

## Tesis Doctoral

# Estudio de las resistencias a roya común del maíz y a roya de la hoja del trigo

Darino, Martín Alejandro

2015-03-09

Este documento forma parte de la colección de tesis doctorales y de maestría de la Biblioteca Central Dr. Luis Federico Leloir, disponible en [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). Su utilización debe ser acompañada por la cita bibliográfica con reconocimiento de la fuente.

This document is part of the doctoral theses collection of the Central Library Dr. Luis Federico Leloir, available in [digital.bl.fcen.uba.ar](http://digital.bl.fcen.uba.ar). It should be used accompanied by the corresponding citation acknowledging the source.

Cita tipo APA:

Darino, Martín Alejandro. (2015-03-09). Estudio de las resistencias a roya común del maíz y a roya de la hoja del trigo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires.

Cita tipo Chicago:

Darino, Martín Alejandro. "Estudio de las resistencias a roya común del maíz y a roya de la hoja del trigo". Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires. 2015-03-09.

**EXACTAS** UBA

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales



**UBA**

Universidad de Buenos Aires



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES

Facultad de Ciencias Exactas y Naturales

**Estudio de las resistencias a roya común del maíz y a roya de la hoja del trigo**

Tesis presentada para optar al título de Doctor de la Universidad de Buenos Aires en el área: **CIENCIAS BIOLÓGICAS**

**Martín Alejandro Darino**

Directores de Tesis: Dra. Sara Beatriz Maldonado

Ing. Agr. Francisco Sacco

Consejero de Estudios: Dra. Sara Beatriz Maldonado

Lugar de trabajo: Instituto de Genética “Ewald A. Favret” CICVyA - INTA Castelar.

Buenos Aires, 2015

## **Estudio de las resistencias a roya común del maíz y a roya de la hoja del trigo**

La roya común, causada por el hongo biótrofo *Puccinia sorghi* Schwein. es una importante enfermedad del maíz. En la Argentina poco se conoce acerca de fuentes de resistencia, no existen híbridos comerciales identificados como portadores de resistencia durable a la enfermedad y se desconoce acerca de la estructura poblacional de *P. sorghi* presente en la zona núcleo de cultivo. Los objetivos del presente trabajo consistieron en: la identificación de fuentes de resistencia a la enfermedad mediante la evaluación de un set de líneas de maíz con 66 aislamientos del patógeno y con infecciones naturales a campo; evaluación de la variabilidad patogénica y molecular de los 66 aislamientos; y profundizar en el conocimiento acerca de las bases genéticas que controlan la resistencia durable en cereales para poder implementarlas en programas de mejoramiento de maíz, mediante el estudio de una variedad de trigo llamada Buck Poncho que fue identificada como portadora de resistencia durable a roya de la hoja (*Puccinia triticina* Erikss.). Las líneas de maíz *Rp3-A*, *Rp1-K*, *Rp-GI*, *Rp-G5*, *Rp-G5JD*, PIO19802, PIO28760 y PIO17570 resultaron resistentes a más del 75% de los aislamientos y en más del 78% de las localidades evaluadas. En las líneas PIO68752, PIO28427 y PIO36420 se identificó un nuevo tipo de resistencia cuya expresión comenzó en el estadio V4. Las líneas PIO12345 y PIO74876 mostraron resistencia parcial en el estadio V2. Se identificaron en la población de *P. sorghi* por lo menos 3 grupos de virulencia y 26 fenotipos de virulencia o razas que podrían ser 40 razas si se consideran los genotipos de AFLP. En Buck Poncho se detectaron la existencia de por lo menos tres genes de resistencia *LrBP1*, *LrBP2* y *LBP3*. La combinación de los genes de resistencia detectados en las distintas líneas de maíz podría generar variedades comerciales que posean resistencia más durable. Los grupos de virulencia identificados en la población de *P. sorghi* no mostraron diferencias en el nivel molecular indicando que aislamientos pertenecientes a un mismo grupo de virulencia pueden tener distintos orígenes dentro de la población. La resistencia durable observada en Buck Poncho se puede explicar en parte por los efectos combinados de los genes *LrBP1*, *LrBP2* y *LrBP3* aunque no puede descartarse la presencia de genes menores y/o QTLs menores cuyos efectos sean detectados con poblaciones segregantes de mayor tamaño a la utilizada en este estudio.

Palabras claves: Roya común, Roya de la hoja del trigo, Fuentes de resistencia, Resistencia durable, Grupos de virulencia, Mapas de ligamiento

## **Study of the disease resistance against common rust in maize and wheat leaf rust**

Common rust caused by the biotrophic fungus *Puccinia sorghi* Schwein. is an important disease of maize. In Argentina little is known about maize lines carrying resistance to the disease, the existence of corn hybrids with durable resistance and about the existence of distinct virulence groups in the *P. sorghi* population. The objectives of this work were: the evaluation of a set of maize lines with 66 isolates of the pathogen and with natural pathogen population present in field in order to identify resistance sources to the diseases; the study of the population structure of *P. sorghi* population; and in order to deepen the knowledge about the genetic basis that control durable resistance, genetic and molecular studies of a wheat variety called Buck Poncho that was identified as durable resistance to wheat leaf rust (*Puccinia triticina* Erikss.) were performed. Maize lines *Rp3-A*, *Rp1-K*, *Rp-GI*, *Rp-G5*, *Rp-G5JD*, PIO19802, PIO28760 and PIO17570 were resistant over the 75% of the isolates and over the 78% of the field locations where they were evaluated. A new class of resistance was identified in maize lines PIO68752, PIO28427 and PIO36420 whose expression of the resistance began at leaf stage V4. In inbred lines PIO12345 and PIO74876 showed partial resistance at leaf stage V2. At least, 3 virulence groups were identified, 26 virulent phenotypes or races were distinguished that could become 40 races if AFLPs genotypes are considered. Three leaf rust resistance genes, *LrBP1*, *LrBP2* and *LrBP3* were identified in Buck Poncho. Pyramiding the resistant genes detected in maize lines could be a useful strategy to increase durability of the resistance. The virulence groups identified in *P. sorghi* population did not differ at genetic level, indicating that isolates from each group could have different origins within the population. The durable resistance observed in Buck Poncho could be explained in part by the combination effects of *LrBP1*, *LrBP2* and *LrBP3* genes and the presence of minor genes or minor QTLs whose effects could perhaps be detected in segregant populations bigger than the one that was used in this study.

**Keywords:** Common rust, Wheat leaf rust, Resistance sources, Durable resistance, Virulence groups, Linkage maps

## **AGRADECIMIENTOS**

Quisiera agradecer a mi familia: a mis padres y mis hermanos por haberme brindado su apoyo y amor a través de todos los proyectos personales y laborales que fui emprendiendo.

A Meli, que también es bióloga como yo y siempre estuvo a mi lado ayudándome en la realización de esta tesis y alentándome a que no baje los brazos a pesar de que las cosas no salían bien.

A Ing. Agr. Francisco Sacco y Dra. Sara Maldonado, mis directores de tesis, por haberme brindado la oportunidad de realizar mi doctorado con ellos.

A las chicas del laboratorio: Majo, Fernanda, Lorena y Lucia por ayudarme cuanto tenía alguna inconveniente en el laboratorio y por todos los buenos momentos que pasamos.

A la compañía Pioneer Hi-Bred International, Inc. Por su apoyo económico que hicieron posible la realización de esta tesis.

Al Dr. Enrique Kreff de la compañía Pioneer, por su buena disposición para responder las preguntas o dudas surgidas durante el desarrollo de esta tesis.

A la Dra. Verónica Lía, del Instituto de Biotecnología del INTA Castelar, por su siempre buena disposición y ayuda en el análisis de los datos respectivos al estudio de la población de *P. sorghi*.

## **DEDICATORIA**

A melina, gracias por tu apoyo incondicional

## ÍNDICE

<b>Publicaciones en preparación a partir de este trabajo</b>	1
<b>INTRODUCCIÓN</b>	2-18
- Roya Común	2-4
- Mecanismos de resistencia frente a patógenos	4-6
- Resistencia cualitativa en maíz	6-10
- Resistencia cuantitativa en maíz	10-12
- Enfoques para el estudio de la estructura poblacional de las especies del orden Pucciniales	12-17
- Estudio de la resistencia durable a roya de la hoja del trigo	17-18
<b>HIPÓTESIS Y OBJETIVOS</b>	19
<b>MATERIALES Y MÉTODOS</b>	20-37
<b>1. Maíz</b>	20-31
1.1 Material vegetal	20
1.2 Obtención de los aislamientos de <i>P. sorghi</i>	20-22
1.3 Evaluaciones a campo	22
1.4 Evaluación en condiciones de invernáculo	23-24
1.5 Escala utilizada para la evaluación del tipo de reacción	24
1.6 Detección de resistencia en estadios superiores de desarrollo foliar	24-25
1.7 Detección de resistencia parcial o general	25-27
1.8 Fenotipos de virulencia	27
1.9 Extracción de ADN de <i>P. sorghi</i>	27-28
1.10 Purificación de ADN	28
1.11 Protocolo de AFLP	28-29
1.12 Visualización de los productos de PCR	29-30
1.13 Análisis de los datos	30-31
<b>2. Trigo</b>	31-37
2.1 Material vegetal	31
2.2 Material del patógeno	31-32
2.3 Inoculaciones artificiales con <i>P. triticina</i>	32

2.4	Análisis de segregación	33
2.5	Prueba de alelismo entre los genes <i>LrBP2</i> y <i>Lr11</i>	33
2.6	Extracción de ADN de trigo	33-34
2.7	Análisis mediante marcadores moleculares	34-35
2.8	Condiciones de amplificación del marcador para el gen <i>Lr10</i>	35
2.9	Desarrollo del marcador de región amplificada, secuenciada y caracterizada (SCAR)	35-36
2.10	Mapas de ligamiento	36
2.11	Evaluaciones a campo	36-37
<b>RESULTADOS</b>		38-60
1.	<b>Maíz</b>	38-53
1.1	Tipos de reacción de las líneas de maíz en invernáculo y en evaluaciones a campo	38-40
1.2	Detección de resistencia en estadios posteriores a V2	40-43
1.3	Detección de resistencia parcial o general	43-46
1.4	Estudio de la población de <i>P. sorghi</i>	46-53
2.	<b>Trigo</b>	54-60
2.1	Detección de genes de resistencia	54-55
2.2	Marcadores asociados a los genes de resistencia	56-59
2.3	Evaluaciones a campo	59-60
<b>COLABORACIONES</b>		61
<b>DISCUSIÓN</b>		62-72
1.	Evaluación del set de líneas de maíz	62-63
2.	Resistencia en estadios posteriores a V2	63-64
3.	Resistencia parcial	65-66
4.	Estudio de la estructura poblacional de <i>P. sorghi</i>	66-69
5.	Estudios de las bases genéticas de resistencia durable en Buck Poncho	69-72
<b>CONCLUSIONES</b>		73-74
<b>REFERENCIAS</b>		75-82
<b>ANEXOS</b>		83-101
	Tabla Anexo 1 (Tabla A1)	83-88
	Tabla Anexo 2 (Tabla A2)	89-91
	Tabla Anexo 3 (Tabla A3)	92-93
	Tabla Anexo 4 (Tabla A4)	94-95





**Este trabajo de tesis doctoral dará lugar a las siguientes publicaciones:**

- **M.A. Darino**, M.J. Dieguez, D. Singh, L.R. Ingala, M.F. Pergolesi, R.F. Park, R.A. McIntosh, F. Sacco. Detection and identification of *Lr11* and other leaf rust resistance genes in the durably resistant wheat cultivar Buck Poncho. Enviado a Euphytica el 23 de enero de 2015 (En revisión).

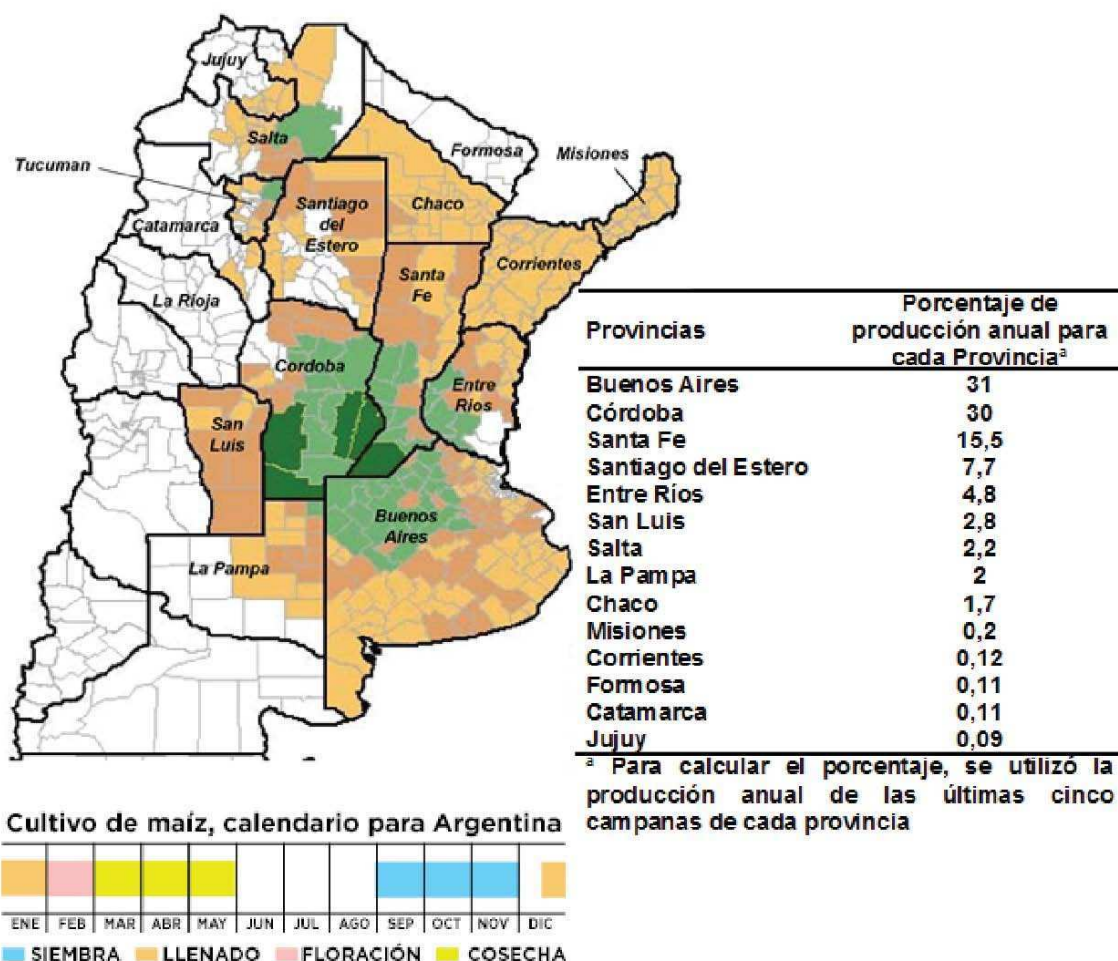
**Trabajo en preparación:**

- **Darino M.A**, Rochi L, Kreff ED, Pergolesi M.F, Ingala L.R, Dieguez M.J, Sacco F. Identification of maize lines resistant to common rust population from Argentina. Va a ser enviado a Plant Disease

# INTRODUCCIÓN

## Roya común

El Maíz (*Zea mays L.*) es uno de los cereales más cultivados en el mundo con una producción global de 868,81 millones de toneladas durante la campaña 2012/2013 (USDA-FAS 2014); siendo principalmente destinadas a la alimentación, producción de bioetanol y almidón. En Argentina tiene un papel destacado con una producción promedio de alrededor de 26 millones de toneladas anuales con un crecimiento sostenido. La denominada zona núcleo maicera Argentina es la principal zona productiva y comprende el norte de la provincia de Buenos Aires, el sur de la provincia de Santa Fe y el sureste de la provincia Córdoba (Fig. 1). En dichas provincias se concentra el 76,5% de la producción nacional anual (SIIA 2014).



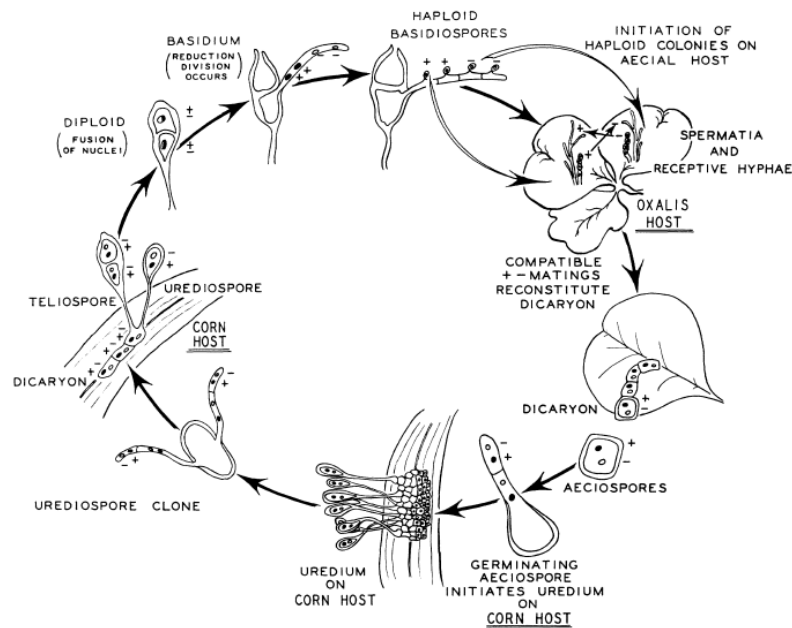
**Fig. 1** Mapa de la Argentina donde se representan las provincias productoras de maíz. Los tonos de color verde y rojo indican las zonas con mayor y menor producción, respectivamente (Fyo 2014)

Tanto los productores como los mejoradores están interesados en producir variedades de mayor rendimiento, mejor calidad y mayor seguridad de cosecha. Entre los factores que

afectan la seguridad de cosecha, pueden mencionarse las enfermedades de origen fúngico. En la Argentina las principales enfermedades fúngicas que afectan al cultivo de maíz son la roya común (*Puccinia sorghi* Schwein), tizón foliar (*Exserohilum turcicum*) y podredumbre de la espiga (*Fusarium verticillioides*) (Formento y col. 2012).

La roya común del maíz es una enfermedad endémica en la Argentina, presentándose cada año con diferentes niveles de severidad dependiendo de las condiciones ambientales, las razas del patógeno y los genotipos de las variedades comerciales cultivadas. El agente causal de la misma, el hongo biótrofo *Puccinia sorghi* Schwein, desarrolla su ciclo asexual a través de uredosporas producidas en hojas de maíz y teosintes. El ciclo sexual lo realiza sobre *Oxalis corniculata* L., *O. stricta* L. y *O. europea* Jord. (Fig. 2), siendo por lo tanto una especie heteroica (Hooker 1985). Los daños sobre el cultivo se traducen en una reducción del peso del grano que oscila entre 3 y 8% por cada 10% del área foliar afectada (White 1999).

