoides, biológicamente activos, de bajo peso molecular y de elevada termoestabilidad. Estas moléculas son tóxicos potentes de las células eucarióticas y causan lesiones dérmicas, alteraciones de la respuesta inmunológica e

inhibición de la síntesis de macromoléculas, con acción letal en dosis altas. Podemos mencionar entre estos tricotecenos al diacetoxiscirpenol (DAS), al monoacetoxiscirpenol (MAS), deoxinivalenol (DON), 3 acetilDON (3-ADON), 15 acetil-DON (15-ADON); nivalenol (NIV); fusarenona-X (FUS) (Martinez y col., 2014; Kang y Buchenauer, 1999) de preocupación para la producción animal y salud humana (Bai y Shaner, 1994; Snijders, 2004; Klahr, y col., 2007).

Todas estas micotoxinas ocasionan contaminación aun con niveles bajos de infección, siendo esto de importancia relevante en el uso posterior del producto. En Argentina, el principal agente causal, que como ya se mencionó es *F. graminearum*, posee predominantemente el genotipo que produce 15-ADON (Reynoso y col., 2011; Castañares y col., 2014; Malbran y col., 2014; Alvarez y col., 2009; van der Lee y col., 2015).

Como lo exponen Martinez y col. (2014) la Food and Drug Administration (FDA) (<http://www.fda.gov>) de EEUU establece como valor de advertencia el de 1 µg/kg de DON para las harinas de trigo, encontrando estos autores que de un relevamiento realizado en muestras de trigo cedidas por un molino harinero de la campaña 2012/13, un 24 % de las mismas superaron ese valor. Tal como concluyen en el trabajo, todas las muestras de trigo analizadas fueron comercializadas, con el riesgo para la salud que ello implica.

La acumulación de la micotoxina en los granos es influenciada por varios factores, incluyendo la resistencia del hospedante, quimiotipo, agresividad de las especies fúngicas prevalentes, y el ambiente (principalmente temperatura y humedad) durante el desarrollo de la enfermedad (Del Ponte y col., 2007). Las diferentes micotoxinas tienen diferentes propiedades toxicológicas. El NIV es más tóxico que el DON para los seres humanos y los animales domésticos y el Comité Científico Europeo para la Alimentación Humana ha emitido un límite más estricto para la ingesta diaria tolerable temporal de NIV (0,7 µg / kg de peso corporal) que para DON (1 µg / kg) (EFSA CONTAM Panel 2013, citado por van der Lee y col., 2015).

Además de la importancia de tener bajos coeficientes de infección a campo, para impedir caídas de rendimiento en situaciones favorables a la enfermedad, la selección de germoplasma resistente ayuda a impedir un daño indirecto como es la acumulación de micotoxinas. La selección por bajos niveles de infección seleccionará indirectamente por baja acumulación de DON (Snijders, 2004).

Los tratamientos con fungicidas y las prácticas de manejo agrícola reducen los daños, pero se continúan observando pérdidas significativas en rendimiento y calidad.

El hongo *F. graminearum* sobrevive saprofiticamente en residuos de granos pequeños y maíz. Se han propuesto varias prácticas culturales para eliminar las fuentes de inóculo primario. La adopción de labranza mínima para la conservación del suelo reduce las opciones en estas técnicas de manejo. Los tratamientos de semilla y las aplicaciones foliares de fungicidas en anthesis pueden proporcionar cierta protección. Varios fungicidas están registrados para su aplicación en trigo y cebada al final de la temporada. El costo del tratamiento, la dificultad de determinar el momento óptimo de aplicación, y la falta de fungicidas registrados altamente eficaces, han limitado el uso de la protección química contra la FE. Aún si un fungicida reduce las pérdidas directas de rendimiento, no puede reducir la contaminación con micotoxinas a niveles tolerables para consumo humano (Bai y Shaner, 2004).

Ramirez y col. (2004) estudiaron el efecto de fungicidas triazoles, imidazoles y estrobilurinas, y aunque los fungicidas tienen diferentes modos de acción, todos fueron capaces de inhibir el crecimiento fúngico en casi todas las condiciones ensayadas. Sólo dos fungicidas triazoles durante el estudio *in situ*, en dos condiciones diferentes mostraron estimulación del crecimiento. Todos los fungicidas mostraron estimulación o reducción de DON en al menos una de las condiciones ensayadas, y esa estimulación o reducción de la producción de DON en presencia de fungicidas está influenciada por interacciones complejas entre actividad del agua, temperatura, concentración de fungicida y tiempo de incubación.

En consecuencia, el desarrollo de cultivares con resistencia genética a la enfermedad es el componente clave en una estrategia efectiva para el control de la FE (Gervais y col., 2003). Desafortunadamente no se encuentran disponibles aún en el mercado suficientes materiales adaptados a condiciones locales, con buen rendimiento y con buenos niveles de resistencia genética a FE.

Síntomas de la enfermedad

Los síntomas típicos de infección por *Fusarium* muestran lesiones castañas y acuosas en las espiguillas y pérdida de clorofila en la espiguilla y el raquis (Pugh y col., 1933; Parry y col., 1995; McMullen y col., 2008; Nicholson y col., 2007), con una decoloración que se extiende en todas los sentidos de la espiga. Pugh y col. (1933) encontraron que la

progresión de la infección seguía la progresión general de anthesis, comenzando en el centro de la espiga y progresando hacia la punta y a base de la misma. Los síntomas también se propagarán por todo el raquis, tanto apical como basalmente desde el punto de infección. El micelio externo se extiende desde la espiguilla originalmente afectada hacia las espiguillas adyacentes, con condiciones ambientales óptimas.

Si el ambiente es húmedo y cálido, un desarrollo fúngico de color rosa salmón a naranja será visible en las espigas afectadas y a lo largo del borde de las glumas o la base de la espiguilla (Parry y col., 1995). La coloración marrón oscura del raquis y el tejido del tallo coincide con la obstrucción del tejido vascular y la subsiguiente obstrucción de la translocación de agua y nutrientes, lo que puede provocar que las espigas maduren prematuramente (Bai y Shaner, 1994; Nicholson y col., 2007).

Los granos infectados con *Fusarium* suelen ser de color tostado, castaño o castaño oscuro, y delgados o aplanados debido a la escasez de agua y nutrientes (Tekauz y col., 2000). Las infecciones avanzadas muestran peritecios negros en la superficie de los granos (Tekauz y col., 2000; Steffenson y col., 2003). La FE es fácil de reconocer en el campo porque tiene síntomas muy particulares y coloración típica de las espigas enfermas que contrastan con el resto de las mismas verdes.

En el trabajo histológico llevado adelante por Brown y col. (2010) encontraron que el frente de avance de la infección en el raquis se encontraba únicamente en el apoplasto de la corteza y no en la vasculatura como se había descrito anteriormente, de acuerdo a lo citado por Miller y col. (2004); Ribichich y col. (2000); Tu (1950). En el frente de la infección, las células del parénquima de la corteza rodeadas de hifas intercelulares no habían plasmolizado y todavía contenían organelos. Además, las hifas adoptaron la forma de los espacios intercelulares, a menudo en las uniones de células corticales vecinas, tomando una forma triangular en lugar de alterar las células huéspedes circundantes. Este modo de colonización recuerda el de la endófito estrechamente relacionada *Epichloe festucae*. Muy cerca del frente de avance de la infección, los núcleos de las células corticales del huésped se agrandaron y se redondearon. Posteriormente, el citoplasma apareció granuloso y la célula huésped plasmolizada. No está claro si esta muerte de la célula huésped fue programada o fue el resultado de la necrosis.

En un estudio anterior, Desmond y col. (2008) demostraron que el DON causa la muerte celular en trigo y que la misma estuvo asociada con la degradación del ADN genómico, una señal de muerte celular programada en plantas y otros eucariotas. Sus

experimentos sugieren que el nivel de producción de DON afecta la respuesta celular de forma que puede promover el crecimiento de hongos necrotróficos iniciando la muerte celular programada o reducir el crecimiento del hongo por desencadenar la expresión de genes de defensa y la acumulación de proteínas antimicrobianas.

La siguiente figura (Figura 4, tomada y modificada de Brown y col., 2010) esquematiza el progreso de la infección en la espiga.

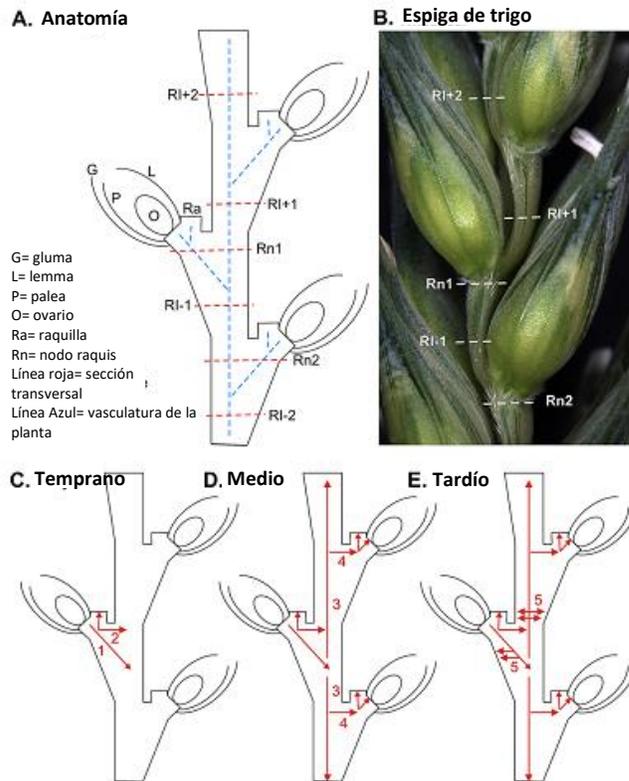


Figura 4. Esquema de la anatomía de la espiga de trigo y las conexiones vasculares entre espiguillas vecinas. (A). Espiga de trigo, cultivar Bobwhite, mostrando las posiciones de las secciones transversales **(B)**. Esquema de la trayectoria de la infección fúngica, desde la espiguilla inoculada (10) hasta las espiguillas vecinas (9, abajo y 11, arriba), en los puntos temporales temprano **(C)**, medio **(D)** y tardío **(E)**. Leyenda: líneas punteadas azules = vasculatura de la planta. Flecha roja = dirección general de la infección fúngica, número rojo = etapa de infección fúngica descrita en este estudio. 1, crecimiento vertical de hifas intra e intracelular en la corteza y vasculatura, desde la espiguilla inoculada hasta el raquis. 2, crecimiento lateral de hifas intracelulares a través del esclerenquima en el raquis. 3, crecimiento hifal vertical arriba y abajo del raquis, colonización intercelular de la corteza seguida por colonización intracelular de la corteza y vasculatura. 4, crecimiento lateral de hifas intercelulares debajo del tejido esclerenquimático en el nodo raquídeo no inoculado. 5, aumento del crecimiento lateral de las hifas, acumulación bajo la superficie, rotura de la epidermis y producción de un micelio aéreo.

Mecanismos de resistencia

En cuanto a los mecanismos de resistencia desarrollados por el organismo hospedador pueden clasificarse en activos o pasivos (Mesterhazy, 1995). Los primeros están asociados a caracteres fenotípicos tales como altura de planta, presencia de aristas, densidad de espiguillas, período de floración (Mesterhazy, 1995; Pritsch y col., 2000; He y col., 2014; Prat y col., 2014). Dentro de los mecanismos activos de resistencia, se propusieron cinco tipos: la resistencia a la infección inicial (resistencia tipo 1) y la resistencia a la dispersión de la infección dentro de la planta (resistencia tipo 2) (Schroeder y Christensen, 1963; Argyris y col., 2005), a la infección del grano (resistencia tipo 3), tolerancia (resistencia tipo IV), y a la micotoxina deoxinivalenol por descomposición de la misma (resistencia tipo V) (Snijders y Perkowski, 1989; Mesterházy, 1995).

Los más comúnmente aceptados y estudiados son tres de los mencionados: a la infección primaria, a la dispersión dentro de la espiga y a la acumulación de micotoxinas en granos infectados (Schroeder y Christensen, 1963; Yu, 2007; He y col., 2014).

Diferentes procedimientos de inoculación nos permiten testear para componentes específicos de resistencia. La inoculación por aspersión permite evaluar la resistencia de tipo 1 mediante el registro de la incidencia de la enfermedad, es decir, el porcentaje de las espigas que presentan síntomas de FE. La resistencia de tipo 1 se considera difícil de evaluar, y los estudios en los que utilizan la inoculación por aspersión se focalizan en general en la evaluación de la severidad de la enfermedad (porcentaje de espiguillas enfermas por unidad de superficie) que abarca resistencia de tipo 1 y tipo 2 (Buerstmayr y col., 2012). Si bien se considera que la inoculación por aspersión imita las condiciones naturales de infección, las evaluaciones pueden sufrir los efectos ambientales y son, por tanto, propensas a las interacciones genotipo x ambiente (Fuentes y col., 2005; Ma y col., 2006).

Por otra parte, los programas de mejoramiento frecuentemente emplean inoculación por aspersión para evaluar gran cantidad de material en el campo, con el desarrollo de protocolos para sus necesidades particulares. La dispersión de granos con inóculo es otro método usado para la evaluación de gran cantidad de material en evaluaciones a campo. Los protocolos desarrollados para este método son similares a los desarrollados para la inoculación por aspersión, con la excepción que el inóculo proviene

de granos precolonizados que han sido desparramados en el campo. Este método probablemente sea lo más cercano a simular una epidemia natural (Rudd y col., 2001).

La medición de la resistencia de tipo 3 (resistencia a la infección del grano) se realiza mediante análisis químico de muestras de granos. Los ensayos para la obtención de las muestras de grano se realizan típicamente en invernáculo para que las condiciones para la infección sean cuidadosamente controladas, y minimizar el efecto de la interacción genotipo ambiente (Yu, 2007).

Si nos centramos en la resistencia de tipo 2, ésta es típicamente evaluada en invernáculo inoculando una espiguilla central de una espiga en anthesis y cuantificando el progreso de los síntomas de la enfermedad desde el punto de inoculación. De acuerdo a van Ginkel y col. (1996) este es el momento y lugar ideal para provocar la infección. Se han desarrollado varios métodos de inoculación puntual. De 4 a 10 espigas por genotipo evaluado son las que usualmente se inoculan.

Típicamente, una única flor central es inoculada en anthesis con 5 a 10 ml de una suspensión de esporas con una concentración de 50000 macroconidios / ml. Ésta concentración es la más comúnmente utilizada, pero se han reportado otras concentraciones (Shen y col. (2003), Semagn y col (2007), Stein y col. (2009), Shin y col (2014)).

El inóculo es colocado en la flor con una jeringa repetitiva automática, aguja, o un pequeño trozo de algodón empapado en el inóculo (Bekele, 1985), o un grano de mijo *Setaria italica* (L.) P. Beauv. colonizado (revisado en Rudd y col., 2001). La humedad se mantiene para facilitar la infección y el desarrollo de la enfermedad, cubriendo la espiga individual o toda la planta con una envoltura de plástico o manteniendo la humedad mediante un sistema de niebla.

De acuerdo con van Ginkel y col. (1996) éste método de inoculación es confiable, no daña los órganos reproductivos y está bien adaptado para estudios cuantitativos.

El progreso de la enfermedad se registra mediante el recuento del número de espiguillas enfermas luego de la inoculación. Tanto la frecuencia y el momento del registro de datos varían de un programa a otro. En algunos programas, varias observaciones se hacen y se calcula el área bajo la curva de progreso de la enfermedad (ABCPE). En otros casos, los síntomas se registran sólo una vez, típicamente de 14 a 21 días después de la inoculación dependiendo del progreso de la enfermedad en el testigo susceptible. Algunos

programas luego cosechan y trillan las espigas inoculadas en la madurez para evaluar la calidad de los granos (Rudd y col., 2001).

En trigo tetraploide, la mayoría de los estudios realizados se han basado en la evaluación de resistencia de tipo 2, la cual está menos sesgada por variaciones ambientales, como los experimentos se instalan generalmente en invernáculos con mejor control de las condiciones y se puede evitar el escape de la enfermedad debido a que el inóculo se coloca directamente en las espiguillas (Prat y col., 2014).

La influencia del ambiente

En todo el mundo, los cambios climáticos afectan simultáneamente el crecimiento de los cultivos agrícolas y la incidencia y severidad de las epidemias de enfermedades de los cereales (Skelsey, 2015). Los factores ambientales pueden tener influencia en la expresión de ciertas características morfológicas, introduciendo variación entre ambientes y a través de los años.

Las fuertes interacciones genotipo - ambiente asociadas a la resistencia a la FE (Campbell y Lipps 1998; Fuentes y col, 2005) complican la evaluación fenotípica y el análisis genético de esta resistencia. El análisis de QTLs puede permitir la identificación de regiones genómicas asociadas con la resistencia, y los marcadores ligados a esas regiones pueden usarse en un esquema de selección asistida por marcadores moleculares, sin la preocupación adicional de los efectos ambientales (Chu y col., 2011).

Mesterhazy (1997) en su trabajo sugirió que los genotipos fueran evaluados al menos 2 o 3 años (ambientes) antes de sacar conclusiones con respecto a su reacción a esta enfermedad, que posee una alta influencia ambiental. La estabilidad de la reacción de un genotipo en diferentes ambientes de evaluación también es importante (Fuentes y col., 2005), considerando que la estabilidad de la resistencia es otro problema clave (Mesterhazy y col., 1999).

En un trabajo previo Mesterhazy (1995) postula que la estabilidad de las reacciones de la enfermedad dependería del nivel de resistencia o estabilidad del genotipo. Genotipos altamente resistentes parecen ser estables, por ejemplo, ellos permaneces sanos bajo prácticamente todas las condiciones epidémicas, o en ellos solo se desarrollará una leve infección y la inestabilidad será mayor a mayor susceptibilidad.

El medio ambiente afecta significativamente la evaluación fenotípica de la enfermedad (Bai y Shaner, 2004), por lo que los marcadores moleculares pueden resolver los problemas asociados con la evaluación fenotípica de la enfermedad y permitir combinar genes de resistencia de diferentes fuentes a través de la selección asistida por marcadores (Bai y Shaner, 2004).

Las técnicas de *screening* para FE pueden ser tan diversas como los programas que las utilizan. Los objetivos del trabajo, el nivel de precisión necesario, el número de líneas bajo evaluación y los recursos disponibles son todas consideraciones importantes para elegir una técnica. Lo que es común a todas las técnicas es la inoculación en antesis y proveer un ambiente favorable para la infección y desarrollo de la enfermedad. Algunos programas de mejoramiento utilizan un solo aislado agresivo en su programa de selección. Otros programas, teniendo en cuenta que la agresividad de los aislados pueden estar afectados por el ambiente, utilizan una mezcla de aislados.

En este sentido, van Eeuwijk y col., en 1995 concluyen que cualquier cepa razonablemente agresiva, es satisfactoria para los fines de selección.

Fuentes de resistencia

En cuanto a las fuentes de resistencia genética conocidas hasta el momento, no se conocen fuentes de resistencia completa, y las actualmente conocidas solo proporcionan resistencia de tipo parcial (Rudd y col., 2001).

En China, se identificaron 32 accesiones con elevado nivel de resistencia, de 17 mil testeadas. Desafortunadamente, la mayoría de las accesiones resistentes fueron poblaciones locales (*landraces*) demasiado altas, con espigas pequeñas, ciclos muy largos y otras características agronómicas indeseables. Algunas de esas *landraces* fueron usadas como progenitores en programas de mejoramiento, pero fue difícil incorporar la resistencia en líneas elite (Bai y Shaner, 2004), debido al trabajo que se requiere para recuperar el genoma mejorado.

Las mayores fuentes de resistencia a FE utilizadas en los programas de mejoramiento de todo el mundo son Sumai 3 (Funu/ Taiwan Wheat) y Ning7840 (Aurora/Anhui 11//Sumai 3) o algún otro cultivar derivado, como Alsen (ND 674// ND 2710/ ND 688, donde ND 2710= Sumai 3/ Weaton/ Grandin).

El cultivar primaveral Sumai 3, incluyendo las líneas derivadas tales como Ning 7840, es sin duda la fuente más utilizada de la resistencia a FE en el mundo y es ciertamente la mejor caracterizada (Rudd y col., 2001, Badea y col., 2008). Este cultivar ha sido calificado como resistente o altamente resistente por los programas de mejoramiento de todo el mundo donde ha sido usado. Los problemas asociados con el uso del mismo, como progenitor en un programa de mejoramiento, incluyen la alta susceptibilidad a otros patógenos y el desgrane. Hay diferentes selecciones de Sumai 3 diseminadas en el mundo, con diferencias en la resistencia para *Fusarium* y otras características agronómicas (Rudd y col., 2001). Buena parte del buen comportamiento de Sumai 3 frente a la FE es explicada por un QTL mayor ubicado en el cromosoma 3BS denominado *Fhb1* (Xie y col., 2007).

Nyubai es un cultivar japonés moderadamente resistente que explica más del 30% de la varianza fenotípica para la resistencia de tipo 2. El QTL *Fhb1* de Nyubai fue mapeado en el mismo locus que el QTL *Fhb1* derivado de Sumai 3, pero con diferentes tamaños de alelos. Es una potencial fuente alternativa de resistencia al ampliamente usado cultivar chino Sumai 3 (Gunnaiah y col., 2012).

Lamentablemente, la dependencia de unas pocas fuentes de resistencia puede resultar en una eventual erosión de la efectividad de los genes involucrados (Shaner y Buechley, 2001; McCartney y col., 2004).

Con el objetivo de evitar la completa dependencia en una o pocas fuentes de resistencia, Yu y col. (2006) caracterizaron cultivares y *landraces* asiáticas en base a AFLPs y SSR asociados a los QTLs de Sumai 3. Encontraron que algunas de las accesiones analizadas con altos niveles de resistencia tendrían *loci* de resistencia diferentes a los de Sumai 3. De manera similar, Yang y col. (2006) determinaron la relación entre la resistencia de Sumai 3 y nuevas fuentes, usando cinco marcadores SSR asociados a los QTLs de Sumai 3 de los cromosomas 3BS y 6BS.

Otras fuentes de resistencia que han sido ampliamente utilizadas incluyen Frontana de Brasil y Nobeoka Bouzu de Japón (Rudd 2001, Badea y col., 2008).

Aunque la resistencia en algunos cultivares es frecuentemente solo intermedia, son fuentes atractivas para los mejoradores porque se generan poblaciones segregantes que están adaptadas, tienen resistencia a fusariosis por combinación de genes presentes en ambos progenitores y tienen aceptables características agronómicas y de calidad. Algunas de esas fuentes de resistencia fortuitas incluyen el cultivar 2375 usado

primeramente, en la región de trigo primaveral de estados Unidos, y Ernie y Freedom usados en la región este de trigos invernales rojos blandos de Estados Unidos (Rudd y col., 2001). Otra fuente de resistencia es el cultivar 2710.

Algunos programas han explorado especies emparentadas silvestres buscando resistencia a FE pero estos esfuerzos han tenido un éxito limitado (Rudd y col., 2001; Bai y Shaner, 2004). Aproximadamente 6000 accesiones de especies emparentadas fueron testeadas en China a principios de 1980, pero ninguna mostró alto nivel de resistencia a FE (Bai y Shaner, 2004)

El cultivar brasilero Pampeano (ORL 91274/ ORL 93807// ORL 95711 “s”, donde ORL 95711 “s”= BR35// BR14*2/ Sumai 3/ OR1) si bien tiene en su pedigree a Sumai 3, tendría otros factores de resistencia, ya que estudios previos (Canú, 2008) han mostrado que no posee el QTL *Qfhs.ndsu-3BS*, y sin embargo, muestra una resistencia tipo 2 similar a Sumai 3 y Alsen. En el trabajo citado anteriormente, de acuerdo a los resultados de distancias genéticas estimadas con el mapeo de los sectores cromosómicos 3BS, 5AS y 6BS, más los datos de severidad observados, Pampeano mostró baja probabilidad de compartir regiones cromosómicas con Sumai 3, a pesar de estar emparentado como ya se mencionó anteriormente.

Además, los resultados obtenidos en el trabajo de Alves y col., 2013, les permiten concluir que Pampeano, junto a un reducido grupo de los genotipos ensayados, presentó valores de severidad, porcentaje de granos fusariosos y área bajo la curva de progreso de la enfermedad que demuestran el potencial de este cultivar para ser utilizado como fuente de resistencia tipo 1 y 2.

Genética de la resistencia

Numerosos estudios sobre la genética de fuentes conocidas de la resistencia a FE definen la herencia del carácter como compleja (Rudd 2001, Buerstmayr y col., 2009, Niwa y col., 2014). Diversos autores han reportado tanto herencia oligogénica (van Ginkel y col., 1996, Singh y col., 1995) como poligénica (Bai y Shaner, 1994, Gervais y col., 2003, Mesterházy y col., 2005) para factores de resistencia asociados a la FE.

Además, existe considerable evidencia que prueba la segregación transgresiva en la resistencia a fusariosis (Snijders, 1990, Jiang y col., 1994, Waldron y col., 1999). El cultivar Sumai 3 (mencionado en el punto anterior como uno de los principales dadores de resistencia a nivel mundial) deriva de un cruzamiento de dos líneas con niveles

intermedios de resistencia. Por su parte, el cultivar Ernie fue seleccionado de la progenie de dos líneas moderadamente susceptibles (McKendry et al., 1995). van Ginkel y col. (1996) reportaron que tanto Frontana como Ning 7840 tenían cada uno dos genes dominantes y que parte de la progenie del cruzamiento entre ellos mostró segregación transgresiva, es decir mayor resistencia que cualquiera de los parentales. Estos autores proponen en su trabajo que estos cultivares poseen dos o tres genes de resistencia cada uno. Por su parte, Singh y col. (1995) postularon que Frontana tendría 3 genes de resistencia.

Estudios posteriores corroboraron que la resistencia a la FE es un carácter cuantitativo controlado por múltiples genes, lo que dificulta la determinación de mecanismos de resistencia y la obtención de cultivares resistentes (Zhang y col., 2011). Mediante diversas técnicas de mapeo con marcadores moleculares, se ha identificado un QTL de efecto mayor localizado en el brazo corto del cromosoma 3B (Anderson y col., 2001; Bai y col., 2003; del Blanco y col., 2003; Cuthbert y col., 2006). Este QTL, denominado *Qfhs.ndsu-3BS*, deriva del cultivar chino Sumai 3, que es ampliamente usado como fuente de resistencia para FE en los programas de mejoramiento de trigo (Anderson y col., 2001). Ban y Suenaga (2000), sugieren a partir de sus ensayos a campo que los genes de resistencia de Sumai 3 están asociados a resistencia de tipo 1 y 2. El análisis de los QTL indicó que la resistencia de Sumai 3 estuvo controlada principalmente por 3 genes: FHB1 en el cromosoma 3BS (revisado en Xie y col., 2007), FHB2 en el cromosoma 6BS (Cuthbert y col., 2007), y FHB5 en el 5AS (Buerstmayr y col., 2003; Xue y col., 2011). La región en que se detectaron esos QTL se saturó con marcadores e identificó aquellos estrechamente ligados, que se encuentran disponibles para la selección asistida (He y col., 2014).

Se pueden citar numerosos trabajos donde se identifican otros QTL que explican menores porcentajes de la variabilidad fenotípica observada (Bai y col., 1999; Anderson y col., 2001; Buerstmayr y col., 2002; Zhou y col., 2002; Bourdoncle y Ohm, 2003; Gervais y col., 2003; Steiner y col., 2004; Mardi y col., 2005; Yang y col., 2005; Chen y col., 2006; Häberle y col., 2007; Klahr y col., 2007; Buerstmayr y col., 2009; Li y col., 2010; Li y col., 2011; Xue y col., 2010; Cattivelli y col., 2013; Zhang y col., 2011; Niwa y col., 2014).

En los trigos invernales europeos, dos genes de resistencia inducida (WIR1) que fueron regulados positivamente luego de la inoculación con *F. graminearum* han demostrado que se co-localizan con un QTL en el cromosoma 7B (Diethelm y col., 2014).

A nivel mundial, los programas de mejoramiento para la resistencia a fusariosis han dependido fuertemente de unos pocos genes mayores, principalmente de los aportados por Sumai 3 y sus derivados (Ruckenbauer y col., 2001; Yang y col., 2006). Existe entonces la necesidad de explorar y utilizar nuevas fuentes de resistencia, especialmente genotipos que posean nuevos genes de resistencia, no sólo para prevenir el quiebre de la resistencia, sino también para ampliar la base genética para el desarrollo de cultivares con resistencia durable (He y col., 2014).