Las poblaciones de distintas especies de roya se caracterizan, en general, por exhibir gran variabilidad patogénica y capacidad para generar nuevas formas virulentas que superan la mayoría de las resistencias genéticas empleadas en las variedades comerciales. Mecanismos como la mutación, la recombinación durante la reproducción sexual y/o la hibridación somática (intercambio de núcleos por medio de la fusión de las hifas de dos razas que se encuentran sobre el mismo tejido foliar), podrían explicar la aparición de nuevas formas virulentas que serían rápidamente seleccionadas debido a la difusión de nuevos genotipos uniformes del hospedante en amplias zonas de cultivo (McDonald & Linde 2002). Cabe mencionar también que, debido a la gran producción de esporos fácilmente transportables por el viento a grandes distancias, la migración de formas virulentas de otras áreas de cultivo puede ser un factor importante para el inicio de epifitias, especialmente cuando no existen barreras geográficas. Si bien *O. corniculata*, uno de los hospedantes intermediarios donde *P. sorghi* puede desarrollar su ciclo sexual, crece naturalmente en la principal zona maicera de Argentina pero no existen estudios acerca de la variabilidad generada por este mecanismo.



**Fig. 2** Ciclo de vida de *P. sorghi*. El hongo se propaga principalmente a través de uredosporas ( $n+n$ ) que se diseminan por el viento, depositándose en la superficie de las hojas de maíz. Cuando las condiciones ambientales, principalmente temperatura ( $15-25^{\circ}\text{C}$ ) y humedad ( $\geq 98\%$ ) son favorables, emite un tubo germinativo que penetra a través de los estomas y completa su ciclo en el mesófilo de la hoja hasta esporular produciendo más uredosporas que reinician el ciclo de diseminación e infección, (ciclo asexual). En determinadas condiciones, en el mismo micelio, se producen teliosporas ( $n+n$ ) de las cuales mediante meiosis surgen las basidiosporas ( $n$ ) que infectan a las especies de *Oxalis* y generan unas estructuras denominadas picnios que están compuestas por hifas receptoras ( $n$ ) y picniosporas ( $n$ ). Las hifas receptoras son fertilizadas por picniosporas compatibles (núcleo de hifa receptora + con núcleo de picniospora -), de manera de regenerar micelio ( $n+n$ ) del que surgen las aeciosporas ( $n+n$ ) que infectan al maíz (ciclo sexual), (Flangas & Dickson 1961; Hooker 1985)

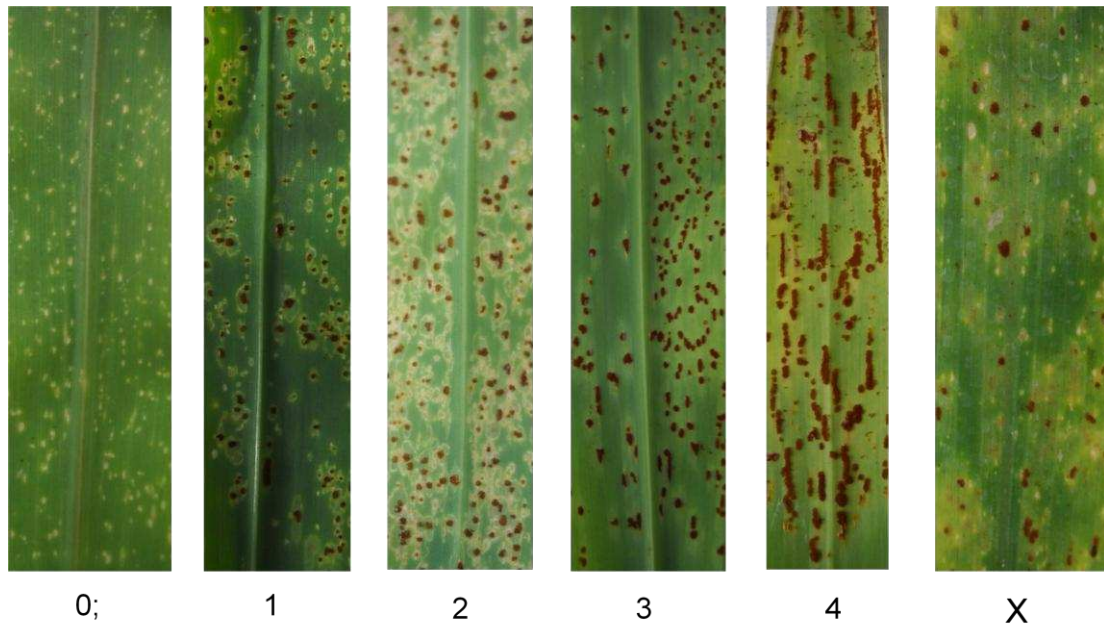
El control de la enfermedad se realiza principalmente por la utilización de genes de resistencia. Sin embargo, en los últimos años la aplicación de fungicidas durante los estadios foliares V8 y VT ha logrado reducir la severidad de la enfermedad, pero la aplicación de fungicidas implica un mayor gasto por parte del productor como así también un posible daño ambiental. Por lo tanto el uso de genes de resistencia representa a mediano plazo una de las formas más económicas para el control de enfermedades como las royas. Esta metodología exige, no sólo un esfuerzo constante de evaluación e incorporación de genes de resistencia en los programas de mejoramiento, sino también una evaluación de la variabilidad genética de las poblaciones del patógeno y de su potencialidad para generar nuevas formas virulentas (Ingala 2008).

### Mecanismos de resistencia frente a patógenos

Las plantas poseen distintas estrategias de resistencia frente a los patógenos. La resistencia de no-hospedante, es la primera barrera a la cual se enfrenta un patógeno y consiste principalmente en defensas físicas o químicas preformadas como paredes

celulares gruesas, enzimas antimicrobianas presentes en la superficie foliar y metabolitos secundarios. Cuando las defensas preformadas son superadas, las plantas detectan ciertos dominios conservados en algunas moléculas del patógeno denominados MAMPs o PAMPs (Microbe/pathogen associated molecular patterns) e inducen un primer nivel de respuesta denominado inmunidad inducida por PAMP (PTI, PAMP-Triggered Immunity). El reconocimiento de los MAMPs/PAMPs es realizado mediante receptores proteicos localizados en la membrana plasmática. Los patógenos más especializados sobre un determinado hospedante vegetal, han desarrollado moléculas denominadas efectores capaces de neutralizar la PTI. Sin embargo, las plantas han desarrollado un segundo nivel de resistencia donde receptores proteicos con dominios de unión a nucleótido (NBS, Nucleotide binding site) y dominios ricos en leucina (LRR, Leucine rich repeat) son capaces de reconocer de forma directa o indirecta a los efectores y activar la denominada inmunidad inducida por efectores (ETI, Effector-Triggered Immunity). La ETI posee como resultado la activación de la respuesta hipersensible (HR), caracterizada por la formación de un halo necrótico producto de la muerte celular programada de las células infectadas y de aquellas que las rodean impidiendo el desarrollo del patógeno (Cheng y col. 2012; Jones & Dangl 2006). Los patógenos y las plantas poseen mecanismos como la recombinación o mutación que permiten que el patógeno genere nuevas variantes alélicas de los efectores que no sean reconocidas por los NBS-LRR y las plantas, generar variantes alélicas de los NBS-LRR capaces de reconocer a los nuevos efectores.

Para el caso de la roya común, se ha observado que la HR puede variar en función de la velocidad a la cual las células mueren luego de entrar en contacto con el patógeno, de manera que pueden encontrarse distintos niveles de esta respuesta (Hulbert 1997). Los genetistas en su afán de clasificar cualitativamente la reacción del hospedante, definen clases o intervalos de clases que agrupan reacciones características. Uno de los pioneros en realizar este tipo de clasificaciones fue Stakman que propuso una escala para la roya del tallo (*Puccinia graminis* f. sp. *tritici*) en trigo que asigna valores numéricos comprendidos entre 0 y 4, siendo 0 el valor de máxima resistencia y 4 el de máxima susceptibilidad. Los valores comprendidos dentro del rango establecen distintos grados de resistencia o susceptibilidad de acuerdo a la respuesta del huésped. También propuso la clase X que incluía un tipo de respuesta particular o excepcional, difícil de incluir en la escala previa, donde se observan pústulas de tamaños variables con reacciones del tipo resistente y susceptible en una misma hoja (Stakman y col. 1962). La escala fácilmente puede ser adaptada a la interacción maíz-roya común (Fig. 3).



**Fig. 3** Clasificación de los tipos de reacción del hospedante según la escala propuesta por Stakman y col. (1962) para la interacción Maíz - *P. sorghi*. El tipo de reacción 0; hace referencia a flecks hipersensibles con necrosis, el tipo 1 pequeñas pústulas con necrosis alrededor, tipo 2 son pústulas pequeñas a medianas rodeadas por necrosis o clorosis, tipo 3 pústulas medianas que pueden estar rodeadas o no por clorosis y por último la reacción tipo 4 son pústulas grandes sin clorosis. Entre las clases, a su vez se pueden establecer tipos de reacción intermedios. Reacción tipo X indica distintos tipos de reacción en una misma hoja

Existe otro tipo de resistencia frente a royas que se caracteriza por variaciones en el número y tamaño de las pústulas donde algunos estudios genéticos han demostrado que se trataría de un conjunto de genes (poligenes), donde la combinación de sus efectos es la responsable de la resistencia (Gingera y col. 1995; Hooker 1985; Kim & Brewbaker 1977). A este tipo de resistencia usualmente se la denomina cuantitativa, mientras que la resistencia basada en el tipo de reacción se la considera cualitativa.

### **Resistencia cualitativa en Maíz**

La respuesta cualitativa, en el caso de maíz es raza-específica. En esta respuesta genes conocidos como *Rp* confieren resistencia a determinadas razas del patógeno a partir de la primera hoja y durante todo el ciclo de vida de la planta (Hooker 1985). La respuesta de resistencia de estos genes es del tipo HR. El fenotipo de la respuesta, ya sea la velocidad a la cual las células mueren y el número de células que mueren luego de la inoculación varían con cada *Rp*, la mayoría son dominantes, no lográndose distinguir entre el homocigota resistente y el heterocigota (Hulbert 1997).

Las bases genéticas de la resistencia raza-específica están determinadas por la relación gen a gen descrita por primera vez por Flor (1942) en la interacción lino - roya del lino (*Linum usitatissimum* - *Melampsora lini*), en donde para un factor de avirulencia (*Avr*) presente en el patógeno existe un gen de resistencia (*R*) en el hospedante capaz de

reconocerlo y desencadenar la respuesta de resistencia. Dicha hipótesis ha sido probada en varias interacciones hospedante - patógeno (Tabla 1). En la interacción maíz - roya común no ha sido demostrada ya que no se han realizado estudios detallados de herencia de los genes para patogenicidad en el hongo. Sin embargo, tampoco se han hallado evidencias que indiquen lo contrario (Flangas & Dickson 1961).

**Tabla 1.** Sistemas de hospedante – patógeno para las cuales la relación gen a gen fue sugerida en función de estudios genéticos realizados en el hongo y el hospedante

Hospedante	Patógeno
<i>Linum</i>	<i>Melampsora lini</i>
<i>Triticum</i>	<i>Puccinia graminis tritici</i>
<i>Triticum</i>	<i>Puccinia striiformis</i>
<i>Triticum</i>	<i>Puccinia recondita</i>
<i>Avenae</i>	<i>Puccinia graminis avenae</i>
<i>Coffea</i>	<i>Hemileia vastatrix</i>
<i>Helianthus</i>	<i>Puccinia helianthi</i>
<i>Avenae</i>	<i>Ustilago avenae</i>
<i>Triticum</i>	<i>Ustilago tritici</i>
<i>Triticum</i>	<i>Tilletia caries</i>
<i>Triticum</i>	<i>Tilletia contraversa</i>
<i>Hordeum</i>	<i>Erysiphe graminis hordei</i>
<i>Triticum</i>	<i>Erysiphe graminis tritici</i>
<i>Malus</i>	<i>Venturia inaequalis</i>
<i>Avenae</i>	<i>Helmithosporium victoriae</i>
<i>Solanum</i>	<i>Phytophthora infestans</i>
<i>Lycopersicum</i>	<i>Cladosporium fulvum</i>
<i>Solanum</i>	<i>Sinchytrium endobioticum</i>

Tabla extraída de Flor (1971).

Hooker y colaboradores identificaron 24 genes del tipo *Rp*, utilizando una extensa colección de razas de maíz. De los 24, 16 se localizaron en el área *rp1* del brazo corto del cromosoma 10, de los cuales 14 fueron designados *Rp1* (*Rp1A-Rp1N*) porque fueron mapeados en un único locus denominado *rp1* (Hagan & Hooker 1965; Hooker 1969, 1973; Hooker & Le Roux 1957; Hooker & Russell 1962a, b; Lee y col. 1963; Russell & Hooker 1959; Wilkinson & Hooker 1968); los otros 2 genes, *Rp5* y *Rp6*, tienen una designación distinta porque mapean por lo menos a más de una unidad de mapa del locus *rp1* (Hagan & Hooker 1965; Wilkinson & Hooker 1968). De los restantes 8 genes, 6 serían alelos y se encuentran cerca del centrómero del cromosoma 3 y fueron designados *Rp3* (*Rp3A-Rp3F*) (Hooker 1985). Los otros 2, también alelos, se localizaron en el cromosoma 4 y fueron designados *Rp4* (*Rp4A-Rp4B*) (Hagan & Hooker 1965; Wilkinson & Hooker 1968). Otro locus de resistencia designado *Rp8* fue localizado en el cromosoma 6 (Delaney y col. 1998). Los genes identificados por Hooker y colaboradores fueron transferidos a la línea R168 para crear un conjunto de líneas casi isogénicas (NILs, Near Isogenic Lines) para ser utilizados en estudios de comparación de genes.



Las razas utilizadas para identificar el set de genes descrito por Hooker ya no existen y con el objetivo de recuperar una colección de razas que permitan diferenciar cada uno de los genes, Hulbert, otro autor, colectó aislamientos en distintas regiones de Estados Unidos. Si bien la colección de razas permitió detectar todos los genes, no se logró diferenciarlos a todos y se hipotetizó, basándose en la respuesta fenotípica de resistencia - susceptibilidad de los genes a las distintas razas, que los grupos: *Rp1-E*, *Rp1-I* y *Rp1-K*; *Rp1-A* y *Rp1-F*; *Rp1-H* y *Rp1-J*; *Rp1-C*, *Rp1-L* y *Rp1-N* podrían ser los mismos genes (Hulbert y col. 1991). Estudios moleculares que incluyeron la utilización de una sonda *rp1* demostraron que las líneas portadoras del *Rp1-C*, *Rp1-L* y *Rp1-N* portaban el mismo haplotipo *Rp1*. Lo mismo fue observado para *Rp1-E*, *Rp1-I* y *Rp1-K*, y para el *Rp1-A* y *Rp1-F*. La redundancia observada sería consecuencia de la propagación por varios años sin realizar tests de rutina. Estos tests hubieran permitido identificar cada uno de los genes *Rp*, y evitar que varias de estas líneas los perdieran (Hulbert y col. 2001).

Detallados estudios genéticos que incluyeron pruebas de progenies de heterocigotas para dos genes *Rp1* dominantes demostraron que algunas progenies susceptible o doble resistentes podían ser obtenidas mediante recombinación para ciertos cruzamientos indicando que los genes del locus *rp1* podía considerarse en ciertos casos, genes estrechamente ligados y no alelos (Hooker & Saxena 1971; Saxena & Hooker 1968). Análisis de progenies similares pero empleando marcadores de polimorfismos de longitud de fragmentos de restricción (RFLPs, restriction fragment length polymorphism) flanqueantes al locus *rp1*, determinaron que los genes del locus *rp1* podían ser combinados por simple recombinación o recombinación desigual, indicando para este último caso que los genes residen en una región rica en duplicaciones en tándem. De este trabajo también se determinó que el *Rp1-G* en realidad mapeaba a más de dos unidades de mapa de los genes *Rp1* y que pasó a designarse *Rp-G* (Hulbert & Bennetzen 1991).

Ensayos a campo y evaluaciones en invernáculo, realizadas por distintos autores, con distintas razas del patógeno no han podido diferenciar a los 6 alelos del locus *rp3*, sugiriendo en función de la respuesta de virulencia, que estos seis alelos podrían ser un único gen (Groth y col. 1992; Pataky 1987; Sanz-Alferez y col. 1995). Sin embargo, pruebas de progenie de heterocigotas para dos genes *Rp3* dominantes y marcadores moleculares del tipo RFLPs flanqueantes al locus *rp3* determinaron que el locus *rp3* es muy similar al locus *rp1*, en el sentido de que se tratarían de genes estrechamente ligados los cuales pueden ser combinados por simple recombinación o recombinación desigual (Webb y col. 2002).

Otro tipo de resistencia cualitativa poco estudiada para el caso de maíz es la respuesta de resistencia tipo Z que se caracteriza por fleck necrótico hipersensible hacia la punta de las hojas y pústulas esporulantes hacia la base de las mismas. Posiblemente este tipo de respuesta se encuentre relacionado con la maduración de las hojas, ya que la base foliar es menos madura que la punta. Un ejemplo de este tipo de respuesta es el gen *Rp4-B* (Van Dyke & Hooker 1968).

Los genes de resistencia raza-específica confieren inicialmente buenos niveles de resistencia frente a la enfermedad pero a medida que el cultivar portador del gen de resistencia es utilizado extensivamente por largos períodos de tiempo, la presión de selección sobre las poblaciones patógenas aumenta, determinando la aparición de nuevas razas del patógeno capaces de infectar al cultivar. Por lo tanto a este tipo de resistencias se las considera poco durables y su utilización en programas de mejoramiento requiere de una constante evaluación de nuevas variantes génicas resistentes e incorporación en los cultivares comerciales, lo que implica un mayor costo para las compañías productoras de semillas. En los Estados Unidos, ninguno de los genes *Rp* resultó resistente a todas las razas del patógeno colectadas (Hulbert y col. 1991); en Hawái donde la siembra de maíz se realiza de forma continúa durante todo el año, ninguno de los genes *Rp* resultó efectivo frente a la enfermedad (Brewbaker 1983). La acumulación de este tipo genes podría generar resistencias que fuesen más durables, independientemente de la difusión del cultivo. Para validar esta hipótesis, mediante eventos de recombinación se obtuvieron 11 líneas, con combinaciones de dos o tres genes del área *rp1*, las cuales fueron denominadas líneas compuestas (Hu & Hulbert 1996; Hulbert 1997) (Tabla 2).

**Tabla 2.** Líneas con combinaciones de genes *Rp* desarrolladas por Hu y Hulbert (1996).

Línea compuesta <sup>a</sup>	Cruzamiento
<i>Rp-GI</i>	<i>Rp-G</i> x <i>RpI-I</i>
<i>RpI-DJ</i>	<i>RpI-D</i> x <i>RpI-J</i>
<i>Rp-G5</i>	<i>Rp-G</i> x <i>Rp5</i>
<i>Rp-5D</i>	<i>Rp5</i> x <i>RpI-D</i>
<i>RpI-JC</i>	<i>RpI-J</i> x <i>RpI-C</i>
<i>RpI-FJ</i>	<i>RpI-F</i> x <i>RpI-J</i>
<i>RpI-GFJ</i>	<i>RpI-FJ</i> x <i>Rp-G</i>
<i>RpI-FJC</i>	<i>RpI-FJ</i> x <i>RpI-C</i>
<i>Rp-GDJ</i>	<i>Rp-G</i> x <i>RpI-DJ</i>
<i>Rp-G5JC</i>	<i>Rp-G5</i> x <i>RpI-JC</i>
<i>Rp-G5DJ</i>	<i>Rp-G5</i> x <i>RpI-DJ</i>

<sup>a</sup> El orden de los genes dentro de las líneas compuestas está determinado en función del posible orden que poseen los genes *Rp* desde el telómero al centrómero.

Las líneas con las combinaciones descritas arriba y líneas portadoras de 15 genes *Rp* individuales fueron evaluadas con aislamientos de patógeno virulento al *RpI-D*, el cual había conferido resistencia a la enfermedad por más de 15 años en los Estados Unidos. Los genes: *RpI-E*, *RpI-I*, *RpI-K* y *Rp-G* y las líneas con combinaciones de genes *Rp*: *RpI-JFC*, *RpI-JC*, *Rp-GI*, *Rp-G5*, *Rp-GDJ*, *Rp-G5JD*, *Rp-G5JC* y *Rp-GFJ* resultaron ser efectivas frente a estas nuevas formas virulentas (Pataky y col. 2001). Sin embargo,

la durabilidad de las mismas no puede ser predicha ya que se evaluaron con un pequeño set de aislamientos, por lo que se requiere que sean evaluadas extensivamente en condiciones de campo con infecciones naturales de la población patógena. En la Argentina el set de líneas portadoras de genes individuales fue evaluado en la localidad de Pergamino, durante los años 1996 al 2000. Los genes *Rp1-N*, *Rp3-A* y *Rp3-C*, resultaron ser resistentes a la enfermedad mientras que los genes *Rp1-A*, *Rp1-B*, *Rp1-C*, *Rp1-D*, *Rp1-E*, *Rp1-F*, *Rp1-G*, *Rp1-H*, *Rp1-I*, *Rp1-J*, *Rp1-K*, *Rp1-M*, *Rp3-B*, *Rp3-D*, *Rp3-E*, *Rp4-A*, *Rp4-B* y *Rp5* resultaron susceptibles o moderadamente susceptibles a la enfermedad (González 2000). Si bien el set no fue extensamente evaluado en distintas localidades de la zona núcleo maicera, puede observarse que no todos los genes *Rp* descritos son efectivos frente a la población patógena. Además, que la mayoría de los genes resulten susceptibles indica que la población de *P. sorghi* en la Argentina puede ser altamente variable con la presencia de distintos fenotipos de virulencia o razas. La evaluación de genes *Rp* y sus combinaciones, con infecciones naturales a campo y con razas del patógeno colectadas en distintas localidades de la Argentina, permitiría identificar a aquellos genes o combinaciones que puedan resultar de utilidad en programas de mejoramiento.

### **Resistencia cuantitativa en maíz**

La resistencia cuantitativa para el caso de maíz se asocia a la resistencia general o parcial en donde un conjunto de genes de efectos pequeños controla la enfermedad a través de la reducción en el número y tamaño de pústulas, retraso en la esporulación y/o reducción en la producción de esporos. Este tipo de resistencia a menudo se encuentra asociada a la resistencia de planta adulta, pero puede ser detectada en el estadio de plántula (Hooker 1969, 1985; Pataky 1986).

La resistencia parcial, a diferencia de la resistencia raza-específica, reduce el desarrollo del patógeno de manera que la presión de selección sobre los factores de avirulencia es menor y por lo tanto puede resultar más duradera (Parlevliet 2002); sin embargo, por su naturaleza poligénica, resulta difícil su introgresión en los cultivares comerciales (Hulbert 1997). El desarrollo de mapas saturados con marcadores moleculares, como así también de nuevas tecnologías como el mapeo por asociación y secuenciación de próxima generación (NGS, Next-Generation Sequencing) permiten identificar QTLs, seguir el destino de los mismos en poblaciones segregantes y combinarlos en las progenies (Varshney y col. 2009).

En general las líneas portadoras de resistencia cuantitativa exhiben el mismo nivel de resistencia frente a todas las razas evaluadas de un mismo patógeno, de allí que muchos autores la consideren raza no específica, sin embargo para algunas interacciones hospedante/patógeno podría ser del tipo raza-específica, considerando lo que sucede en variedades de maíz con resistencia general a tizón foliar (*Setosphaeria turcica* y *Cochliobolus heterostrophus*) en las que se aislaron razas que ocasionan lesiones muy severas. A pesar de estos resultados, en condiciones de campo, no existen reportes confiables de erosión de este tipo de resistencia (Parlevliet 2002).

Los distintos componentes de la resistencia parcial pueden evaluarse según los siguientes parámetros: frecuencia de infección (IF) que consiste en contar el número de pústulas producidas por unidad foliar luego de realizar una inoculación artificial (Parlevliet & Kuiper 1977); producción de esporos (SP), que consiste en pesar la cantidad de esporos producidos por hoja aunque la metodología resulta tediosa de manera que se recurre a medir el diámetro de pústula, ya que se asume que existe una relación entre tamaño de pústula y la producción de esporos (Neervoort & Parlevliet 1978; Parlevliet 1985); por último el período de latencia (LP), que generalmente se calcula como el tiempo requerido para que el 50 % de las pústulas erupcionen y para ello se requiere del conteo de pústulas a determinados intervalos de tiempo (Shaner 1980). La medición de estos tres componentes (IF, LP y SP), requieren de una inoculación uniforme de manera que se deposite la misma cantidad de inóculo sobre las líneas a evaluar. Altas densidades de inóculo promueven una menor producción de esporos y el grado de maduración de las hojas influye sobre las mediciones. Los componentes se encuentran relacionados y en general una línea con mayor LP posee menor IF y SP. El período de latencia resulta el mejor componente para evaluar la resistencia parcial porque puede ser evaluado de manera sencilla, precisa y estima la resistencia parcial tan bien como los otros componentes (Neervoort & Parlevliet 1978). Una de las primeras metodologías empleadas para su cálculo fue el período de latencia promedio ponderado (MLP, weighted average latent period), (Ohm & Shaner 1976):

$$MLP = \sum_{i=0}^n P_i t_i$$

Donde  $P_i$  es la proporción de pústulas esporulantes (en relación al número total de pústulas) que surgieron en el  $i$ th día luego de la inoculación.  $t_i$  es el  $i$ th día luego de la inoculación y  $n$  es el número de días luego de la inoculación cuando se alcanzó el máximo número de pústulas esporulantes.

El empleo de esta fórmula requiere que se realicen conteos diarios, ya que omitir una observación de uno o más días genera que el MLP calculado sea mayor que el obtenido mediante observaciones diarias, a su vez si el número de líneas a evaluar es grande, realizar conteos diarios se torna dificultoso (Shaner 1980).

Si se grafica la proporción de pústulas emergidas en función de los días posteriores a la inoculación, la curva obtenida es del tipo sigmoidea (Shaner & Hess 1978). Calcular el período de latencia mediante extrapolación de la curva era complejo porque en la década del 80 no se contaba con programas informáticos que permitieran realizarlo. Shaner (1980) propuso para la interacción roya de la hoja del trigo - trigo una metodología que consistía en transformar los valores de proporción de pústulas emergidas empleando el probit. Mediante la transformación se logra obtener una recta que por extrapolación permite calcular el período de latencia como el tiempo al cual el 50% de las pústulas esporulantes aparecen ( $T_{50}$ ). Esta metodología permite además, calcular el  $T_{50}$  mediante días alternados de conteos sin necesidad de examinar las hojas diariamente. Otra aproximación ensayada años después, consistió en utilizar fórmulas

de la forma sigmoidea para el cálculo del  $T_{50}$ . En función de parámetros como el valor  $R^2$  y la comparación de las sumas de cuadrados obtenidas de utilizar una regresión lineal o sigmoidea, se determinó que el cálculo del  $T_{50}$  a partir de una curva sigmoidea era más exacto (Webb & Nutter Jr 1997). Sin embargo, otros autores sugieren que la transformación probit propuesta por Shaner es la más exacta para calcular el  $T_{50}$  (Lannou 2012). Para el caso de maíz no se han evaluado si este tipo de metodologías son útiles para medir el periodo de latencia.

En maíz se identificó un tipo especial de resistencia parcial para roya común. En distintos híbridos de maíz se observó que a medida que la planta crecía, la severidad de la infección de roya común disminuía. Este tipo de resistencia, al igual que la resistencia parcial reduce el número de pústulas por área foliar pero a diferencia de esta última sería una propiedad universal del maíz ya que todos los híbridos mostraron este tipo de resistencia definida como resistencia de planta adulta (Headrick & Pataky 1987).

### **Enfoques para el estudio de la estructura poblacional de las especies del orden Pucciniales**

La estructura poblacional de las especies del orden Pucciniales, puede ser estudiada por medio de técnicas numéricas que consisten en establecer relaciones entre los genotipos o fenotipos de virulencia de los aislamientos, pertenecientes a una misma población o a poblaciones distintas de la misma especie. Las relaciones se establecen a partir de coeficientes que permiten medir el grado de semejanza entre dos aislamientos. Los coeficientes se aplican sobre una matriz básica de datos (MBD) que contiene los estados para el set de caracteres empleados en la descripción de las unidades taxonómicas operativas (OTU), que en este caso son los aislamientos. Se construye una matriz a partir de los valores de semejanza para todas las combinaciones posibles de pares de aislamientos. Sobre esta matriz se emplea una técnica de agrupamiento que construye grupos de aislamientos en función del grado de semejanza. Los grupos se representan por medio de un diagrama arborescente denominado dendrograma (Sneath & Sokal 1973).

Para el caso de las royas, como caracteres pueden emplearse un set de líneas del hospedante, portadoras de genes individuales de resistencia, donde cada carácter estará representado por un gen de resistencia. Los estados posibles de cada carácter frente a los aislamientos serán dos, el tipo de reacción resistente que se lo clasifica como avirulento y el tipo de reacción susceptible se lo clasifica como virulento. Los aislamientos son evaluados sobre el set de líneas del hospedante; al patrón de virulencia – avirulencia de cada aislamiento se lo considera el fenotipo de virulencia y en función de los distintos fenotipos observados se define el número de razas detectadas. Los fenotipos de virulencia son luego utilizados para establecer relaciones de semejanza entre aislamientos que luego son visualizadas en un dendrograma, donde aislamientos con fenotipos similares tenderán a agruparse. En general se utilizan entre 10 a 30 líneas del hospedante dependiendo del número de genes disponibles para cada patosistema

(Kosman & Leonard 2005). No deben utilizarse líneas del hospedante que posean combinaciones de genes ya que la respuesta de resistencia - susceptibilidad sería una consecuencia lógica de la acción de la respuesta de genes individuales y dicha información resulta redundante (Crisci Lopez & Armengol 1983).

El fenotipo de virulencia también se los emplea para establecer nomenclaturas que permiten describir de forma sencilla el patrón de virulencia – avirulencia de cada aislamiento. Una de ellas es la nomenclatura propuesta por Long y Kolmer (1989) para roya de la hoja del trigo (*Puccinia triticina* Erikss.). En función del número de genes de resistencia disponibles, se construyen sets de cuatro genes. La respuesta del aislamiento sobre cada set se clasifica mediante una letra consonante a partir de la B hasta la T. Cada letra se corresponde con un patrón de avirulencia – virulencia sobre los cuatro genes (Tabla. 3). De esta manera la nomenclatura queda determinada por un código de letras consonantes, donde el número de letras estará determinado por el número de sets de genes utilizado.

**Tabla 3.** Código de letras para cada uno de los patrones posibles de avirulencia–virulencia sobre un set de cuatro genes imaginarios del hospedante.

Letra consonante	Tipos de reacción producidos sobre el set de 4 genes <sup>a</sup>			
	1	2	3	4
B	L	L	L	L
C	L	L	L	H
D	L	L	H	L
F	L	L	H	H
G	L	H	L	L
H	L	H	L	H
J	L	H	H	L
K	L	H	H	H
L	H	L	L	L
M	H	L	L	H
N	H	L	H	L
P	H	L	H	H
Q	H	H	L	L
R	H	H	L	H
S	H	H	H	L
T	H	H	H	H

<sup>a</sup> L y H hacen referencia a los tipos de reacción resistente y susceptible, respectivamente.

Otro tipo de carácter empleado es el de tipo molecular o genético, donde los aislamientos son evaluados mediante marcadores moleculares. Al principio se utilizaron polimorfismos amplificados aleatorios (RAPD, “Random Amplified Polymorphic DNA”) para el estudio de variabilidad genética en poblaciones de roya estriada del trigo, *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* (Chen y col. 1993) y roya de la hoja del trigo, *P. triticina* (Kolmer y col. 1995). Luego comenzaron a utilizarse los marcadores denominados polimorfismos del largo del fragmento amplificado (AFLP, “Amplified Fragment Length Polymorphism”) en especies como roya del tallo en avena, *Puccinia*

*graminis* f. sp. *avenae* (Haque y col. 2008) y en *P. triticina* (Kolmer 2001). Estos tipos de marcadores son dominantes, es decir para un locus tendremos ausencia o presencia de banda y permiten evaluar múltiples loci para cada aislamiento en una sola corrida electroforética. Cada locus representa un carácter genético en donde la presencia de banda se indica como 1 y la ausencia como 0 (Kosman & Leonard 2005). En general se ha observado que los marcadores del tipo AFLP resultan ser más polimórficos y reproducibles que los RAPDs logrando distinguir aislamientos con igual fenotipo de virulencia (Kolmer 2001). El número de loci utilizados en el estudio de poblaciones patógenas es variable desde 15 a 107 loci polimórficos con RAPDs (Chen y col. 1993; Kolmer y col. 1995) y entre 164 a 563 loci polimórficos con AFLPs (Haque y col. 2008; Kolmer 2001). Sin embargo, no existe un criterio acerca de cuál es el número mínimo de loci polimórficos a evaluar. En el caso de conocerse la secuencia del patógeno se han desarrollado marcadores del tipo microsatélites (SSR, Simple sequence repeats), principalmente para las especies de *P. triticina* y *P. striiformis*, que permiten profundizar el conocimiento acerca de la estructura poblacional, inferir el tipo predominante de reproducción y la existencia de mutaciones como mecanismo generador de variabilidad genética (Cheng & Chen 2014; Ordoñez & Kolmer 2009).

Dentro de los distintos tipos de coeficientes utilizados para establecer el grado de semejanza entre aislamientos podemos mencionar: los llamados de similitud donde la mayoría varían entre 0 y 1, siendo el 1 el mayor grado de semejanza. Los coeficientes de disimilitud o distancia establecen una medida de distancia que mide el grado de semejanza entre dos OTU, la mayoría varían entre 0 y 1, pero en este caso el valor 1, indica que dos OTU son completamente distintos. Como ejemplos de coeficientes de similitud podemos mencionar el coeficiente de Jaccard y el Simple Matching; como coeficiente de disimilitud, la distancia Euclidiana (Tabla 4). Estos coeficientes han sido ampliamente utilizados en los estudios de poblaciones patógenas, sin embargo en ninguno de los trabajos que los incluyen se menciona algún criterio para la elección de uno en particular; al parecer su uso estaría determinado por los programas informáticos disponibles o porque han sido utilizados en publicaciones previas relativas al tema (Kosman & Leonard 2005).

**Tabla 4.** Coeficientes de similitud y disimilitud.

Coeficiente	Símbolo	Formula
Coeficiente de Jaccard	J	$J(x1, x2) = a/(a + b + c)$
Coeficiente Simple Matching	SM	$SM(x1, x2) = a + d/(a + b + c + d)$
Distancia Euclidiana	EU	$EU(x1, x2) = \sqrt{\sum_k^m (Xk1 - Xk2)^2}$

Considerando caracteres binarios.  $x1$ ,  $x2$  refiere al par de OTU a comparar.  $a$ = número de caracteres presentes en ambos OTU,  $b$ = número de caracteres presente en  $x1$  ausente en  $x2$ ,  $c$ = número de caracteres ausentes en  $x1$  y presente en  $x2$ ,  $d$  =número de caracteres ausentes en ambos OTU. Para el caso de la distancia Euclideana  $Xk1$  y  $Xk2$  hacen referencia al valor del  $kth$  carácter para los individuos  $x1$  y  $x2$ , respectivamente.  $m$  es el número total de caracteres empleados.

Los análisis de agrupamientos comprenden técnicas que siguiendo reglas más o menos arbitrarias forman grupos de OTU que se asocian por su grado de semejanza. La técnica de agrupamiento más utilizada en este tipo de trabajos, es la media aritmética no ponderada (UPGMA, “Unweighted Pair Group Method with Arithmetic Mean”), la cual es del tipo “grupo par” en el cual solamente puede ser admitida un OTU o un grupo de OTU por nivel. Se trata de una técnica aglomerativa y en donde el valor de similitud del OTU a incorporarse y del grupo es igual a una similitud promedio resultante de los valores de similitud entre el candidato y cada uno de los integrantes del grupo o núcleo (Crisci & Lopez Armengol 1983). La robustez de los agrupamientos observados en el dendrograma puede evaluarse mediante un test estadístico denominado bootstrap. Esta metodología fue propuesta por Efron (1979) e introducida en el análisis de dendrogramas por Felsenstein (1985), la misma consiste en remuestrear de forma aleatoria los caracteres para generar múltiples matrices básicas de datos, que sean de igual tamaño a la original pero donde algunos caracteres son eliminados y otros son duplicados. A partir de cada matriz obtenida se construye un dendrograma, luego se calculan el porcentaje de veces que ocurren cada uno de los grupos en los distintos dendrogramas. Si estos ocurren más del 95% de las veces se consideran estadísticamente significativos, siendo válido ese agrupamiento.

A partir de la matriz con los valores de semejanza entre aislamientos, pueden realizarse otros análisis como el análisis de coordenadas principales (PcoA, “Principal Coordinates Analysis”) y el análisis molecular de la varianza (AMOVA, “Analysis of Molecular Variance”). El PcoA trata de una técnica donde las relaciones entre OTU están reflejadas en la posición en que se disponen en el espacio, donde cuanto más cerca se encuentran dos OTU, están más estrechamente relacionados. La posición de los OTU en el espacio está determinada por las coordenadas principales, donde cada uno de ellas contiene parte de la variabilidad total de los caracteres. La primera coordenada es la que mayor variabilidad contiene. De la variabilidad restante, la segunda coordenada incluye más información y así sucesivamente con cada coordenada. Las coordenadas no están correlacionados entre sí y deben interpretarse de manera independiente (Crisci & Lopez



Armengol 1983). Como ventaja frente a los métodos de construcción de dendrogramas mediante análisis de agrupamiento (UPGMA o Neighbour Joining), se trata de un método que no asume una estructura jerárquica, la cual puede ser cierta en niveles taxonómicos altos pero no en el nivel de poblaciones. Además, la representación de los OTU en el espacio resulta más sencilla de interpretar en comparación a árboles con muchos OTU; sin embargo, este método no ofrece un análisis estadísticos de los grupos observados como ocurre con los dendrogramas (Peakall & Smouse 2006, 2012).