Como la resistencia es poligénica, parcial, no específica, de ser posible identificar genes de resistencia a *Fusarium graminearum*, estos genes serían efectivos, independientemente de las condiciones ambientales y el aislamiento utilizado para detectar tales genes (Snijders, 2004). Esto concuerda con Buerstmayr y col. (2009) que sostienen que los diferentes aislamientos pueden diferir en su agresividad, pero hasta el momento no se han detectado razas biológicas con una interacción específica hospedante - patógeno.

La resistencia cuantitativa es muy difícil de seleccionar en los programas de mejoramiento convencionales. Con la comparación de QTLs obtenidos en diferentes ambientes y poblaciones, ahora es posible identificar QTLs principales que pueden ser identificados por marcadores y utilizados en esquemas de selección asistida (Feuillet y Keller, 2004).

Estrategias de estudio. Los marcadores disponibles.

La base fundamental del fitomejoramiento es la selección de plantas específicas con caracteres deseables. Esta selección típicamente involucra la evaluación de la población a ser mejorada para uno o más caracteres en ensayos a campo o invernáculo (p.e. caracteres agronómicos, resistencia a enfermedades o tolerancia a estreses), o con ensayos químicos (p.e. calidad de grano), con el objetivo de ensamblar combinaciones más deseables de genes en nuevos genotipos (Collard y Mackill, 2008). Para detectar las variantes deseables debemos poder identificarlas.

Un marcador ideal debería reunir una serie de atributos que podrían resumirse en lo siguiente: polimorfismo, herencia mendeliana y sin epístasis, no influenciado por efectos ambientales, sin efectos en el desarrollo de la planta, simplicidad en la identificación y análisis, codominancia y detección temprana.

Tradicionalmente, se han utilizado marcadores morfológicos para llevar adelante la selección y mejora de las plantas. Como la morfología refleja no solamente la constitución genética de un cultivar, sino también la interacción del genotipo con el ambiente (Smith y Smith, 1992), la selección basada en este tipo de marcadores se ve limitada.

Dada la dificultad y los considerables recursos que son necesarios para discriminar la resistencia a enfermedades en los programas de mejoramiento de trigo, los marcadores moleculares asociados a características específicas pueden contribuir significativamente a una mayor eficiencia en el mejoramiento de la resistencia (Feuillet y Keller, 2004).

El mejoramiento en trigo ha hecho progresos significativos durante los últimos años y es fundamental que este progreso continúe para proveer alimentos a la creciente población mundial. En este sentido, el mejoramiento asistido por marcadores moleculares permite acelerar el desarrollo de cultivares y lograr genotipos con mayor resistencia a patógenos, mejores características agronómicas y mayor calidad comercial e industrial.

De acuerdo con Feuillet y Keller, 2004, que concluyen que los marcadores resultan más útiles cuando el fenotipado tiene un costo alto, cuando múltiples genes están involucrados en un carácter, cuando los caracteres se expresan sólo en ciertas épocas del año, o en algunas condiciones ambientales y para los genes recesivos; debido a la herencia cuantitativa de la FE, y a las dificultades en la detección certera de la presencia de genes de resistencia, los marcadores de ADN asociados con tales genes pueden incrementar la eficiencia de la selección para la resistencia (Anderson y col., 2001).

En cuanto a los marcadores moleculares disponibles, basados en el ADN, podemos mencionar i) los RFLPs (*restriction fragment length polymorphism*, polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción), basados en la hibridación del ADN, ii) los RAPDs (*random amplified polymorphic DNA*, polimorfismo de ADN amplificado al azar), AFLPs (*amplified fragment length polymorphism*, polimorfismos de longitud de fragmentos amplificados) y SSRs (*simple sequence repeats*, secuencias simples repetidas) basados en la reacción en cadena de la polimerasa, y con un desarrollo posterior: iii) DARTs (*Diversity array technology*, tecnología de microarreglos de diversidad), y iv) SNPs (*single nucleotide polymorphism*, polimorfismo simple de un nucleótido).

Se mencionan sólo los marcadores más ampliamente utilizados, pero debe tenerse en cuenta que existen otros marcadores de ADN. A continuación se presenta una descripción para cada tipo de marcador mencionado.

RFLPs

Los RFLP, denominados por Jones y col. (2009) de primera generación, se desarrollaron aprovechándose la característica de las endonucleasas de cortar el genoma de genotipos diferentes en diferentes sitios, generando así fragmentos de distinta longitud, es decir polimorfismo. De acuerdo con los autores anteriormente citados, estos marcadores tienen la desventaja de protocolos extensos y de alto costo, pero son altamente reproducibles.

Kam-Morgan y col. (1989) quienes iniciaron el desarrollo de un mapa de ligamiento del cromosoma 5D, mediante marcadores RFLPs, encontraron un nivel muy bajo de variabilidad detectada mediante estos marcadores en genotipos de trigo hexaploide, observado mayor polimorfismo en genotipos de *A. squarrosa*. Esto puede explicarse por el hecho de que el trigo hexaploide se originó aproximadamente hace 10.000 años, presumiblemente a partir de la hibridación de uno o unos pocos genotipos de trigo tetraploide (*Triticum turgidum* L.) con *A. squarrosa* (diploide). Gill y col. (1996) construyeron el mapa genético del cromosoma 5B en trigo y 5D en *Triticum tauschii* con estos marcadores. Posteriormente, Waldrom y col. (1999) condujeron un estudio para identificar marcadores RFLP asociados a la resistencia a la fusariosis en trigo. En base a los marcadores RFLP analizados, encontraron 5 regiones genómicas significativamente asociadas.

Este tipo de marcadores han sido reemplazados en gran medida por protocolos basados en PCR o secuenciación (Jones y col., 2009).

RAPDs

Entre los marcadores de segunda generación, basados en la PCR, la técnica de RAPDs es rápida y fácil para explorar el polimorfismo genético, y además requiere muy poca cantidad de ADN (Yang y Quiros, 1993). Una ventaja de utilizar RAPDs, es que no se requiere información previa sobre la secuencia nucleotídica de ADN a ser analizada, aunque tiene el inconveniente de producir marcadores mayormente dominantes, ya que solo si el polimorfismo se debe a pequeñas inserciones o deleciones se obtienen marcadores codominantes. El tipo de polimorfismo que se puede detectar por RAPDs, y de acuerdo con Vierling y Nguyen (1992), hacen de esta técnica apta para estudios de diversidad genética, relaciones genéticas, mapeo genético y estudios de genética de

poblaciones. Sus principales desventajas son la escasa confiabilidad y reproducibilidad, y alta sensibilidad a las condiciones experimentales.

El estudio de Sun y col. (2003) permitió detectar 3 marcadores RAPDs significativamente asociados con genotipos resistentes a FE, sugiriendo los autores que los mismos pueden resultar útiles para selección asistida por marcadores. Anteriormente, Bai, en 1995, detectó 2 QTL de resistencia aportados por el cultivar Ning 7840 asociados a marcadores RAPDs.

AFLPs

Con las técnicas anteriormente descritas, RFLP y RAPD, se ha estudiado la FE, y se han identificado marcadores asociados a la resistencia a la misma, tal como se ha citado. Sin embargo, el nivel de polimorfismo o la reproducibilidad (en el caso de RAPDs) puede ser un inconveniente para la identificación de marcadores que están estrechamente vinculados a los principales genes de resistencia.

Los AFLPs combinan el uso de enzimas de restricción y la amplificación por PCR de los fragmentos, para detectar el polimorfismo de la longitud de los fragmentos. Los protocolos de AFLP son técnicamente complejos y costosos de poner a punto, pero detectan un gran número de *loci*, revelando una gran cantidad de polimorfismo y producen *fingerprints* de ADN de alta complejidad que pueden utilizarse para la identificación y para el mapeo de alta resolución y la clonación asistida por marcadores (Jones y col., 2009).

Bai y col. (1999) en su estudio de una población de RILs derivadas del cruzamiento entre Ning 7840 (resistente) y Clark (susceptible) mediante marcadores AFLPs, lograron la amplificación de más de 100 productos por combinación de cebadores, con polimorfismos entre los dos padres con casi todas las combinaciones de cebadores que amplificaron un claro perfil de banda. Aproximadamente el 7% de las combinaciones de cebadores amplificaron al menos una banda polimórfica entre los ADNs, en comparación con sólo 1% de polimorfismo para RAPDs en el mismo cruzamiento. Estos autores identificaron 11 marcadores AFLP estrechamente ligados a la región QTL para resistencia a la fusariosis, lo que indicaría que son eficientes para generar marcadores moleculares para esta característica.

Posteriormente, un trabajo con AFLPs y SSRs publicado por Anderson y col. (2001) complementa los resultados logrados con RFLP (Waldron y col., 1999), para

identificar y mapear otros marcadores de ADN ligados a la resistencia, en dos poblaciones de RILs que poseen Sumai 3 en su pedigree. Identificaron marcadores de AFLP y SSR que explicaron una gran proporción de la variación fenotípica en comparación a los marcadores de RFLP previamente identificados.

SSRs

Los genomas de las plantas contienen un gran número de SSR o microsatélites, de <6 pb que se repiten en tándem y se dispersan ampliamente en muchos cientos de loci en todo el complemento cromosómico (Jones y col., 2009). Los SSR se han propuesto como uno de los marcadores más adecuados para la evaluación de la variación genética y la diversidad entre variedades o líneas de trigo, debido a que son multialélicos, cromosoma específico y distribuidos uniformemente a lo largo de los cromosomas.

Roder y col. (1998) presentaron el primer mapa de ligamiento del genoma del trigo basado en SSRs. Con un set de 230 *primers* identificaron y mapearon 279 *loci* microsatélites, demostrando que los microsatélites en trigo son principalmente genoma específicos y que los set de *primers* generalmente amplifican un solo locus en uno de los 3 genomas presentes en la especie.

En el trabajo publicado por Zhou y col. (2002) el QTL mayor para resistencia a FE, previamente mapeado con AFLPs (Bai y col., 1999) fue además localizado físicamente en la región del brazo corto del cromosoma 3B con la ayuda de marcadores microsatélite.

Posteriormente, Gilsinger y col. (2005) desarrollaron una población de RILs para detectar y mapear QTL asociados a la relación entre el ancho y la duración de la apertura de las flores y la incidencia de la fusariosis en el trigo. También en 2005, Mardi y col., lograron la detección de 2 QTL de resistencia a partir del análisis realizado con 44 grupos de ligamiento (basados en 258 marcadores AFLP y 39 marcadores SSR polimórficos) y el área bajo la curva de progreso de la enfermedad como variable fenotípica.

En 2006, Chen y col., estudiando una población doble haploide, con un progenitor resistente a la FE obtenido por selección recurrente, mediante marcadores SSR confirmaron los QTL ya detectados en 3BS y 5AS. Li y col. en 2011, también mediante SSRs construyeron los grupos de ligamiento con los marcadores que resultaron polimórficos entre los parentales para esos cromosomas. Este mapeo les permitió detectar 5 QTL de resistencia, uno de ellos de efecto mayor.

Así como se expusieron algunos avances en el conocimiento sobre la resistencia a la fusariosis logrados con el mapeo mediante SSRs, hay muchas otras publicaciones con este tipo de marcadores que podrían citarse.

Una tercera generación de marcadores, que se están usando actualmente, permiten lograr un número elevado de *data point* por experimento, permitiendo la construcción de mapas de ligamiento de alta densidad en relativamente poco tiempo. Nos referiremos a los DArTs y SNPs.

DArTs

La tecnología DArT es una modificación del protocolo desarrollado para los AFLPs, utilizando una plataforma de microarreglos, que puede usarse para descubrir cientos a miles de marcadores en un solo experimento. Es un método de alto rendimiento, independiente de la información de la secuencia (Jaccoud y col., 2001). Akbari y col. (2006) a partir de los resultados de su estudio demuestran que esta tecnología puede ser efectivamente utilizada en especies poliploides con genomas grandes como el trigo. La calidad de los datos obtenidos en trigo fue similar a la calidad de los datos previamente generados para cebada y otras especies. También concluyen, estos autores, que un ensayo de DArT, que tarda un máximo de tres días hábiles para completarse desde la obtención del ADN hasta contar con los datos, genera un genotipado de densidad media, útil para una serie de aplicaciones en mejoramiento y genética molecular.

Rutkoski y col. (2012) utilizaron esta tecnología combinada con la metodología de selección genómica y concluyen que los datos obtenidos en los viveros cooperativos de evaluación de la enfermedad en Estados Unidos, que consisten en evaluar germoplasma de diferentes instituciones en diferentes regiones, pueden usarse para entrenar modelos de predicción relativamente precisos que podrían ser útiles para mejoramiento para la resistencia a la fusariosis en trigo. Para el mejoramiento de la resistencia en DON específicamente, encontraron que la selección basada en modelos de predicción basados en marcadores podría conducir a una mayor ganancia genética por ciclo y mayor ganancia genética por unidad de tiempo en comparación con la selección basada sólo en caracteres correlacionados.

Recientemente, Lombardo y col. (2016) construyó un mapa de ligamiento con una población de RILs obtenida del cruzamiento de BioINTA 2001 y Baguette P.11, incluyendo marcadores DArT, SSRs, SNPs y específicos, logrando un mapa con una densidad y distribución de marcadores que le permitieron la detección de QTL de precocidad intrínseca en trigo.

Previamente, Semagn y col. (2006) utilizando DArTs, AFLPs y SSRs construyeron un mapa de ligamiento de una población de RILs derivadas del cruzamiento de Arina como dador de la resistencia a fusarium y una línea noruega mejorada, pero con susceptibilidad a este patógeno. El mapa logrado fue utilizado para identificar nuevos QTLs para resistencia a Fusarium, además de otras características.

Otro mapa de ligamiento construido con marcadores DArTs, SSRs y SNPs permitió detectar QTL de resistencia en una población de RILs evaluada en 6 viveros de evaluación de fusariosis. Se encontraron 9 QTLs asociados a la resistencia (McCartney y col., 2016).

Otros estudio llevado a cabo sobre resistencia a FE, mediante DArTs, es el publicado por Ghavami y col., en 2011, quienes detectan QTLs de resistencia en *Triticum turgidum* mediante mapeo por asociación, demostrando que una región del 3BS es la potencialmente ligada a la resistencia, coincidiendo con el QTL mayor *Fhb1* informado para el trigo pan. También este estudio permitió confirmar un QTL de susceptibilidad en el cromosoma 2A.

SNPs

Existen numerosos sitios dentro de un genoma donde un corto tramo de ADN en un par de cromosomas homólogos difiere por un solo nucleótido. Un SNP debe estar presente en al menos el 1% de individuos en una población para calificar como polimórficos, es decir, tener al menos dos formas alélicas alternativas en el lugar en cuestión. Los SNPs se descubrieron durante la secuenciación del genoma humano, cuando se alinearon regiones del genoma de diferentes individuos y se encontró que mostraban alguna variación de secuencia (Jones y col., 2009). Por ello se describen a menudo como la *nueva generación de marcadores moleculares*, ya que son de reciente descubrimiento y están entrando en uso más de una década después de otros marcadores establecidos como RFLPs, SSRs y AFLPs. La razón de esta llegada tardía es la reciente disponibilidad

de información de las secuencias genómicas a gran escala, materia prima para la detección de SNPs (Jones y col., 2009).

Los SNP pueden usarse como marcadores genéticos únicos que pueden identificarse en la proximidad de genes de interés, pero existe también un gran potencial en el uso de la asociación de haplotipos de SNP con caracteres particulares tales como la resistencia a enfermedades (Feuillet y Keller, 2004).

Los marcadores SSRs o CAPS ejecutados en geles de agarosa o secuenciador capilar tienen mayor costo que los SNPs ejecutados en plataformas de alto rendimiento. Como resultado, mientras que en el pasado sólo los marcadores en las regiones genómicas críticas se emplearon para marcar caracteres realmente importantes, hoy en día los marcadores se utilizan para evaluar la herencia de tantos *loci* como sea posible a través de todo el genoma y con precisión a nivel de nucleótidos (Barabaschi y col., 2016).

El genotipado de alto rendimiento en el trigo hexaploide ha sido posible en los últimos años de la mano de la llegada de tecnologías de secuenciación de última generación (*next generation sequencing*, NGS) y el descubrimiento masivo de SNPs, con el posterior desarrollo de tecnologías de genotipado basadas en SNPs (Allen y col., 2017).

Tanto las matrices de SNPs de baja resolución como las de alta resolución seguirán siendo valiosas en los próximos años. Las matrices de SNP de baja resolución permiten a los mejoradores realizar selecciones directas de genes de interés. Complementariamente, las matrices de SNPs de media o alta resolución ayudarán a los mejoradores en el análisis del *background* genético de los progenitores y la selección de líneas elite mejoradas (Chen y col., 2013).

Los autores recién mencionados, sostienen que, en comparación con la NGS, las matrices SNP pueden satisfacer mejor la necesidad de los mejoradores de una rápida identificación de los genotipos esperados mediante la detección masiva de SNPs basados en genes de interés agronómico sobre un gran número de muestras en períodos de tiempo más cortos y producir datos que son más fáciles de analizar, aunque los datos pueden no ser tan informativos como los de NGS. Por el contrario, NGS puede ayudar a los mejoradores a explorar nuevas variaciones genéticas, pero requiere más esfuerzo en el análisis de los datos. En el futuro, tanto las matrices de SNPs como las plataformas NGS muy probablemente se utilizarán en combinación para facilitar el trabajo de los mejoradores para realizar *mejoramiento molecular por diseño*.

Esas nuevas estrategias de selección y mejoramiento se basan en la disponibilidad de sistemas de marcadores baratos y confiables. Los nuevos sistemas de marcadores, combinados con las nuevas estrategias de selección y evaluación basadas en marcadores, proporcionan una base para una revolución en el mejoramiento de los cultivos y la genética (Tester y Langridge, 2010).

Existen numerosas publicaciones sobre la detección de regiones genómicas asociadas a la resistencia genética a *F. graminearum* en trigo, sobre todo en los últimos años. Se exponen algunas de ellas a continuación.

Staltari y col. (2015), detectaron QTLs asociados a la FE en una población de RILs derivada del cruzamiento entre una variedad Argentina, AR5, resistente y Sonalika, variedad india altamente susceptible, que fue genotipada mediante un chip de SNPs de 9K.

Por otra parte, He y col., 2016, también mapearon una población de RILs producto del cruzamiento entre un trigo sintético (Soru#1) y un cultivar susceptible (Naxos) mediante un chip de SNP de 90K, y detectaron 2 QTLs mayores de resistencia y algunos menores. Ellos concluyen que los SNPs estrechamente ligados a los QTLs de resistencia, pueden utilizarse en los programas de mejoramiento para facilitar la transferencia y selección de esos QTLs.

En 2016, Arruda y col. realizaron un estudio de asociación de SNPs con la resistencia a la fusariosis empleando otra estrategia, estudio de asociación genómica, detectando 10 marcadores SNP ligados. Estos marcadores pueden ser utilizados para seleccionar nuevas líneas con diferentes combinaciones de alelos favorables.

Trabajando con una población interespecífica, Giancaspro y col., 2016, la cual fue genotipada mediante SNPs con un chip de 90k, detectaron QTLs de efecto mayor para incidencia y severidad en 5 cromosomas, además de detectar otros QTLs para otras características de importancia agronómica, encontrando correlaciones entre la enfermedad y características morfológicas.

Resultados esperados

El resultado esperado de este proyecto es la identificación de regiones del genoma del cultivar Pampeano asociadas a la tolerancia a FE utilizando para ello una estrategia de mapeo biparental basada en la cruce Pampeano (R) x BioINTA 1005 (S).

De lo anteriormente expuesto en la revisión bibliográfica se puede concluir que la vía más económica y eficiente para proteger el trigo contra este patógeno es el desarrollo de variedades con resistencia genética (Mackintosh y col., 2007). El desarrollo y utilización de cultivares de trigo con resistencia a FE es uno de los objetivos más importantes en investigación y mejoramiento en el mundo, y ha sido reconocido como una de las estrategias más económica, ambientalmente segura y efectiva para el control de la enfermedad (Kosaka y col., 2015).

Esto no ha sido algo sencillo de lograr, sobre todo la obtención de cultivares resistentes a este patógeno, de buen comportamiento agronómico, y con sanidad frente a otros patógenos importantes sobre la determinación del rendimiento. La dificultad se debe principalmente a la herencia poligénica del carácter, la baja heredabilidad del mismo, y por ende la alta interacción ambiental que dificulta una efectiva selección.

Los programas de mejoramiento en la actualidad tratan de seleccionar genotipos portadores de resistencia proveniente de más de un donante, y que además posean otras características relevantes que lo conviertan en un genotipo competitivo. En el programa de mejoramiento de trigo de INTA durante muchos años se implementó la selección asistida por marcadores moleculares (marcadores SSR) seleccionando líneas portadoras del QTL *Qfhs.ndsu-3BS* mediante el marcado con los microsatélites *Xgwm493* y *Xgwm533*, que se encuentran estrechamente ligados (Anderson y col.; 2001). Se han genotipado varios cientos de líneas, con pocos resultados satisfactorios, debido a que aquellas líneas portadoras de este QTL (que llega a explicar hasta el 50% de la variabilidad del carácter, Bai y col., 1999) carecen de otras características indispensables para tener una buena performance a campo y ser competitivas en los ensayos comparativos de rendimiento. De todos modos es relevante destacar la reciente liberación del cultivar MS INTA 416 portador del gen *Fhb1* incorporado por selección asistida por los microsatélites *Xgwm493* y *Wgwm533* (Bainotti y col., 2017).

Los programas de mejoramiento actuales se basan en integrar la selección fenotípica en esquemas de mejoramiento clásicos con herramientas moleculares (por ejemplo selección asistida por marcadores y transformación genética de plantas). La disponibilidad de secuenciación masiva, recursos de bioinformática y plataformas de fenotipificación está promoviendo el avance de la fitomejoramiento y se puede prever una próxima generación de estrategias de mejoramiento resultante de la integración de

recursos genéticos con tecnologías avanzadas en un futuro cercano (Barabaschi y col.; 2016).

MATERIALES Y MÉTODOS

Para cumplir con los objetivos específicos propuestos para este trabajo de tesis, se cumplió con una serie de actividades.

En primer lugar se desarrolló una población de mapeo, en segundo término se seleccionó el tipo de marcador molecular a utilizar para genotipificar esa población, caracterizando la misma con suficiente cantidad de marcadores polimórficos, y paralelamente se caracterizó fenotípicamente la población para la variable bajo estudio (severidad a la FE), en diferentes ensayos.

Por último, una vez genotipificadas las RILs, establecidos los grupos de ligamiento, con las distancias genéticas y el orden de los marcadores, y procesados los datos fenotípicos obtenidos, se procedió a localizar los posibles determinantes genéticos responsables de la respuesta a la FE presentes en el germoplasma estudiado.

Se detallan a continuación las actividades generadas para dar cumplimiento a los objetivos.

Material vegetal

Se utilizó en este estudio una población de mapeo de 126 RILs (*recombinant inbred lines*, líneas recombinantes endocriadas) derivadas del cruzamiento entre Pampeano y BioINTA 1005.

Se utilizó el método de conducción de descendencia de semilla única (masal modificado). La población de RILs fue avanzada hasta la generación 8 (F8), para asegurar altos niveles de homocigosis que posibilitan realizar diversos análisis genéticos y evaluaciones fenotípicas dado que las combinaciones genéticas dentro del genoma se encuentran fijadas o *inmortalizadas*.

De acuerdo a lo descrito por Broman (2005), las RILs pueden servir como una poderosa herramienta para el mapeo genético. Una RIL es formada por el cruzamiento de dos líneas endogámicas seguidas de repetidas autopolinizaciones o cruzamiento entre hermanos enteros para crear una nueva línea endocriada cuyo genoma es un mosaico de los genomas parentales. Como cada RIL es una línea endogámica, y puede propagarse

eternamente, un panel de RILs tiene un número de ventajas para el mapeo genético: es necesario el genotipado una sola vez, se puede fenotipar múltiples individuos de cada línea para reducir la variabilidad individual, ambiental y de medición; se pueden obtener múltiples fenotipados invasivos del mismo set de genomas; y se pueden obtener mapeos de mayor resolución.

Como, y de acuerdo con Jones y col. (2009), el mapeo es posible sólo si hay variabilidad para el carácter en estudio, un estudio de mapeo exitoso depende en gran medida de la elección de líneas parentales contrastantes a partir de las cuales se generará la población de estudio.

Los progenitores de la población fueron seleccionados por su contrastante nivel de resistencia a FE. Pampeano es un cultivar de origen brasilero resistente y BioINTA 1005 es un cultivar argentino de alto potencial de rendimiento que ha mostrado alta susceptibilidad a FE. Pampeano fue seleccionado en Brasil y su pedigree es: ORL 91274/ ORL 93807// ORL 95711 "s", donde ORL 95711 "s"= BR35// BR14*2/ Sumai 3/ OR1). BioINTA 1005 es un material desarrollado por el CIMMYT e introducido y seleccionado en INTA Marcos Juárez y su pedigree es Babax/Amadina//Babax.

Metodología seguida

1. Mapeo molecular. Construcción del mapa genético

Cuando la población de RILs alcanzó la homocigosis práctica (mayor a 99%), se inició la caracterización molecular de la misma.

1.1. Obtención de ADN

El ADN genómico de ambos padres y de las líneas de la población fue extraído de plántulas puestas a germinar en bandejas plásticas por 4-6 días a 24°C, de acuerdo al siguiente protocolo:

- a) Colocar el material vegetal en tubos eppendorf y triturarlo con nitrógeno líquido,
- b) Agregar 600 µl de solución de extracción (TRIS-HCl 1,5 M, pH 8.8, EDTA 0,5 M pH 8) y 100 µl de SDS (al 20%),
- c) Llevar a 65°C por 30 minutos, agitando cada 10 minutos,
- d) Agregar 200 µl Acetato de Sodio (2,5M),
- e) Colocar en hielo 20 minutos,

- f) Retirar del hielo y agregar 400 μ l de cloroformo,
- g) Centrifugar 20 minutos a 14.000 rpm,
- h) Tomar el sobrenadante y agregar 500 μ l de Isopropanol,
- i) Centrifugar 7 minutos a 14.000 rpm. Eliminar el sobrenadante,
- j) Agregar 500 μ l de Etanol 70%. Centrifugar 7 minutos. Repetir tres veces,
- k) Secar los ADN y resuspender.

Una vez obtenido el ADN, para evaluar la cantidad y calidad, se hizo una cuantificación a luz UV utilizando el espectrofotómetro Nanodrop (Thermo Scientific, Wilmington, DE, USA), registrándose los ng/ μ l, y además se consideraron las relaciones 260nm/280nm y 260nm/230nm de absorbancia como indicadores de la pureza de la muestra. Los ADNs se testearon también en geles de agarosa al 1% teñidos con Sybr Safe (Invitrogen Carlsbad, CA), sometidos a electroforesis por 1 h y 60 V constantes, con posterior visualización en transiluminador.

1.2. Exploración del polimorfismo de los progenitores y las RILs

El ADN de ambos progenitores fue ensayado con un set de marcadores microsatélite de uso público para evaluar el polimorfismo entre ambos. La reacción de PCR fue optimizada en un volumen final de 10 μ l, y el producto de amplificación sometido a electroforesis en geles de agarosa o poliacrilamida. Los *loci* microsatélite en los que la diferencia en pares de base entre los alelos esperados era suficientemente grande, se resolvieron en geles de agarosa al 1%.

Posteriormente, se seleccionaron al azar 13 líneas de la población de mapeo (RILs) para comprobar que los marcadores polimórficos en los progenitores mostraran segregación en las RILs. Se realizó la amplificación de esas líneas y los dos progenitores de la población con 20 SSRs seleccionados al azar entre los que resultaran polimórficos entre Pampeano y BioINTA 1005.

1.3. Genotipado masivo de las RILs. Construcción del mapa genético

Cada muestra de ADN de las RILs fue ajustada a una concentración de 50 ng/ μ l y enviadas al Instituto de CONICET de La Plata (IGEVE) para el genotipado mediante el microarreglo de SNPs Axiom® Wheat Breeder's Genotyping Array de 35K (35143 SNPs).