El análisis de AMOVA es un procedimiento estadístico que permite la partición jerárquica de la variación genética o fenotípica entre y dentro de las poblaciones o grupos y consiguiente cálculo de los coeficientes de endogamia o estadísticos  $F$  y sus análogos. Un coeficiente de endogamia, mide la reducción de la heterocigosis esperada por apareamiento al azar en cualquier nivel de una jerarquía poblacional (organismos individuales, subpoblaciones, población total) en relación a otro nivel más inclusivo de la misma. Dentro de los coeficientes de endogamia podemos mencionar el  $F_{ST}$  que mide el efecto de la subdivisión poblacional como la reducción de la heterocigosis de una subpoblación en relación a la población total (Hamilton 2009; Wright 1951). Para el caso de datos de tipo binario se han diseñado coeficientes como el  $\Phi_{PT}$  ( $\Phi_{PT}$ ) que resulta análogo al  $F_{ST}$ , (Peakall & Smouse 2006, 2012). En el caso de las royas estos coeficientes no son empleados para medir la reducción de la heterocigosis esperada por apareamiento al azar, ya que muchas poblaciones de royas suelen reproducirse principalmente de forma asexual. Sin embargo, como estos índices  $F_{ST}$  o  $\Phi_{PT}$  se pueden calcular a partir de la partición jerárquica de la varianza es que son utilizados para medir el grado de diferenciación en el nivel genético o fenotípico entre grupos o poblaciones de aislamientos (Cheng & Chen 2014; Mantovani y col. 2010; Ordoñez & Kolmer 2009). El estadístico  $F_{ST}$  y su análogo  $\Phi_{PT}$  varían entre 0 y 1, siendo 1 el máximo grado de diferenciación entre dos poblaciones. El AMOVA propone como hipótesis nula la falta de diferenciación entre subpoblaciones o grupos, es decir  $F_{ST}=0$  o  $\Phi_{PT}=0$  y como hipótesis alternativa la existencia de diferenciación, es decir  $F_{ST}>0$  o  $\Phi_{PT}>0$ . Bajo la hipótesis nula, las subpoblaciones pueden ser consideradas como una única población y que las diferencias observadas entre ellas se deben al muestreo al azar. La prueba de significación consiste en evaluar si nuestro valor de diferenciación puede ser obtenido por azar, para ello se permutan los individuos de forma aleatoria entre las poblaciones o grupos a comparar y se calcula un valor de diferenciación ( $F_{ST}$  o  $\Phi_{PT}$ ). Repitiendo este procedimiento varias veces (ej. 1000 veces), se obtiene la distribución nula que nos permite calcular la probabilidad de obtener un valor igual o mayor por azar. Si el  $P < 0.05$  se considera significativo y se rechaza la hipótesis nula.

Estudios realizados en las poblaciones de roya de la hoja del trigo en América del Norte, roya estriada del trigo en Estados Unidos y roya del tallo de la avena en Australia, mediante el empleo de marcadores moleculares y un set de líneas del hospedante portadoras de genes individuales de resistencia; se demostró la existencia de distintas poblaciones de aislamientos que difieren no solo en el nivel molecular sino también en el nivel de fenotipos de virulencia. Estas evidencias indicaron que las poblaciones se habrían originado a partir de distintas introducciones de razas del patógeno provenientes

de distintas regiones (Cheng & Chen 2014;Haque y col. 2008;Ordoñez & Kolmer 2009).

No existen reportes acerca de estudios de estructura poblacional para *P. sorghi*. El estudio de la misma permitiría identificar si la población presente en la Argentina, se encuentra estructurada en grupos con diferencias en los niveles fenotípico y molecular.

### **Estudio de la resistencia durable a roya de la hoja del trigo**

Para el caso de maíz, hasta el momento no se ha identificado en el mundo una variedad con resistencia durable a roya común. Una posible explicación podría ser porque la roya común no es una enfermedad importante en el nivel mundial y en consecuencia son pocos los esfuerzos por caracterizar nuevas fuentes de resistencia o desarrollar cultivares con combinaciones de genes que confieran resistencia durable. Por otro lado, la roya de la hoja del trigo es una enfermedad importante en el nivel mundial, principalmente en América del Norte, Sudamérica, Europa del Este, China y Australia. Continuamente se identifican nuevos genes de resistencia y también variedades o genes que confieren resistencia durable a la enfermedad.

La roya común es causada por el hongo biótrofo *Puccinia triticina* Erikss. En Argentina puede causar pérdidas anuales de entre 5 al 10% dependiendo del estadio de desarrollo de la planta de trigo en el cual ocurre la infección (Kolmer 1996; Macagno y col. 1993; Rodríguez Amieva y col. 1961). Los primeros intentos por controlar esta enfermedad involucraron la identificación de genes de resistencia designados como *Lr*. Existen dos tipos de genes *Lr* en función del estadio foliar en el cual comienzan a expresar la resistencia. Los genes de plántula o resistencia en todos los estadios (ASR, all stage resistance) donde la resistencia comienza en la primera hoja y se mantiene durante todo el ciclo de vida de la planta. Los genes de resistencia en planta adulta (APR, adult plant resistance) donde la expresión de la resistencia puede comenzar en cualquier estadio posterior al de plántula, pero alcanzan su máxima expresión en la hoja bandera (estadio de planta adulta) (Samborski 1985). La mayoría de los genes *Lr* confieren resistencia raza-específica y en general expresan la respuesta hipersensible (McIntosh y col. 1995). Al igual que para el maíz, el control de la enfermedad también se realiza por medio de fungicidas, sin embargo esto implica un gasto adicional para el productor y un posible impacto ambiental.

En general las nuevas variedades comerciales muestran buenos niveles de resistencia al inicio de su comercialización, pero una vez que son utilizadas extensivamente en agricultura se tornan susceptibles como consecuencia de la aparición de nuevas razas del patógeno. En la Argentina se pueden mencionar como ejemplos a la variedades Klein Don Enrique (portadora del gen *Lr26*) y ProINTA Gaucho (portadora del gen *Lr19*), comercializadas a partir de los años 1998 y 2000, respectivamente. Al principio de su comercialización eran resistentes, pero pocos años después se tornaron susceptibles. Varios ejemplos similares en el nivel mundial son citados en la literatura (Kolmer 1996;McIntosh y col. 1995;Samborski 1985). Sin embargo, algunas variedades se mantuvieron resistentes luego de ser utilizadas extensivamente en agricultura por

varios años, a estas variedades se las definió como portadoras de resistencia durable (Johnson 1981). Uno de los casos más conocidos es el caso de gen *Lr34* de expresión en planta adulta que confiere resistencia no sólo a roya de la hoja sino también a roya estriada del trigo (*P. striiformis*) (Dyck 1987). Otra fuente de resistencia durable es la variedad Argentina Sinvalocho MA, la cual data de los años 40. Esta variedad ha sido utilizada como fuente de resistencia no solo en la Argentina sino también en Europa del Este (Francisco Sacco, *comunicación personal*). Estudios genéticos y moleculares indicaron que además de poseer el gen de plántula *Lr3a* (Suárez & Favret 1984) posee dos genes raza-específica de expresión en planta adulta, designados como *LrSV1* y *LrSV2*. Los genes de expresión en planta adulta serían los componentes principales de la resistencia durable (Favret y col. 1983; Ingala y col. 2012). Una característica común observada en la resistencia durable es la presencia de genes de expresión en planta adulta, pero cabe destacar que no todos los genes de este tipo confieren resistencia durable.

Otros ejemplos de resistencia durable en Argentina son las variedades comerciales en desuso como La Prevision 13, Pergamino Gaboto, El Gaucho y Buck Manantial (Favret y col. 1983). La variedad Buck Poncho es la más reciente identificada como portadora de resistencia durable. Comercializada a partir del año 1986, fue extensamente sembrada durante la década de los 90 alcanzando el 10 al 15% del área sembrada con trigo en la Argentina (Antonelli 2003). Si bien actualmente no es utilizada comercialmente, sigue siendo utilizada en los programas de mejoramiento en Argentina no solo por su tolerancia a roya de la hoja sino también por sus características agronómicas entre las que se destacan la calidad y rendimiento de grano. Poco se conoce acerca de las bases genéticas de resistencia durable en Buck Poncho. Antonelli (2003) sugirió una base genética compleja que involucraría la interacción de varios genes de expresión en plántula sin la presencia de genes de planta adulta. En función de la evaluación con distintos aislamientos sobre Buck Poncho y un set de líneas portadoras de distintos genes de resistencia, Antonelli propuso los genes de plántula *Lr3ka*, *Lr10* y *Lr16* como candidatos. Sin embargo el autor no realizó estudios genéticos y moleculares que pudieran confirmar la presencia de estos genes en Buck Poncho.

Como se mencionó previamente en maíz no existen variedades portadoras de resistencia durable a roya. El estudio acerca de las bases genéticas que controlan este tipo de resistencia en otros cereales, como es el caso de trigo, permitiría profundizar el conocimiento acerca de la resistencia durable para que puedan ser implementados en el desarrollo de híbridos comerciales de maíz.

## **HIPÓTESIS Y OBJETIVOS**

### **Hipótesis**

- (1) La evaluación de un set de líneas de maíz portadoras de genes de resistencia con aislamientos de *P. sorghi* y con infecciones naturales de la población patógena en condiciones de campo permite identificar aquellos genes que confieren resistencia a la enfermedad.
- (2) La evaluación de aislamientos de *P. sorghi* con un set de líneas diferenciales de maíz y con marcadores moleculares permite identificar grupos de aislamientos con diferencias fenotípicas y moleculares.
- (3) La variedad de trigo Buck Poncho, posee una combinación de genes tanto de expresión en plántula como de planta adulta que le confiere resistencia durable a roya de la hoja

### **Objetivos**

- (1) Identificar fuentes de resistencia a *P. sorghi* en un set de líneas maíz, tanto en el estadio de plántula como de planta adulta.
- (2) Estudiar la variabilidad patogénica y molecular, mediante la identificación de grupos de aislamientos con diferencias fenotípicas y moleculares. Examinar la relación entre grupos de aislamientos definidos por análisis molecular y fenotípico.
- (3) Identificar las bases genéticas de resistencia durable a roya de la hoja en la variedad de trigo Buck Poncho. Caracterizar los genes de resistencia detectados.

## MATERIALES Y MÉTODOS

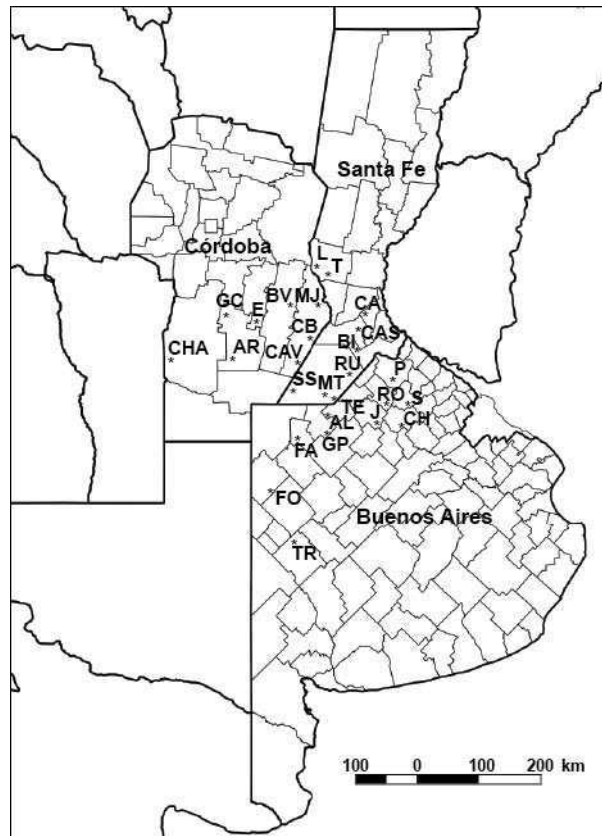
- **Maíz**

### **Material vegetal**

Se utilizó un set de 37 líneas de maíz que consistió en 16 líneas isogénicas (NILs, Near Isogenic Lines), portadoras de genes de resistencia *Rp* individuales, *Rp1-A*, *Rp1-B*, *Rp1-C*, *Rp1-D*, *Rp-G*, *Rp1-J*, *Rp1-K*, *Rp1-M* y *Rp3-A* y combinaciones de genes *Rp*, *Rp-5D*, *Rp-G5*, *Rp-GI*, *Rp-GDJ*, *Rp-G5JD*, *Rp1-JC* y *Rp1-FJ*. Estas líneas fueron desarrolladas por Hulbert y col. (2001) mediante retrocruzas utilizando la línea H95 como parental recurrente; Quince líneas endocriadas pertenecientes al germoplasma de la compañía Pioneer: PIO68752, PIO28427, PIO15600, PIO36420, PIO20046, PIO43601, PIO19802, PIO28760, PIO16310, PIO10189, PIO38360, PIO12345, PIO74876, PIO69383 y PIO17570; Seis híbridos comerciales: H11247C1, H43627C1, H14371C2, H80172C3, H37745C3 y H20684C4 completan el set. Los híbridos comerciales provienen de las cuatro compañías más importantes en la Argentina. El nombre de los híbridos fue codificado para mantener confidencial su nombre comercial y la compañía a la cual pertenecen. Sin embargo, luego del código numérico se agregó una C con un número para identificar a los híbridos que provienen de la misma compañía. El set de 37 líneas de maíz fue provisto por la compañía Pioneer Hi-Bred International, Inc. (Pioneer).

### **Obtención de los aislamientos de *P. sorghi***

El set descrito arriba fue sembrado en 27 localidades, donde la enfermedad es endémica, pertenecientes a las provincias de Buenos Aires, Santa Fe y Córdoba durante los años 2010 y 2012 (Fig. 4). Las muestras fueron colectadas sobre el set mencionado seleccionando siempre las hojas de aquellas líneas que poseían un alto porcentaje de pústulas (las infecciones en condiciones naturales siempre se observaron en el tercio próximo a la axila de la hoja). Las hojas con pústulas se cortaron en rectángulos de aproximadamente 3 cm x 6 cm, luego se plegaron sobre sí mismas de manera que la cara que contenía el mayor número de pústulas quedase hacia dentro. Las hojas plegadas fueron colocadas en sobres de papel madera. Los sobres fueron colocados en heladera a 8 °C, con la solapa del sobre abierta para permitir el secado de los trozos de hojas. Los sobres fueron rotulados con la línea de maíz y localidad de donde se extrajeron las muestras y el año de colecta.



**Fig. 4** Localidades donde los aislamientos de *P. sorghi* fueron colectados. AR: Alejandro Roca; AL: Alberdi; BV: Bell Ville; BI: Bigand; GC: General Cabrera; CHA: Chaján; CA: Carcarañá; CAS: Casilda; CAV: Cavanagh; CH: Chacabuco; CB: Corral de Bustos; T: El Trébol; E: Etruria; FO: Fortín Olavarría; FA: Florentín Ameghino; GP: General Pinto; J: Junín; MJ: Marcos Juárez; MT: María Teresa; L: Landeta; P: Pergamino; RO: Rojas; RU: Runciman; SS: Sancti Spiritu; S: Salto; TE: Teodelina; TR: Trongé. La imagen del mapa fue provista por el Departamento de Estimaciones Agrícolas de la Bolsa de Cereales de Buenos Aires, Argentina

De cada sobre se seleccionó un trozo de hoja y mediante la utilización de un hisopo húmedo se procedió a extraer uredosporas provenientes de una única pústula. Con el hisopo impregnado con esporos se “pintó” suavemente las hojas de plántulas de maíz correspondientes a la línea de la cual se obtuvo la muestra. Las plántulas se colocaron en un recipiente húmedo y se rociaron con una solución de 1,5 L de agua conteniendo 6 gotas de Tween20 (Sigma-Aldrich), de manera de humedecer la superficie foliar y favorecer la germinación de los esporos. El recipiente plástico se colocó en un cuarto con una temperatura promedio de 20 °C durante 16 h. Las plántulas inoculadas con cada aislamiento se transfirieron al invernáculo y se colocaron dentro de un compartimiento de vidrio que impide la contaminación con otros aislamientos. Alrededor de 12 a 14 días después de haber sido inoculadas se procedió a juntar los esporos. Para ello las plántulas se golpearon suavemente sobre papel manteca para que caigan los esporos. Luego los esporos se colocaron en un tubo de hemólisis de vidrio (Fig. 5). Cada aislamiento se identificó con las iniciales de la localidad donde fue colectado, el nombre del hospedante de cual se obtuvo la muestra y el año de colecta. Mediante este procedimiento se obtuvieron 66 aislamientos (Tabla A1). Posteriormente, cada

aislamiento fue multiplicado en 6 macetas de 0,5 L con 7 semillas cada una correspondiente a la línea de la cual se obtuvo el aislamiento, para su posterior almacenamiento en nitrógeno líquido y utilización en las pruebas posteriores.



**Fig. 5** Compartimientos de vidrio utilizados para la multiplicación de aislamientos. En la imagen puede observarse el papel manteca empleado para la recolección de esporos, la tablilla utilizada para golpear las plantas y tubo de hemólisis utilizado para el almacenamiento

### **Evaluaciones a campo**

El tipo de reacción de las líneas portadoras de genes *Rp* individuales, sus combinaciones y las líneas endocriadas pertenecientes a la compañía Pioneer fueron evaluadas en algunas de las localidades descritas arriba (Fig. 4) durante los años 2010 a 2012. Las localidades evaluadas cada año se determinaron en función del grado de infección. Se evaluaron 14, 10 y 9 localidades en los años 2010, 2011 y 2012, respectivamente (Tabla A2). En cada localidad 20 semillas de cada línea fueron sembradas en dos surcos de 6 m. Las líneas dentro del set fueron distribuidas de forma aleatoria para minimizar el efecto que las líneas vecinas puedan tener sobre la infección. Diez plantas de cada línea fueron evaluadas en el estadio reproductivo R1 (emergencia de estigmas en flores femeninas). La evaluación del tipo de reacción se realizó sobre las 5 hojas más superiores de cada planta. Para cada línea el tipo de reacción consistió en un valor promedio que surgió de los tipos de reacción observados en las 10 plantas.

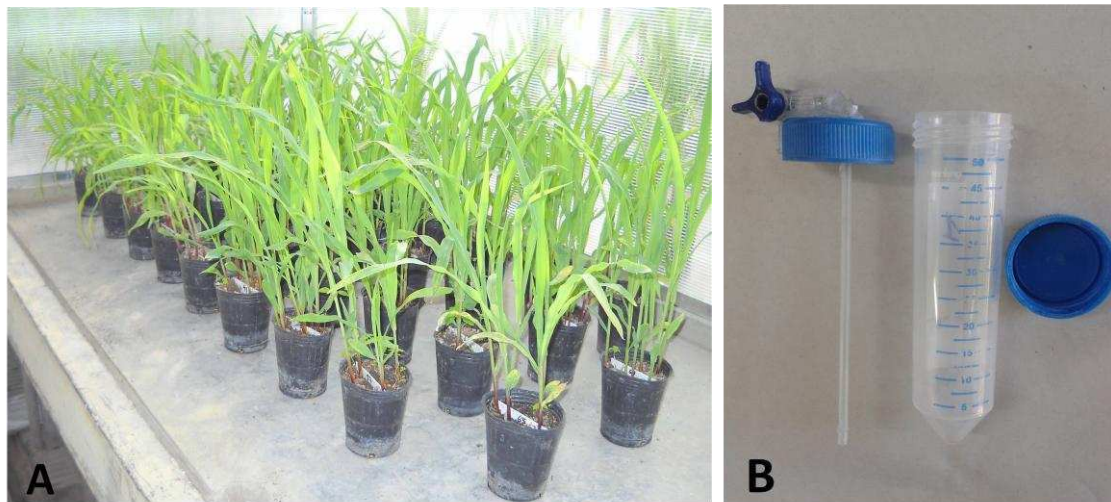
Las líneas siempre estuvieron expuestas a infecciones naturales de la población patógena. Las líneas PIO10189, PIO38360, PIO69383 and PIO43601 no fueron incluidas en el análisis por que mostraron bajos niveles de germinación. La coordinación de siembra en las distintas localidades y la selección de las localidades a visitar fueron llevadas a cabo por el Ing. Agr. PhD. Enrique Domingo Kreff, investigador científico de la compañía Pioneer.

## **Evaluación en condiciones de invernáculo**

Los 66 aislamientos se utilizaron para evaluar el tipo de reacción sobre el set de 27 líneas que consistió en las líneas portadoras de genes *Rp* y las líneas endocriadas pertenecientes a la compañía Pioneer, ya que del set original de 37 se descartaron las líneas PIO10189, PIO38360, PIO69383 y PIO43601 debido a la baja germinación o poca disponibilidad de semillas y los híbridos H43627C1, H14371C2, H80172C3, H37745C3 y H20684C4

Se sembraron 5 a 7 semillas de cada línea en una maceta plástica de 0,5 L (Fig. 6A). Las macetas se colocaron en condiciones de invernáculo a una temperatura promedio de 20 °C durante 14 a 15 días, en donde la mayoría de las líneas se encontraron en el estadio de plántula, (V2, hojas número 2 con collar foliar visible y hoja número 3 en expansión). El set se colocó en un recipiente metálico previamente humedecido con agua, luego se rociaron las plántulas con una solución de Tween20 (6 gotas de Tween20/1,5 L de agua). Aproximadamente 20 mg de esporos se colocaron en un tubo falcón de 50 ml que contiene una solución de 45 ml de agua y una gota de Tween20. Se agitó para homogenizar la suspensión y se dejó reposar por 1 a 2 min, luego por medio de un pulverizador, (Fig. 6B) y utilizando un compresor se procedió a esparcir el inóculo sobre el set. El recipiente se cubrió con una tapa metálica, para mantener las condiciones de humedad y oscuridad, y se mantuvo a una temperatura promedio de 20 °C durante 16 h. Luego se colocaron las plántulas en condiciones de invernáculo a 20 °C durante 12 a 13 días aproximadamente en donde se evaluó el tipo de reacción. Las 5 o 7 plantas de cada línea fueron evaluadas para el tipo de reacción en las tres primeras hojas. El tipo de reacción de cada línea fue un promedio de los tipos de reacción observados en las 5 o 7 plantas. Los aislamientos fueron evaluados en set independientes.





**Fig. 6 A)** Set de líneas de maíz inoculadas con algún aislamiento. **B)** pulverizador empleado para la inoculación. Consiste en un tubo falcón de 50 ml, en donde se emplea una llave de tres vías, adherida a la tapa del tubo, con el objetivo de concentrar el aire de alta presión, sobre la punta del tubo plástico (cartucho de bolígrafo BIC® opaco) y generar el ascenso de la solución que contiene los esporos (principio de Venturi). Pulverizador diseñado por el autor de esta tesis

### **Escala utilizada para la evaluación del tipo de reacción**

La evaluación del tipo de reacción se realizó mediante la escala de Stakman y col. (1962) adaptada para roya común. Se establecieron cuatro categorías: resistentes a los tipos de reacción comprendidos entre 0; y 11+, moderadamente resistente 11+2<sup>-</sup> a 1+2, moderadamente susceptible 22+ a 2++3 y susceptible 2++34 a 4. La reacción X se caracterizó por una mezcla de tipos de reacción con flecks necrótico y pústulas bien desarrolladas y no fue incluido en ninguna de las cuatro categorías. Tanto en la evaluaciones a campo como en condiciones de invernáculo con los distintos aislamientos las líneas fueron clasificadas de acuerdo a estas cuatro categorías. Para cada línea el número de aislamientos o localidades en cada categoría se expresó mediante frecuencias porcentuales. Para ello el número de aislamientos o localidades en cada categoría se dividió por el número total de aislamientos o localidades evaluadas en la línea. Al valor obtenido se lo multiplicó por cien.

### **Detección de resistencia en estadios superiores de desarrollo foliar**

Dos experimentos fueron realizados. Para determinar en qué estadio la resistencia comienza a expresarse se seleccionaron tres estadios foliares, V2, V4 y V6 los cuales fueron inoculados por separado. Los estadios se definieron en función del método del collar foliar, donde cada estadio está determinado por el número de hojas con collar foliar visible (banda blanca decolorada entre la lámina foliar y la vaina foliar) (Abendroth y col. 2011). Para descartar la posibilidad de que las diferencias en el tipo de reacción entre estadios se debieran a efectos ambientales durante la inoculación, los estadios V2 y V6 fueron inoculados simultáneamente. Para ambos experimentos dos

aislamientos fueron utilizados los cuales se inocularon en set independientes. Ocho plantas de cada línea (4 plantas en una maceta de 1 L) fueron evaluadas en los estadios V2, V4 y V6. En cada estadio las inoculaciones fueron realizadas en la hoja más alta con collar foliar visible y completamente expandida, y en la siguiente hoja en expansión sin collar foliar visible. La inoculación fue similar a la descrita previamente pero en este caso se utilizaron 40 mg de uredosporas frescas (no más de 15 días de haber sido colectadas). El tipo de reacción se evaluó a los 15 días después de la inoculación utilizando la escala de Stakman y col. (1962) sobre las 8 plantas de cada línea en las 2 hojas inoculadas. Para cada estadio, el tipo de reacción de cada línea fue un promedio de los tipos de reacción observados en las 8 plantas. Cada experimento se repitió dos veces.

Las líneas a evaluar exhibieron diferencias en la capacidad germinativa como así también en la tasa de crecimiento debido a la diversidad del germoplasma. Para que todas las líneas, PIO68752, PIO28427, PIO36420, PIO20046, PIO16310 y *Rp-D5* se encontrasen en el mismo estadio al momento de inocular se realizó un ensayo en donde se midió el tiempo que tarda cada línea en alcanzar los estadios V2, V4 y V6. Se utilizaron macetas plásticas de 1 L con 4 plantas por maceta, dos réplicas por línea y se contabilizó el número de días que cada línea tardó en alcanzar cada estadio (Tabla. 5).

**Tabla. 5** Tiempo en días requeridos por cada línea para alcanzar los distintos estadios.

Línea	Estadio vegetativo		
	V2	V4	V6
PIO68752	20	30	60
PIO28427	22	32	76
PIO36420	20	31	70
PIO20046	20	30	62
PIO16310	20	38	57
<i>Rp-D5</i>	20	30	60

Temperatura promedio durante el ensayo: 20 °C. Es importante destacar que los valores pueden modificarse en función de la temperatura, cantidad de luz y poder germinativo.

### **Detección de resistencia parcial o general**

#### A- Modelos utilizados para el cálculo del período de latencia

La detección de la resistencia parcial se realizó mediante la medición del período de latencia utilizando dos métodos. Uno de ellos fue el método de regresión lineal basado en la transformación probit propuesto por Shaner (1980). Como se mencionó en la introducción la proporción de pústulas esporulantes en función de los días luego de la inoculación, describen una curva sigmoidea. Esta metodología transforma, mediante probit, los valores de proporción de pústulas esporulantes, de manera de obtener una relación lineal. A partir de la ecuación de la recta y mediante extrapolación se obtiene el día al cual el 50 % de las pústulas esporulantes emergieron o sea el período de latencia ( $T_{50}$ ). Esta metodología permite calcular  $T_{50}$  mediante días alternados de conteo. El otro

método utilizado consistió en un modelo regresión no lineal basado en una curva de dosis – respuesta que se ajustó a la curva sigmoidea. Utilizando el programa GraphPad Prim v5 se seleccionó una fórmula de dosis – respuesta:

$$Y = \frac{100}{(1 + 10^{((\text{LogEC50}-X) \times \text{Pendiente}))}}$$

EC50 es la concentración de la dosis (estimulo) que genera una respuesta del 50%. Los valores de X se representan como el logaritmo en base diez de la concentración química de la dosis. Los valores de respuesta (frente al estímulo) se representan en la coordenada Y mediante porcentajes que van de 0 a 100%. A medida que aumenta la concentración del componente estimulante aumenta la respuesta.

Esta fórmula se adaptó de la siguiente forma: a partir de los valores de proporción de pústulas se calcularon los porcentajes de pústulas para cada día de evaluación, estos valores se representaron en la coordenada Y. Por otra parte los días de evaluación se transformaron al logaritmo en base 10 y representaron los valores de la coordenada X. EC50 va a hacer referencia al tiempo al cual hayan emergido el 50 % de las pústulas, de manera que nos permite calcular el T<sub>50</sub>. El programa calcula la mejor curva que se ajusta a los datos y entrega los valores de pendiente y EC50 (T<sub>50</sub>).

#### B- Calculo del período de latencia en el estadio foliar V2

El período de latencia se evaluó en plántula en el estadio V2. Para cada línea se utilizaron 5 macetas de 1 L con dos plántulas por maceta. A los 4 días después de haber sido inoculadas se seleccionaron en función de la densidad de círculos verdes claros (sitio con infección) un área de 2 cm<sup>2</sup> sobre las caras superiores de la segunda y tercera hoja de cada plántula. Cada área analizada se consideró una réplica independiente de manera que por línea se analizaron 20 réplicas (tanto para la segunda hoja como para la tercera hoja el tipo de reacción y severidad fue similar). El área demarcada se encontró entre 2 o 3 cm de la base de cada hoja. El conteo de pústulas se realizó sobre dicha áreas día por medio hasta que no sugieran más pústulas o que las hojas comenzaran a senescer. Para determinar el día en que ya no surgen más pústulas esporulantes, el máximo número de pústulas contadas debía ser similar con el del siguiente día de conteo. Para cada réplica se calculó la proporción de pústulas que emergieron en los días posteriores a la inoculación (Tabla A3). El cuarto día se consideró con una proporción igual a cero ya que no hubo emergencia de pústulas. Los conteos en general comenzaron el día 6 y se extendieron hasta el día 14. Para lograr una inoculación uniforme sobre cada hoja, las semillas en cada maceta se sembraron en extremos opuestos de manera que las hojas de las plántulas no se superpongan. Por otra parte al momento de la inoculación el set de macetas de cada línea se inoculó en recipientes independientes, para que las macetas puedan ser colocadas de forma equidistante evitando que las hojas de plantas vecinas se superpongan. Cada línea se inoculó con una mezcla de 40 mg de las razas P10PIO16310 y CA11PIO43601 (20 mg de cada raza), en

un volumen de 100 ml de agua y 2 gotas de Tween20. En este caso primero se inocularon las plantas y luego se rociaron con una solución de Tween20 (5 gotas de Tween20 – 1 L de agua) con el objetivo de incrementar el tamaño de las gotas con inóculo depositadas sobre las hojas e impedir que se sequen durante la germinación, ya que si se rociaban primero y luego inoculan, podían ocurrir goteos durante la inoculación que arrastren el inóculo alterando la distribución uniforme del mismo.

Utilizando ambos modelos de regresión se calculó el período de latencia para cada replica. Replicas con solo dos datos de conteo no se consideraron en el análisis de manera que para las líneas PIO16310, PIO12345 y PIO74876 se analizaron 15, 19 y 19 réplicas, respectivamente. Luego se calculó el período de latencia promedio ( $T_{50}$  promedio) para cada línea. Mediante ANOVA y posterior test de Tukey se compararon los períodos de latencia entre líneas para cada modelo. Los  $T_{50}$  promedios calculados por ambos modelos para cada línea se compararon mediante ANOVA y posterior test de Bonferroni. Antes de realizar el test de ANOVA se evaluó si cada set de datos cumplía con los supuestos del test. La prueba de normalidad se realizó mediante el test de D'Agostino & Pearson omnibus normality y la prueba de homogeneidad de varianza se realizó mediante el test de Bartlett. Todos los cálculos fueron realizados con el programa GraphPad Prism.

### **Fenotipos de virulencia**

Se seleccionaron 9 líneas NILs (*Rp1-A*, *Rp1-B*, *Rp1-C*, *Rp1-D*, *Rp-G*, *Rp1-J*, *Rp1-K*, *Rp1-M* y *Rp3-A*) y 5 líneas endocriadas (PIO68752, PIO19802, PIO28760, PIO12345 y PIO17570) para ser utilizadas como un set de líneas diferenciales del hospedante. Los tipos de reacción comprendidos entre 0; a 1+2 fueron clasificados como avirulentos y los tipos de reacción entre 22+ a 4 fueron clasificados como virulentos. Los fenotipos de virulencia obtenidos para cada aislamiento fueron descritos basándose en la nomenclatura propuesta por Long y Kolmer (1989) para *P. triticina* pero adaptado para *P. sorghi*. La primera letra describió los tipos de reacción sobre los genes *Rp1-A*, *Rp1-B*, *Rp1-C* y *Rp1-D*. La segunda letra describió los tipos de reacción sobre los genes *Rp-G*, *Rp1-J*, *Rp1-K* y *Rp1-M*. La tercera letra describió los tipos de reacción del gen *Rp3-A* y de las líneas endocriadas PIO19802, PIO28760 y PIO12345. La cuarta letra describió los tipos de reacción de las líneas endocriadas PIO17570 y PIO68752 y dos genes imaginarios que siempre resultaron avirulentos a todos los aislamientos.

### **Extracción de ADN de *P. sorghi***

El protocolo de extracción de ADN utilizado fue una adaptación del protocolo de extracción de ADN a partir de micelio de *P. triticina* (Kolmer y col. 1995).

Veinte a treinta miligramos de uredosporas fueron mezcladas con arena estéril y molidas suavemente en un mortero. El material molido se colocó en un tubo plástico Eppendorf de 2 ml con 800  $\mu$ l de buffer de extracción (125 mM Tris-HCL pH 7.5, 875 mM NaCl, 62,5 mM EDTA pH 8). El tubo se agitó algunos minutos y se incubó a 65 °C

por 5 min. Luego se le agregaron 100  $\mu$ l de 10 % Cetyltrimethyl ammonium bromide (CTAB) y 100  $\mu$ l de 20 % sodium dodecyl sulfate (SDS), y se incubó con agitación suave a 65 °C durante 60 min. Se enfrió la solución a 25 °C y se le agregó un volumen igual de 24:1 cloroformo/alcohol isoamilico. Se mezcló la emulsión durante 5 min y se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. Se removió la fase acuosa y se la colocó en un tubo plástico limpio de 1,5 ml con 10  $\mu$ l de 10 % ARNase. La mezcla se incubó a 37 °C durante 60 min. Luego se realizó una segunda extracción con cloroformo/alcohol isoamilico. La fase acuosa se transfirió a un tubo plástico de 1 ml y se le agregó 60 % del volumen obtenido de isopropanol absoluto frío. Se mezcló la solución ADN – isopropanol y se la centrifugó a 14.000 rpm por 10 min. El isopropanol se removió y se lavó el pellet conteniendo el ADN con 1 ml de 70 % de alcohol etanol. Nuevamente se centrifugó a 14.000 rpm por 10 min y se descartó el sobrenadante. El pellet se secó y resuspendió en 20  $\mu$ l de agua estéril.

### **Purificación de ADN**

El ADN genómico en un volumen de 20  $\mu$ l, se sembró en un gel 1 % de agarosa de bajo punto de fusión y se realizó la electroforesis durante 40 min a 80 V constante. Luego mediante un bisturí se procedió a cortar la porción de gel (200 mg de agarosa) que contenían el ADN genómico y se lo colocó en un tubo plástico de 2 ml en estufa a 65 °C durante 15 min, para derretir la agarosa. Se incubó con 1 U de agarACE<sup>TM</sup> (Promega) durante 40 min a 45 °C en estufa con el objetivo de digerir la agarosa. Se agregaron 60  $\mu$ l de NaAc 3 M pH 9.32 y 600  $\mu$ l de etanol absoluto frío, se agitó brevemente y se colocó en heladera a -70 °C durante 90 min para lograr que el ADN precipite. Se centrifugó a 14.000 rpm, durante 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y el pellet resultante se lavó con 1 ml de etanol 70 % durante 5 min. Nuevamente se centrifugó a 14.000 rpm, durante 20 min a 4 °C. Se descartó el sobrenadante y al pellet resultante se le agregó 20  $\mu$ l de HPLC y se almacenó a -70 °C.

### **Protocolo de AFLP**

Cien nanogramos de ADN genómico fueron simultáneamente digeridos y ligados a los adaptadores en un volumen total de 20  $\mu$ l con 3 U de *Pst*I (Thermo Scientific, Fermentas), 1,5 U de *Mse*I (New England, BioLabs), 0,4 U de T4 DNA ligasa (Thermo Scientific, Fermentas), 0,2 mM ATP, 75 nM de adaptador *Pst*I y 750  $\mu$ M de adaptador *Mse*I, 10 mM Tris-HAc pH 7.5, 10 mM MgAc, 50 mM KAc, 5 mM DTT y 50 ng/ $\mu$ l BSA. La mezcla se incubó a 37 °C durante toda la noche. La preamplificación se realizó en un volumen final de 25  $\mu$ l con 40 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM de cada dNTPs, 75 ng de cada uno de los cebadores P01, M01 y 1U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen) utilizando 4  $\mu$ l de la mezcla de digestión-ligación como templado. El ciclado térmico consistió en 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C.

El producto de preamplificación fue diluido 1:20 con agua HPLC y 4 µl fueron utilizados como templado para la amplificación específica en un volumen total de 20 µl con 22 mM Tris-HCl pH 8, 55 mM KCl, 1,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM de cada dNTPs, 100 ng de cada primer y 1 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen). El ciclado térmico consistió en 3 min a 94 °C; 33 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min con temperatura de apareamiento de cebadores (ver adelante) y 1,30 min a 72 °C. La temperatura de apareamiento fue 65 °C en el primer ciclo y se redujo 1 °C en cada ciclo durante nueve ciclos y se mantuvo a 56 °C durante 23 ciclos más, donde las condiciones de ciclado fueron 30 s a 94 °C, 30 s a 56 °C y 1 min a 72 °C. La extensión final fue 10 min a 72 °C. Las secuencias de los adaptadores, cebadores utilizados en la preamplificación y amplificación selectiva fueron los descritos por Vos y col. (1995).

Para la amplificación selectiva se evaluaron 26 combinaciones de cebadores, donde el cebador para la secuencia de *PstI* poseía dos bases adicionales selectivas mientras que el cebador para la secuencia de *MseI* poseía 3 bases adicionales selectivas. Solo las bandas de AFLP polimórficas, altamente reproducibles y fáciles de evaluar fueron seleccionadas para los análisis (Tabla 6).

**Tabla 6** Combinación de cebadores, número de bandas polimórficas y tamaño de bandas seleccionadas para cada combinación.