Una vez obtenida la matriz de datos de la población, se analizó la segregación de cada marcador SNP. La constitución alélica de la población de RILs se organizó en una matriz, con las RILs en las filas y los marcadores (SNP) en las columnas. Se recodificaron, para cada marcador, los alelos: se les asignó A a las RILs que tenían el genotipo de BioINTA 1005 y B a las que poseían el alelo de Pampeano. Se anotaron como H aquellos que resultaron heterocigotas, y como – los genotipos para los cuales en ese marcador aparecía un alelo no esperado.

Con el objetivo de descartar los que resultaron monomórficos para los progenitores, los que no tuvieran la segregación esperada de acuerdo al genotipo de los progenitores, los que tuvieran exceso de heterocigotas y/o datos faltantes y con segregación distorsionada con respecto a la proporción esperada (1:1), se utilizó el test de Chi-cuadrado.

La matriz de datos finales fue usada para análisis de ligamiento y recombinación genética para construir el mapa de ligamiento utilizándose el paquete R/QTL y MapMaker 3.0.

Para construir los grupos de ligamiento y el orden de los marcadores se fijó un LOD=3 como valor umbral y una frecuencia de recombinación máxima=35%. Las frecuencias de recombinación se convirtieron a cM (centimorgans), es decir unidades de mapa mediante la función de mapeo de Haldane (Haldane, 1919). El orden genético de marcadores obtenidos en este mapa fue convalidado con la versión TGACv1 correspondiente al primer mapa físico del genoma de trigo recientemente publicado (Clavijo y col., 2017).

2. Caracterización fenotípica de la población: Inoculación con *Fusarium graminearum*

Por las razones expuestas en la revisión bibliográfica sobre la naturaleza de la resistencia genética al patógeno estudiado, la alta influencia ambiental, la importancia de una concentración de inóculo conocida y estable en todo el ensayo y entre ensayos, un método de inoculación confiable y que sea capaz de discriminar entre genotipos con distinto grado de resistencia o susceptibilidad, para caracterizar fenotípicamente la población de RILs se decidió llevarlo adelante en invernáculo, con un aislado de *F. graminearum* seleccionado por su patogenicidad, a una concentración establecida, y además condiciones controladas de temperatura y humedad, y el control cultural

necesario para disminuir en lo posible la variabilidad del fenotipado por factores no genéticos, según se detalla a continuación:

2.1. Implantación de los ensayos

Para proceder a la caracterización fenotípica de las RILs y los progenitores de la población de estudio se implantaron 3 ensayos en invernáculo, en la EEA Paraná del INTA, en Oro Verde, Entre Ríos. Las fechas de realización de los ensayos fueron: abril 2014 (Ensayo 1), octubre 2014 (Ensayo 2) y abril 2015 (Ensayo 3).

El diseño estadístico utilizado fue un DBCA, con tres repeticiones. Las líneas y los progenitores se implantaron en macetas de 7 litros, con una mezcla de tierra y perlitas en proporción 9:1. Se sembraron 15 semillas de cada RIL por maceta, para finalmente dejar 8 plantas en cada maceta. Se aplicó riego de acuerdo a los requerimientos para el desarrollo normal del cultivo.

El invernáculo contó con instalación de sistema de refrigeración mediante un panel de circulación de agua y extractores, y el sistema de calefacción utilizado fue mediante estufas instaladas para la realización de estos ensayos. Las temperaturas promedio máximas y mínimas fueron 26,4°C y 14,3°C en el ensayo 1, 28,7°C y 18,6°C en el ensayo 2, 25,8°C y 16,8°C en el ensayo 3, respectivamente. Se contaba además con un sistema en la parte superior del invernáculo de picos de aspersion para lograr una niebla (con el objetivo de aumentar la humedad relativa), con funcionamiento automático durante las 24 hs y la frecuencia se monitoreó y adaptó a las necesidades diariamente.

2.2. Inóculo empleado

El inóculo de *Fusarium graminearum* que se utilizó fue el aislamiento denominado internamente FT5, seleccionado por los resultados de un ensayo de patogenicidad previo (Cáceres y col., 2011). El hongo se cultivó en un medio específico para *Fusarium*: YGC (Agar extracto de levadura - Glucosa - Cloranfenicol). Las temperaturas de crecimiento fueron entre 25 y 30 °C y 12 horas de luz. Las placas de Petri fueron incubadas durante el lapso de 25 a 30 días bajo un equipo de dos tubos fluorescentes: uno de luz *blanca* y otro de luz negra, (UVA, 365nm) con encendido cada doce horas, para favorecer la producción de esporos.

Para multiplicar el hongo y contar con volumen suficiente para las inoculaciones se lo cultivó en caldo de poroto Mung de acuerdo al protocolo de Leslie y Summerell (2006), manteniendo el caldo de cultivo en agitación constante.

La suspensión de inóculo se ajustó a una concentración de 5×10^4 esporos/mL, con agua destilada estéril.

2.3. Inoculación y observación de síntomas

En el momento de anthesis se procedió a la inoculación puntual, siguiendo el método descrito y utilizado por Canú (2008), que consiste en utilizar una pequeña cantidad de algodón embebida en el inóculo, ubicando este algodón con una pinza en la flor de una espiguilla central de la espiga. El método utilizado, de acuerdo a la definición de van Ginkel y col. (1996) es confiable, no daña los órganos reproductivos de la planta, y es adecuado para estudios cuantitativos. Una vez inoculadas, las espigas fueron levemente asperjadas con agua estéril y permanecieron 48 hs en cámara húmeda mediante una bolsa de polietileno de 8 x 15 cm (humedad relativa: 100%) cubriendo la espiga.

Desde el comienzo de las inoculaciones, el ensayo estuvo sometido a aspersiones automáticas de agua, para proveer condiciones de humedad relativa alta ($\geq 90\%$) y se controló la temperatura para mantenerla entre 20 y 30°C.

La observación de los síntomas se realizó a los 21 días pos inoculación. Se registró la proporción de espiguillas infectadas desde el punto de inoculación hacia abajo con respecto al número de espiguillas totales. Se inocularon hasta 10 espigas por línea, para obtener el promedio de severidad de cada línea en cada repetición.

En la siguiente figura se presentan imágenes de los ensayos de inoculación (Figura 5).

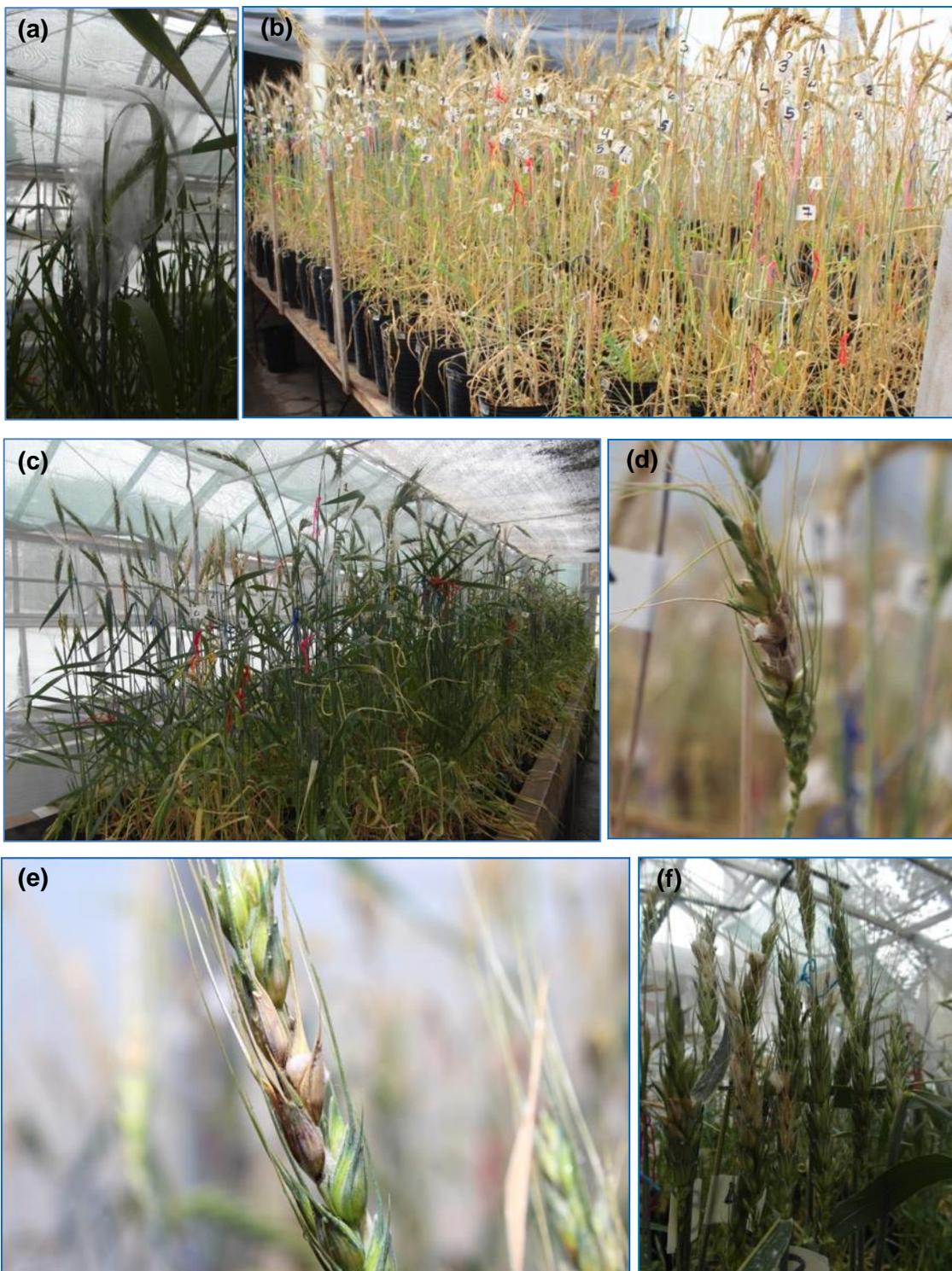


Figura 5. Evaluación de síntomas de severidad de la fusariosis de la espiga de trigo en la población de RILs de estudio (Pampeano por BioINTA 1005) . a) espiga de trigo en cámara húmeda por 48 hs pos inoculación, b) y c) vista general de ensayos de inoculación, (d), (e) espigas individuales y (f) grupo de espigas inoculadas con síntomas de fusariosis en algunas espiguillas.

2.4. Tratamiento estadístico de los datos

A los datos de severidad registrados en los ensayos se les realizó un análisis de variancia de modelos mixtos, con la **severidad** como variable de respuesta, considerando las RILs como efecto fijo y los ensayos y repeticiones (ensayos) como efectos aleatorios (Yang 2010). La decisión de considerar a las RILs como efecto fijo se tomó teniendo en cuenta que las líneas ensayadas constituyen la población desarrollada y no una muestra de la misma y que las inferencias a hacer son sobre esa población de RILs. Para corroborar el cumplimiento del supuesto de distribución normal de los residuos, se les aplicó a los mismos la prueba de Shapiro-Wilk.

En el modelo estadístico se consideraron los siguientes efectos:

$$Y_{ij} = \mu + \alpha_i + \beta_j + \tau_k + (\beta\tau)_{ij} + \varepsilon_{ij}$$

Con $i= 1$ a 124, y $j= 1$ a 3, $k=1$ a 3.

Dónde: Y_{ij} es la observación correspondiente a la i -ésima RIL, j -ésimo ensayo y k -ésimo bloque; μ es la media general, α_i es el i -ésimo efecto de RIL, β_j es el j -ésimo efecto de ensayo, τ_k es el k -ésimo efecto del bloque, $(\alpha\beta)_{ij}$ ij -ésima interacción genotipo ensayo y ε_{ij} es el error aleatorio. En esta ecuación α_i es un efecto fijo, y el resto de los efectos se consideran aleatorios.

Para la detección de diferencias significativas se realizó el test de comparación de medias, con la prueba LSD Fisher (Alfa=0.05), con el procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni.

También se calculó el coeficiente de correlación de Pearson (r) entre los datos de los 3 ensayos, con su nivel de significancia.

Todos los análisis estadísticos se realizaron mediante el paquete estadístico Infostat (Di Rienzo y col., 2017).

3. Detección de QTL

La localización de los QTLs en el mapa genético implica encontrar asociaciones estadísticamente significativas entre los marcadores moleculares y los caracteres estudiados. Los marcadores genéticamente vinculados a un QTL que influyen en el carácter de interés cosegregarán más frecuentemente con determinado fenotipo, mientras que los marcadores no enlazados no mostrarán asociación significativa con el fenotipo (Miles y Wayne, 2008).

En este trabajo, para la detección de los probables QTL de resistencia se realizó el mapeo de QTL con el programa Windows QTL Cartographer (Wang et al. 2004) utilizando el modelo 6 del método de mapeo por intervalo compuesto (*composite interval mapping*, CIM) con velocidad de avance de 0,5 cM, método de regresión 3 (*Forward and Backward method*) para la selección de cofactores con probabilidad de entrada y salida de 5% y tamaño de ventana de 10cM.

La posición del posible QTL fue confirmada cuando el mayor valor de LOD estimado superó el valor umbral de significancia ($\alpha=0,05$) establecido en 2, en función del tamaño de la población estudiada.

En cada QTL detectado en los diferentes ambientes evaluados, el marcador molecular ubicado en el pico máximo del QTL se utilizó como variable clasificatoria en un modelo simple de ANOVA (mediante Infostat). El modelo estadístico incluyó los efectos individuales de cada QTL detectado y las interacciones de primer grado entre estos QTL.

El efecto aditivo de cada QTL fue estimado como la diferencia media (en unidades del carácter) entre los dos grupos genotípicos de RILs que portan los alelos de BioINTA 1005 y Pampeano utilizando para ello el software Windows QTL Cartographer. Valores positivos significan contribuciones del alelo de BioINTA 1005 al valor fenotípico, mientras que valores negativos significan contribuciones del alelo de Pampeano. .

Se evaluó también la interacción de primer grado entre los QTL detectados, con el objetivo de establecer, en el caso de que existieran, interacciones epistáticas entre los QTL. Para este fin se utilizó un análisis de ANOVA considerando los marcadores picos de los QTL principales detectados en los 3 ambientes de evaluación (ensayos) como variable clasificatoria, adicionalmente el efecto del ambiente, repetición y las interacciones entre QTL y ambiente se consideraron en el modelo estadístico.

RESULTADOS

1. Genotipado de la población

1.1. Exploración del polimorfismo entre los progenitores

Inicialmente, se ensayaron 314 *primers* de marcadores SSR para testear polimorfismo entre los progenitores. Para ello, se seleccionaron *primers* de todos los cromosomas y brazos cromosómicos. De los *primers* ensayados 118 (37,6%) mostraron diferente patrón de bandas entre BioINTA 1005 y Pampeano, es decir fueron polimórficos. A continuación se ensayaron un grupo de RILs (*recombinant inbred lines*, líneas endogámicas recombinantes) comprobándose segregación en la población de mapeo. Estos ensayos previos permitieron comprobar la existencia de polimorfismo entre los progenitores utilizados y la segregación esperada en las RILs.

1.2. Genotipado de las RILs mediante el microarreglo de SNPs

La matriz total de datos obtenida del microarreglo de SNPs Axiom® Wheat Breeder's Genotyping Array de 35K, contenía información de 35143 marcadores SNP de 125 líneas y los dos progenitores. De una línea no se obtuvieron datos, debido probablemente a algún problema en la calidad de su ADN.

Además, se debió eliminar del análisis una segunda RIL (RIL78), debido a que presentaba un número excesivo de entrecruzamientos en relación al resto, lo que indica mezcla de ADN (Figura 6).

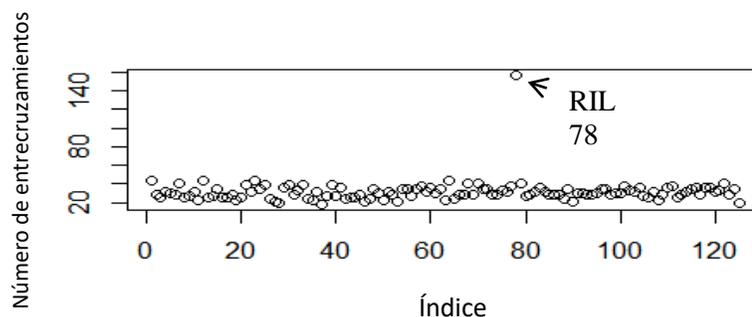


Figura 6. Gráfico que presenta el número de entrecruzamientos (*crossovers*) que presentan las RILs de la población de mapeo de trigo Pampeano x BioINTA 1005 para la construcción del mapa de ligamiento.

De los 35000 marcadores originales del chip un total de 2093 marcadores resultaron polimórficos, con menos de 15% de datos faltantes o heterocigotas y mostraron segregación de acuerdo a lo esperado (1:1). De estos, 1534 tuvieron idéntica segregación que otro/s marcadores, es decir la información fue redundante. Los marcadores en esta situación fueron colapsados, debido a que aportaban la misma información (Tabla 1).

Tabla 1. SNPs utilizados en la construcción de mapa genético organizados por grupo de ligamiento. Se detalla el número de SNPs validos e informativos y la longitud de cada grupo de ligamiento (cM).

Cromosoma	N° snps válidos	N° snps informativos	Grupo de ligamiento (cM)
1A	208	45	114,6
1B	97	29	175,3
1D	12	10	160,4
2A	105	29	134,1
2B	236	41	76,5
2D	9	8	93,1
3A	77	18	241,7
3B	150	31	123,1
3D	11	3	98
4A	109	29	374,4
4B	34	17	136
4D.1	6	3	1,8
4D.2	9	5	11,6
5A	163	50	236,4
5B	211	71	157,3
5D	4	3	95,5
6A	70	30	150,1
6B	192	40	72,6
6D	12	3	18,6
7A	334	62	183,9
7B	33	16	74
7D	11	6	98,4
Sin asignar		10	
Total genoma A	1066	263	1435,2
Total genoma B	953	245	814,8
Total genoma D	74	41	577,4
Total general	2093	559	2827,4

Luego de realizado esto, 559 marcadores snps (loci) son los que se incluyeron en la matriz de datos para la construcción de los grupos de ligamiento (Tabla 1).

El mapa final presentó 549 marcadores distribuidos en 22 grupos de ligamiento correspondientes a los 21 cromosomas del trigo hexaploide. Solo el cromosoma 4D, quedó representado por 2 grupos de ligamiento. La longitud del mapa completo fue de 2827,4 cM (1435,2 cM genoma A, 814,8 cM genoma B y 577,4 cM genoma D) con una densidad promedio de 5,15 cM/locus (Tabla 1 y Figura 7).

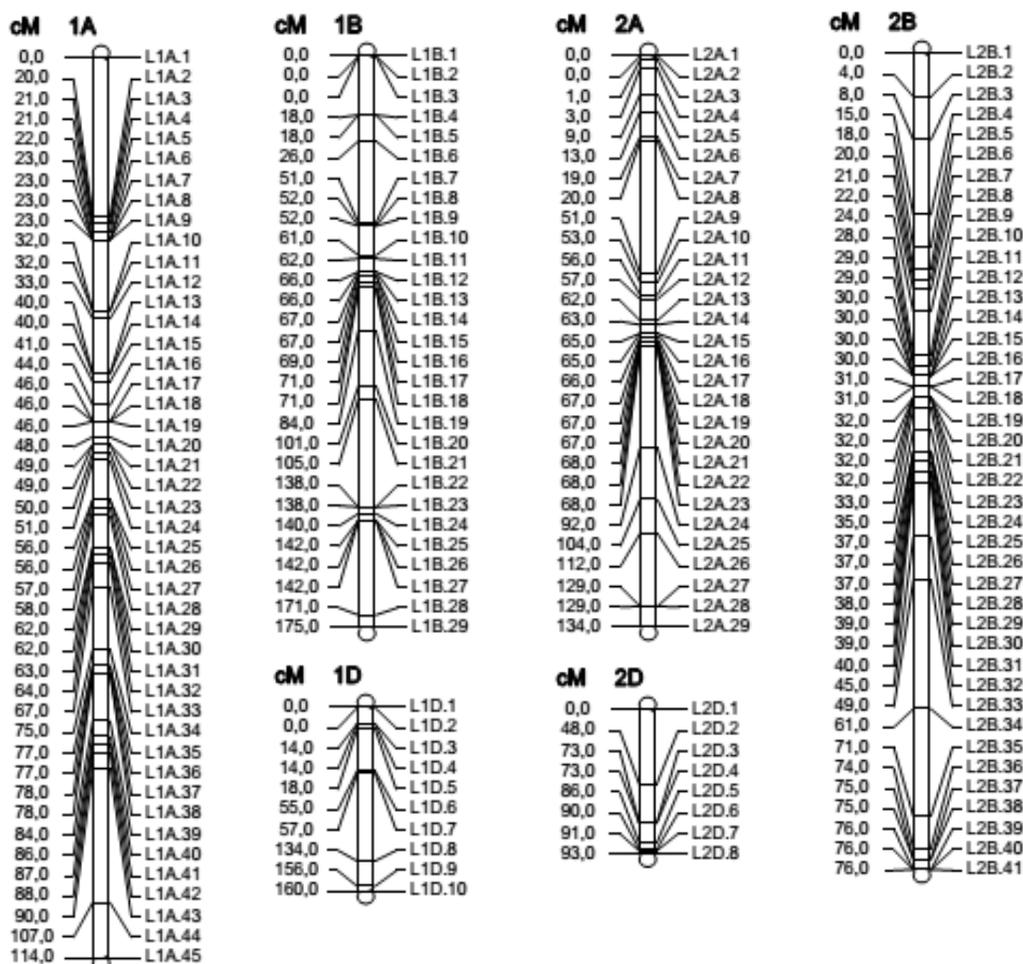


Figura 7. Mapa de ligamiento de la población de RILs de trigo del cruzamiento de Pampeano x BioINTA 1005. En cada cromosoma, los marcadores se muestran a la derecha y las distancias genéticas acumuladas en centiMorgan a la izquierda. Los brazos cortos de los cromosomas se presentan en la parte superior.

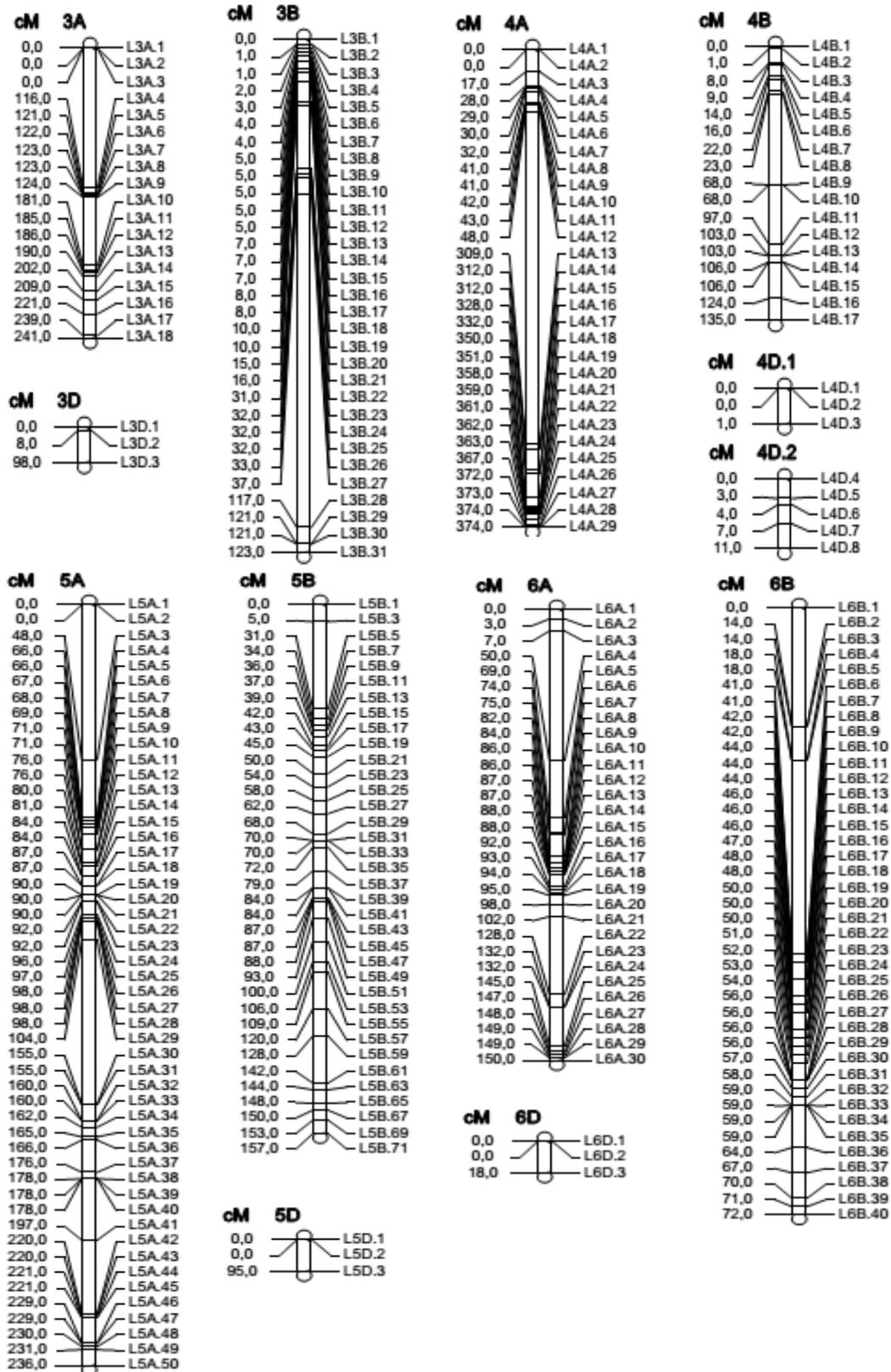


Figura 7. Continuación.

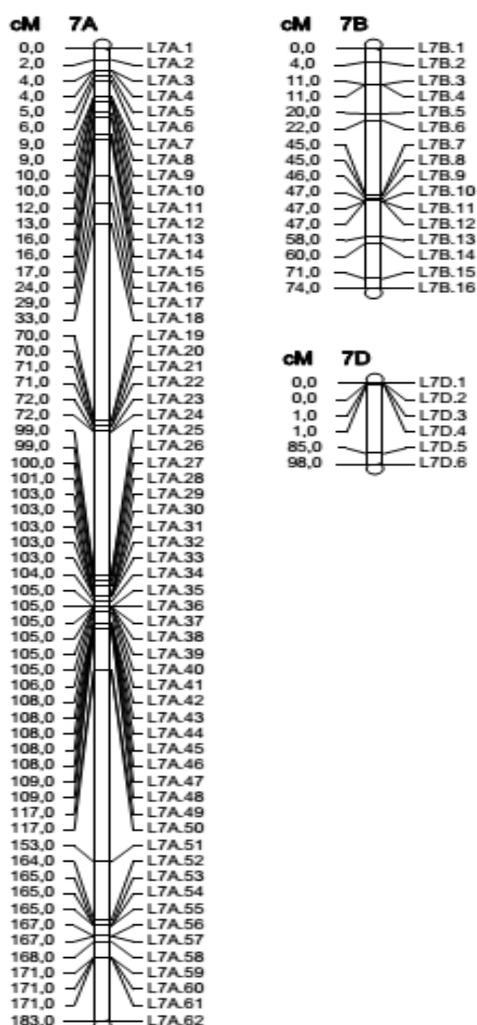


Figura 7. Continuación.

Si se tiene en cuenta el número de marcadores informativos por genoma, se puede ver que el genoma D es el que se encontró más pobremente representado, ya que sólo el 7,5% de los marcadores pertenecieron a grupos de ligamiento de ese genoma. Los genomas A y B tuvieron similar número de marcadores informativos (47,9% y 44,6%, respectivamente). Este resultado coincide con la amplia mayoría de mapas publicados de trigo pan y el mismo se explicaría por el menor polimorfismo presente en el genoma D respecto de los genomas A y B de trigo pan (Chao y col., 2009).

2. Caracterización fenotípica de la población

2.1. Variación en la resistencia fenotípica para fusariosis de la espiga

El progenitor Pampeano mostró un alto nivel de resistencia en los tres ensayos llevados a cabo, en un rango entre 10% y 27% de severidad; mientras que el otro progenitor, BioINTA 1005 fue altamente susceptible, con valores de severidad en un rango de 72% a 80%.