Combinación de cebadores <sup>a</sup>	Bandas polimórficas	Tamaño de banda (pb)	Combinación de cebadores <sup>a</sup>	Bandas polimórficas	Tamaño de banda (pb)
P-AA/M-AAA	2	145,190	P-AC/M-ATG	3	240, 250, 260
P-AA/M-AAG	4	160, 180, 190, 199	P-AC/M-ATT	3	135, 180, 225
P-AA/M-ACA	3	135, 140, 145	P-AG/M-AAA	4	135, 137, 150, 198
P-AA/M-ACC	2	166, 215	P-AG/M-AAG	3	160, 212, 215
P-AA/M-ACT	2	128, 165	P-AG/M-ACC	1	245
P-AA/M-AGA	6	110, 120, 140, 170, 173, 199	P-AG/M-ACG	1	140
P-AA/M-AGG	2	190, 220	P-AG/M-AGA	1	195
P-AA/M-AGT	3	130, 140, 160	P-AG/M-AGC	2	165, 190
P-AA/M-ATC	2	220, 225	P-AG/M-AGG	5	185, 188, 190, 195, 210
P-AA/M-ATG	5	160, 178, 250, 270, 275	P-AG/M-AGT	1	170
P-AC/M-AAG	6	160, 170, 180, 190, 210, 220	P-AG/M-ATA	3	165, 178, 200
P-AC/M-ACA	4	175, 180, 210, 215	P-AG/M-ATG	3	175, 195, 197
P-AC/M-AGG	4	160, 170, 190, 210	P-AG/M-ATT	1	199

<sup>a</sup> P, *PstI* y M, *MseI*

### Visualización de los productos de PCR

A los 20 µl de producto de amplificación se le agregaron 15 µl de buffer de carga (10 mM NaOH, 0,05 % bromophenol blue, 0,05 % xylene cyanol y 95 % formamida deionizada) y luego de 5 min de incubación a 94 °C, 8 µl de la mezcla fueron sembrados en un gel desnaturante de poliacrilamida 6 % y se realizó la corrida electroforética con buffer TBE 0,5 X durante 120 min aproximadamente a 60 W

constante. Los fragmentos separados fueron teñidos utilizando una tinción a base de plata: 30 min de incubación con 10 % HAc, seguido de tres lavados con agua bidestilada durante 5 min cada uno, 30 min de incubación con una solución de 1 g/L AgNO<sub>3</sub> y 0,06 % de formaldehído, luego se realizó un lavado rápido de 15 s, con agua bidestilada y se agregó una solución de 30 g/L NaCO<sub>3</sub>, 0,06 % de formaldehído y 0,0002 % de tiosulfato de sodio (Bassam y col. 1991).

### **Análisis de los datos**

Las reacciones de avirulencia y virulencia obtenidas para cada aislamiento sobre las 14 diferenciales se convirtieron en un código binario. Las reacciones de avirulencia y virulencia fueron clasificadas como 0 y 1, respectivamente. Para el caso de AFLP, la presencia o ausencia de banda para cada *locus* evaluado también fue transformado en un código binario. La presencia fue considerada como 1 mientras que la ausencia fue considerada como 0. Se utilizó la distancia Euclidiana para calcular los valores de disimilitud (semejanza) entre pares aislamientos tanto para los fenotipos de virulencia como para los loci AFLP. A partir de las matrices de disimilitud y empleando el método de agrupamiento UPGMA se construyeron los dendrogramas para ambos tipos de caracteres. El cálculo de los valores de disimilitud y el análisis de agrupamiento fueron llevados a cabo con el programa Power Marker v3.25 (Liu & Muse 2005). Los dendrogramas fueron dibujados mediante el programa FigTree v1.4.2 (Rambaut 2009). La robustez de los dendrogramas fue evaluada mediante bootstrap, remuestreando la matriz de datos binarios 1001 veces mediante el programa Power Marker v3.25. Los valores de bootstrap fueron calculados mediante el programa CONSENSE del paquete de programas Phylip v3.69 (Felsenstein 1989). La matriz de disimilitud obtenida a partir de los fenotipos de virulencia fue graficada en dos dimensiones mediante PcoA con el programa GenAlex v6.501 (Peakall & Smouse 2006, 2012).

El grado de diferenciación en los niveles fenotípico y molecular, entre los grupos de virulencia fue evaluado estadísticamente mediante el cálculo de  $\Phi_{PT}$  ( $\Phi_{PT}$ ) vía AMOVA. Los cálculos de los valores de  $\Phi_{PT}$  para cada par de grupos comparado se realizaron utilizando la información de los fenotipos de virulencia y de los loci AFLP, respectivamente. Los grupos de aislamientos definidos por el análisis genético también fueron evaluados mediante AMOVA. Para los análisis se consideraron los grupos de virulencia o AFLPs con más de 8 aislamientos, ya que es un requerimiento por parte del sistema (Peakall & Smouse 2006, 2012) En el análisis de AMOVA, las matrices de distancia para los fenotipos de virulencia y loci AFLP se obtuvieron mediante la utilización de la distancia binaria haploide, que resulta ser una variante de la distancia Euclidiana. El nivel de significancia fue establecido mediante 999 permutaciones.

Para los 40 aislamientos analizados mediante loci AFLP se calculó la matriz de disimilitud para los fenotipos de virulencia utilizando la distancia Euclidiana del programa Power Marker v3.25. El test de Mantel fue utilizado para establecer la existencia de correlación entre las matrices de disimilitud para los fenotipos de virulencia y loci AFLP de los 40 aislamientos. El nivel de significancia de la correlación

fue evaluado mediante 999 permutaciones. El AMOVA y el test de Mantel fueron realizados con el programa GenAlex v6.501.

*Nota: para el caso del test de Mantel, las permutaciones se realizan sobre los elementos de una de las matrices, manteniendo los datos de la otra matriz sin cambio. Para cada permutación se calcula el valor del coeficiente de correlación (R). Si la probabilidad de obtener un valor mayor o igual al nuestro por azar es menor a 0,05, se rechaza la hipótesis nula (no existe relación entre los elementos de las matrices X y Y,  $R_{xy}=0$ )*

- **Trigo**

### **Material vegetal**

Una población F<sub>9</sub> de 196 líneas endocriadas recombinantes (RILs, recombinant inbred lines), derivada del cruzamiento entre Buck Poncho x Purple Straw por medio de la técnica de descendiente de semilla única (SSD, single seed descendant) fue utilizada para los análisis genéticos y moleculares. Purple Straw es a menudo utilizado como padre susceptible en los análisis genéticos ya que ha resultado susceptible a todas las razas de roya evaluadas en los últimos 50 años en la Argentina.

Un set de 27 líneas isogénicas (NIL, near isogenic lines) del cultivar de trigo Thatcher, portadoras cada una de una de los siguientes genes: *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3a*, *Lr3ka*, *Lr3Bg*, *Lr9*, *Lr10*, *Lr11*, *Lr14a*, *Lr14b*, *Lr15*, *Lr16*, *Lr17*, *Lr18*, *Lr19*, *Lr20*, *Lr21*, *Lr23*, *Lr24*, *Lr25*, *Lr26*, *Lr28*, *Lr29*, *Lr30*, *Lr32*, *LrB*.

Una colección de líneas nulli - tetrasómicas y ditelosómicas desarrolladas por Sears (1954);Sears & Sears (1978) a partir del cultivar de trigo Chinese Spring.

### **Material del patógeno**

Se utilizaron 8 razas de *P. triticina* obtenidas a partir de aislamientos de una única pústula provenientes de hojas de distintos cultivares de trigo (Tabla 7). Las razas fueron utilizadas para inocular a los padres del cruzamiento (Buck Poncho y Purple Straw) y 96 líneas RILs tanto en el estadio de plántula (primera y segunda hoja) como en el estadio de planta adulta (hoja bandera). Las razas fueron clasificadas en función de la nomenclatura propuesta por Long y Kolmer (1989) para *P. triticina*; para lo cual fueron inoculadas sobre el set de líneas isogénicas portadoras de genes individuales en el estadio de plántula. Luego, se construyeron 7 sets con 4 líneas cada uno: *Lr1*, *Lr2a*, *Lr2c*, *Lr3a*; *Lr9*, *Lr16*, *Lr24*, *Lr26*; *Lr3ka*, *Lr11*, *Lr17*, *Lr30*; *LrB*, *Lr10*, *Lr14a*, *Lr18*; *Lr3bg*, *Lr14b*, *Lr20*, *Lr28*; *Lr15*, *Lr23*, *Lr21*, *Lr32* y *Lr19*, *Lr25*, *Lr29* mas un gen de resistencia imaginario que siempre resultó avirulento a todas las razas. A la combinación de reacciones de avirulencia – virulencia de cada set se le asignó una letra consonante de la B a la T.



**Tabla 7.** Razas de *P. triticina* utilizadas para la detección de genes en la población producto del cruzamiento entre Buck Poncho x Purplestraw.

Razas <sup>a</sup>	Hospedante	Localidad <sup>c</sup>
Ma07BG	Buck Guapo	Maciel (SF)
66 <sup>b</sup>	Gamma6	-
Ba08A801	ACA 801	Balcarce (BA)
Ba08Bg18	Baguette 18	Balcarce (BA)
Ba08PIG	ProINTA Gaucho	Balcarce (BA)
Ca07DMC	Don Mario Cronox	Castelar (BA)
Ma07KE	Klein Escorpión	Maciel (SF)
77M <sup>b</sup>	Buck Manantial	-

<sup>a</sup> Las razas son designadas en función del año de colecta, la localidad y el hospedante donde fueron colectadas.

<sup>b</sup> Estas razas poseen una designación antigua utilizada en el Instituto, se desconoce el año de colecta como así también donde fueron colectadas.

<sup>c</sup> Localidades donde las razas fueron colectadas. BA: Buenos Aires, SF: Santa Fe.

### Inoculaciones artificiales con *P. triticina*

Las infecciones con las distintas razas se llevaron a cabo en invernáculo. Se sembraron entre 5 y 6 semillas de cada línea en una maceta plástica de 0,25 L para el caso de los análisis de plántula y en macetas de 1 L para las evaluaciones en planta adulta. Las macetas se colocaron en condiciones de invernáculo a una temperatura promedio de 20 °C durante 12 días para el caso de las evaluaciones en plántula y entre dos a dos meses y medio para las evaluaciones en planta adulta. Una vez que el set de líneas alcanzó el estadio deseado, se colocaron en un recipiente metálico previamente humedecido. Luego se rociaron las plantas con una solución de Tween20 (6 gotas de Tween20/1,5 L de agua). Aproximadamente entre 10 mg y 20 mg de esporos de cada raza fueron utilizados para las inoculaciones en plántula y planta adulta, respectivamente. Los esporos fueron colocados en un tubo falcon de 50 ml que contiene una solución de 45 ml de agua y una gota de Tween20. Mediante un pulverizador (Fig. 6B) y utilizando un compresor se procedió a esparcir el inóculo sobre el set de plantas. El recipiente se cubrió con una tapa metálica y se mantuvo a 20 °C durante 16 hs. Luego las plantas se colocaron en invernáculo a 20 °C. Después de 12 a 15 días de haber sido inoculadas se realizó la evaluación del tipo de reacción. Las razas siempre fueron evaluadas en set independientes. Las líneas fueron clasificadas en resistentes o susceptibles en función de la escala propuesta para *P. triticina* por Mains & Jackson (1926). Esta escala resulta similar a la propuesta por Stakman y col. (1962) para roya del tallo en trigo. Los tipos de reacción comprendidos entre 0; a 11+ fueron considerados como resistentes, 11+2<sup>-</sup> a 1+2 como moderadamente resistentes, 22+ a 2++3 como moderadamente susceptibles y 2++34 a 4 como susceptibles.

## Análisis de segregación

Una vez clasificadas las líneas RILs, en susceptible o resistentes, se realizó un análisis de segregación para determinar cuántos genes de resistencia fueron detectados por cada raza. Para dicho análisis se utilizó la prueba de bondad de ajuste de Chi-cuadrado. La hipótesis nula indica a que segregación (nro. de genes detectados por cada raza) se ajustaron los valores observados de líneas RIL resistentes y susceptibles. Se rechazó la hipótesis nula con valores de  $P \leq 0,05$  (Tabla 8). Para determinar la asociación entre los genes detectados por razas distintas o por la misma raza, se utilizó el test exacto de Fisher. La hipótesis nula indica la independencia entre genes detectados por una misma raza o razas distintas y se rechaza con  $P \leq 0,05$ .

Genes detectados	Genotipo de las líneas RIL	Segregación esperada (Res – Sus)
1	AA, aa	1:1
2	AABB, AAbb, aaBB, aabb	3:1
3	AABBCC, AAbbCC, AABBcc, aaBBCC, AAbbcc, aaBBcc, aabbCC, aabbcc	7:1

A, B y C indican el alelo de resistencia, mientras que a, b y c indican el alelo de susceptibilidad.

## Pruebas de alelismo entre los genes *LrBP2* y *Lr11*

Dos líneas RILs portadoras solamente del gen de plántula *LrBP2* fueron cruzadas con la línea NIL portadora del gen *Lr11* (Thatcher\*6/El Gaucho). El Gaucho MA es una variedad Argentina donde se identificó la presencia del *Lr11* y se utilizó como portadora del gen para la construcción de la línea NIL en el cultivar Thatcher (Samborski & Dyck 1976). La población F<sub>2</sub> fue inoculada en el estadio de plántula con la raza 66, la cual resultó avirulenta sobre los genes *Lr11* y *LrBP2*.

## Extracción de ADN de trigo

La extracción es similar a la utilizada para los esporos de *P. sorghi*. Pero en este caso la extracción se realizó a partir de tejido fresco provenientes de primera y segunda hoja de plántulas de trigo. El tejido vegetal se colocó en tubos Eppendorf de 2 ml los cuales se depositaron en un desecador. A los tubos conteniendo el tejido seco se le colocaron dos bolitas de acero inoxidable y se procedió a su molienda mediante el Tissue Lyser II (Qiagen). Al tejido molido se le agregó 800 µl de buffer de extracción a 65 °C (100 mM Tris-HCL pH 7.5, 700 mM NaCl, 50 mM EDTA pH 8). Las muestras se agitaron algunos minutos y se incubaron a 65 °C por 5 min. Luego se le agregaron 100 µl de CTAB 10 % con agitación y 100 µl de SDS 20 % con inversión. Las muestras se incubaron por 60 min a 65 °C en horno con agitación suave y luego se llevaron a temperatura ambiente. Se les agregó un volumen de 900 µl de cloroformo – isoamilico

(24:1), se agitaron por inversión durante 5 min y se centrifugaron a 14.000 rpm. Los sobrenadantes (fase acuosa) se trasvasaron a tubos plásticos de 1,5 ml y se incubaron con 5 µl de 10 % ARNase durante 60 min a 37 °C. Nuevamente se les agregó un volumen de 900 µl de cloroformo – isoamilico (24:1), se agitaron por inversión durante 5 min y se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min. Los sobrenadantes se trasvasaron a tubos plásticos de 1 ml y se le agregaron 60 % del volumen obtenido de isopropanol absoluto frío. Se invirtieron algunos segundos y se centrifugaron a 14.000 rpm por 10 min. Se descartó el isopropanol y a los pellets resultantes, se le agregó 1 ml de alcohol etanol al 70 % y se dejaron reposar algunos minutos. Se centrifugaron a 14.000 rpm durante 10 min, se retiró el alcohol y se dejaron secar. Los pellets se resuspendieron en 50 µl de agua grado HPLC. La cuantificación del ADN se realizó mediante espectrometría utilizando el NanoDrop (Thermo scientific).

### **Análisis mediante marcadores moleculares**

Con el objetivo de identificar marcadores moleculares ligados a los genes de resistencia se utilizó la metodología de análisis de bloque o grupos segregantes (BSA, Bulk Segregant Analysis) propuesta por Michelmore y col. (1991). Brevemente, el BSA consiste en comparar la segregación de marcadores que se genera a partir de individuos homocigotas para cada alternativa del carácter de interés (familias homocigotas resistentes y susceptibles para el gen identificado). Estos marcadores segregarán al azar cuando no estén asociados al gen de interés y comenzaran a heredarse con cierto grado de ligamiento cuando los marcadores se encuentren próximos al gen, el ligamiento será más intenso cuanto más próximo al gen se encuentren. Los marcadores fueron evaluados sobre los parentales (Buck Poncho y Purple Straw) y 2 grupos cada uno conformado por 6 líneas RILs homocigotas resistentes y susceptibles, respectivamente. Los marcadores que se encontraron asociados al gen de resistencia, fueron seleccionados para realizar la apertura que consistió en evaluar a los marcadores sobre 4 líneas RILs susceptibles y 4 líneas RILs resistentes (distintas de las usadas para armar los grupos). Los marcadores que se encontraron asociados al gen de resistencia fueron evaluados en toda la población de líneas RILs.

La localización cromosómica de los marcadores moleculares ligados a los genes de resistencia se determinó mediante la evaluación de los marcadores sobre un set de líneas nulli - tetrasómicas y ditelosómicas del cultivar Chinese Spring.

Marcadores Microsatélites: La reacción de PCR fue llevada a cabo en un volumen de 20 µl conteniendo 20 mM Tris-HCL pH 8,50, 50 mM KCL, 1,5 mM MgCL<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada cebador, 0,05 mM de cada dNTP, 1 U de Taq polymerase (Invitrogen) y 50 ng de ADN genómico. La amplificación de los fragmentos de ADN se realizó utilizando temperaturas de apareamiento comprendidas entre 50 y 65 °C o reduciendo un 1 °C por ciclo, dependiendo del marcador microsatélite. En general el ciclado térmico fue: 3 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a temperatura de apareamiento, 1 min a 72 °C, y finalmente un ciclo de 10 min a 72 °C.

Marcadores AFLP: 750 ng de ADN fueron simultáneamente digeridos y ligados a los adaptadores en un volumen total de 20 µl con 3 U de *Pst*I, 1,6 U de *Mse*I, 1,2 U de T4 ADN ligasa, 0,2 mM de ATP, 75 nM de adaptador *Pst*I, 750 nM de adaptador *Mse*I, 10 mM Tris-HAc pH 7,5, 10 mM MgAc, 50 mM KAc, 5 mM DTT y 50 ng/µl de BSA. La mezcla se incubó durante toda la noche a 37 °C. La preamplificación se realizó en un volumen final de 25 µl con 3 µl de la mezcla de digestión – ligación como templado, 50 mM de Tris-HCl pH 8, 100 mM KCl, 1,2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM de cada dNTPs, 75 ng de cada uno de los cebadores P01, M01 y 1 U de Platinum Taq DNA polymerase (Invitrogen). El ciclado térmico consistió en 3 min a 94 °C; 30 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C y una extensión final de 10 min a 72 °C. El producto de preamplificación fue diluido 1:3 con agua HPLC y 2 µl fueron utilizados en la amplificación selectiva en un volumen final de 20 µl con 20 mM Tris-HCl pH 8.4, 50 mM KCL, 1,6 mM de MgCl<sub>2</sub>, 0,05 mM de cada dNTP, 1 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen) y 30 ng de cada cebador. Las condiciones de ciclado térmico fueron las mismas que las descritas para los aislamientos de *P. sorghi*. Con respecto a la condición de selección, para el caso de trigo, ambos cebadores contenían 3 nucleótidos selectivos adicionales. La secuencias de los cebadores y adaptadores utilizados fue la descrita por Vos y col. (1995).