Se presenta a continuación una tabla con los valores promedio de severidad de los 2 progenitores, que se incluyeron en los 3 ensayos de inoculación. Se realizó un análisis de variancia para cada ensayo. En los tres el modelo fue altamente significativo y el efecto genotipo también. El ajuste del modelo elegido fue bueno ($R^2=0,993$, $0,997$ y $0,995$ para los ensayos 1, 2 y 3, respectivamente) y los coeficientes de variación dentro de valores adecuados ($CV(\%)=11,0$, $4,8$ y $8,3$ para los ensayos 1, 2 y 3, respectivamente) (Tabla 2 y Tabla 11 del anexo).

Tabla 2. Análisis de variancia de los valores de síntomas de severidad (%) de infección de las espigas de las dos variedades de trigo progenitoras de la población biparental estudiada, en los 3 ensayos de inoculación con *Fusarium graminearum* realizados.

Progenitor	Ensayo 1 ¹			Ensayo 2 ²			Ensayo 3 ³		
	%	EE		%	EE		%	EE	
BIOINTA 1005	72,0	2,62	A	78,3	1,47	A	79,7	2,27	A
PAMPEANO	10,3	2,62	B	27,3	1,47	B	14,7	2,27	B

Test: LSD Fisher Alfa=0,05. EE: error estándar. *Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0,05$).* 1. DMS=15,97077, 2. DMS=8,95669, 3. DMS=13,83109

La inoculación y evaluación de síntomas del primer ensayo de inoculación se realizó desde mediados de abril y durante mayo de 2014. En la matriz de datos se incluyeron los valores de severidad de 1904 espigas en 121 líneas y los dos progenitores. En promedio fueron 5,2 espigas por línea por repetición. Los valores promedio de severidad de las líneas de este ensayo oscilaron en un rango entre 5% y 58%, lo que indica segregación transgresiva hacia el progenitor resistente (Figura 8 y Tabla 2). BioINTA 1005 tuvo una severidad mayor que la máxima severidad alcanzada por las líneas, mientras que el progenitor resistente fue superado por 2 líneas que mostraron mejor comportamiento frente a la inoculación puntual (RIL6 y RIL109).

En el segundo ensayo, conducido durante noviembre y diciembre de 2014, se inocularon un total de 2413 espigas en las 124 líneas y los dos progenitores, con un promedio de 6,4 espigas por línea por repetición. Los valores promedio de severidad de las líneas de este ensayo oscilaron en un rango desde 29% hasta 74%. Ambos progenitores tuvieron valores extremos en este ensayo, no siendo superados en resistencia y susceptibilidad por alguna línea de la población estudiada.

En el tercer ensayo de inoculación, que se llevó a cabo desde mediados de abril y durante mayo de 2015, se inocularon 1776 espigas, con un promedio por línea y repetición de 4,7 espigas. Los valores promedio de severidad de las líneas de este ensayo oscilaron en un rango de 12% a 53%. Dos líneas mostraron segregación transgresiva con respecto a Pampeano (RIL70 y RIL91). BioINTA 1005 presentó un porcentaje de severidad mayor que cualquiera de las líneas, al igual que en los dos ensayos anteriores. Cuando se grafican los datos de severidad de los 3 ensayos juntos (Figura 8), se puede apreciar que hay una diferencia entre ensayos en la media de severidad, pero en los tres ensayos hay suficiente variación fenotípica entre las líneas ensayadas para el carácter, lo que permite discriminarlas por su comportamiento.

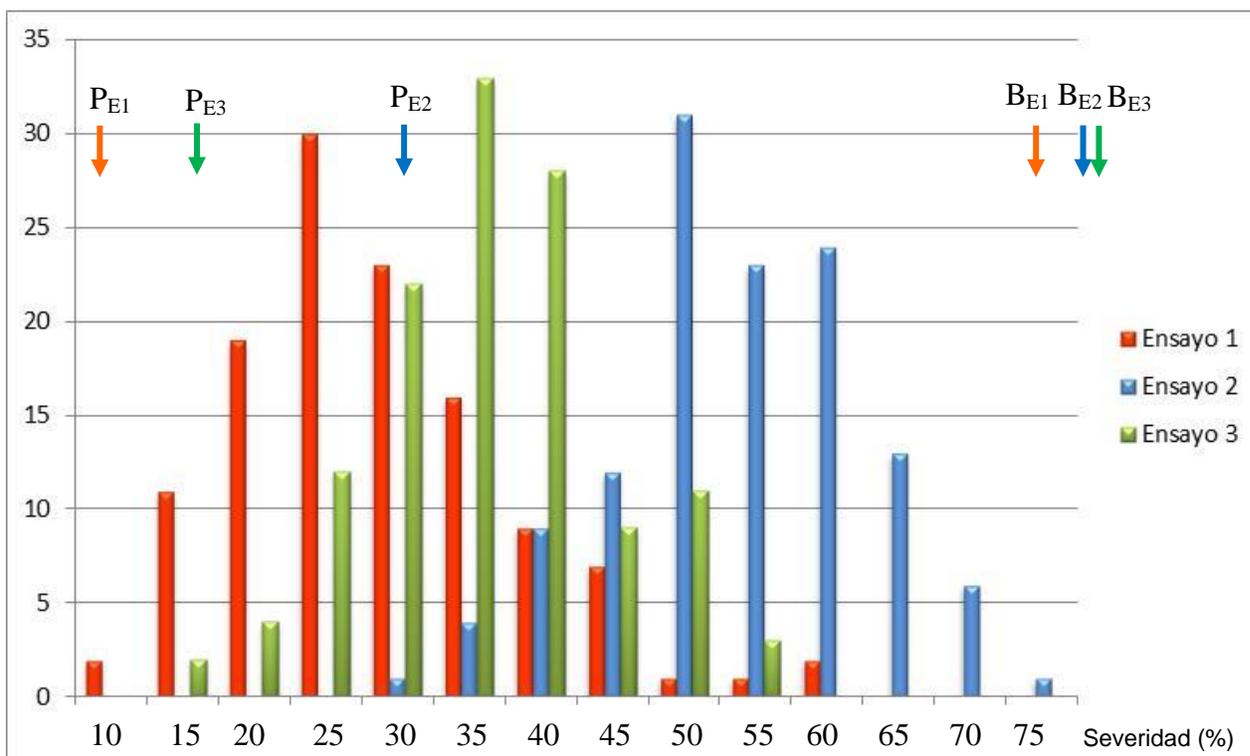


Figura 8. Histograma de distribución de frecuencias de la severidad observada en los 3 ensayos de inoculación puntual de espigas sobre la población de 124 RILs, generada de la cruz de Pampeano x BioINTA 1005. En puntas de flecha se destaca la ubicación de ambos progenitores, P: Pampeano, B: BioINTA 1005.

2.2. Correlaciones entre ensayos

Se estimaron las correlaciones fenotípicas entre los promedios de severidad de los 3 ensayos, resultando los coeficientes de correlación entre los tres experimentos altamente significativos y con valores aceptables para este carácter, que es de naturaleza compleja y altamente influenciado por el ambiente (Tabla 3).

Tabla 3. Coeficientes de correlación de Pearson entre los ensayos experimentales donde se registró la variable severidad de infección de la espiga (fila superior) de la población de mapeo de trigo de Pampeano por BioINTA 1005, inoculada en invernáculo con *Fusarium graminearum*, y el respectivo nivel de significancia (fila inferior).

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Ensayo 1	*	0,52 <0.0001	0,64 <0.0001
Ensayo 2		*	0,43 <0.0001

La correlación más alta fue entre el ensayo 1 y ensayo 3, coincidiendo que estos ensayos fueron realizados durante la misma época del año (otoño) respecto al ensayo 2 que fue realizado durante la primavera. Los ensayos 1 y 3 desarrollados (otoño), tuvieron promedios de severidad más bajos en general, que el ensayo 2 (primavera), que presentó en general valores de severidad mayores.

2.3. Análisis estadístico de los datos de las RILs

Los datos se analizaron estadísticamente mediante un modelo generalizado mixto, considerando el genotipo (RILs) como efecto fijo y el resto aleatorio. Para corroborar el cumplimiento del supuesto de distribución normal de los residuos, se les aplicó a los mismos la prueba de Shapiro-Wilks (Tabla 4). Si bien los mismos no cumplen con una distribución normal, se probaron algunas transformaciones (log x, log x+cte, estandarización de los datos) aunque no se logró normalizar los residuos.

Si se observa el gráfico de distribución de frecuencias de los residuos, podemos ver que su distribución es cercana a una curva normal (Figura 9), y además los datos no ajustan mejor con otras distribuciones, como ser la binomial.

También se analizó la distribución de los residuos eliminando algunos valores distanciados (*outliers*) con una mejora insignificante del test Shapiro-Wilks, por lo que se

decidió conservar esos datos. En este sentido, Montgomery (1991) sostiene que si la respuesta distanciada es un valor particular deseable, este residuo distanciado puede proporcionar más información que el resto de los datos. Este autor sostiene que hay que ser cuidadoso para no descartar o rechazar una observación distanciada, a menos que exista una base no estadística razonable para hacerlo.

Tabla 4. Test de normalidad de Shapiro Wilks de los residuos de la variable severidad de infección de la espiga de la población de mapeo de trigo de Pampeano por BioINTA 1005, inoculada en invernáculo con *Fusarium graminearum*.

Shapiro-Wilks (modificado)

Var	n	Media	D.E.	W*	p(Unil D)
RDUO	1081	0,00	0,11	0,99	<0,0001

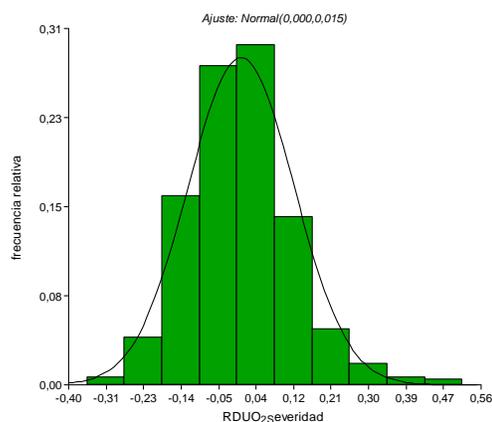


Figura 9. Histograma de frecuencias de los residuos de la variable severidad de infección de la espiga de la población de mapeo de trigo de Pampeano por BioINTA 1005, inoculada en invernáculo con *Fusarium graminearum*.

El resultado del análisis de variancia, que se presenta a continuación (Tabla 5 y Tabla 12 del Anexo), muestra que el efecto del Genotipo resultó altamente significativo y que ese ajuste del modelo (R^2) indica que del total de la variabilidad presente no es alto el porcentaje explicado por este efecto, pero permite detectar diferencias entre las RILs consideradas.

Tabla 5. Medidas de ajuste del modelo y significancia (p-value) del efecto fijo (RILs) de la variable severidad de infección de la espiga de la población de mapeo de trigo de Pampeano por BioINTA 1005, inoculada en invernáculo con *Fusarium graminearum*.

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1	R2 2
1088	-664,53	-45,90	459,26	0,13	0,17	0,51	0,55

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	956	25,51	<0,0001
RILs	123	956	2,92	<0,0001

Pruebas de hipótesis marginales

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
RILs	123	956	2,92	<0,0001

Cuando se realizó el test de comparación de medias, con la prueba LSD Fisher (Alfa=0.05), con el procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni, se puede ver que el test discrimina entre RILs de acuerdo a su severidad. El rango de severidades promedio de los 3 ensayos oscila entre 21% para la línea más resistente, a 56% en la línea más susceptible (Tabla 13 del anexo).

3. Detección de QTLs

Luego de realizado el análisis estadístico de los datos, y al constatarse diferencias estadísticamente significativas entre las RILs mediante el test LSD de Fisher, con la corrección de Bonferroni (Tabla 13 del Anexo), se utilizaron los valores fenotípicos de severidad para identificar las regiones genómicas que expliquen significativamente la variación del carácter.

Este análisis de asociación entre el genotipo y el fenotipo se llevó a cabo incluyendo en la matriz para detectar los posibles QTLs al valor promedio de severidad de cada RIL en cada ensayo. Los valores de severidad se arreglaron en una matriz genotipo – fenotipo manteniéndose individualizados los valores promedio por ensayo, y se incluyó también en el análisis el promedio de los 3 ensayos, como un ambiente de detección más. Esto se realizó para observar la presencia de QTLs que se expresen de forma diferente en los distintos ambientes de evaluación (ensayos).

Como valor crítico de existencia de un QTL se fijó el valor de LOD= 2, considerando este valor apropiado por el tamaño de la población de mapeo estudiada.

Para el mapeo de los QTLs se utilizó el mapa de ligamiento previamente construido, integrado por 22 grupos de ligamiento.

Se presentan a continuación los resultados encontrados.

3.1. Efecto individual de los QTLs

Considerando los datos fenotípicos promedio se encontraron 7 QTLs significativos (LOD umbral= 2,0). Los valores de LOD de los QTLs encontrados, oscilaron entre 2,09 y 3,19. Las regiones detectadas como portadoras de genes de resistencia se ubicaron en los cromosomas 2B, 3A, 6A y 7A (Tabla 6 y Figura 10).

En los cromosomas 6A y 7A se detectaron QTLs presentes en más de 1 ambiente (considerando el promedio como un ambiente más). En el caso del cromosoma 6A, con el Ensayo 1, el Ensayo 2 y el promedio de los 3 ensayos, y en el 7A con los datos fenotípicos del Ensayo 3 y los datos promedio de los 3 ensayos (Ens.Prom).

En la tabla 6, se puede observar que los dos progenitores de las RILs han sido donantes de factores de resistencia. Pampeano aporta los QTLs detectados en los cromosomas 2B, 3A, y 7A, mientras que BioINTA 1005 es donante del QTL detectado en el cromosoma 6A.

Tabla 6. QTLs para severidad a la fusariosis de la espiga, detectados en la población Pampeano x BioINTA 1005 en 3 ensayos de inoculación puntual.

Crom	Ensayo	Marcador ¹	cM ²	LOD	Donante ³	Efecto Aditivo ⁴	R2 (%) ⁵
2B	Ensayo 3	AX-94759165	24,5	2.74	Pampeano	-2.46	5.96
3A	Ens.Prom.	AX-95207390	116.8	2.51	Pampeano	-5.05	5.15
6A	Ensayo 1	AX-94547709	75,6	3.19	BioINTA 1005	2.79	6.27
6A	Ens.Prom.	AX-94547709	75,6	3.03	BioINTA 1005	2.53	7.37
6A	Ensayo 2	AX-94547709	75,6	2.09	BioINTA 1005	2.98	6.11
7A	Ensayo 3	AX-94756419	117,1	2.43	Pampeano	-2.45	8.30
7A	Ens.Prom.	AX-94756419	117,1	2.74	Pampeano	-2.36	8.00

¹ Marcador ligado al máximo LOD. ² ubicación a partir del extremo del GL. ³ Alelo del parental favorable para el carácter. ⁴ Estimado por QTL Cartographer 2.5, Signo (-) proveniente de Pampeano, signo (+) proveniente de BioINTA 1005. ⁵ Porcentaje de la varianza explicada por el QTL.

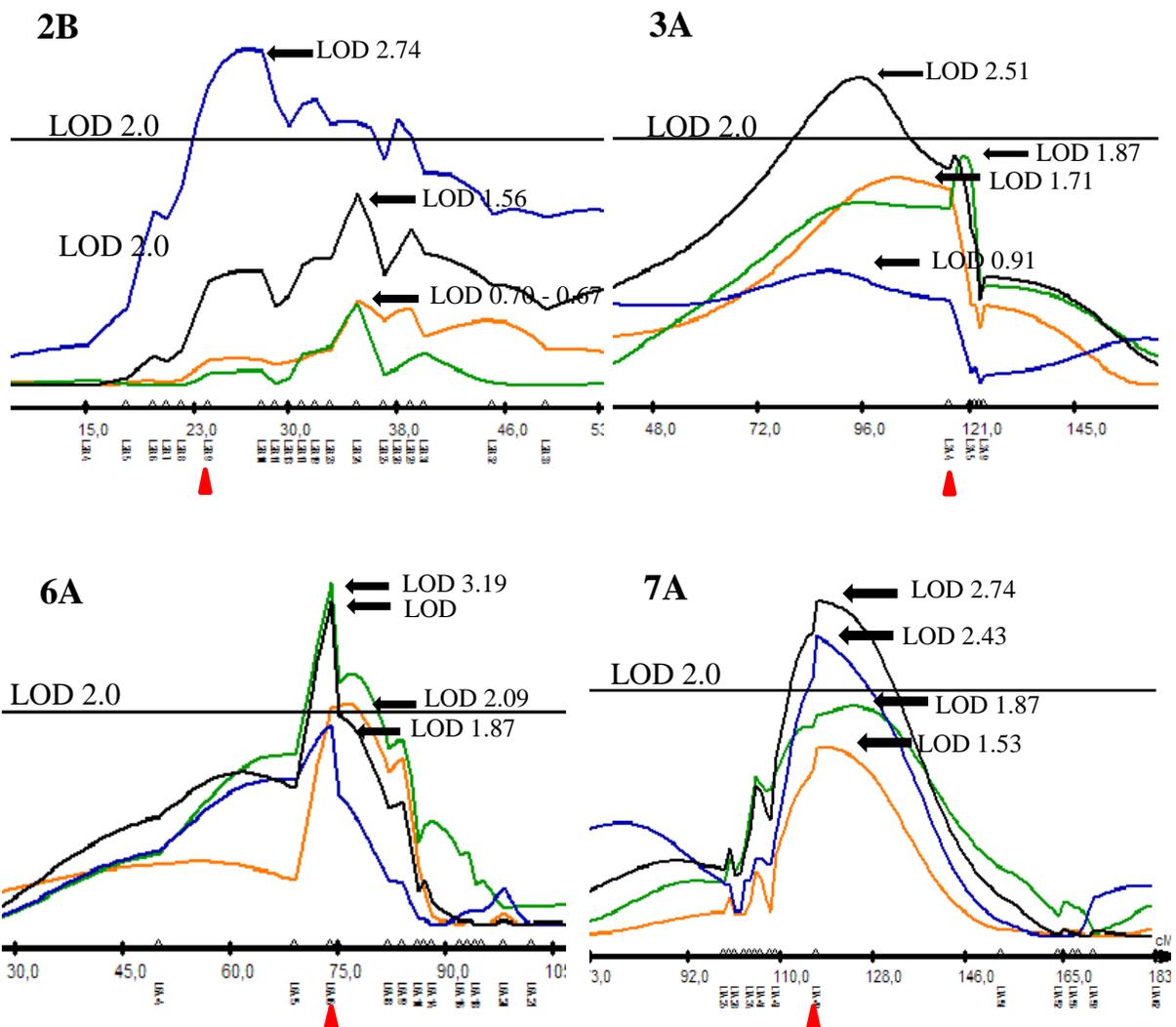


Figura 10. QTLs identificados para severidad a la FE en la población Pampeano x BioINTA 1005 en 3 ensayos de inoculación puntual. Referencias: --E1, --E2, --E3, --EPromedio; ▲ marcador más cercano al pico máximo.

A continuación, se detallan los QTLs detectados en cada cromosoma.

Cromosoma 2B

El QTL se detectó sólo en un ambiente de evaluación (Ensayo 3). El incremento del valor fenotípico es contribuido por el parental Pampeano, y mapea en un intervalo de aproximadamente 22.1cM, flanqueado por los marcadores AX-94889709 y AX-94623285, con su pico máximo ligado al marcador AX-94759165 (Figura 10a). En el análisis estadístico, el marcador ubicado más cercano al pico del QTL resultó estadísticamente significativo solamente en este ensayo, y en términos del efecto sobre la severidad, este

QTL explica el 5.96% de la variación fenotípica observada y explicada por el modelo (Tabla 6 y Tabla 16 del anexo).

Cromosoma 3A

Este QTL, al igual que en el cromosoma anterior, superó el LOD umbral solamente en el ambiente promedio de los 3 ensayos (EProm., Tabla 6 y Figura 10b). Pampeano contribuye con el alelo asociado a la resistencia. El marcador más estrechamente ligado a este QTL es AX-95207390, ubicado a 116,8 cM y el porcentaje de la variación fenotípica explicada es de 5.15%, de acuerdo al análisis de variancia realizado (Tabla 6 y Tabla 17 del anexo). Si bien este QTL superó el LOD fijado como umbral en un ambiente de evaluación, en el análisis de variancia realizado en cada ambiente, el marcador ligado al mismo resultó con un efecto significativo en el ambiente 1 y 2, además del que superó el LOD fijado (Tablas 14, 15 y 17 del anexo).

Cromosoma 6A

El QTL detectado sobre este cromosoma se puede considerar más estable que los anteriores, ya que se detectó con los datos fenotípicos de más de un ambiente: Ensayo 1, Ensayo 2 y EProm (Tabla 6 y Figura 10c). El marcador SNP más estrechamente ligado al QTL es AX-94547709. De acuerdo al análisis de variancia de los efectos individuales de los QTLs, resultó estadísticamente significativo en el ensayo 3 también, a pesar de tener un valor de LOD=1.87 (Tablas 14, 15, 16, y 17 del anexo). En términos del efecto sobre la severidad, éste QTL explicó el 6,27%, 7,37%, 4,00% y 6,11% de la variación fenotípica en los ambientes Ensayo 1, Ensayo 2, Ensayo 3 y EProm, respectivamente. El parental que aporta el alelo involucrado en la determinación del valor fenotípico del carácter, en este caso, es BioINTA 1005.

Cromosoma 7A

El QTL detectado sobre éste cromosoma superó el LOD umbral en los ambientes Ensayo 3 y EProm (Figura 10d). Pampeano es el parental que contribuye con el alelo de resistencia. El marcador más estrechamente ligado a este QTL es AX-94756419, ubicado a 117,1 cM. De la variación fenotípica explicada por el modelo aplicado (Tablas 16 y 17 del anexo), el QTL explica el 8,30% y 8,00% en los ambientes Ensayo 3 y EProm, respectivamente. Cabe destacar que en el análisis de variancia incluyendo los

marcadores ligados a los QTLs detectados, el de este QTL tuvo un efecto significativo en todos los ambientes de evaluación (Tablas 14, 15, 16 y 17 del anexo).

3.2. Interacciones entre QTL

Se evaluaron las interacciones en primer grado entre los QTL detectados para el carácter, con el objetivo de establecer, en el caso de que existieran, interacciones epistáticas entre los QTL. Para tal fin se utilizó un análisis de ANOVA considerando los marcadores picos de los QTL detectados en los 3 ensayos de evaluación como variable clasificatoria. Adicionalmente el efecto del ambiente (Ensayo), y las interacciones entre QTL y ambiente se tuvieron en cuenta en el modelo estadístico.

Se presenta el análisis realizado considerando los 3 ensayos de evaluación juntos (Tabla 7), pero además, en el anexo (Tablas 13 a 16) se presentan los ANOVA para los datos de cada año y del promedio de los 3 ensayos (EProm), donde se muestra que no se encontraron interacciones estadísticamente significativas entre QTLs (representados por el marcador más cercano al pico máximo de cada uno) en esos análisis, excepto entre los QTLs detectados en los cromosomas 6A y 2B, que muestran interacción significativa.

Tabla 7. Análisis de varianza donde se muestra el efecto de los QTL y las interacciones en primer grado entre ellos, con su valor de significancia.

Variable N R² R² Aj CV
 Severidad 363 0,67 0,66 21,54

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo .	46088,55	12	3840,71	58,77	<0,0001
Ensayo	41054,62	2	20527,31	314,11	<0,0001
AX-94547709_6A	1649,42	1	1649,42	25,24	<0,0001
AX-94756419_7A	1462,58	1	1462,58	22,38	<0,0001
AX-94759165_2B	431,21	1	431,21	6,60	0,0106
AX-95207390_3A	1009,10	1	1009,10	15,44	0,0001
AX-94547709_6A*AX-94756419_7A	15,90	1	15,90	0,24	0,6221
AX-94547709_6A*AX-94759165_2B	251,68	1	251,68	3,85	0,0505
AX-94547709_6A*AX-95207390_3A	40,74	1	40,74	0,62	0,4303
AX-94756419_7A*AX-94759165_2B	10,05	1	10,05	0,15	0,6952
AX-94756419_7A*AX-95207390_3A	2,32	1	2,32	0,04	0,8507
AX-94759165_2B*AX-95207390_3A	160,93	1	160,93	2,46	0,1175
Error	22872,89	350	65,35		
Total	68961,44	362			

El modelo general explicó un 67% de la variación fenotípica observada. El efecto individual de los QTLs detectados resultó altamente significativo en los cromosomas 3A,

6A y 7A, y tuvo un valor menor de significancia el QTL detectado en el cromosoma 2B. Los porcentajes de la variación explicada por cada QTL (representado por el marcador más cercano al pico máximo) como efecto individual es bajo: 0,63% para el 2B, 1,46% para el 3A, 2,39% para el 6A, y 2,12% para el 7A.

El efecto del ambiente (Ensayo) es el factor que explica la mayor proporción de la variación fenotípica total explicada por el modelo (59,5%). Con respecto a las interacciones epistáticas entre QTLs, se puede observar en los resultados de este análisis de varianza que no resultaron significativas, excepto la interacción entre los QTLs presentes en los cromosomas 6A y 2B, como ya se mencionó. Ésta interacción explicó el 0,36% de la variación fenotípica observada, y el efecto de la misma se presenta gráficamente en la figura 11.

En los análisis de variancia realizados para cada ambiente de evaluación las interacciones entre los marcadores incluidos en el análisis no resultaron significativas en ningún caso (Tablas 13, 14, 15 y 16 del anexo).

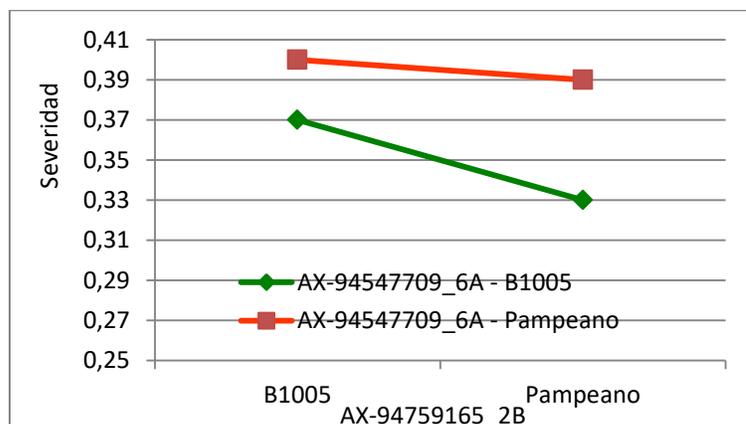


Figura 11. Representación gráfica del efecto epistático entre los marcadores AX-94547709 y AX-94759165.

3.3. Contribución de los dos principales QTLs detectados en este estudio a la severidad de síntomas en espiga

De los resultados expuestos anteriormente, es posible sintetizar la contribución de los 2 QTLs principales que se han detectado, en los cromosomas 6A y 7A, mediante los porcentajes de severidad que se observan en las líneas agrupadas por poseer el alelo favorable o el otro alelo en cada QTL. Se presentan los resultados en la siguiente tabla (Tabla 8 y Tabla 18 del anexo).

Tabla 8. Efecto individual de los alelos alternativos en los 2 QTLs detectados en los cromosomas 6A y 7A, cuantificado por la severidad observada en las líneas portadoras de cada alelo.

	Alelo	N° RILs	Severidad promedio (%)			
			Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio *
QTL 6A						
Pampeano	B	63	28	54	35	39 A
<u>BioINTA 1005</u>	A	58	24	49	32	35 B
QTL 7A						
<u>Pampeano</u>	B	65	24	49	32	35 A
BioINTA 1005	A	57	29	54	36	40 B

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

En la tabla se puede observar que en los 3 ensayos la severidad promedio de las RILs portadoras del alelo favorable (en el marcador ligado al QTL) tienen una severidad menor. Para el QTL en el cromosoma 6A es el alelo A (aportado por BioINTA 1005) el responsable de la resistencia, y en el QTL 7A es el alelo B (aportado por Pampeano) el responsable de la resistencia.

La contribución combinada de los dos principales QTL al fenotipo en estudio detectados en los cromosomas 6A y 7A se presenta a continuación (Tabla 9 y Tabla 18 del anexo).

Tabla 9. Efecto combinado de los alelos alternativos en los 2 QTLs detectados en los cromosomas 6A y 7A, cuantificado por la severidad observada en las líneas portadoras de cada alelo.

QTL				n° RILs	Severidad promedio (%)			
6A	Alelo	7A	Alelo		Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3	Promedio*
Pampeano	B	BioINTA 1005	A	37	31	56	37	41 C
Pampeano	B	<u>Pampeano</u>	B	27	25	51	33	36 B
<u>BioINTA 1005</u>	A	BioINTA 1005	A	20	26	51	35	37 B
<u>BioINTA 1005</u>	A	<u>Pampeano</u>	B	38	23	48	31	34 A

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

Como se puede observar las líneas portadoras de la combinación alélica resistente BioINTA 1005 QTL 6A + Pampeano QTL 7A mostraron en promedio 7% menos severidad que las líneas portadoras de la combinación alélica susceptible BioINTA 1005

QTL 7A + Pampeano QTL 6A. Estos resultados permiten ver el efecto aditivo de los QTLs, y que a pesar de no haberse detectado los mismos en todos los ambientes, la severidad observada siempre fue menor en las RILs portadoras de la combinación de alelos favorables para el carácter (alelo A en el QTL del cromosoma 6A y alelo B en el QTL del cromosoma 7A).

Se presentan las siguientes figuras que permiten ver gráficamente lo recientemente expuesto (Figura 12).

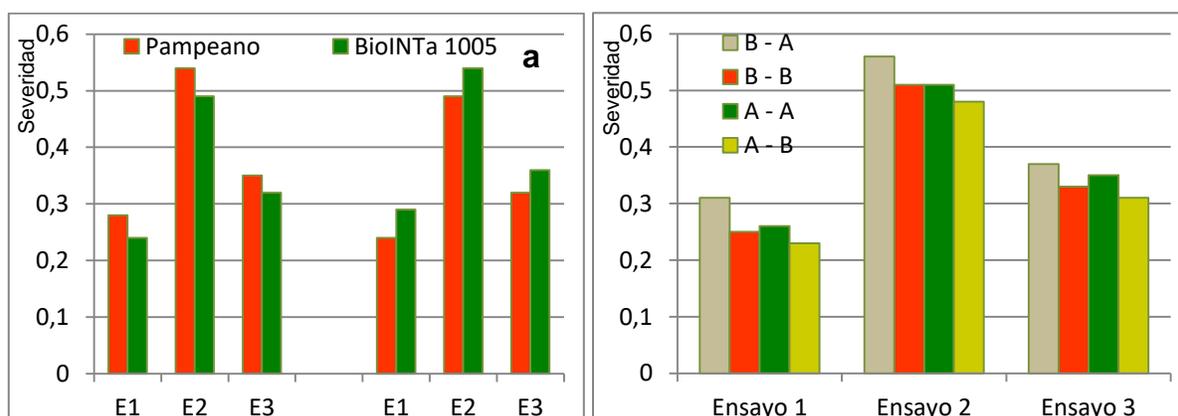


Figura 12. a) Severidad promedio en cada ensayo de las RILs portadoras del alelo de Pampeano (B) o BioINTA 1005 (A) para los QTL detectados en los cromosomas 6A (izquierda) y 7A (derecha). b) Severidad promedio de las RILs portadoras de las distintas combinaciones de los alelos de Pampeano (B) y BioINTA 1005 (A) en 6A y 7A, en los 3 ensayos de inoculación.

Finalmente, se analizó los alelos presentes en la región próxima a los 2 picos detectados en los cromosomas 6A y 7A, en las RILs que mostraron una menor severidad promedio de los 3 ensayos. Se incluyeron las 10 líneas de mejor comportamiento y aquellas RILs que habían mostrado mejor comportamiento que Pampeano en alguno de los ensayos, resultando en total 12 líneas (Tabla 10). Se incluye el genotipo observado en cada marcador (en las columnas) de la región asociada a la resistencia entre los marcadores flanqueantes de esa región, asignándole A si corresponde a BioINTA 1005 y B si corresponde a Pampeano.

El marcador más cercano al pico del QTL es AX-94547709 en el cromosoma 6A y AX-94756419 en el cromosoma 7A (se encuentran resaltados en color).

Lo que se puede observar es que el marcador asociado al QTL de resistencia en el cromosoma 6A presenta en 8 de las 12 líneas el alelo favorable a la resistencia (alelo A

presente en BioINTA 1005), y en el marcador asociado al cromosoma 7A en 9 de las 12 líneas presenta el alelo favorable (alelo B, presente en Pampeano). Considerando el efecto aditivo de los QTLs, son 7 de 12 las líneas que presentan la combinación de alelos en los 2 QTLs que les permiten sumar esos efectos (RIL 41, RIL 67, RIL 71, RIL 72, RIL 76, RIL 91, RIL 109). De las líneas que habían mostrado mejor comportamiento que el progenitor resistente, sólo 2 de las 4 presentarían la variante alélica más favorable a la resistencia.

Tabla 10. Región próxima a los QTLs detectados en los cromosomas 6A y 7A en 12 RILs de buen comportamiento a FE.

RIL	QTL 6A									QTL 7A									
	AX-95178786	AX-95017416	AX-95184774	AX-94547709	AX-95012377	AX-94616754	AX-94912807	AX-94534539	AX-95149371	AX-94927037	AX-94514902	AX-94514025	AX-94536499	AX-95229215	AX-94714903	AX-94580593	AX-94756419	AX-94531661	AX-94628214
Ril 6*	A	A	A	A	A	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RIL 35	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
RIL 41	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
RIL 67	-	B	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
RIL 69	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
RIL 70*	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A
RIL 71	B	B	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
RIL 72	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
RIL 76	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B
RIL 91*	A	A	A	A	B	B	B	-	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A
RIL 98	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	B	A	A	A
RIL 109*	-	-	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	B	B	B	B	A

A: alelo aportado por BioINTA 1005, B: alelo aportado por Pampeano. *:RIL que mostró segregación transgresiva en algún ensayo. Se resalta en otro color (BioINTA 1005 (A): verde, Pampeano (B): naranja) el alelo presente en el marcador más estrechamente ligado al QTL (AX-94547709 en el cromosoma 6A y AX-94756419 en el cromosoma 7A).

DISCUSIÓN

Una vez detallados los resultados obtenidos en el desarrollo del trabajo experimental, se discuten a continuación los mismos, en los siguientes apartados: genotipado de la población, caracterización fenotípica de la población, detección de QTLs, contribución potencial al mejoramiento genético de los principales QTLs detectados, y finalmente la identificación de QTLs de resistencia a FE utilizando los datos fenotípicos máximos de cada ensayo en la matriz genotipo - fenotipo.

1. Genotipado de la población

En la exploración inicial en busca de polimorfismo entre ambos progenitores, mediante marcadores SSR, se encontró que el 37,6% de los mismos resultaron polimórficos por su patrón de bandas. En el análisis de los resultados del genotipado masivo de las RILs realizado mediante marcadores SNP, se encontró que de un total de 35143 marcadores, 24478 resultaron monomórficos, y debieron ser descartados por esa causa. Esto representa el 69,7% de los marcadores.

De acuerdo a lo informado en la bibliografía, estos resultados están dentro de los valores esperados para esta especie. Somers y col. (2004) sostienen que en el mapeo de poblaciones de trigo el nivel de polimorfismo encontrado varía entre 20 y 40%, siendo esto una limitante en el número de marcadores que se pueden mapear. Debido a ello proponen mapear poblaciones con diferentes progenitores y construir mapas consenso.

El nivel de polimorfismo encontrado entre los parentales en una población va a depender en gran medida de la distancia genética existente entre ellos, y también del tipo de marcador utilizado. Roder y col. (1998) sostienen que los marcadores RFLPs tienen un uso limitado para análisis moleculares intra específicos, debido a que por lo general menos del 10% de los *loci* resultan polimórficos en trigo.

En el mapa de ligamiento construido con la población estudiada, el genoma que quedó menos representado fue el D, y con una marcada diferencia con respecto a los otros 2 genomas: genoma A con el 47,9% de los marcadores informativos, genoma B con el 44,6% y el genoma D con sólo el 7,5% y 577,4 cM. Específicamente, los cromosomas más subrepresentados fueron 3D, 5D y 6D con tres *loci* cada uno (Tabla 1 y Figura 7).

Un mapa de ligamiento recientemente construido con el mismo microarreglo de SNPs, con una población de RILs obtenidas del cruzamiento de Baguette 10 x Klein Chajá tuvo un resultado similar en cuanto a la menor cobertura de los grupos de ligamiento de los cromosomas del genoma D (Alonso, M.P., comunicación personal) lo cual sugeriría una limitante inherente al set de SNPs seleccionados para el desarrollo del microarreglo. Roder y col. (1998) genotipando una población con marcadores SSR también encontraron menor polimorfismo en el genoma D. También Cui y col. (2014) quienes desarrollaron un mapa genético usando una población de 188 RILs, y marcadores de distinto tipo, encontraron que el 44,8% mapeo en el genoma A, el 33,5% en el genoma B y el 21,7% en el genoma D.

Con los resultados obtenidos en el genotipado, de buena cobertura en los genomas A y B, y deficiente en el D, se debería genotipar la población de estudio con otro tipo de marcadores, como ser SSRs, para los cromosomas de este último genoma, con el objetivo de lograr grupos de ligamiento que representen mejor esos cromosomas. Esto posibilitaría, probablemente, detectar otras regiones ligadas a la resistencia, que no han sido detectadas con el mapa actual. Otra opción podría ser la utilización de microarreglos alternativos al Axiom 35k como DARTSeq y 91k Illumina entre otros asumiendo una mejor cobertura del genoma D. En este sentido, mapas genéticos desarrollados con la tecnología DARTSeq generaron tamaños similares (308-414 cM) al obtenido en este estudio (Ren y col., 2017; Li y col., 2015, respectivamente) representados por 98-140 *loci* vs 74 *loci* obtenidos en nuestro estudio lo que sugiere una limitante similar a la observada con el microarray Axiom 35 en este estudio. Alternativamente, la utilización de la tecnología 91k Illumina permitió la obtención de un mapa del genoma D de 429 cM representados por 1168 *loci* (Fowler y col., 2016), lo que lo posicionaría como mejor opción para resolver el escaso número de marcadores polimórficos presentes en el genoma D.

Por otra parte, en las regiones donde se detectaron QTLs de resistencia, se debería encontrar marcadores cercanamente ligados a los alelos de resistencia, y fáciles de utilizar para selección asistida. Estos marcadores podrían ser SSR o bien desarrollar marcadores específicos a partir de los SNPs. Este proceso de saturación con marcadores de regiones específicas del genoma se ha facilitado enormemente con los recientes avances en la obtención de la secuencia referencia del genoma completo de trigo pan (Clavijo et al. 2017), por lo cual es posible el desarrollo de marcadores para selección

asistida y la búsqueda de genes candidatos para el eventual clonado posicional del gen de resistencia a FE.

2. Caracterización fenotípica de la población

En los 3 ensayos de inoculación llevados adelante en invernáculo, los progenitores de las RILs alcanzaron valores de severidad de acuerdo a lo previsto por la información previa disponible sobre estos cultivares (Alves y col., 2013; Canú, 2008; Alberione y col., 2012). Pampeano fue seleccionado como progenitor de la población por su resistencia a la enfermedad, sobre todo por su comportamiento para resistencia de tipo 2, de dispersión del patógeno en la espiga. BioINTA 1005, es un cultivar de excelente potencial de rendimiento, pero con marcada susceptibilidad a FE.

En dos de los tres ensayos de evaluación llevados adelante, se observó segregación transgresiva de algunas líneas. Esta segregación transgresiva ocurrió siempre en el sentido del progenitor resistente, es decir se obtuvieron líneas con mayor resistencia que el progenitor más resistente. Este hecho nos estaría indicando que ambos progenitores aportaron factores de resistencia, suposición que fue posteriormente confirmada cuando se detectaron los QTLs presentes en la población de estudio, y que ambos progenitores aportaron alelos de resistencia.

Ambos progenitores se ubicaron en los extremos de las distribuciones en los 3 ensayos, y si bien Pampeano fue superado por la resistencia por 2 líneas en el ensayo 1 y otras 2 líneas en el ensayo 3, la diferencia en el valor de severidad entre las líneas y el cultivar fue pequeña.

El fenotipado de las RILs presentó una alta variación dentro de repeticiones (entre espigas inoculadas en cada repetición) y entre repeticiones en cada RIL, en los 3 ensayos de inoculación. Aun así, los valores promedio obtenidos por repetición y por RIL en cada ensayo permitieron discriminar entre líneas, en el análisis estadístico con un efecto genotipo (RILs) altamente significativo. En el gráfico de los histogramas de frecuencias de cada ensayo (Figura 8) se observa una distribución cercana a la normal en cada uno. Estos resultados obtenidos del fenotipado en cuanto a la variación observada, son coincidentes con lo expuesto por Anderson y col. (2001) que expresan que uno de los principales problemas en evaluar la resistencia a la fusariosis de la espiga es la reproducibilidad. La severidad de los síntomas observados es un rasgo de carácter

cuantitativo, modulado por factores genéticos del hospedante (factores de resistencia) y del patógeno (virulencia y patogenicidad); y por la influencia ambiental en el establecimiento de la enfermedad y el desarrollo de la misma, con un componente importante de interacción genotipo - ambiente.

Con la idea de minimizar los factores externos que afectan el fenotipado, y que se está en condiciones de controlar, se decidió trabajar con resistencia de tipo 2, y utilizar como método de inoculación el del algodón embebido en la solución de inóculo con concentración conocida. En este sentido, hay ensayos previos del grupo de trabajo y otros grupos, que con el ajuste y optimización de la técnica han permitido la evaluación y caracterización de germoplasma por su resistencia a la dispersión del patógeno en la espiga de forma satisfactoria (Muller y Lassaga, 2008; Canú, 2008; Navarro, 2009; Toledo y col. 2011; Cattivelli y col. 2013).

A nivel internacional, van Ginkel y col. (1996), concluyen que éste método de inoculación es simple, efectivo y puede detectar diferencias cuantitativas entre genotipos. Esta metodología de inoculación, que permite que la infección se dé naturalmente, posibilita una mayor discriminación entre genotipos que otras que consisten en forzar la infección, tal como lo sugiere Engle y col. (2003) en su trabajo.

Cuando se estimó la correlación de Pearson entre ensayos, se encontró que las mismas tuvieron valores entre 0,43 y 0,64, siempre altamente significativos (Tabla 3). La mejor correlación es la que se obtuvo entre los ensayos 1 y 3, los cuales fueron conducidos durante el otoño de 2014 y 2015. Teniendo en cuenta el carácter bajo evaluación y la compleja determinación genética del mismo, pueden considerarse estos valores como aceptables. Otros trabajos que involucran la determinación de la severidad (resistencia de tipo 2) informan correlaciones variables, tanto en magnitud como en significancia estadística.

Cattivelli y col. (2013) informaron una correlación de 0,5 entre los 2 ensayos de evaluación realizados en condiciones similares a las de este trabajo. Yang y col. (2005) en sus experimentos de inoculación encontraron correlaciones altamente significativas y con valores entre 0,36 y 0,57 entre diferentes años de evaluación. Anteriormente, Bai y col. (1999) encuentran correlaciones altamente significativas y mayores a las de este trabajo. Buerstmayr y col (2013) encontraron correlaciones altamente significativas y con valores entre 0,40 y 0,71 en ensayos de inoculación en invernáculo.

Con los resultados obtenidos del fenotipado se logró la discriminación entre líneas por su comportamiento cuantificado por la severidad observada, y las consideraciones anteriormente expuestas permitirían suponer que aumentando los ambientes de evaluación, aumentará la precisión al detectar regiones genómicas asociadas a la resistencia estudiada en esta población.

Otras evaluaciones, como ser de resistencia a la infección inicial o resistencia a la acumulación de micotoxinas deberían ser evaluadas en esta población, para explorar otros genes y mecanismos de resistencia involucrados en la determinación del comportamiento observado en condiciones de campo por los progenitores.

3. Detección de QTLs

En el análisis individual llevado adelante para detectar los posibles QTLs de resistencia, y tal como se detalló en los resultados, se detectaron QTLs en 4 cromosomas. En dos cromosomas, el 2B y 3B, la aparición de estos QTLs se produjo en un solo ambiente de evaluación. En tanto, las regiones genómicas de los cromosomas 6A y 7A, asociadas a la resistencia, serían más estables, ya que fueron detectadas en más de un ambiente de evaluación. Los QTLs encontrados no están ubicados en los cromosomas 2D, 3B, 4B, 5A y 6B, que es donde se han identificado en más de una ocasión, con diferentes poblaciones de mapeo y han sido validados (Buerstmayr y col., 2009).

Estos QTL detectados explican cada uno un porcentaje bajo de la variancia fenotípica observada, es decir, tienen un efecto menor en la explicación de la variación fenotípica.

De las 4 regiones genómicas asociadas a la resistencia, la del cromosoma 2B es la menos estable, ya que superó el LOD umbral fijado en un solo ambiente, y además el marcador ligado al QTL resultó estadísticamente significativo en el análisis de variancia sólo en ese ambiente (Tabla 6 y Tablas 14, 15, 16 y 17 del anexo).

Sobre el cromosoma 3A la situación fue similar con respecto a la detección mediante el CIM, pero en los análisis estadísticos realizados, incluyendo al marcador más cercano al pico, tuvo un efecto estadísticamente significativo en más ambientes: Ensayo 1, Ensayo 2 y EProm. Los otros dos QTLs fueron detectados en más de un ambiente, superando el LOD umbral, y además en el análisis de variancia realizado en cada ambiente el efecto fue estadísticamente significativo en todos ellos. Esto nos estaría

indicando una mayor estabilidad de los mismos (Tabla 6 y Tablas 14, 15, 16 y 17 del anexo).

En el QTL identificado sobre el cromosoma 6A en todos los ambientes el pico máximo del QTL se encontró en el mismo lugar, es decir más cercanamente ubicado al mismo marcador, y en el ambiente de menor valor de LOD, éste llegó a 1,87 (Figura 10). El análisis de variancia del marcador ligado resultó con un efecto estadísticamente significativo en todos los ambientes considerados (Tablas 6, y 14 a 16 del anexo).

El QTL que fue identificado sobre el cromosoma 7A, si bien superó el valor de LOD umbral en dos ambientes de evaluación, en los otros alcanzó valores para este parámetro de 1,87 y 1,53, y como se detalló en los resultados, en el análisis de variancia involucrando al marcador ligado, tuvo un efecto estadísticamente significativo en todos los ensayos, lo que también indicaría estabilidad del mismo (Tablas 6, y 14 a 16 del anexo).

Revisando los antecedentes en la bibliografía de los QTLs informados en estos cromosomas, se encontró que hay informadas regiones responsables de la resistencia a la dispersión de *F. graminearum* en la espiga en todos ellos.

Sobre el cromosoma 2B, están informados QTLs de resistencia con distintas poblaciones de estudio, que explican porcentajes entre 4,2 y 6,1% de la variación fenotípica en la severidad, valores similares al 5.96% observado en nuestro estudio (Tabla 6). El estudio de la población de 133 RILs de Ning 7840 x Clark, llevado a cabo por Zhou y col. (2002), fenotipando la misma en 4 experimentos en invernáculo, permitió detectar un QTL de resistencia sobre el brazo largo del cromosoma, con un 4,7% de la variación fenotípica explicada, y el marcador SSR Xgwm120 ligado al mismo.

En una población doble haploide de 180 líneas, con progenitores Remus y Frontana, Steiner y col. (2004) detectaron sobre este cromosoma un QTL que explicó un 6,1% de la variación fenotípica, e informan que los marcadores Xs13m25.8 y Xs24m15.6 son los más cercanamente ligados al QTL. Posteriormente, Liu y col., en 2007, también identifican un QTL de resistencia sobre este cromosoma, que explica un 4,2% de la variación fenotípica, con 243 RILs del cruzamiento entre Ernie y MO94-317. Este QTL se encuentra ligado al marcador SSR Xgwm276b.

Hay informados también QTLs de resistencia a la infección inicial, y explican porcentajes mayores de la variación fenotípica observada. Gilsinger y col. (2005) detectan dos QTLs de este tipo de resistencia, con datos de incidencia de seis ensayos realizados.

Uno de los QTLs es de efecto mayor, y explica el 29% de la variación fenotípica, fue detectado en el intervalo entre los marcadores Xbarc200 y Xgwm210.

De los QTLs asociados a resistencia a FE mencionados para el cromosoma 2B aquel que se ubica en la misma región genómica al detectado en este estudio sería proveniente de la variedad Goldfield ubicado en el intervalo 5-40 cM del cromosoma 1B y asociado con apertura estrecha de flor (Gilsinger y col., 2005, citado en Buerstmayr y col. 2009). Goldfield es un trigo blanco blando desarrollado por la Universidad de Purdue con un pedigree no relacionado con el cultivar brasilero Pampeano (Ohm y col., 2000), aunque futuros estudios genéticos podrán establecer si se trata del mismo QTL o son diferentes.

Para el cromosoma 3A, también hay varios reportes de QTLs de resistencia a FE, cada uno de ellos con explicación de porcentajes variables de la variación fenotípica observada, la amplia mayoría de ellos ubicados en la región centromérica del brazo corto de dicho cromosoma lo cual coincidiría con la ubicación del QTL identificado en este estudio proveniente de Pampeano. Este QTL de resistencia a FE ha sido identificado en germoplasma de diversos orígenes como ser chino, trigos europeos invernales y sudamericano (Frontana) (Buerstmayr y col., 2009; He y col., 2016).

En el cromosoma 6A, los QTLs previamente informados de resistencia a FE (provistos por los cultivares ND2603 y Dream, extraído de Buerstmayr y col. 2009) se ubican en el brazo corto del cromosoma a una posición más distal respecto a el QTL 6A proveniente de BioINTA 1005 identificado en este estudio, el cual presenta una posición más cercana al centrómero lo cual sugeriría un origen diferente. En otro trabajo, Arruda y col. (2014) identificaron un marcador asociado a la resistencia a *F. graminearum* sobre este cromosoma, pero asociado a la incidencia. En este caso tampoco coincide la posición relativa del QTL con la del detectado en nuestra población de estudio.

Los reportes previos de QTLs involucrados en la severidad, sobre el cromosoma 7A, son numerosos y la mayoría de ellos de origen chino (Wangshuibai). Al respecto, en dos poblaciones independientes (Wanghuibai x Wheaton y Wanghuibai x Alondra) se identificaron QTLs asociados a resistencia a FE en la región proximal del brazo largo del cromosoma 7A, y ésta resistencia fue provista por Wangshuibai (Zhou y col., 2004; Jia y col., 2005). Esta región es coincidente con el QTL 7A detectado en este estudio, proveniente de Pampeano. Una posible explicación a esta coincidencia podría estar dada por la presencia de germoplasma de origen chino (Sumai 3) en el pedigree de Pampeano,

si bien hasta el momento no se han reportado en Sumai 3 QTL de resistencia a FE en este cromosoma, por lo que podría tratarse de otro origen.

Los porcentajes de variación fenotípica explicada por los QTLs detectados no difieren en gran medida de los informados en la literatura. Hay que tener en cuenta además, la alta influencia de los factores ambientales sobre este carácter. Coincide que todos los QTLs previamente informados sobre estos cromosomas son de efecto menor.

Sería interesante utilizar los marcadores informados como estrechamente ligados a los QTLs informados en estos cromosomas, para caracterizar la población de estudio de este trabajo (en el caso que resulten polimórficos, o buscar otro cercano), para determinar si están ligados a los QTLs de resistencia detectados.

4. Contribución potencial al mejoramiento genético de los principales QTLs de resistencia a FE detectados en este estudio

En un primer análisis, cuando se cuantificó el cambio en los valores de severidad por la presencia de los alelos que serían los responsables de la resistencia, en los dos QTLs más estables, los resultados encontrados fueron los esperados, es decir, la severidad promedio de los genotipos portadores de los alelos de resistencia siempre fue menor, y con diferencias estadísticamente significativas. Además, en todos los ambientes de evaluación el comportamiento fue similar demostrando estabilidad de los QTLs. Estos resultados posicionarían a estos dos QTLs como una combinación atractiva para la incorporación de nuevas fuentes de resistencia a FE en germoplasma adaptado mediante selección asistida por marcadores.

Por otro lado, el análisis de los alelos presentes en las líneas que resultaron, en promedio para todos los ensayos, con menores valores de severidad, puso en evidencia que si bien la mayor proporción de las mismas era portadora de al menos en uno de los dos QTLs considerados (6A y 7A) de acuerdo al alelo identificado con la resistencia, no fue así en todos los casos. En total siete de las 12 líneas analizadas tuvieron la combinación de alelos resistentes para las dos regiones. Esto se explicaría por el efecto menor que poseen estos QTLs, y que si bien los resultados encontrados indican aditividad de los mismos, no explican porcentajes altos de la variación fenotípica observada. Probablemente las líneas de mejor comportamiento tienen alelos favorables a la

resistencia en otras regiones genómicas, y que no han podido ser detectadas en este estudio, o bien se han detectado sin poder ser considerados estables.

5. Identificación de QTLs de resistencia a FE utilizando datos fenotípicos máximos

Se probó también un segundo análisis de detección de QTLs con una matriz incluyendo los datos fenotípicos máximos observados en cada línea en cada ensayo, al existir un antecedente (Cattivelli y col., 2013) quienes en su trabajo de detección de QTLs para resistencia de tipo 2 a la FE en una población de RILs tomaron este criterio, al observar gran variabilidad en el carácter evaluado. Estos autores consideraron que el valor máximo de severidad es el límite hasta donde el genotipo permitió el avance del patógeno, estimado por los síntomas visibles.

Cuando se analizaron los QTLs detectados con ésta matriz, se detectaron un mayor número de QTLs, no sólo en más regiones genómicas, sino también en mayor número de ensayos. Con respecto a las regiones genómicas, aparecen QTLs significativos en 4 cromosomas más: 1D, 3B, 4A, 5A y 7B, con respecto a la detección utilizando los datos completos. No se detectó ningún QTL que estuviera presente en todos los ambientes evaluados, aunque se detectaron algunas regiones genómicas con QTLs significativos en más de un ambiente de evaluación. Al igual que en la situación anterior (datos completos), ambos progenitores presentaron alelos favorables a la resistencia (Pampeano estaría aportando alelos de resistencia en 3 regiones genómicas, y BioINTA 1005 lo haría en 5 regiones) (Tabla 19 y Figura 13 del anexo).

De los 21 QTLs que se detectaron con esta matriz fenotípica, seis fueron encontrados sólo en un ambiente de evaluación. Estos se ubicaron sobre los cromosomas 1D, 3B, 4A.1, 5A.1, 7A.1 y 7B. En términos del efecto sobre la severidad, estos QTLs explican entre el 5,04% y el 9,90% respectivamente, de la variación fenotípica observada y explicada por el modelo. Ninguno de ellos fue detectado con la matriz de datos fenotípicos completos.

Los otros dos QTLs nuevos encontrados, con los datos máximos, fueron los ubicados en los cromosomas 4A (4A.2) y 5A (5A.2). El porcentaje de la variancia explicada por los marcadores ligados a estos QTLs osciló entre 0,18% y 9,59%. El resto

de los QTLs detectados con estos datos coincide con los anteriormente detectados (con la matriz de datos completos).

Sobre el cromosoma 2B, el QTL se detectó en 2 oportunidades: en el tercer ambiente de evaluación (Ensayo 3) y el promedio de las severidades máximas de los 3 ensayos (EProm). En Ensayo 3, con un LOD=4.96 asociado al marcador AX-94542864 en su pico máximo. El alelo asociado a la resistencia es aportado por el parental Pampeano, y mapea en un intervalo de aproximadamente 31.1cM, flanqueado por los marcadores AX-94889709 y AX-94488406, (Tabla 19 y Figura 13b del anexo). En términos del efecto sobre la severidad, este QTL explica el 15.21% de la variación fenotípica observada y explicada por el modelo. En EProm se detectaron 3 picos que superaron el LOD umbral, asociados a 3 marcadores: AX-94491066, AX-94943657 y AX-94542864, todos dentro de la misma región genómica asociada al carácter detectada con los datos del Ensayo 3. De estos marcadores estrechamente ligados, solamente AX-94491066 resultó estadísticamente con diferencias significativas, explicando un 8,93% de la variación fenotípica (Tablas 22 y 23 del anexo).

En el cromosoma 3A, el QTL superó el LOD umbral en dos ambientes analizados: Ensayo 1 y EProm. Pampeano aporta el alelo de resistencia del carácter. El marcador más estrechamente ligado a este QTL, en los dos ambientes, es AX-95207390, ubicado a 116,8 cM. Esto coincide con el marcador ligado al QTL detectado con los valores de EProm. El porcentaje de la variación fenotípica explicada es de 6.16% y 4.81% para Ensayo 1 y EProm, respectivamente (Tabla 19, 20 y 23 y figura 13c del anexo). La diferencia en el pico máximo que presentó este QTL en los diferentes ambientes de evaluación podrían deberse a los efectos ambientales involucrados en la determinación del carácter, debido a su compleja y elevada interacción con factores no genéticos.