La metodología empleada para visualización de los productos de PCR tanto de marcadores microsátélites como de marcadores AFLP fue la misma que la descrita para los marcadores AFLP en *P. sorghi*.

### **Condiciones de amplificación del marcador para el gen *Lr10***

La amplificación se realizó en un volumen final de 20 µl con 25 mM Tris-HCL pH 8.4, 62,5 mM KCL, 3,75 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,5 µM de cada cebador ThLr10E: AGCCCTAATATGGCAACC y ThLr10H: TGTAGAACCGTGCCTTAC (Feuillet y col. 2003), 0,075 µM de cada cebador de actina de trigo Forward: GACCCAGACAACCTCGCAACT, y Reverse: CTCGCATATGTGGCTCTTGA, (Pellegrineschi y col. 2004), 0,25mM de cada dNTP, 1 U de Taq polymerase (Invitrogen) y 50 ng de ADN genómico. Las condiciones de ciclado fueron 1 ciclo de 4 min a 94 °C, 35 ciclos de 1 min a 94 °C, 1 min a 55 °C y 2 min a 72 °C, y finalmente 1 ciclo de 10 min a 72 °C. Los productos de amplificación fueron resueltos en un gel de agarosa 1 % en buffer TBE 0,5X.

### **Desarrollo del marcador de región amplificada, secuenciada y caracterizada (SCAR)**

La banda de AFLP P32/M35<sub>275</sub> fue cortada del gel teñido con plata mediante un tip de micropipeta, previamente humedecida la porción del gel que contenía la banda con agua. La banda de interés fue reamplificada en un volumen de 20 µl conteniendo 20 mM Tris-HCL pH 8.4, 50 mM KCL, 1,6 mM MgCl<sub>2</sub>, 30 ng de cada cebador P32 y M35 , 0,05 mM de cada dNTP y 1 U de Taq DNA polymerase (Invitrogen). El ciclado

térmico consistió en 1 min a 94 °C seguido de 30 s a 94 °C, 30 s de temperatura de apareamiento (ver después) y un 1 min a 72 °C. La temperatura inicial de apareamiento fue 65 °C y luego se redujo 1 °C en los próximos 9 ciclos y se mantuvo la temperatura a 56 °C por otros 25 ciclos. Finalmente se realizó un ciclo de 10 min a 72 °C. Los productos de amplificación fueron resueltos en un gel de agarosa 2 % de bajo punto de fusión (Bio-Rad Laboratories). La banda de PCR de interés fue purificada del gel utilizando el kit de extracción QLAquick Gel Extraction Kit (Qiagen) y secuenciada mediante un secuenciador automático utilizando los cebadores P32 y M35. En función de la secuencia se diseñaron los cebadores utilizando el programa Primer3 (Rozen & Skaletsky 1999). Las condiciones de amplificación para estos cebadores fueron 50 ng de ADN genómico, 20 mM Tris-HCL pH 8,4, 50 mM KCL, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,2 µM de cada cebador (Forward: ACCATTTGCGCATTTGATTT y Reverse: GAGCGGGGAGAGAGAGAGAG), 0,05 mM de cada dNTP y 1 U Taq polymerase (Invitrogen) en un volumen final de 20 µl. Las condiciones de ciclado fueron 1 ciclo de 4 min a 94 °C, 40 ciclos de 30 s a 94 °C, 30 s a 65 °C y 1 min a 72 °C y un ciclo de extensión final de 10 min a 72 °C.

### **Mapas de ligamiento**

Los grupos de ligamiento y las distancias genéticas (Kosambi) fueron calculadas mediante el programa CARTHAGENE v1.2.3 (De Givry y col. 2005) con un valor mínimo de LOD score de 3. Los mapas fueron dibujados con el programa MapChart (Voorrips 2002). Los mapas fueron construidos con 190 líneas RIL para cada gen de plántula, debido a que se descartaron aquellas líneas que resultaron heterocigotas para los genes o para los marcadores moleculares evaluados.

### **Evaluaciones a campo**

Las evaluaciones a campo fueron realizadas durante 3 años en el campo experimental del Instituto de Genética (INTA, Castelar) localizado en la provincia de Buenos Aires (Argentina) donde la enfermedad se presenta todos los años. Diez a doce semillas de cada línea RIL fueron sembradas en un surco de 1 m de longitud. Las plantas fueron expuestas a infecciones naturales de la población patógena, sin el agregado de surcos con líneas de trigo susceptibles o inoculaciones artificiales. El tipo de reacción fue evaluado mediante la escala de Mains y Jackson (1926) y la severidad fue estimada mediante el conteo de pústulas en un área de un centímetro cuadrado sobre cinco hojas banderas de cada línea (Tabla A5). Una vez que se identificó que genes de resistencia poseía cada línea RIL en las evaluaciones de invernáculo, las líneas con igual combinación de genes fueron consideradas como unidades experimentales en los diferentes años y al número total de líneas RIL con la misma combinación de genes (más de 11 líneas RIL por combinación) como repeticiones del mismo tratamiento. Utilizando el número promedio de pústulas/cm<sup>2</sup> para cada combinación de genes, se realizó un análisis de la varianza (ANOVA) seguido de contrastes ortogonales con el

objetivo de probar el efecto de cada combinación de genes. Buck Poncho fue comparado con las líneas RIL portadoras de genes de resistencia o la combinación de genes mediante el test de Kruskal – Wallis seguido del test de comparaciones múltiples de Dunn. Purple Straw fue comparado con las líneas RIL sin genes de resistencia mediante el test de Mann-Whitney

## RESULTADOS

- **Maíz**

### **Tipos de reacción de las líneas de maíz en invernáculo y en evaluaciones a campo**

Las líneas *Rp1-A*, *Rp1-B*, *Rp1-C*, *Rp1-D*, *Rp-D5*, *Rp1-M* y PIO16310 resultaron susceptibles (2++34 a 4) o moderadamente susceptibles (22+ a 2++3) a más del 89% de los aislamientos y en más del 63% de las localidades evaluadas (Tabla 9 y Tablas A1 y A2). La línea PIO20046 resultó susceptible o moderadamente susceptible al 100% de los aislamientos y localidades evaluadas. Por otro lado no se observó una línea que resultara resistente a todos los aislamientos evaluados. Sin embargo, las líneas *Rp-G*, *Rp-G5*, *Rp-GI*, *Rp-GDJ*, *Rp-G5JD*, *Rp1-J*, *Rp1-JC*, *Rp1-FJ*, *Rp1-K*, *Rp3-A*, PIO19802, PIO28760 y PIO17570 resultaron resistentes (0; a 11+) o moderadamente resistentes (11+2<sup>-</sup> - 1+2) a más del 60% de los aislamientos y en más del 78% de las localidades evaluadas, a excepción de las líneas *Rp1-J* y *Rp1-FJ* que en las evaluaciones a campo resultaron resistentes o moderadamente resistentes al 57% y 54% de las localidades evaluadas, respectivamente. Las líneas *Rp3-A* y PIO19802 fueron resistentes o moderadamente resistentes al 97% y 99% de los aislamientos evaluados, respectivamente. La línea PIO28760 fue la única que resultó resistente en el 100% de las localidades evaluadas durante los tres años. Las líneas endocriadas PIO28427, PIO15600, PIO36420 y PIO74876 fueron susceptibles o moderadamente susceptibles a más del 93% de los aislamientos evaluados. Sin embargo, en las evaluaciones a campo resultaron resistentes o moderadamente resistentes para algunas localidades, siendo las líneas PIO28427 y PIO74876 con el 75% y 65% respectivamente, las más resistentes entre ellas. Las líneas PIO28427, PIO16310 y PIO74876 resultaron moderadamente resistentes para algunos aislamientos. Sin embargo, la reacción de moderada resistencia siempre tendió a la moderada susceptibilidad sugiriendo la existencia de efectos ambientales o del fondo genético que explicarían la reacción de moderada resistencia para algunos aislamientos. En las líneas PIO68752, PIO19802, PIO28760, PIO12345 y PIO17570 se detectó resistencia en plántula. Las líneas PIO68752 y PIO12345 resultaron principalmente susceptible o moderadamente susceptibles al 62% y 65% de los aislamientos evaluados, respectivamente. Sin embargo, resultaron resistentes o moderadamente resistentes en el 90% y 69% de las localidades evaluadas, respectivamente.

**Tabla 9.** Frecuencias (%) de los tipos de reacción para las líneas de maíz evaluadas frente a los 66 aislamientos en condiciones de invernáculo y en diferentes localidades durante 2010 a 2012.

Líneas <sup>a</sup>	Evaluaciones de invernáculo					Evaluaciones a campo				
	0; -	11+2 -	22+ -	2++34 -	Nro.	0; -	11+2 -	22+ -	2++34 -	Nro.
	11+	1+2	2++3	4		11+	1+2	2++3	4	
<i>Rp1-A</i>	1,5	1,5	48,5	48,5	66	0	0	30,3	69,7	33
<i>Rp1-B</i>	3	7,7	62	27,3	66	0	24,2	69,7	6,1	33
<i>Rp1-C</i>	1,5	0	42,4	56,1	66	6,1	30,3	39,4	24,2	33
<i>Rp1-D</i>	1,5	1,5	44	53	66	0	9,1	63,6	27,3	33
<i>Rp-D5</i>	1,5	1,5	33,4	63,6	66	0	0	54,5	45,5	33
<i>Rp-G</i>	44	28,8	13,6	13,6	66	77,8	11,1	11,1	0	18
<i>Rp-G5</i>	65	18,5	15	1,5	65	73,3	20	6,7	0	30
<i>Rp-GI</i>	56,1	19,7	15,2	9	66	66,6	15,2	18,2	0	33
<i>Rp-GDJ</i>	41,3	20,6	16	22,1	63	60,6	27,3	12,1	0	33
<i>Rp-G5JD</i>	52,3	25	15	7,7	65	72	15,5	12,5	0	32
<i>Rp1-J</i>	39,4	24	29	7,6	66	0	57,6	39,4	3	33
<i>Rp1-JC</i>	31	34	23	12	65	36,4	42,4	21,2	0	33
<i>Rp1-FJ</i>	36,4	30,3	21,2	12,1	66	12,1	42,4	45,5	0	33
<i>Rp1-K</i>	29	53	11	7	66	51,5	36,4	12,1	0	33
<i>Rp1-M</i>	0	1,5	66,5	32	66	0	12,1	72,7	15,2	33
<i>Rp3-A</i>	51,5	45,5	1,5	1,5	66	24,3	54,5	21,2	0	33
PIO68752	16,6	21,2	44	18,2	66	39,4	51,5	9,1	0	33
PIO28427	0	1,7	61	37,3	59	6,1	69,7	24,2	0	33
PIO15600	0	0	76	24	54	3	15,2	57,6	24,2	33
PIO36420	0	0	49	51	65	3	25	72	0	32
PIO20046	0	0	52,6	47,4	57	0	0	5	95	20
PIO19802	82	17	1	0	66	72,7	21,2	6,1	0	33
PIO28760	54,5	30,3	15,2	0	66	91	9	0	0	33
PIO16310	0	1,5	52,3	46,2	65	0	0	36,4	63,6	33
PIO12345	19,6	15,2	50	15,2	66	15,2	54,5	30,3	0	33
PIO74876	0	6,2	86,2	7,6	65	18,7	47	34,3	0	32
PIO17570	63,6	21,2	15,2	0	66	60,6	27,3	12,1	0	33

<sup>a</sup> Algunas líneas no pudieron ser analizadas en todas las localidades y frente a todos los aislamientos debido a la baja germinación o disponibilidad de semilla.

Once aislamientos fueron seleccionados, entre los 66 utilizados en este estudio, para caracterizar a todas las líneas portadoras de genes *Rp* y líneas endocriadas de Pioneer, ya que permitieron detectar la mayor cantidad de diferencias entre las líneas. Considerando los tipos de reacción entre 0; a 1+2 como resistentes y 22+ a 4 como susceptibles, pudieron distinguirse 14 patrones de resistencia - susceptibilidad (Tabla 10). Todos los genes *Rp* individuales pudieron ser distinguidos con la excepción de los genes *Rp1-C* y *Rp1-M*. El patrón de resistencia - susceptibilidad para la mayoría de las combinaciones de genes *Rp* se encontró correlacionado con los patrones de los genes que conforman la combinación. La línea *Rp-G5* tendió a hacer más resistente que la línea *Rp-G*. Los patrones de resistencia - susceptibilidad observados en las líneas PIO68752, PIO19802, PIO28760, PIO12345 y PIO17570 no se encontraron



correlacionados con los patrones observados en las líneas portadoras de genes *Rp* individuales o portadoras de combinaciones de genes *Rp* sugiriendo que las líneas de Pioneer serían portadoras de nuevos genes de resistencia de expresión en plántula.

**Tabla 10.** Tipos de reacción para 9 líneas portadoras de genes *Rp* individuales, 7 líneas portadoras de combinaciones de genes *Rp* y 11 líneas endocriadas en condición de plántula frente a 11 aislamientos de *P. sorghi*.

Líneas <sup>b</sup>	Aislamientos <sup>a</sup>										
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
<i>RpI-A</i>	34	2++3	22++	22+	34	0;	1+2	2++3	34	34	34
<i>RpI-B</i>	2++3	2++3	1+2	1+2	2++3	1+2	22+	34	2++3	2++3	2++3
<i>RpI-C</i>	34	2++3	2++3	2++3	34	11+	2++3	22++	34	34	34
<i>RpI-D</i>	34	22+	2++3	2++3	2++3	0;	1+2	34	2++34	34	34
<i>Rp-D5</i>	34	2++3	22++	2++3	34	0;1	1+2	2++34	2++34	34	34
<i>Rp-G</i>	1+2	0;	0;	1+2	0;	0;	0;	34	2++34	34	0;
<i>Rp-GDJ</i>	1+2	0;	0;	1+2	0;	0;	0;	34	2++34	34	0;
<i>Rp-G5</i>	0;	0;	0;	0;	0;	0;	0;	1+2	2++3	2++34	0;
<i>Rp-G5JD</i>	0;	0;	0;	0;	0;	1+2	0;	1+2	34	2++34	0;
<i>RpI-K</i>	0;1	0;1	0;	0;1	1+2	0;	11+	1+2	2++3	11+	1+2
<i>Rp-GI</i>	1+2	0;	0;	0;	0;	0;	0;	1+2	2++3	11+	0;
<i>RpI-J</i>	11+	2++3	0;1	0;1	0;	0;	0;1	34	2++34	34	0;
<i>RpI-JC</i>	0;1	2++3	0;	1+2	1+2	0;	0;	34	2++3	34	0;
<i>RpI-FJ</i>	0;	2++3	0;	1+2	0;	0;	0;	34	2++34	34	0;1
<i>RpI-M</i>	34	22++	2++3	2++3	2++3	1+2	22++	34	34	34	2++3
<i>Rp3-A</i>	0;1	0;	0;1	0;1	1+2	11+	11+	0;	11+	1+2	2++3
PIO68752	2++3	0;	2++34	0;	4	4	34	1+2	1+2	0;1	22+
PIO19802	0;	0;	0;	0;	0;	0;	0;	11+	1+2	2++3	0;
PIO28760	0;1	0;	0;1	0;1	1+2	1+2	1+2	0;	0;	0;	11+
PIO12345	1+2	2++3	2++34	2++3	2++3	2++3	2++3	0;	0;	0;	1+2
PIO17570	0;	0;	2++3	0;	1+2	22++	2++3	0;	11+	0;	0;1
PIO28427	34	1+2	2++3	34	34	34	2++3	2++3	2++34	2++3	-
PIO15600	34	2++3	2++3	2++3	34	2++3	34	34	2++34	2++3	2++34
PIO36420	2++3	2++3	2++34	2++3	4	4	34	34	2++3	34	2++3
PIO20046	34	2++3	2++3	34	34	X(0;34)	2++3	34	2++3	34	34
PIO16310	34	2++3	2++3	34	34	2++3	2++3	34	2++34	2++34	2++34
PIO74876	1+2	22++	2++3	22++	2++3	22++	2++3	22++	2++3	2++3	22+

<sup>a</sup> Designación de los aislamientos: 1 AL10RpD5; 2 BV10Rp1J; 3 GC10PIO69383; 4 T10Rp1M; 5 P10PIO16310; 6 P10PIO17570; 7 P10PIO10189; 8 S10RpGDJ; 9 CAS11H43627; 10 CHIPIO19802 y 11 JIIRp3A.

<sup>b</sup> Algunas líneas no pudieron ser analizadas frente a todos los aislamientos debido a la baja germinación o disponibilidad de semillas.