El QTL en el cromosoma 6A estuvo presente en más de un ambiente: Ensayo 1 y EProm. El marcador SNP más estrechamente ligado al QTL fue AX-94616754 en el caso del Ensayo 1, y el marcador AX-94547709 en EProm. Entre ellos están separados por 8,6 cM. De acuerdo al análisis de variancia de los efectos individuales de los QTLs, ambos marcadores tuvieron un efecto estadísticamente significativo en sus respectivos ensayos (Tabla 19, 20 y 23 y Figura 13g del anexo). En términos del efecto sobre la severidad, éste QTL explicó el 3,38% y 6,99% de la variación fenotípica en los ambientes Ensayo 1 y EProm, respectivamente. El parental que aporta el alelo asociado al carácter es BioINTA 1005.

Fueron identificadas dos regiones sobre el cromosoma 7A, una ya descrita en los QTLs detectados en un solo ambiente de evaluación. El segundo QTL detectado sobre éste cromosoma superó el LOD umbral en Ensayo 2, Ensayo 3 y EProm, con estos datos máximos. El marcador más estrechamente ligado a este QTL es AX-94756419, ubicado a 117,1 cM en E3 y EProm, y el marcador AX-94927037, ubicado a 9,1 cM del anterior, en Ensayo 2. De la variación fenotípica explicada por el modelo aplicado, el QTL explica el 5,15%, 6.11% y 5,57% en los ambientes Ensayo 2, Ensayo 3 y EProm, respectivamente (Tabla 19, 21, 22 y 23 y Figura 13h del anexo).

La presencia de QTLs en diferentes regiones cromosómicas estaría confirmando la base genética compleja del carácter, y la aparición de mayor número de QTLs con estos datos de severidad, donde se están maximizando los valores de este carácter, nos estaría indicando la presencia de otras regiones con genes relacionados a la resistencia, no detectadas con los datos fenotípicos totales.

Cuando se consideraron las interacciones en primer grado entre los QTL detectados para el carácter, se encontraron interacciones entre los mismos considerando esta matriz de datos (Tablas 20 a 23 del anexo).

En el ensayo 2 se detectó interacción estadísticamente significativa entre los marcadores AX-94975563 (7A.1) y AX-94927037 (7A.2), ambos ubicados sobre el cromosoma 7A, y asociados a 2 QTLs detectados sobre el mismo. Se graficó el efecto epistático detectado entre los marcadores estos marcadores (Figura 14).

En el ensayo 3 se detectaron 3 interacciones estadísticamente significativas entre marcadores: AX-94542864 y AX-95009696 (QTLs detectados en los cromosomas 2B y 7B), AX-94756419 y AX-95634516 (QTLs detectados en los cromosomas 7A.2 y 4A.1), y AX-94542864 y AX-94761767 (QTLs detectados en los cromosomas 2B y 4A.2).

Estas interacciones entre QTLs, explican porcentajes de la variación fenotípica total para el carácter entre 2,41% y 4,33% (Tablas 21 y 22 del anexo). La interacción detectada en el ensayo 2, entre los QTLs situados sobre el mismo cromosoma, el 7A, es donde se encuentra el mayor porcentaje de variación explicada (4,33%). Las interacciones entre QTLs detectadas en el ensayo 3, explican un 3,36% entre los QTLs de los cromosomas 2B y 7A, un 2,45% entre los QTLs de los cromosomas 7A (7A.2) y 4A (4A.1), y un 2,41% entre los QTLs de los cromosomas 2B y 4A (4A.2).

Cuando se consideraron los datos máximos de severidad observados en cada RIL, en el análisis de QTLs se obtuvo mayor número de regiones genómicas asociadas a la severidad de la fusariosis en esta población de estudio. De todos modos es importante

tomar los resultados de detección de QTLs de FE con valores máximos de severidad con extrema precaución ya que presentan una debilidad importante dada por la baja correlación entre resultados obtenidos por ambiente: 0,16 en Ensayo 1 vs Ensayo 2, 0,21 en Ensayo 1 vs Ensayo 3 y 0,08 Ensayo 2 vs Ensayo 3 (Tabla 14 del anexo). Además, al ser un dato único de cada RIL en cada ensayo (sin repetición), no es conveniente analizar estadísticamente los mismos.

En todos los casos, los QTLs detectados con los valores promedio de severidad, fueron detectados con los datos máximos. Los QTLs detectados con los valores máximos, además de sus efectos individuales, también mostraron interacciones significativas entre algunos de ellos (Figura 14 del anexo).

CONCLUSIONES

De acuerdo a los resultados obtenidos en este estudio, y considerando que la hipótesis de trabajo fue que el cultivar Pampeano posee factores novedosos de resistencia genética a la fusariosis de la espiga, cuya localización genómica difiere de aquellos identificados en el cultivar chino Sumai 3, y el objetivo general fijado fue determinar la base genética de la resistencia a la fusariosis de la espiga de Pampeano utilizando una población derivada del cruzamiento entre Pampeano (resistente) y BioINTA 1005 (susceptible), se concluye lo siguiente:

- La estrategia de genotipado masivo con el microarray Axiom 35K permitió la construcción de un mapa genético basado en la población estudiada el cual incluye la totalidad de los cromosomas de genoma de trigo, con una menor cobertura en grupos de ligamiento de los cromosomas del genoma D.
- El fenotipado de las RILs realizado en ensayos de inoculación puntual de las espigas en invernáculo permitió discriminar a las mismas por la severidad de los síntomas de la dispersión del patógeno en la espiga, constituyendo la metodología utilizada una técnica confiable y apropiada para este tipo de estudio.
- Los valores de severidad que caracterizaron las diferentes RILs permitieron la detección de QTLs en la población de estudio. Los valores obtenidos, con una gran dispersión de los datos de cada línea dentro de cada ensayo y entre ensayos reflejan la naturaleza sumamente compleja del carácter.
- Se identificaron QTLs de resistencia sobre 4 cromosomas. En los cromosomas 2B y 3A los QTLs detectados mostraron menos estabilidad, de acuerdo a los ambientes en que fueron detectados, y en los cromosomas 6A y 7A los QTLs detectados mostraron mayor estabilidad.

- En los QTLs de resistencia detectados, se identificaron alelos aportados por ambos progenitores (Pampeano y BioINTA 1005) como los responsables de esta resistencia. En este sentido, no se esperaba encontrar alelos de resistencia aportados por BioINTA 1005, dada su alta susceptibilidad a la fusariosis de la espiga mostrada a campo.
- Todos los QTLs detectados son de efecto menor, ya que no explicaron porcentajes altos de la variación fenotípica observada para el carácter bajo estudio. Ese efecto menor de los QTLs detectados coincide por su magnitud con el efecto de los QTLs de resistencia tipo 2 previamente informados sobre los mismos cromosomas.
- Pampeano porta alelos favorables en los QTLs detectados en los cromosomas 2B, 3A y 7A, y BioINTA 1005 aporta el alelo favorable en el QTL detectado sobre el cromosoma 6A.
- Los QTLs correspondientes a los alelos aportados por Pampeano coinciden con QTLs previamente descritos para FE, mientras que el QTL presente en el cromosoma 6A y aportado por BioINTA 1005 es inédito.
- La combinación alélica de los dos principales QTLs detectados en este estudio llega a reducir en un 7% la severidad de la FE lo que lo posiciona como una importante contribución al mejoramiento genético.
- La saturación con marcadores adicionales de los grupos de ligamiento del genoma D permitirá explorar la eventual existencia de QTL adicionales de resistencia a FE no detectados en este análisis.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G.N. 2004 (copyright 2005). Plant Pathology. 5th. Edition. Academic Press, San Diego, CA.
- Akbari, M.; Wenzl, P.; Caig, V.; Carling, J.; Xia, L.; Yang, S.; Uszynski, G.; Mohler, V.; Lehmensiek, A.; Kuchel, H.; Hayden, M.J.; Howes, N.; Sharp, P.; Vaughan, P.; Rathmell, B.; Huttner, E.; Kilian, A. 2006. Diversity arrays technology (DArT) for high-throughput profiling of the hexaploid wheat genome. *Theor Appl Genet* 113(8): 1409-1420.
- Alberione, E; Bainotti, C.; Frascina, J.; Salines, J.; Donaire, G.; Formica, B.; Gómez, D. 2012. Evaluación sanitaria de cultivares de trigo en la subregión triguera II Norte - Campaña 2011/12. http://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-inta_sanidadtrigo12.pdf
- Allen, A.M.; Winfield, M.O.; Burridge, A.J.; Downie, R.C.; Benbow, H.R.; Barker, G.L.; Wilkinson, P.A.; Coghill, J.; Waterfall, C.; Davassi, A.; Scopes, G.; Pirani, A.; Webster, T.; Brew, F.; Bloor, C.; Griffiths, S.; Bentley, A.R.; Alda, M.; Jack, P.; Phillips, A.L.; Edwards, K.J. 2017. Characterization of a Wheat Breeders' Array suitable for high-throughput SNP genotyping of global accessions of hexaploid bread wheat (*Triticum aestivum*). *Plant Biotechnol J.* 15(3):390-401.
- Alvarez, C.L.; Azcarate, M.P.; Pintos, V.F. 2009. Toxigenic potential of *Fusarium graminearum* sensu stricto isolates from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 135 (2009) 131–135
- Alves, R.H.; Nora, T.D.; Franco, F.A.; Costa, A.C.T.; Stangarlin, J.R. 2013. Reação de Resistência Tipo I e Tipo II a Giberela em cultivares de trigo. *Summa Phytopathologica*, v.39 (3):167-171.
- Andersen, A.L. 1948. The development of *Gibberella zeae* head blight of wheat. *Phytopathology*, St. Paul, v.38:595-611.
- Anderson, J.A.; Stack, R.W.; Liu, S.; Waldron, B.L.; Fjeld, A.D.; Coyne, C.; Moreno-Sevilla, B.; Mitchell Fetch, J.; Song, Q.J.; Cregan, P.B.; Frohberg, R.C. 2001. DNA markers for *Fusarium* head blight resistance QTLs in two wheat populations. *Theor Appl Genet* 102:1164–1168
- Argyris, J.; TeKrony, D.; Hershman, D.; VanSanford, D.; Hall, M.; Kennedy, B.; Rucker, M.; Edge, C. 2005. *Fusarium* head blight infection following point inoculation in the greenhouse compared with movement of *Fusarium graminearum* in seed and floral components. *Crop Sci.* 45:626–634.

- Arruda, M.P.; Brown, P.; Brown-Guedira, G.; Krill, A.M.; Thurber, C.; Merrill, K.R.; Foresman, B.F.; Kolb, F. 2016. Genome-wide association mapping of Fusarium head blight resistance in wheat using genotyping-by-sequencing. *The plant genome* 9(1): 1-14.
- Badea, A.; Eudes, F.; Graf, R.J.; Laroche, A.; Gaudet, D.A.; Sadasivaiah, R.S. 2008. Phenotypic and marker-assisted evaluation of spring and winter wheat germplasm for resistance to fusarium head blight. *Euphytica* 164:803–819.
- Bai, S.; Shaner, G.; 1994. Scab of wheat: Prospects for control. *Plant Disease* 78:760-766.
- Bai, G.H. 1995. Scab of wheat: epidemiology, inheritance of resistance, and molecular markers linked to cultivar resistance. PhD thesis. Purdue Univ. 179 pp.
- Bai, G.H.; Guo, P.; Kolb, F. 2003. Genetic relationships among head blight resistant cultivars of wheat assessed on the basis of molecular markers. *Crop Sci.* 43:498-507.
- Bai, S.; Shaner, G. 2004. Management and resistance in wheat and barley to Fusarium head blight. *Annual review of Phytopathology* 42: 135-161.
- Bai, G.-H., Kolb, F. L., Shaner, G., and Domier, L. L. 1999. Amplified fragment length polymorphism markers linked to a major quantitative trait locus controlling scab resistance in wheat. *Phytopathology* 89:343-348.
- Bainotti, C.; Lewis, S.M.; Campos, P.; Alberione, E.; Salines, N.; Gomez, D.; Frascina, J.; Salines, J.H.; Formica, M.B.; et al. 2017. MS INTA 416: A new Argentinean wheat cultivar carrying Fhb1 and Lr47 resistance genes. *Crop Breeding and Applied Biotechnology*. In press:274-280.
- Bainotti, C.; Alberione, E.; Lewis, S.; Cattivelli, M.; Nisi, M.; Lombardo, L.; Vanzetti, L., Helguera, M. 2013. Genetic resistance to Fusarium head blight in wheat (*Triticum aestivum* L.). Current status in Argentina. In: *fusarium head blight in Latinoamérica*. pp:231-240. Springer, Dordrecht. ISBN 978-94-007-7090-4.
- Ban, T.; Suenaga, K. 2000. Genetic analysis of resistance to Fusarium head blight caused by *Fusarium graminearum* in Chinese wheat cultivar Sumai 3 and the Japanese cultivar Saikai 165. *Euphytica* 113: 87–99, 2000.
- Barabaschi, D.; Tondelli, A.; Desiderio, F.; Volante, A.; Vaccino, P.; Valè, G.; Cattivelli, L. 2016. Next generation breeding. *Plant Science* 242:3-13.
- Bekele. G.T. 1985. Head scab screening methods used at CIMMYT. In: *Wheats for more tropical environments*. CIMMYT, México, D.F. 169- 173.

Bourdoncle, W.; Ohm, H.W. 2003. Quantitative trait loci for resistance to Fusarium head blight in recombinant inbred wheat lines from the cross Huapei 57-2 / Patterson. *Euphytica* 131:131-136.

Boutigny, A.L.; Ward, T.J.; Van Coller, G.J.; Flett, B.; Lamprecht, S.C.; O'Donell, K.; Viljoen, A. 2011. Analysis of the *Fusarium graminearum* species complex from wheat, barley and maize in South Africa provides evidence of species-specific differences in host preference. *Fungal Genet. Biol.* 48(9):914-920.

Broman, K.W. 2005. The genomes of recombinant inbred lines. *Genetics* 169:1133-1146.

Brown, A.; Urban, M.; Van de Meene, A.; Hammond Kosack, K. 2010. The infection biology of *Fusarium graminearum*: Defining the pathways of spikelet to spikelet colonisation in wheat ears. *Fungal Biology* 114:555-571.

Buerstmayr, H.; Lemmens, M.; Hartl, L.; Doldi, L.; Steiner, B.; Stierschneider, M.; Ruckenbauer, P. 2002. Molecular mapping of QTLs for Fusarium head blight resistance in spring wheat. Resistance to fungal spread (type II resistance). *Theor Appl Genet* 104:84-91.

Buerstmayr, H.; Steiner, B.; Hartl, L.; Griesser, M.; Angerer, N.; Lengauer, D.; Miedaner, T.; Schneider, B.; Lemmens, M. 2003. Molecular mapping of QTL for Fusarium head blight resistance in spring wheat. II. Resistance to fungal penetration and spread. *Theor Appl Genet* 107:503-508.

Buerstmayr, M.; Huber, H.; Heckmann, J.; Steiner, B.; Nelson, J.; Buerstmayr, H. 2012. Mapping of QTL for Fusarium head blight resistance and morphological and developmental traits in three backcross populations derived from *Triticum dicoccum* x *Triticum durum*. *Theor Appl Genet* 125:1751-1765

Buerstmayr, H.; Ban, T.; Anderson, J.A. 2009. QTL mapping and marker-assisted selection for Fusarium head blight resistance in wheat: a review. *Plant Breeding* 128, 1-26.

Cáceres, C.; Musante, C.; Tabia, A.; Fabrello, A.; Visintin, G.; García, B. y S. Lassaga. 2011. Patogenicidad de distintos aislamientos de *Fusarium* spp. en espigas de trigo. Jornada Regional de cultivos de invierno. Campaña 2011:27-31. Facultad de Ciencias Agropecuarias – UNER. ISBN 978-950-698-268-3.

Campbell, K.A.G.; Lipps, P.E. 1998. Allocation of resources: Sources of variation in Fusarium head blight screening nurseries. *Phytopathology* 88:1078-1086.

Campos, P. 2014. Patologías del trigo. En: Enfermedades del trigo: avances científicos en la Argentina. 1ra ed. La Plata: EDULP. ISBN 978-987-1985-35-7 pag.223-243.

Canú, A.P. 2008. Resistencia genética a la fusariosis de la espiga en genotipos de trigo (*Triticum aestivum* L.) de buenas aptitudes agronómicas. Tesis para optar por el grado de Magíster en genética vegetal. Facultad de Ciencias Agrarias de la Universidad Nacional de Rosario. 67p.

Castañares, E.; Albuquerque, D.R.; Dinolfo, M.I.; Pinto, V.F.; Patriarca, A.; Stenglein, S.A. 2014. Trichothecene genotypes and production profiles of *Fusarium graminearum* isolates obtained from barley cultivated in Argentina. *Int J Food Microbiol.* 2014 Jun 2;179:57-63.

Cattivelli, M.; Lewis, S.; Appendino, M.L. 2013. A *Fusarium* head blight resistance quantitative trait locus on chromosome 7D of the spring wheat cultivar Catbird. *Crop Sci.* 53:1464-1471.

Chao, S.; Zhang, W.; Akhunov, E.; Sherman, J.; Ma, Y.; Luo, M.C.; Dubcovsky, J. 2009. Analysis of gene-derived SNP marker polymorphism in US wheat (*Triticum aestivum* L.) cultivars. *Molecular Breeding* 23:23-33.

Chen, J.; Griffey, C.A.; Saghai Maroof, M.A.; Stromberg, E.L.; Biyashev, R.M.; Zhao, W.; Chappell, M.R.; Pridgen, T.H.; Dong, Y.; Zeng, Z. 2006. Validation of two major quantitative trait loci for fusarium head blight resistance in Chinese wheat line W14. *Plant Breeding* 125: 99-101.

Chen, H.; He, H.; Zhou, F.; Yu, H.; Wang Deng, X. 2013. Development of genomics-based genotyping platforms and their applications in rice breeding. *Current Opinion in Plant Biology* 16:247-254.

Chu, Ch.; Niu, Z.; Zhong, S.; Chao, S.; Friesen, T.L.; Halley, S.; Elias, E.; Dong, Y. Faris, J.D.; Xu, S. 2011. Identification and molecular mapping of two QTLs with major effects for resistance to *Fusarium* head blight in wheat. *Theor Appl Genet.* 123(7):1107-1119.

Clavijo, B.J.; Venturini, L.; Schudoma, C., Accinelli, G.G.; Kaithakottil, G.; Wright, J.; Borrill, P.; Kettleborough, G.; Heavens, D.; et al. 2017. An improved assembly and annotation of the allohexaploid wheat genome identifies complete families of agronomic genes and provides genomic evidence for chromosomal translocations. *Genome Research* 27:885-896.

Collard, B.C.Y.; Mackill, D.J. 2008. Marker-assisted selection: an approach for precision plant breeding in the twenty-first century. *Phil. Trans. R. Soc. B* 363: 557–572.

Cordó, C. 2014. Patologías del trigo. En: Enfermedades del trigo: avances científicos en la Argentina. 1ra ed. La Plata: EDULP. ISBN 978-987-1985-35-7 pag.21-56.

- Cui, F.; Fan, X.; Zhao, CH.; Zhang, W.; Chen, M.; Ji, J. Li, J. 2014. A novel genetic map of wheat: utility for mapping QTL for yield under different nitrogen treatments. *BMC Genetics* 15:57. 17p.
- Cuthbert, P.A.; Somers, D.J.; Thomas, J.; Cloutier, S.; Brulé-Babel, A. 2006. Fine mapping Fhb1, a major gene controlling fusarium head blight resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 112: 1465-1472.
- Cuthbert, P.A.; Somers, D.; Brulé-Babel, A. 2007. Mapping of Fhb2 on chromosome 6BS: a gene controlling Fusarium head blight field resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 114 (3):429-437.
- del Blanco, L.; Frohberg, R.; Snack, R.; Berzonsky, W.; Kianian, S. 2003. Detection of QTL linked to fusarium head blight resistance in Sumai 3 derived North Dakota bread wheat lines. *Theor Appl Genet* 106:1027-1031.
- Del Ponte, E.M.; Fernandes, J.M.C.; Bergstrom, G.C. 2007. Influence of growth stage on Fusarium head blight and deoxynivalenol production in wheat. *J. Phytopathology* 155: 577–581.
- Desmond, O.; Manners, J.; Stephens, A.; Maclean, D.; Schenk, P.; Gardiner, D.; Munn, A.; Kazan, K. 2008. The Fusarium mycotoxin deoxynivalenol elicits hydrogen peroxide production, programmed cell death and defence responses in wheat. *Molecular Plant Pathology* 9 (4): 435–445.
- Diethelm, M.; Schmolke, M.; Groth, J.; Friedt. W.; Schweizer, G.; Hartl, L. 2014. Association of allelic variation in two NPR1-like genes with Fusarium head blight resistance in wheat. *Mol Breeding* 34: 31-43.
- Di Rienzo J.A.; Casanoves F.; Balzarini M.G.; Gonzalez L.; Tablada M.; Robledo C.W. 2017. InfoStat versión 2017. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dubcovsky, J.; Dvorak, J. 2007. Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication. *Science*. 316(5833): 1862–1866.
- Engle, J.S.; Madden, L.V.; and Lipps, P.E. 2003. Evaluation of inoculation methods to determine resistance reactions of wheat to *Fusarium graminearum*. *Plant Dis*. 87:1530-1535.
- Feuillet, C.; Keller, B.; 2004. Molecular Markers for Disease Resistance: The Example Wheat. In: Lörz H., Wenzel G. (eds) *Molecular Marker Systems in Plant Breeding and Crop Improvement. Biotechnology in Agriculture and Forestry*, vol 55. Springer, Berlin, Heidelberg p.353-370.

Formento, N.; de Souza, J.C. 2004. La antesis en trigo: ventana de vulnerabilidad a la infección de la fusariosis de la espiga (*Fusarium graminearum* y *Fusarium* spp.). Serie de extensión n° 26. Actualización técnica en trigo. INTA EEA Paraná:41-43.

Formento, A.N.; Firpo, R. 2002. Fusariosis de la Espiga (*Fusarium* spp): Variables patométricas y su relación con el rendimiento de cultivares de trigo. Actualización Técnica de Trigo-Lino EEA Paraná. Serie de Extensión N° 22.

Fowler, D.B.; N'Diaye, A.; Laudenci-Chingcuanco, D.; Pozniak, C.J. 2016. Quantitative trait loci associated with phenological development, low-temperature tolerance, grain quality, and agronomic characters in wheat (*Triticum aestivum* L.). PLoS ONE 11:1-21.

Fuentes, R.G.; Mickelson, H.R.; Busch, R.; Dill-Macky, R.; Evans, C.K.; Thompson, W.G.; Wiersma, J.V.; Xie, W.; Dong, Y.; Anderson, J.A. 2005. Resource allocation and cultivar stability in breeding for *Fusarium* head blight resistance in spring wheat. *Crop Sci.* 45:1965–1972.

Gervais, L.; Dedryver, F.; Morlais, J.Y.; Bodusseau, V.; Negre, S.; Bilous, M.; Groos, C.; Trottet, M. 2003. Mapping of quantitative trait loci for field resistance to *Fusarium* head blight in an European winter wheat. *Theor Appl Genet.* 106:961–970.

Ghavami, F.; Elias, E.; Mamidi, S.; Ansari, O.; Sargolzaei, M.; Adhikari, T.; Mergoum, M.; Kianian, S. 2011. Mixed model association mapping for *Fusarium* head blight resistance in Tunisian-derived Durum wheat populations. *Genes, Genomes, Genetics* 1(3): 209-218.

Giancaspro, A.; Giove, S.L.; Zito, D.; Blanco, A.; Gadaleta, A. 2016. Mapping QTLs for *Fusarium* head blight resistance in an interspecific wheat population. *Front. Plant Sci.* 7:1381.

Gill, K.S.; Gill, B.S.; Endot, T.R.; Boyko Gill, E.V. 1996. Identification and high-density mapping of gene-rich regions in Chromosome Group 5 of Wheat. *Genetics* 143 1001-1012.

Gilsinger, J.; Kong, L.; Shen, X.; Ohm, H.; 2005. DNA markers associated with low *Fusarium* head blight incidence and narrow flower opening in wheat. *Theor Appl Genet* 110:1218-1225.

Goswami, R. S.; Kistler, H. C. 2004. Heading for disaster: *Fusarium graminearum* on cereal crops. *Mol. Plant Pathol.* 5:515-525.

Gunnaiah, R.; Kushalappa, A.C.; Duggavathi, R.; Fox, S.; Somers, D.J. 2012. Integrated metabolo-proteomic approach to decipher the mechanisms by which wheat QTL (Fhb1) contributes to resistance against *Fusarium graminearum*. PLoS ONE 7(7): e40695.

Häberle, J.; Schmolke, M.; Schweizer, G.; Korzun, V.; Ebmeyer, E.; Zimmermann, G.; Hartl, L. 2007. Effects of two major Fusarium Head Blight resistance QTL verified in a winter wheat backcross population. *Crop Sci.* 47:1823-1831.

Haldane, J.B.S. 1919. The combination of linkage values and the calculation of distances between the loci of linked factors. *Genetic.* 8:299-309.

Han, F.P.; Fedak, G.; Ouellet, T.; Dan, H.; Somers, D.J. 2005. Mapping of genes expressed in *Fusarium graminearum* infected heads of wheat cultivar Frontana. *Genome* 48:88-96.

He, X.; Singh, P.K.; Schlang, N.; Duveiller, E.; Dreisigacker, S.; Payne, T.; He, Z. 2014. Characterization of Chinese wheat germplasm for resistance to Fusarium head blight at CIMMYT, Mexico. *Euphytica* 195:383–395.

He, X.; Lillemo, M.; Shi, J.; Wu, J.; Bjørnstad, Å.; Belova, T.; Dreisigacker, S.; Duveiller, E.; Singh, P. 2016. QTL characterization of Fusarium head blight resistance in CIMMYT bread wheat line Soru#1. *PLoS ONE* 11(6): e0158052.

Jaccoud, D; Peng, K.; Feinstein, D.; Kilian, A. 2001. Diversity arrays: a solid state technology for sequence information independent genotyping. *Nucleic Acids Research* 29(4):e25.

Jia, G.; Chen, P.D.; Qin, G. J.; Bai, G. H.; Wang, X.; Wang, S.L.; Zhou, B.; Zhang, S.H.; Liu, D.J. 2005: QTLs for Fusarium head blight response in a wheat DH population of Wangshuibai/Alondra's. *Euphytica* 146: 183 -191.

Jiang, G.; Wu, Z.; Huang, D. 1994. Effects of recurrent selection for resistance to scab (*Gibberella zeae*) in wheat. *Euphytica* 72:107-113.

Jones, N.; Ougham, H.; Thomas, H. Pašakinskienė, I. 2009. Markers and mapping revisited: finding your gene *New Phytologist* 183: 935–966.

Kam-Morgan, L. N. W.; Gill; B. S.; Muthukrishnan, S. 1989. DNA restriction fragment length polymorphisms: a strategy for genetic mapping of D genome of wheat. *Genome* 32: 724-732.

Kang, Z.; Buchenauer, H. 1999. Immunocytochemical localization of fusarium toxins in infected wheat spikes by *Fusarium culmorum*. *Physiological and Molecular Plant Pathology* 55(5): 275-288.

Kikot, G.E.; Moschini, R.; Consolo, V.F.; Rojo, R.; Salerno, G.; Hours, R.A.; Gasoni, L.; Arambarri, A.M.; Alconada, T.M. 2010. Occurrence of different species of *Fusarium* from

wheat in relation to disease levels predicted by a weather-based model in Argentina Pampas Region. *Mycopathologia* 171(2):139-49.

Klahr, A., Zimmermann, G.; Wenzel, G.; Mohler, V. 2007. Effects of environment, disease progress, plant height and heading date on the detection of QTLs for resistance to Fusarium head blight in an European winter wheat cross. *Euphytica* 154:17-28.

Kolb, F.L.; Bai, G.H.; Muehlbauer, G.J.; Anderson, J.A.; Smith, K.P.; Fedak, G. 2001. Host plant resistance genes for Fusarium head blight: Mapping and manipulation with molecular markers. *Crop Sci.* 41:611-619.

Kosaka, A.; Manickavelu, A.; Kajihara, D.; Nakagawa, H.; Ban, T. 2015. Altered gene expression profiles of wheat genotypes against Fusarium head blight. *Toxins* 7: 604-620.

Leslie, J.; Summerell, B. 2006. *The Fusarium Laboratory Manual*. Ed. Blackwell Publishing. 388 p.

Li, H.; Xie, G.; Ma, J.; Liu, G.; Wen, S.; Ban, T.; Chakraborty, S. y C. Liu. 2010. Genetic relationships between resistances to Fusarium head blight and crown rot in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). TAG: (doi:10.1007/s00122-010-1363-0)

Li, H.; Vikram, P.; Singh, R.P.; Kilian, A.; Carling, J.; Song, J.; Burgueno-Ferreira, J.A.; Bhavani, S.; Huerta-Espino, J.; et al. 2015. A high density GBS map of bread wheat and its application for dissecting complex disease resistance traits. *BMC Genomics* 16:216.

Li, T.; Bai, G.; Wu, S.; Gu, S. 2011. Quantitative trait loci for resistance to fusarium head blight in a Chinese wheat landrace Haiyanzhong. *Theor Appl Genet* 122:1497–1502.

Liu, S.; Abate, Z.A.; Lu, H.; Musket, T.; Davis, G.L.; McKendry, A.L. 2007. QTL associated with Fusarium head blight resistance in the soft red winter wheat Ernie. *Theor. Appl. Genet.* 115: 417- 427.

Lombardo L.A; Ghione C.E.; Nisi M.M.; Helguera M. 2016. Exploración de la precocidad intrínseca en variedades argentinas de trigo pan y desarrollo de una población de RILs para el mapeo de este carácter. Resúmenes del VIII Congreso Nacional de Trigo, Pergamino, 14-16 de setiembre 2016.

Ma, H.; Zhang, K.; Gao, L.; Bai, G.; Chen, H.; Cai, Z.; Lu, W. 2006. Quantitative trait loci for resistance to fusarium head blight and deoxynivalenol accumulation in Wangshuibai wheat under field conditions. *Plant Pathology* 55(6): 739-745.

Mackintosh, C.; Lewis, J.; Radmer, L.; Shin, S.; Heinen, S.; Smith, L.; Wyckoff, M.; Dill-Macky, R.; Evans, C.; Kravchenko, S.; Baldrige, G.; Zeyen, R.; Muehlbauer, G. 2007.

Overexpression of defense response genes in transgenic wheat enhances resistance to Fusarium head blight. *Plant Cell Rep* 26:479-488.

Malbrán, I.; Mourellos, C. A.; Girotti, J. R.; Balatti, P. A.; and Lori, G. A. 2014. Toxigenic capacity and trichothecene production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentina and their relationship with aggressiveness and fungal expansion in the wheat spike. *Phytopathology* 104:357-364.

Mardi, M.; Buerstmayr, H.; Ghareyazie, B.; Lemmens, M.; Mohammadi, S.; Nolz, R.; Ruckenbauer, P. 2005. QTL analysis of resistance to Fusarium head blight in wheat using a 'Wangshuibai'-derived population. *Plant Breeding* 124:329-333.

Martinez, M.; Castañares, E.; Dinolfo, M.; Pacheco, W.; Moreno, M.; Stenglein, S. 2014. Presencia de *Fusarium graminearum* en muestras de trigo destinado al consumo humano. *Rev Argent Microbiol.* 46(1):41-44.

McCartney, C.A.; Somers, D.J.; Fedak, G.; Cao, W. 2004. Haplotype diversity at fusarium head blight resistance QTLs in wheat. *Theor Appl Genet* 109: 261-271.

McCartney, C.; Brûlé-Babel, A.; Fedak, G.; Martin, R.; McCallum, B.; Gilbert, J.; Hiebert, C.; Pozniak, C. 2016. Fusarium head blight resistance QTL in the spring wheat cross Kenyon/86ISMN 2137. *Frontiers in Microbiology* 7:1542

McKendry, A. L.; Berg, J. E.; Tague, D. N.; Kephart, K. D. 1995. Registration of 'Ernie' soft red winter wheat. *Crop Sci* 35:1513.

McMullen, M.; Jones, R.; Gellenberg, D. 1997. Scab of wheat and barley: A re-emerging disease of devastating impact. *Plant Dis.* 81:1340-1348.

McMullen, M.; Zhong, S.; Neate, S. 2008. Fusarium head blight (scab) of small grains. Plant disease management. NDSU Extension Service. North Dakota State University <https://library.ndsu.edu/repository/bitstream/handle/10365/17320/pp-804-2009.pdf?sequence=2>

Mesterhazy, A. 1995. Types and components of resistance to Fusarium head blight of wheat. *Plant Breed* 114:377-386.

Mesterhazy, A. 1997. Methodology of resistance testing and breeding against Fusarium head blight in wheat and results of this selection. *Cereal Res. Commun.* 25:631-637

Mesterhazy, A.; Bartok, T.; Mirocha, C.; Komoroczy, R. 1999. Nature of wheat resistance to Fusarium head blight and the role of deoxynivalenol for breeding. *Plant Breeding.* 118:97-110

Mesterházy, A.; Bartók, T.; Kászonyi, G.; Varga, M.; Tóth, B.; Varga, J. 2005. Common resistance to different *Fusarium* spp. causing Fusarium head blight in wheat. *European Journal of Plant Pathology* 112: 267–281.

Miles, C.; Wayne, M. 2008. Quantitative trait locus (QTL) analysis. *Nature Educ.* 1(1):208.

Miller, S.S.; Chabot, D.M.P.; Ouellet, T.; Harris, L.J.; Fedak, G. 2004. Use of a *Fusarium graminearum* strain transformed with green fluorescent protein to study infection in wheat (*Triticum aestivum*). *Canadian Journal of Plant Pathology*.(Revue Canadienne De Phytopathologie) 26: 453-463.

Montgomery, D. 1991. Diseño y análisis de experimentos. Grupo Editorial Iberoamericana. ISBN 968-7270-60-8 (version en español). 589 p.

Muller, D.; Lassaga S. 2008. Evaluación de la resistencia tipo II a fusariosis de la espiga en trigos argentinos (*Triticum aestivum* L.). Eficiencia de la selección por el QTL de efecto mayor "3BS". *Revista Científica Agropecuaria* 12(2): 61-70.

Navarro, L. 2009. Herencia de factores de resistencia asociados a fusariosis de la espiga ligados al cromosoma 3BS de trigo (*Triticum aestivum* L.). Tesina para obtener el título de Licenciada en Biotecnología. Facultad de Bioquímica y Ciencias Biológicas (FBCB), Universidad Nacional del Litoral. 81 p.

Nicholson P., Gosman N., Draeger R., Thomsett M., Chandler E., Steed A. (2007) The Fusarium Head Blight Pathosystem. In: Buck H.T., Nisi J.E., Salomón N. (eds) *Wheat production in stressed environments. Developments in Plant Breeding*, vol 12. Springer, Dordrecht

Niwa, S.; Kubo, K.; Lewis, J.; Kikuchi, R.; Alagu, M.; Ban, T. 2014. Variations for Fusarium head blight resistance associated with genomic diversity in different sources of the resistant wheat cultivar 'Sumai 3'. *Breeding Science* 64: 90–96

OHM, H.W., et al. "Registration of 'Goldfield' Wheat." *Crop Science*, vol. 40, no. 2, 2000, p. 581.

Parry, D.W.; Jenkinson, P.; McLeod, L. 1995. Fusarium ear blight (scab) in small grain cereals – a review. *Plant Pathology* 44:207-238.

Petersen, G.; Seberg, O.; Yde, M.; Berthelsen, K. 2006. Phylogenetic relationships of *Triticum* and *Aegilops* and evidence for the origin of the A, B, and D genomes of common wheat (*Triticum aestivum*). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 39: 70–82.

Prat, N.; Buerstmayr, M.; Steiner, B.; Robert, O.; Buerstmayr, H. 2014. Current knowledge on resistance to *Fusarium* head blight in tetraploid wheat. *Molecular Breeding* 34:1689-1699.

Pritsch, C.; Muehlbauer, G.; Bushnell, W.; Somers, D. Vance, C. 2000 Fungal development and induction of defense response genes during early infection of wheat spikes by *Fusarium graminearum*. *MPMI* 13(2):159-169.

Pugh, G.; Johann, H.; Dickson, J.G. 1933. Factors affecting infection of wheat heads by *Gibberella saubinetii*. *Journal of Agricultural Research* 46(9):771-797.

Ramirez, M.L.; Chulze, S.; Magan, N. 2004. Impact of environmental factors and fungicides on growth and deoxynivalenol production by *Fusarium graminearum* isolates from Argentinian wheat. *Crop Protection* 23: 117–125.

Reis, E.M.; Boareto, C.; Danelli, A.L.D.; Zoldan, S.M. 2016. Anthesis, the infectious process and disease progress curves for fusarium head blight in wheat. *Summa Phytopathologica*, v.42, n.2, p.134-139.

Ren Y, Singh RP, Basnet BR, Lan CX, Huerta-Espino J, Lagudah ES, Ponce-Molina LJ. 2017. Identification and Mapping of Adult Plant Resistance Loci to Leaf Rust and Stripe Rust in Common Wheat Cultivar Kundan. *Plant Disease* 101:456-463.

Reynoso, M.M.; Ramirez, M.L.; Torres, A.M; Chulze, S.N. 2011. Trichothecene genotypes and chemotypes in *Fusarium graminearum* strains isolated from wheat in Argentina. *International Journal of Food Microbiology* 145 (2–3): 444-448.

Reynolds y col., 2009. Reynolds, M.; Pask, A.; Mullan, d.; Chávez, P. (Eds.). RIGO Fitomejoramiento Fisiológico I: Enfoques interdisciplinarios para mejorar la adaptación del cultivo. Versión en español de: *Physiological Breeding I: Interdisciplinary approaches to improve crop adaptation*. Centro Internacional de Mejoramiento del Maíz y el Trigo, CIMMYT®. 174p.

Ribichich, K.F.; Lopez, S.E.; Vegetti, A.C.; 2000. Histopathological spikelet changes produced by *Fusarium graminearum* in susceptible and resistant wheat cultivars. *Plant Disease* 84:794-802.

Röder, M.S.; Korzum, V.; Wendehake, K.; Plaschke, J.; Tixier, M.H.; Leroy, P.; Ganal, M. 1998. A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007-2023.

Rudd, J.C.; Horsley, R.D.; McKendry, A.L.; Elias, E.M. 2001. Host plant resistance genes for *Fusarium* head blight: sources, mechanisms, and utility in conventional breeding systems. *Crop Sci.* 41:620–627.

Ruckenbauer, P.; Buerstmayr, H.; Lemmes, M. 2001. Present strategies in resistance breeding against scab (*Fusarium* spp.). *Euphytica* 119, 121–127.

Rutkoski, J.; Benson, J.; Jia, Y.; Brown-Guedira, G.; Jannink, J.L.; Sorrells, M. 2012. Evaluation of genomic prediction methods for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *The Plant Genome* 5:51–61.

Semagn, K.; Bjørnstad, A.; Skinnes, H.; Marøy, A.; Tarkegne, Y.; William, M. 2006. Distribution of DArT, AFLP, and SSR markers in a genetic linkage map of a doubled-haploid hexaploid wheat population. *Genome* 49: 545–555.

Semagn, K.; Skinnes, H.; Bjørnstad, A.; Guri Marøy, a.; Tarkegne, Y. 2007. Quantitative trait loci controlling *Fusarium* head blight resistance and low deoxynivalenol content in hexaploid wheat population from 'Arina' and NK93604. *Crop Sci.* 47:294–303.

Schroeder, H.W.; Christensen, J.J. 1963. Factors affecting resistance of wheat to scab by *Gibberella zeae*. *Phytopathology* 53: 831- 838.

Shaner, G.; Buechley, G. 2001. New sources of resistance to fusarium head blight of wheat. 2001 National Fusarium Head Blight Forum Proceedings. Erlanger, KY. p:203-206.

Shen, X.; Ittu, M.; Ohm, H.W. 2003. Quantitative trait loci conditioning resistance to *Fusarium* head blight in wheat line F201R. *Crop Sci.* 43:850–857.

Shin, S.; Kim, K-H.; Kang, C.S.; Cho, K.M.; Park, C.S.; Okagaki, R.; Park, J.C. 2014. A simple method for the assessment of *Fusarium* head blight resistance in Korean wheat seedlings inoculated with *Fusarium graminearum*. *Plant Pathol. J.* 30(1): 25-32.

Singh, R.P.; Ma, H.; Rajaram, S. 1995. Genetic analysis of resistance to scab in spring wheat cultivar Frontana. *Plant Dis* 79:238-240.

Skelsey, P.; Newton, A.C. 2015. Future environmental and geographic risks of *Fusarium* head blight of wheat in Scotland. *Eur J Plant Pathol* (2015) 142: 133.

Smith, J.S.C.; Smith, O.S. 1992. Fingerprinting crop varieties. *Advances in Agronomy* 47: 85-128.

Snijders, C. H. A., 1990. Genetic variation for resistance to *Fusarium* head blight in bread wheat. *Euphytica* 50:171-179.

Snijders, C.H.A. 2004. Resistance in wheat to *Fusarium* infection and trichothecene formation. *Toxicology Letters.* 153: 37-46.

Snijders, Ch. y J.Perkowski, 1989. Effect of head blight caused by *Fusarium Culmorum* on toxin content and weight of wheat kernels. *Phytopathology* 80, 133 - 140.

Somers, D.J.; Isaac, P.; Edwards, K. 2004. A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 109: 1105-1114.

Staltari, S.; Aulicino, M.B.; Astiz Gassó, M.M.; Barca, H.; Perniola, O.S.; Conway, B.; Verges, V.L.; Chao, S.; Molina, M. del C.; Costa, J.M. 2015. Quantitative trait loci associated with *Fusarium* head blight resistance in argentine wheat line. *National Fusarium Head Blight Forum Proceedings*: 102-106.

Steffenson, B.; Leonard, K.; Bushnell, W. 2003. *Fusarium* head blight of barley: impact, epidemics, management, and strategies for identifying and utilizing genetic resistance. Pages 241-295 in K. Leonard and W. Bushnell, eds. *Fusarium head blight of wheat and barley*. American Phytopathological Society, St. Paul, MN.

Stein, J.M.; Osborne, L.E.; Bondalapati, K.D.; Glover, K.D.; Nelson, C.A. 2009. *Fusarium* head blight severity and deoxynivalenol concentration in wheat in response to *Gibberella zeae* inoculum concentration. *Phytopathology* 99:759-764.

Steiner, B.; Lemmens, M.; Griesser, M.; Scholz, U.; Schondelmaier, J.; Buerstmayr, H. 2004. *Genet* 109: 215-224.

Sun, G.; Bond, M.; Nass, H.; Martin, R.; Dongy, Z. 2003. RAPD polymorphisms in spring wheat cultivars and lines with different level of *Fusarium* resistance. *Theor Appl Genet* 106:1059–1067

Tekauz, A.; McCallum, B.; Gilbert, J. 2000. Review: *Fusarium* head blight of barley in western Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology* 22(1): 9-16.

Tester, M.; Langridge, P. 2010. Breeding technologies to increase crop production in a changing world. *Science* 327: 818-822.

Toledo, V.; Dittrich, A.; Giéco, L.; Lassaga, S. 2011. Herencia de factores de resistencia asociados a fusariosis de espiga que se encuentran ligados al cromosoma 3BS de trigo (*Triticum aestivum* L.). *Jornada regional de cultivos de invierno. Campaña 2011*: 95-99. ISBN 978-950-698-268-3.

Trial, F. 2009. For Blighted Waves of Grain: *Fusarium graminearum* in the Postgenomics Era. *Plant Physiology* 149: 103-110.

Tu, D.S.; 1950. Factors affecting the reaction of wheat varieties to head blight infection caused by *Gibberella zeae*. Ohio State University, Ohio.

Tunali, B.; Obanor, F.; Erginbaş, G.; Westecott, R.A.; Nicol, J.; Chakraborty, S.; 2012. Fitness of three *Fusarium* pathogens of wheat. *FEMS Microbiol Ecol* 81(3):596-609.

Usha Rao, I. y Pandei, B. 2007. Origin and introduction of crop plants, cereals, and pulses. 34p. http://nsdl.niscair.res.in/jspui/bitstream/123456789/125/1/corrected%20Origin_plants_cereals_and_pulses.pdf

van Eeuwijk, E.A.; Mesterhazy, A.; Kling, Ch.L.; Ruckebauer, P.; Saur, L.; Buerstmayr, H.; Lemmens, M.; Keizer, L.C.P.; Maurin, N.; Snijders, C.H.A. 1995. Assessing nonspecificity of resistance in wheat to head blight caused by inoculation with European strains of *Fusarium culmorum*, *F. graminearum* and *F. nivale* using a multiplicative model for interaction. *Theoretical and Applied Genetics*. 90:221–228.

van der Lee, T.; Zhang, H.; van Diepeningen, A.; Waalwijk, C. 2015. Biogeography of *Fusarium graminearum* species complex and chemotypes: a review. *Food Additives & Contaminants: Part A*, 32(4): 453-460.

van Ginkel, M.; Van Der Schaar, W.; Zhuping, Y. y S. Rajaram (1996). Inheritance of resistance to scab in two wheat cultivars from Brazil and China. *Plant Disease*. 80: 863-867.

Vierling, R.A; Nguyen, H.T. 1992. Use of RAPD markers to determine the genetic diversity of diploid, wheat genotypes. *Theoretical and Applied Genetics*. 84:835-838.

Waldron, B. L.; Moreno-Sevilla, B.; Anderson, J.A.; Stack, R.W.; Froberg, R.C. 1999. RFLP mapping of QTL for *Fusarium* head blight resistance in wheat. *Crop Sci*. 39:805-811.

Wang, S.; Basten, C.J.; Gaffney, P.; Zeng, Z.B. 2004. Window QTL Cartographer versión 2.5. *Statistical Genetics*. North Carolina State University. USA

Wang, Q. 2015. The pathosystem wheat (*Triticum aestivum*) root-*Fusarium graminearum*: complex plant responses and fungal strategies. A thesis submitted for the requirement of the doctoral degree in Agricultural Sciences from the Faculty of Agricultural and Nutritional Sciences and Environmental Management. Justus Liebig University Giessen, Germany. 157p.

Xie, G.Q.; Zhang, M.C.; Chakraborty, S.; Liu, J. 2007. The effect of 3BS locus of Sumai 3 on *Fusarium* head blight resistance in Australian wheats. *Australian Journal of Experimental Agriculture* 47: 603-607.

Xue, S.; Li, G.; Jia, H.; Xu, F.; Lin, F.; Tang, M.; Wang, Y.; An, X.; Xu, H.; Zhang, L.; Kong, Z.; Ma, Z. 2010. Fine mapping Fhb4, a major QTL conditioning resistance to *Fusarium* infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet*. 121(1):147-56.

Xue, S.; Xu, F.; Tang, M.; Zhou, Y.; Li, G.; An, X.; Lin, F.; Xu, H.; Jia, H.; Zhang, L.; Kong, Z.; Ma, Z. 2011. Precise mapping Fhb5, a major QTL conditioning resistance to Fusarium infection in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 123:1055-1063.

Yang, J.; Bai, G.; Shaner, G.E. 2005. Novel quantitative trait loci (QTL) for Fusarium head blight resistance in wheat cultivar Chokwang. *Theor Appl Genet* 111:1571-1579.

Yang, Z.; Gilbert, J.; Procnier, J.D. 2006. Genetic diversity of resistance genes controlling fusarium head blight with simple sequence repeat markers in thirty-six wheat accessions from east asian origin. *Euphytica* 148: 345-352.

Yang, X.; Quiros, C. 1993. Identification and clasification of celery cultivars with RAPD markers. *Theor Appl Genet* 86:205-212.

Yang, R.C. 2010. Towards understanding and use of mixed-model analysis of agricultural experiments. *Can. J. Plant Sci.* 90:605-627.

Yu, J.; Bai, G.; Cai S.; Ban, T. 2006. Marker-assisted characterization of Asian wheat lines for resistance to Fusarium head blight. *Theoretical and Applied Genetics* 113:308-320.

Yu, J. 2007. Identification of new sources and mapping of QTL for FHB resistance in asian wheat germplasm. Submitted in partial fulfillment of the requirements for the degree Doctor of Philosophy. Department of Agronomy, College of Agriculture , Kansas State University, Manhattan, Kansas. 103p.

Zadoks, J.C.; Chang, T.T.; Konzak, C.F. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. *Weed Research* 14:415-421.

Zhang, L.; Luo, P.; Ren, Z.; Zhang, H. 2011. Controlling fusarium head blight of wheat (*Triticum aestivum* L.) with genetics. *Advances in Bioscience and Biotechnology* 2: 263-270.

Zhou, W.; Kolb, f.; Bai, G.; Shaner, G.; Domier, L. 2002. Genetic analysis of scab resistance QTL in wheat with microsatellite and AFLP markers. *Genome* 45: 719–727.

Zhou, W.C.; Kolb, F.L.; Yu, J.B.; Bai, G.H.; Boze, L.K.; Domier, L.L. 2004. Molecular characterization of Fusarium head blight resistance in Wangshuibai with simple sequence repeat and amplified fragment length polymorphism markers. *Genome* 47:1137-1143.

ANEXO

Tabla 11. Análisis de variancia de la severidad observada en los progenitores de la población de estudio, en los tres ensayos de inoculación.

Ensayo	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ensayo 1	Severidad	6	0,99	0,98	11,04

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	5745,50	3	1915,17	92,67	0,0107
Parental	5704,17	1	5704,17	276,01	0,0036
Rep	41,33	2	20,67	1,00	0,5000
Error	41,33	2	20,67		
Total	5786,83	5			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=15,97077

Error: 20,6667 gl: 2

Parental	Medias	n	E.E.
Pampeano	10,33	3	2,62 A
BioINTA1005	72,00	3	2,62 B

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

Ensayo	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ensayo 2	Severidad	6	1,00	0,99	4,83

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3917,83	3	1305,94	200,91	0,0050
Parental	3901,50	1	3901,50	600,23	0,0017
Rep	16,33	2	8,17	1,26	0,4432
Error	13,00	2	6,50		
Total	3930,83	5			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=8,95669

Error: 6,5000 gl: 2

Parental	Medias	n	E.E.
Pampeano	27,33	3	1,47 A
BioINTA1005	78,33	3	1,47 B

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

Ensayo	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Ensayo 3	Severidad	6	1,00	0,99	8,35

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	6337,83	3	2112,61	136,30	0,0073
Parental	6337,50	1	6337,50	408,87	0,0024
Rep	0,33	2	0,17	0,01	0,9894
Error	31,00	2	15,50		
Total	6368,83	5			

Test: LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=13,83109

Error: 15,5000 gl: 2

Parental	Medias	n	E.E.
Pampeano	14,67	3	2,27 A
BioINTA1005	79,67	3	2,27 B

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

Tabla 12. Análisis de variancia. Modelos lineales generales y mixtos

Especificación del modelo en R

```
mlm.modelo.000_Severidad_REML<-lme(Severidad~1+RILs
,random=list(Ensayo=pdIdent(~1)
,Repeticion=pdIdent(~1))
,method="REML"
,control=lmeControl(niterEM=150
,msMaxIter=200)
,na.action=na.omit
,data=mlm.modeloR.data00
,keep.data=FALSE)
```

Resultados para el modelo: mlm.modelo.000_Severidad_REML

Variable dependiente: Severidad

Medidas de ajuste del modelo

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2 0	R2 1	R2 2
1088	-664,53	-45,90	459,26	0,13	0,17	0,51	0,55

AIC y BIC menores implica mejor

Pruebas de hipótesis secuenciales

	numDF	denDF	F-value	p-value
(Intercept)	1	956	25,51	<0,0001
RILs	123	956	2,92	<0,0001

Pruebas de hipótesis marginales

Source	numDF	denDF	F-value	p-value
RILs	123	956	2,92	<0,0001

Parámetros de los efectos aleatorios

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1 | Ensayo

Desvíos estándares y correlaciones

(Intercept)
(Intercept) 0,13

Modelo de covarianzas de los efectos aleatorios: pdIdent

Formula: ~1 | Repeticion dentro de Ensayo

Desvíos estándares y correlaciones

(Intercept)
(Intercept) 0,04

Tabla 13. Severidad - Medias ajustadas y errores estándares para RILs.

LSD Fisher (Alfa=0.05). Procedimiento de corrección de p-valores: Bonferroni

Medias con una letra común no son significativamente diferentes ($p > 0.05$).

RILs	Medias	E.E.	
ril93	0,56	0,09	A
ril28	0,55	0,09	A B
ril36	0,53	0,09	A B C
ril43	0,53	0,09	A B C
ril24	0,52	0,09	A B C D
ril49	0,51	0,09	A B C D E
ril80	0,51	0,09	A B C D E F
ril126	0,51	0,09	A B C D E F G
ril5	0,51	0,09	A B C D E F G H
ril92	0,5	0,09	A B C D E F G H
ril100	0,49	0,09	A B C D E F G H I
ril121	0,48	0,09	A B C D E F G H I J
ril42	0,48	0,09	A B C D E F G H I J K
ril88	0,47	0,09	A B C D E F G H I J K L
ril90	0,47	0,09	A B C D E F G H I J K L
ril48	0,47	0,09	A B C D E F G H I J K L M
ril77	0,47	0,09	A B C D E F G H I J K L M N
ril9	0,46	0,09	A B C D E F G H I J K L M N O
ril40	0,46	0,09	A B C D E F G H I J K L M N O P
ril33	0,46	0,09	A B C D E F G H I J K L M N O P
ril122	0,46	0,09	A B C D E F G H I J K L M N O P Q
ril119	0,46	0,09	A B C D E F G H I J K L M N O P Q R
ril123	0,46	0,09	A B C D E F G H I J K L M N O P Q R
ril106	0,45	0,09	A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S
ril68	0,45	0,09	A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T
ril124	0,44	0,09	A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T
ril53	0,44	0,09	A B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U
ril87	0,43	0,09	B C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W
ril117	0,43	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W
ril89	0,42	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X
ril83	0,42	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X
ril45	0,42	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y
ril85	0,41	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z

ril14	0,41	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z
ril120	0,41	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a
ril115	0,41	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a
ril7	0,41	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a
ril95	0,41	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b
ril56	0,4	0,09	C D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c
ril65	0,4	0,09	D E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c
ril99	0,4	0,09	E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c
ril23	0,4	0,09	E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d
ril20	0,4	0,09	E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d
ril1	0,4	0,09	E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d
ril4	0,39	0,09	E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e
ril29	0,39	0,09	E F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e
ril37	0,39	0,09	F G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e
ril79	0,39	0,09	G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e
ril19	0,39	0,09	G H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e
ril39	0,39	0,09	H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e
ril8	0,39	0,09	H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e
ril82	0,38	0,09	H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e
ril38	0,38	0,09	H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f
ril12	0,38	0,09	H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f
ril25	0,38	0,09	H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f
ril13	0,38	0,09	H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f
ril116	0,38	0,09	H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f
ril81	0,38	0,09	H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f
ril52	0,38	0,09	H I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f g
ril73	0,37	0,09	I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f g
ril97	0,37	0,09	I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f g h
ril113	0,37	0,09	I J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f g h
ril54	0,37	0,09	J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f g h
ril74	0,37	0,09	J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f g h
ril10	0,37	0,09	J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f g h
ril62	0,37	0,09	J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f g h
ril27	0,37	0,09	J K L M N O P Q R S T U W X Y Z a b c d e f g h

ril44	0,36	0,09	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h																			
ril3	0,36	0,09	J	K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i																		
ril31	0,36	0,09		K	L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i																		
ril21	0,36	0,09			L	M	N	O	P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i																		
ril84	0,35	0,09				M	N	O	P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i																		
ril108	0,35	0,09					N	O	P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																	
ril112	0,35	0,09					N	O	P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																	
ril94	0,35	0,09					N	O	P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																	
ril2	0,35	0,09						O	P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																	
ril64	0,35	0,09						O	P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																	
ril114	0,34	0,09							P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																	
ril55	0,34	0,09								P	Q	R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																
ril 11	0,34	0,09									R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																	
ril32	0,34	0,09										R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j																
ril107	0,34	0,09											R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j															
ril110	0,34	0,09												R	S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j														
ril18	0,34	0,09													S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j														
ril26	0,33	0,09														S	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k												
ril59	0,33	0,09															T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k												
ril30	0,33	0,09																T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k											
ril34	0,33	0,09																	T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k										
ril60	0,33	0,09																		T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k									
ril102	0,33	0,09																			T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k								
ril70	0,33	0,09																				T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k							
ril111	0,33	0,09																					T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k						
ril63	0,32	0,09																						T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k					
ril118	0,32	0,09																							T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k				
ril61	0,32	0,09																								T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k			
ril103	0,32	0,09																									T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k		
ril17	0,32	0,09																										T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	
ril125	0,32	0,09																										T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	
ril46	0,32	0,09																										T	U	W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k	
ril66	0,31	0,09																											T		W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k
ril104	0,31	0,09																											T		W	X	Y	Z	a	b	c	d	e	f	g	h	i	j	k

ril75	0,31	0,09
ril57	0,31	0,09
ril105	0,3	0,09
ril15	0,3	0,09
ril47	0,3	0,09
ril101	0,3	0,09
ril91	0,29	0,09
ril22	0,29	0,09
ril16	0,28	0,09
ril96	0,28	0,09
ril51	0,28	0,09
ril58	0,28	0,09
ril50	0,27	0,09
ril41	0,27	0,09
ril35	0,27	0,09
ril98	0,26	0,09
ril71	0,26	0,09
ril67	0,26	0,09
ril72	0,25	0,09
ril76	0,25	0,09
ril109	0,25	0,09
ril69	0,23	0,09
ril6	0,21	0,09

```

X Y Z a b c d e f g h i j k
X Y Z a b c d e f g h i j k
X Y Z a b c d e f g h i j k
X Y Z a b c d e f g h i j k
  Y Z a b c d e f g h i j k
    Z a b c d e f g h i j k
      a b c d e f g h i j k
        b c d e f g h i j k
          c d e f g h i j k
            c d e f g h i j k
              c d e f g h i j k
                c d e f g h i j k
                  c d e f g h i j k
                    e f g h i j k
                      e f g h i j k
                        f g h i j k
                          f g h i j k
                            f g h i j k
                              g h i j k
                                g h i j k
                                  g h i j k
                                    i j k

```

Tabla 14. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 1.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	119	0,19	0,12	32,88

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1960,47	10	196,05	2,55	0,0084
AX-94547709_6A	643,97	1	643,97	8,38	0,0046
AX-94756419_7A	557,96	1	557,96	7,26	0,0082
AX-94759165_2B	24,59	1	24,59	0,32	0,5729
AX-95207390_3A	531,74	1	531,74	6,92	0,0098
AX-94547709_6A*AX-94756419..	23,87	1	23,87	0,31	0,5786
AX-94547709_6A*AX-94759165..	84,76	1	84,76	1,10	0,2961
AX-94547709_6A*AX-95207390..	0,65	1	0,65	0,01	0,9270
AX-94756419_7A*AX-94759165..	2,84	1	2,84	0,04	0,8479
AX-94756419_7A*AX-95207390..	21,79	1	21,79	0,28	0,5955
AX-94759165_2B*AX-95207390..	68,29	1	68,29	0,89	0,3481
Error	8303,85	108	76,89		
Total	10264,32	118			

Tabla 15. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 2.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	122	0,18	0,11	16,10

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1688,76	10	168,88	2,43	0,0117
AX-94547709_6A	692,74	1	692,74	9,97	0,0020
AX-94756419_7A	418,02	1	418,02	6,02	0,0157
AX-94759165_2B	22,49	1	22,49	0,32	0,5705
AX-95207390_3A	394,22	1	394,22	5,67	0,0189
AX-94547709_6A*AX-94756419..	14,19	1	14,19	0,20	0,6522
AX-94547709_6A*AX-94759165..	42,39	1	42,39	0,61	0,4364
AX-94547709_6A*AX-95207390..	18,10	1	18,10	0,26	0,6108
AX-94756419_7A*AX-94759165..	45,43	1	45,43	0,65	0,4205
AX-94756419_7A*AX-95207390..	1,14	1	1,14	0,02	0,8984
AX-94759165_2B*AX-95207390..	40,04	1	40,04	0,58	0,4494
Error	7712,36	111	69,48		
Total	9401,11	121			

Tabla 16. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 3.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	122	0,23	0,16	22,26

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1925,64	10	192,56	3,38	0,0007
AX-94547709_6A	348,79	1	348,79	6,13	0,0148
AX-94756419_7A	491,36	1	491,36	8,64	0,0040
AX-94759165_2B	683,88	1	683,88	12,02	0,0007
AX-95207390_3A	148,65	1	148,65	2,61	0,1089
AX-94547709_6A*AX-94756419..	3,14	1	3,14	0,06	0,8147
AX-94547709_6A*AX-94759165..	133,58	1	133,58	2,35	0,1283
AX-94547709_6A*AX-95207390..	53,95	1	53,95	0,95	0,3323

AX-94756419_7A*AX-94759165..	6,52	1	6,52	0,11	0,7356
AX-94756419_7A*AX-95207390..	0,36	1	0,36	0,01	0,9368
AX-94759165_2B*AX-95207390..	55,41	1	55,41	0,97	0,3259
Error	6315,75	111	56,90		
Total	8241,39	121			

Tabla 17. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados con los datos promedio de los 3 ensayos (EProm).

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	122	0,24	0,17	18,27

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	1685,21	10	168,52	3,56	0,0004
AX-94547709_6A	424,68	1	424,68	8,97	0,0034
AX-94756419_7A	555,13	1	555,13	11,73	0,0009
AX-94759165_2B	161,53	1	161,53	3,41	0,0674
AX-95207390_3A	357,47	1	357,47	7,55	0,0070
AX-94547709_6A*AX-94756419..	0,23	1	0,23	4,8E-03	0,9449
AX-94547709_6A*AX-94759165..	104,45	1	104,45	2,21	0,1403
AX-94547709_6A*AX-95207390..	13,10	1	13,10	0,28	0,5999
AX-94756419_7A*AX-94759165..	3,45	1	3,45	0,07	0,7876
AX-94756419_7A*AX-95207390..	0,16	1	0,16	3,4E-03	0,9536
AX-94759165_2B*AX-95207390..	65,01	1	65,01	1,37	0,2438
Error	5254,89	111	47,34		
Total	6940,10	121			

Tabla 18. Análisis de la varianza considerando el efecto de los alelos alternativos en los 2 QTLs detectados en los cromosomas 6A y 7A, cuantificado por la severidad observada en las líneas portadoras de cada alelo.

QTL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
6A	Sev	6	1,00	1,00	1,91

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	711,00	3	237,00	474,00	0,0021
Alelo	24,00	1	24,00	48,00	0,0202
E/Q	687,00	2	343,50	687,00	0,0015
Error	1,00	2	0,50		
Total	712,00	5			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=2,48414

Error: 0,5000 gl: 2

Alelo Medias n E.E.

Bio 35,00 3 0,41 A

PamP 39,00 3 0,41 B

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

QTL	Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
7A	Sev	6	1,00	1,00	1,09

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo III)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	691,00	3	230,33	1382,00	0,0007

Alelo	32,67	1	32,67	196,00	0,0051
E/Q	658,33	2	329,17	1975,00	0,0005
Error	0,33	2	0,17		
Total	691,33	5			

Test:LSD Fisher Alfa=0,05 DMS=1,43422

Error: 0,1667 gl: 2

Alelo Medias n E.E.

PamP 35,00 3 0,24 A

Bio 39,67 3 0,24 B

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

Tabla 19. QTLs para severidad a la FE, detectados en la población Pampeano x BioINTA 1005 en 3 ensayos de inoculación puntual con los datos de severidad máxima de los ensayos.

Crom	Ensayo	Marcador	cM	LOD	Donante ²	Efecto aditivo ³	R2(%)
1D	Ensayo 1	AX-94541657	14,4	2.38	Pampeano	-7.7	9.90
2B.2	Ensayo 3	AX-94542864	37,7	4.96	Pampeano	-6.9	15.21
2B.1	Ens.Prom.	AX-94491066	21.1	2.30	Pampeano	-3.6	8.93
2B.2	Ens.Prom.	AX-94542864	37,7	2.28	Pampeano	-3.47	1.40
3A	Ensayo 1	AX-95207390	116.8	4.08	Pampeano	-20.5	6.16
3A	Ens.Prom.	AX-95207390	116.8	3.5	Pampeano	-9.15	4.81
3B	Ensayo 2	AX-94470094	38.0	9.14	Pampeano	-10.9	6.03
4A.1	Ensayo 3	AX-95634516	32.4	2.38	BioINTA 1005	5.6	5.04
4A.2	Ensayo 1	AX-94761767	309.8	2.77	BioINTA 1005	19.7	0.18
4A.2	Ensayo 3	AX-94761767	309.8	2.70	BioINTA 1005	8.33	9.59
4A.2	Ens.Prom.	AX-94761767	309.8	2.09	BioINTA 1005	9.36	1.48
5A.1	Ensayo 1	AX-95071409	71.7	2.39	Pampeano	-8.34	7.90
5A.2	Ensayo 1	AX-95659250	92.1	2.67	Pampeano	-7.46	2.43
5A.2	Ens.Prom.	AX-95221941	97.8	2.36	Pampeano	-3.56	6.22
6A	Ensayo 1	AX-94616754	84.2	2.46	BioINTA 1005	7.76	3.38
6A	Ens.Prom.	AX-94547709	75.6	2.12	BioINTA 1005	3.6	6.99
7A.1	Ensayo 2	AX-94975563	0.0	2.69	BioINTA 1005	3.37	9.69
7A.2	Ensayo 2	AX-94927037	108,0	2.55	Pampeano	-3.61	5.15
7A.2	Ensayo 3	AX-94756419	117,1	2.34	Pampeano	-5.1	6.11
7A.2	Ens.Prom.	AX-94756419	117,1	2.47	Pampeano	-3.6	5.57
7B	Ensayo 3	AX-95009696	74,0	2.42	Pampeano	-5.27	6.53

¹ Marcador ligado al máximo LOD. ² Alelo del parental que incrementa el valor fenotípico. ³ Estimado por QTL Cartographer 2.5, Signo (-) proveniente de Pampeano, signo (+) proveniente de BioINTA 1005. ⁴ Porcentaje de la varianza explicada por el QTL.

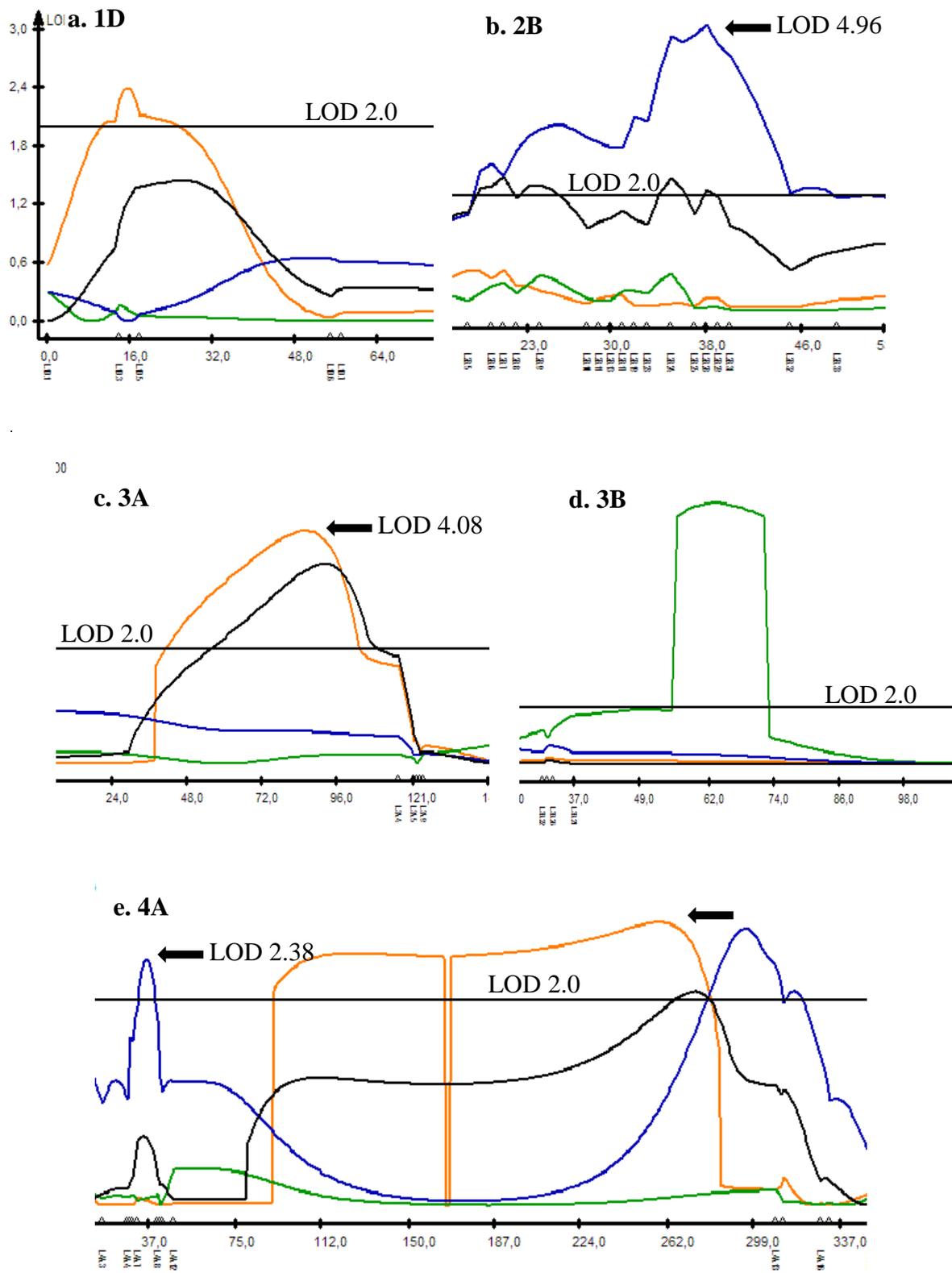


Figura 13. QTLs identificados para severidad a la FE en la población Pampeano x BioINTA 1005 en 3 ensayos de inoculación puntual. Datos máximos. Referencias: --E1, --E2, --E3, --EProm.

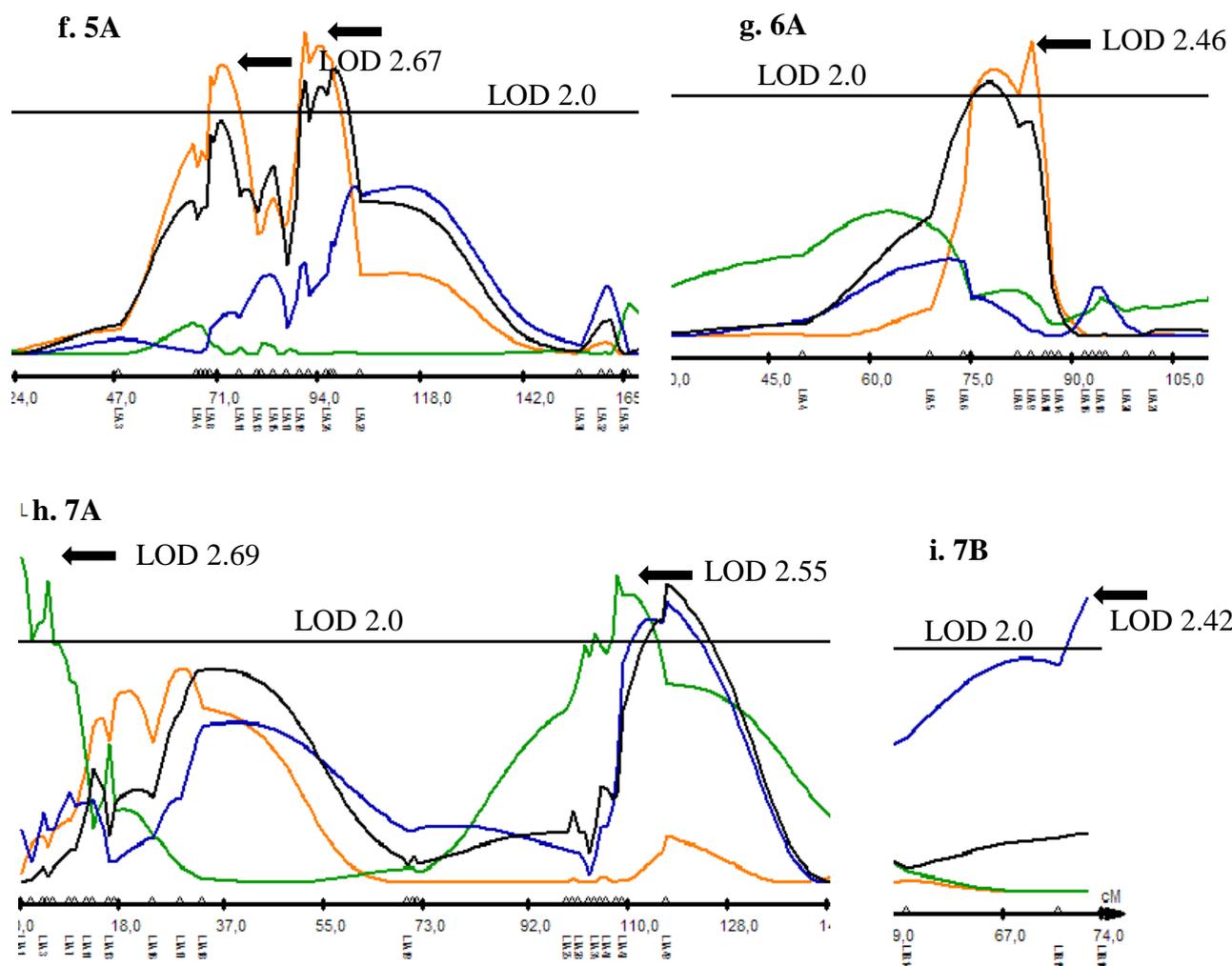


Figura 13. Continuación.

Tabla 20. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 1, con los datos de severidad máxima de los ensayos.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	121	0,36	0,23	31,34

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	28483,27	21	1356,35	2,68	0,0006
AX-95207390_3A	4843,80	1	4843,80	9,56	0,0026
AX-94541657_1D	7782,81	1	7782,81	15,36	0,0002
AX-94761767_4A.2	143,47	1	143,47	0,28	0,5959
AX-95071409_5A.1	6216,53	1	6216,53	12,27	0,0007
AX-95659250_5A.2	1911,85	1	1911,85	3,77	0,0549
AX-94616754_6A	2660,42	1	2660,42	5,25	0,0241
AX-95207390_3A*AX-94541657..	168,90	1	168,90	0,33	0,5650
AX-95207390_3A*AX-94761767..	254,48	1	254,48	0,50	0,4802
AX-95207390_3A*AX-95071409..	403,62	1	403,62	0,80	0,3743
AX-95207390_3A*AX-95659250..	1281,90	1	1281,90	2,53	0,1149
AX-95207390_3A*AX-94616754..	118,75	1	118,75	0,23	0,6294
AX-94541657_1D*AX-94761767..	6,37	1	6,37	0,01	0,9110

AX-94541657_1D*AX-95071409..	58,43	1	58,43	0,12	0,7349
AX-94541657_1D*AX-95659250..	1840,57	1	1840,57	3,63	0,0596
AX-94541657_1D*AX-94616754..	62,88	1	62,88	0,12	0,7254
AX-94761767*AX-95071409	134,29	1	134,29	0,27	0,6078
AX-94761767*AX-95659250	0,42	1	0,42	8,2E-04	0,9772
AX-94761767*AX-94616754	59,19	1	59,19	0,12	0,7333
AX-95071409*AX-95659250	111,52	1	111,52	0,22	0,6400
AX-95071409*AX-94616754	371,26	1	371,26	0,73	0,3941
AX-95659250*AX-94616754	51,83	1	51,83	0,10	0,7498
Error	50166,20	99	506,73		
Total	78649,47	120			

Tabla 21. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 2, con los datos de severidad máxima de los ensayos.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	123	0,25	0,21	10,63

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	3845,27	6	640,88	6,55	<0,0001
AX-94470094_3B	916,04	1	916,04	9,37	0,0027
AX-94975563_7A.1	1472,47	1	1472,47	15,06	0,0002
AX-94927037_7A.2	782,10	1	782,10	8,00	0,0055
AX-94470094*AX-94975563	1,34	1	1,34	0,01	0,9069
AX-94470094*AX-94927037	15,19	1	15,19	0,16	0,6943
AX-94975563*AX-94927037	658,13	1	658,13	6,73	0,0107
Error	11344,70	116	97,80		
Total	15189,97	122			

Tabla 22. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en el Ensayo 3, con los datos de severidad máxima de los ensayos.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	106	0,54	0,46	18,42

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	18037,70	15	1202,51	7,02	<0,0001
AX-94756419_7A	2042,57	1	2042,57	11,93	0,0008
AX-94542864_2B	5088,88	1	5088,88	29,71	<0,0001
AX-95634516_4A.1	1686,09	1	1686,09	9,84	0,0023
AX-94761767_4A.2	3207,58	1	3207,58	18,73	<0,0001
AX-95009696_7B	2184,28	1	2184,28	12,75	0,0006
AX-94756419_7A*AX-94542864..	11,66	1	11,66	0,07	0,7947
AX-94756419_7A*AX-95634516..	821,27	1	821,27	4,79	0,0311
AX-94756419_7A*AX-94761767..	190,97	1	190,97	1,11	0,2938
AX-94756419_7A*AX-95009696..	105,34	1	105,34	0,62	0,4350
AX-94542864*AX-95634516	548,42	1	548,42	3,20	0,0769
AX-94542864*AX-94761767	806,39	1	806,39	4,71	0,0327
AX-94542864*AX-95009696	1125,32	1	1125,32	6,57	0,0120
AX-95634516*AX-94761767	71,27	1	71,27	0,42	0,5205
AX-95634516*AX-95009696	10,22	1	10,22	0,06	0,8076
AX-94761767*AX-95009696	137,43	1	137,43	0,80	0,3728
Error	15415,57	90	171,28		
Total	33453,27	105			

Tabla 23. Análisis de la varianza de los marcadores asociados a los QTLs detectados en EProm, con los datos de severidad máxima de los ensayos.

Variable	N	R ²	R ² Aj	CV
Severidad	121	0,44	0,27	13,51

Cuadro de Análisis de la Varianza (SC tipo I)

F.V.	SC	gl	CM	F	p-valor
Modelo.	8196,01	28	292,71	2,59	0,0004
AX-94547709_6A	1299,73	1	1299,73	11,51	0,0010
AX-94756419_7A	1035,41	1	1035,41	9,17	0,0032
AX-95207390_3A	894,66	1	894,66	7,92	0,0060
AX-94491066_2B	1660,17	1	1660,17	14,70	0,0002
AX-94542864_2B	259,41	1	259,41	2,30	0,1331
AX-94761767_4A.2	274,70	1	274,70	2,43	0,1223
AX-95221941_5A.2	1155,49	1	1155,49	10,23	0,0019
AX-94547709_6A*AX-94756419..	19,17	1	19,17	0,17	0,6813
AX-94547709_6A*AX-95207390..	3,76	1	3,76	0,03	0,8555
AX-94547709_6A*AX-94491066..	47,35	1	47,35	0,42	0,5190
AX-94547709_6A*AX-94542864..	86,86	1	86,86	0,77	0,3828
AX-94547709_6A*AX-94761767..	38,18	1	38,18	0,34	0,5624
AX-94547709_6A*AX-95221941..	0,48	1	0,48	4,2E-03	0,9482
AX-94756419_7A*AX-95207390..	29,11	1	29,11	0,26	0,6129
AX-94756419_7A*AX-94491066..	20,13	1	20,13	0,18	0,6739
AX-94756419_7A*AX-94542864..	0,97	1	0,97	0,01	0,9264
AX-94756419_7A*AX-94761767..	197,45	1	197,45	1,75	0,1894
AX-94756419_7A*AX-95221941..	77,63	1	77,63	0,69	0,4093
AX-95207390_3A*AX-94491066..	152,97	1	152,97	1,35	0,2476
AX-95207390_3A*AX-94542864..	2,23	1	2,23	0,02	0,8885
AX-95207390_3A*AX-94761767..	7,25	1	7,25	0,06	0,8005
AX-95207390_3A*AX-95221941..	110,05	1	110,05	0,97	0,3262
AX-94491066*AX-94542864	186,99	1	186,99	1,66	0,2014
AX-94491066*AX-94761767	309,92	1	309,92	2,74	0,1010
AX-94491066*AX-95221941	227,82	1	227,82	2,02	0,1589
AX-94542864*AX-94761767	7,02	1	7,02	0,06	0,8037
AX-94542864*AX-95221941	79,94	1	79,94	0,71	0,4024
AX-94761767*AX-95221941	11,16	1	11,16	0,10	0,7540
Error	10391,89	92	112,96		
Total	18587,90	120			

Tabla 24. Coeficientes de correlación de Pearson entre experimentos para severidad de infección (fila superior) y nivel de significancia (fila inferior). Valores máximos de cada RIL en cada ensayo.

	Ensayo 1	Ensayo 2	Ensayo 3
Ensayo 1	*	0,16 <0.0746	0,21 <0.0215
Ensayo 2		*	0,08 <0.3791

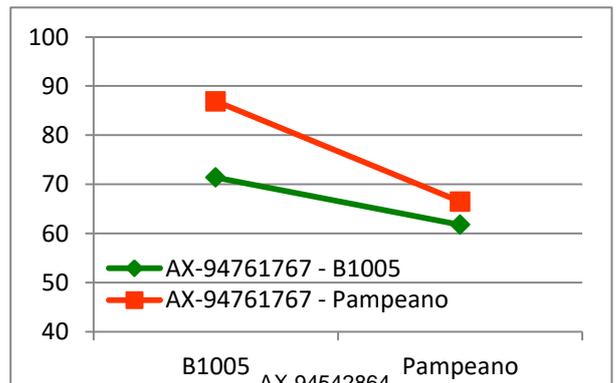
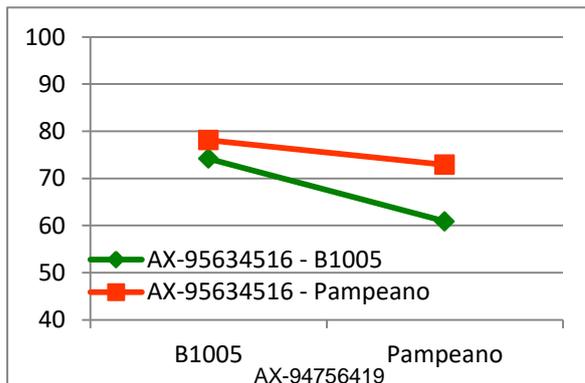
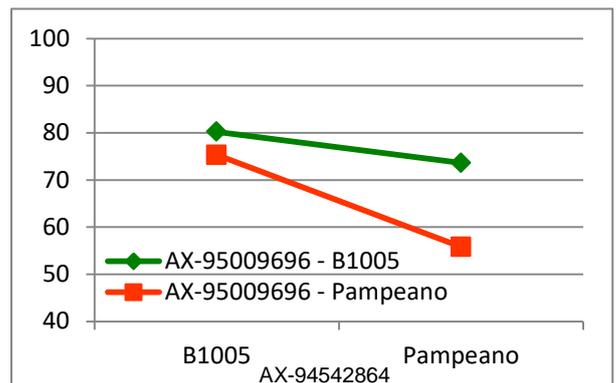
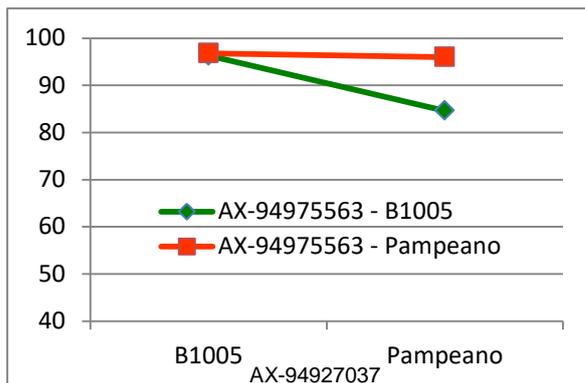


Figura 14. Representación gráfica del efecto epistático entre los marcadores a) AX-94975563 y AX-94927037, b) AX-94542864 y AX-95009696, c) AX-94756419 y AX-95634516 y d) AX-94542864 y AX-94761767.