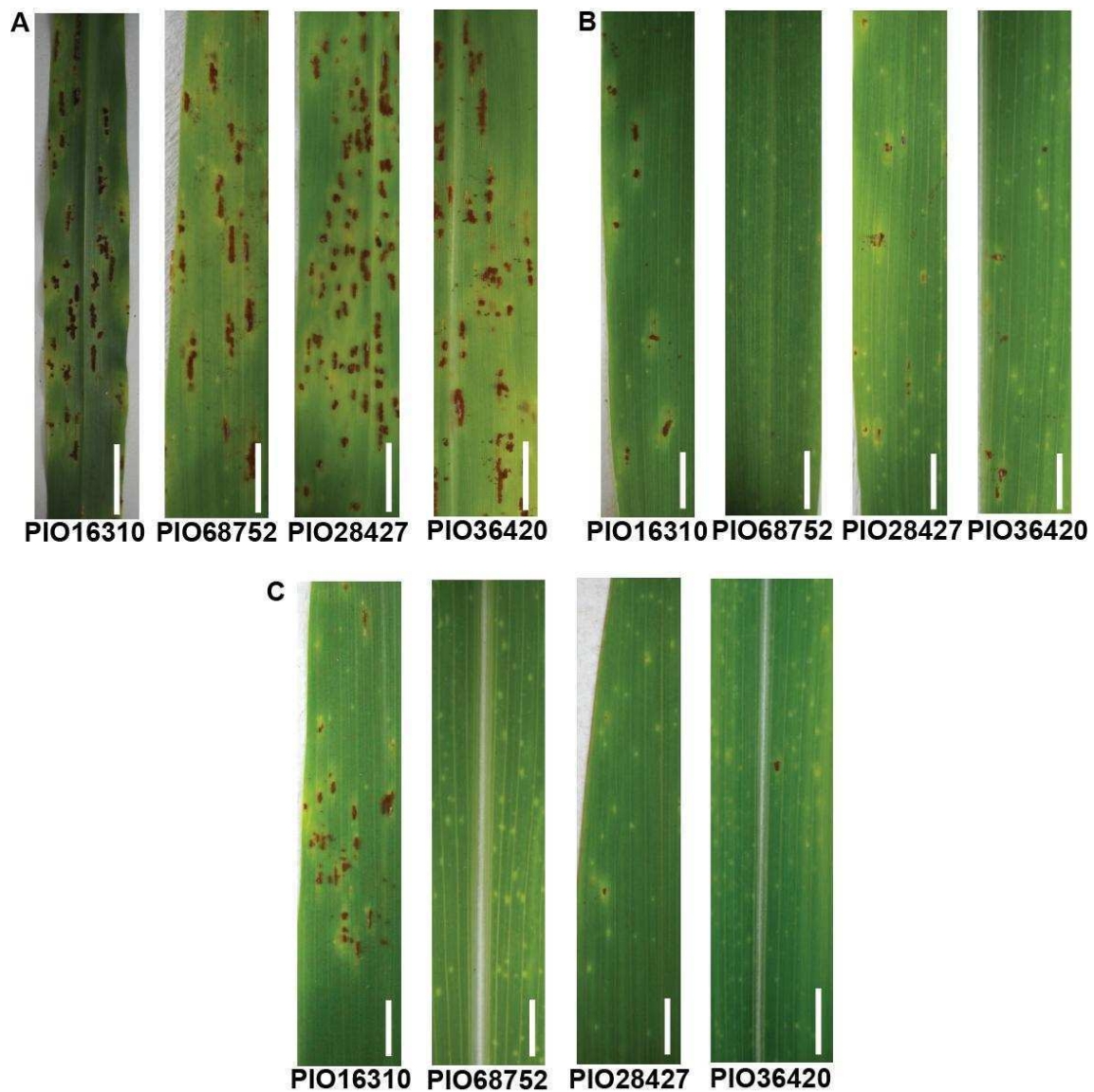
### Detección de resistencia en estadios posteriores a V2

Las líneas PIO68752, PIO28427 y PIO36420 fueron más resistentes en las evaluaciones a campo que en las evaluaciones de invernáculo sugiriendo la existencia de resistencia no detectada en el estadio de plántula (V2) (Tabla 9). Por lo tanto estas líneas fueron seleccionadas para evaluar la existencia de resistencia, cuya expresión comience en

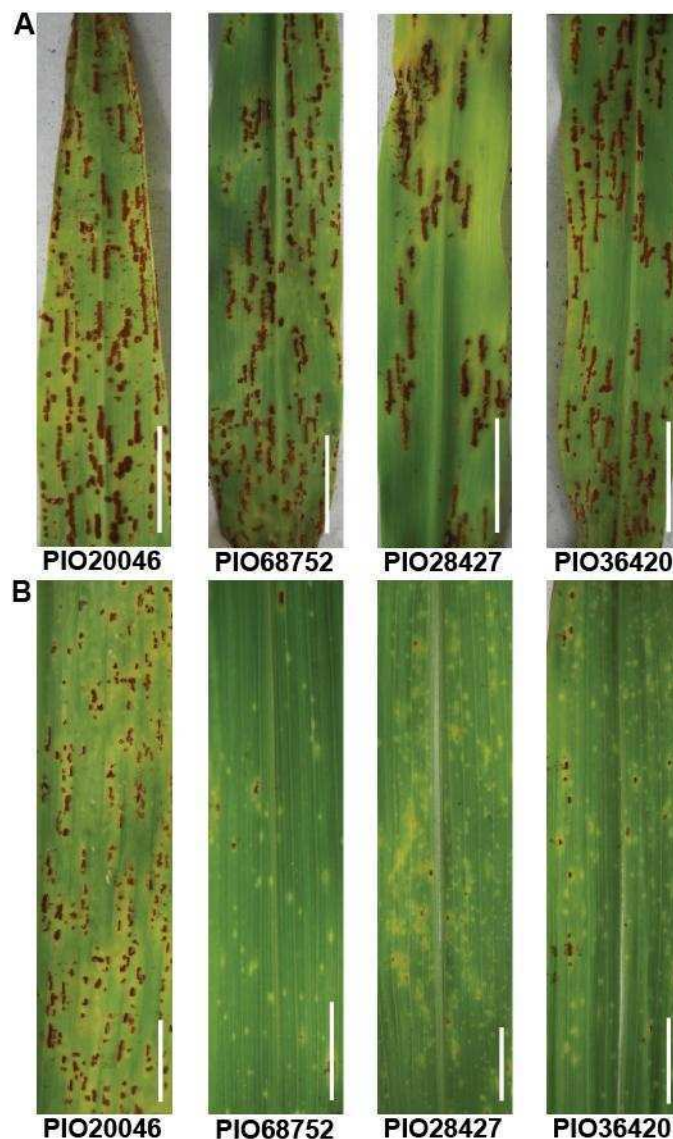
estadios foliares superiores al V2. Dos aislamientos fueron utilizados, T10RpD5 y P10PIO16310, los cuales resultaron virulentos en el estadio de plántula sobre las líneas PIO68752, PIO28427 y PIO36420. Los aislamientos fueron inoculados sobre las líneas en los estadios foliares V2, V4 y V6. Aunque los dos aislamientos poseen el mismo fenotipo de virulencia (Tabla A1) fueron seleccionadas para determinar si podían ser diferenciados por genes de resistencia cuya expresión comenzara en estadios superiores al V2. Las líneas *Rp-D5* y PIO16310 fueron utilizadas como controles susceptibles para los aislamientos T10RpD5 y P10PIO16310, respectivamente por ser los hospedantes en donde fueron colectados los aislamientos. Los dos aislamientos detectaron genes de resistencia en las líneas PIO68752, PIO28427, PIO36420 en el estadio V4, a partir de la cuarta hoja (Tabla 11A, Fig. 7). El tipo de reacción observado para estas tres líneas fue de resistencia o moderada resistencia. Todas las líneas, incluidas los controles tendieron a hacer más resistentes en el estadio V6 que el V4, pero la reacción de resistencia de las líneas PIO68752, PIO28427 y PIO36420 siempre se distinguió de ambos controles. Como las líneas exhibieron distintas tasas de crecimiento y germinación resultó difícil sincronizar los tres estadios para que puedan ser inoculadas al mismo tiempo. Por lo tanto para descartar la posibilidad de que las diferencias en el tipo de reacción observado entre estadios se deban a efectos ambientales durante la inoculación, las líneas en los estadios V2 y V6 fueron inoculadas simultáneamente utilizando los dos aislamientos. En este experimento como control susceptible se utilizó la línea PIO20046 para ambos aislamientos porque resultó más susceptible en los estadios superiores al de plántula siendo un control más apropiado para este tipo de análisis. Nuevamente, las líneas PIO68752, PIO28427 y PIO36420 resultaron resistentes o moderadamente resistentes en el estadio foliar V6 mientras que resultaron completamente susceptibles en el estadio V2. (Tabla 11B, Fig. 8).

**Tabla 11.** Tipos de reacción de 6 líneas de maíz frente a dos aislamientos en los estadios foliares V2, V4 y V6.

Aislamientos		T10RpD5				P10PIO16310			
A	Línea de maíz	<i>Rp-D5</i>	PIO68752	PIO28427	PIO36420	PIO16310	PIO68752	PIO28427	PIO36420
	Estadio foliar								
	V2	2++34	34	34	34	34	4	2++3	34
	V4	2++34	0;11+	1+2	11+	22+	0;1	1+2	11+2
	V6	22+	0;1	0;1	0;11+	22+	0;	0;11+	0;11+
B	Línea de maíz	PIO20046	PIO68752	PIO28427	PIO36420	PIO20046	PIO68752	PIO28427	PIO36420
	Estadio foliar								
	V2	34	4	34	4	4	4	34	4
	V6	22+	11+2	11+	0;11+	2++34	0;1	11+2	0;11+



**Fig. 7** Tipos de reacción en líneas de maíz en los estadios foliares V2, V4 y V6. Los tres estadios fueron inoculados con el aislamiento P10PIO16310. Imágenes A, B y C representan hojas número 2 (estadio foliar V2), hojas número 4 (estadio foliar V4) y hoja número 6 (estadio foliar V6), respectivamente. Escala, 1cm

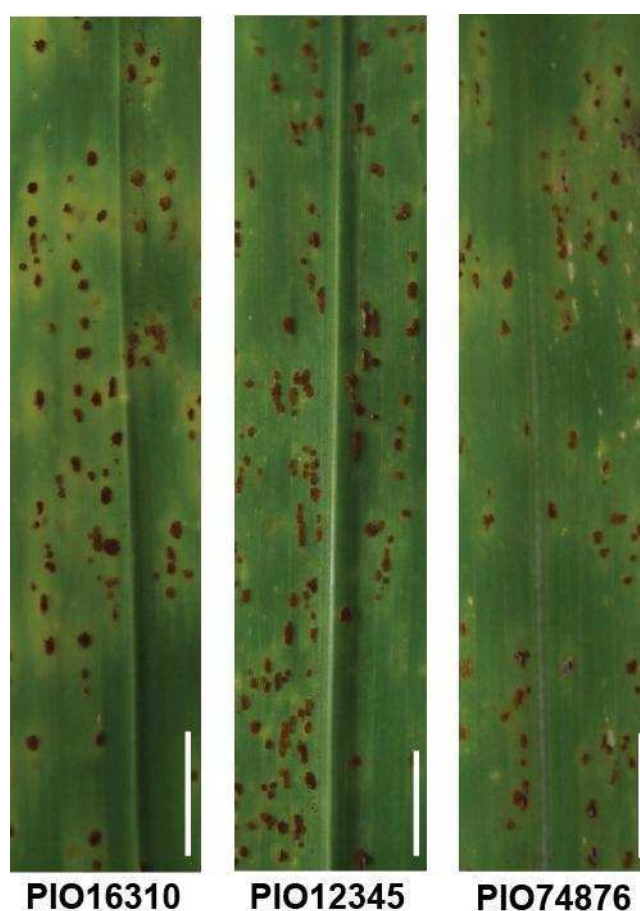


**Fig. 8** Tipos de reacción en líneas de maíz en los estadios foliares V2 y V6. Ambos estadios fueron inoculados simultáneamente con el aislamiento P10PIO16310. Imágenes A y B representan hojas número 2 (estadio foliar V2) y hojas número 6 (estadio foliar V6), respectivamente. Escala, 1cm

### **Detección de resistencia parcial o general**

Como se mencionó más arriba las líneas PIO12345 y PIO74876 resultaron resistentes o moderadamente resistentes en las evaluaciones a campo, mientras que en las evaluaciones en plántula con los distintos aislamientos resultaron principalmente susceptibles o moderadamente susceptibles (Tabla 9). Estas evidencias sugerían la existencia de resistencia no detectada en el estadio de plántula. Para el caso de la línea PIO12345 evaluaciones en el estadio foliar V6 no lograron detectar resistencia del tipo raza-específica (*información no mostrada*), de manera que la resistencia observada a campo podría deberse a la existencia de resistencia parcial. Por otra parte la línea PIO74876 en el estadio de plántula resultó principalmente moderadamente susceptible.

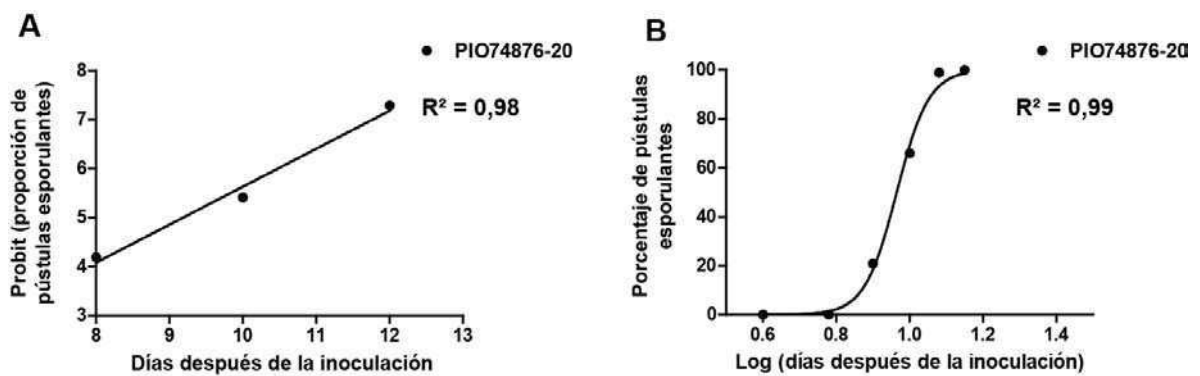
Al momento de evaluar el set de líneas con los distintos aislamientos se observó un retraso en la esporulación con respecto a otras líneas como PIO16310 o PIO12345 (Fig. 9), indicando posiblemente la existencia de resistencia parcial. Con el objetivo de evaluar la existencia de resistencia parcial en las líneas PIO12345 y PIO74876, se calculó el período de latencia mediante dos modelos de regresión que se basaron en la proporción de pústulas esporulantes que surgen en los días posteriores a la inoculación. Como control susceptible se utilizó la línea PIO16310.



**Fig. 9** Retardo en la aparición de pústulas en la línea PIO74876. En la imagen pueden observarse el retardo en la aparición de pústulas para la línea PIO74876 como pústulas pequeñas que comienzan a emerger a diferencia de las líneas PIO12345 y PIO16310 donde la mayoría de las pústulas emergieron y se encuentran cargadas con esporos. Imágenes tomadas sobre hojas número 2, doce días después de haber sido inoculadas con la raza AR10PIO10189

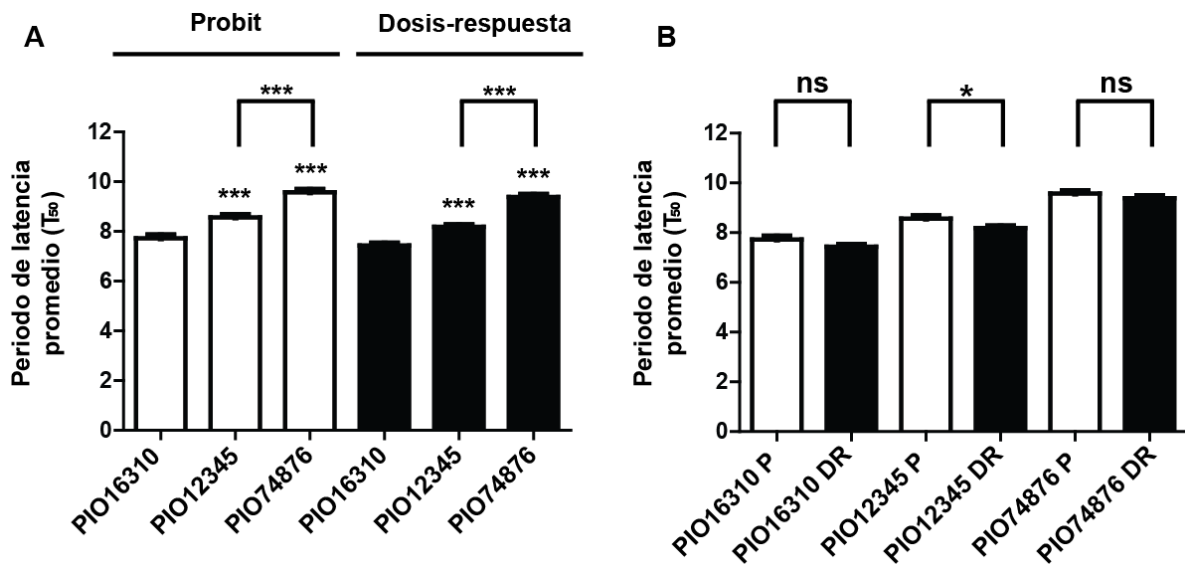
Para el modelo de regresión lineal basado en la transformación probit, las rectas calculadas para las réplicas de cada línea se ajustaron a los valores transformados de proporción de pústulas con un valor de  $R^2$  promedio de  $95,4 \pm 0,05\%$ , (Tabla A4, Fig. 10A). La línea PIO74876 resultó ser la de mayor  $T_{50}$  promedio ( $9,580 \pm 0,428$  días) y se diferenció significativamente del resto de las líneas, mientras que la línea PIO12345, aunque exhibió un  $T_{50}$  promedio ( $8,564 \pm 0,457$  días) menor al de PIO74876, se diferenció significativamente de la línea PIO16310 que resultó ser la de menor  $T_{50}$  promedio ( $7,730 \pm 0,443$  días) (Fig. 11A). Para el modelo de regresión no lineal basado

en la curva de dosis - respuesta, todas las curvas se ajustaron a los valores de porcentaje de pústulas con un valor de  $R^2$  promedio de  $99,6\pm 0,008\%$ , (Tabla A4, Fig. 10B). Mediante este modelo se obtuvieron los mismos resultados que los observados para el modelo de regresión lineal. La línea PIO74876 exhibió el mayor  $T_{50}$  promedio ( $9,382\pm 0,406$  días) el cual se diferenció significativamente de las otras dos líneas. La línea PIO12345 exhibió un  $T_{50}$  promedio intermedio ( $8,182\pm 0,315$  días) entre las líneas PIO74876 y PIO16310, y nuevamente se diferenció significativamente de la línea PIO16310 que resultó ser la de menor  $T_{50}$  promedio ( $7,434\pm 0,309$  días) (Fig. 11A). No se encontraron diferencias significativas entre los  $T_{50}$  promedio calculados por ambos modelos para las líneas PIO16310 y PIO74876, mientras que para la línea PIO12345 se observaron diferencias significativas, sin embargo el grado de significación fue bajo ( $P < 0,05$ ) (Fig. 11B).



**Fig. 10** Ejemplos de ajustes de regresión lineal (probit) y no lineal (curva dosis - respuesta) para una de las réplicas de la línea PIO76876. **A)** ajuste al modelo de regresión lineal probit. **B)** ajuste al modelo regresión no lineal de dosis – respuesta





**Fig. 11.** Análisis de AMOVA para los distintos modelos de regresión utilizados. **A).** comparaciones entre líneas para cada modelo. Las comparaciones se realizaron mediante el test de Tukey. **B)** comparaciones entre modelos. Las comparaciones se realizaron mediante el test de Bonferroni, P y DR indican valores de T<sub>50</sub> promedio obtenido mediante los modelos de probit y dosis – respuesta, respectivamente. \* $P < 0,05$ , \*\* $P < 0,01$  y \*\*\* $P < 0,001$

### Estudio de la población de *P. sorghi*

Para los estudios poblacionales, de los 66 aislamientos evaluados, fueron seleccionados 65. El aislamiento P10PIO17570 fue descartado del análisis porque resultó avirulento sobre todas las líneas NILs portadoras de genes *Rp* individuales o combinaciones de los mismos. El tipo de reacción observado posiblemente se deba a que este aislamiento esté detectando un gen de resistencia perteneciente al fondo genético de la línea H95 utilizado por Hulbert y col. (2001) para la construcción de las NILs. Como set de líneas diferenciales del hospedante fueron utilizadas 9 líneas portadoras de genes *Rp* individuales (*Rp1-A*, *Rp1-B*, *Rp1-C*, *Rp1-D*, *Rp-G*, *Rp1-J*, *Rp1-K*, *Rp1-M* y *Rp3-A*) y 5 líneas endocriadas (PIO68752, PIO19802, PIO28760, PIO12345 y PIO17570) pertenecientes al germoplasma de Pioneer. Estas 5 líneas serían portadoras de genes de resistencia distintos de los genes *Rp* utilizados en este trabajo (Tabla 10).

En función de las reacciones de los 65 aislamientos sobre el set de 14 líneas diferenciales, en el estadio de plántula y empleando la nomenclatura propuesta por Long y Kolmer (1989), se identificaron 26 fenotipos de virulencia o razas (Tabla 12). Los fenotipos más comunes fueron TCCG, TTBB Y TCFG con 12, 9 y 6 aislamientos, respectivamente mientras que los otros fenotipos fueron representados por 1 o no más de 4 aislamientos.

**Tabla 12.** Virulencias <sup>a</sup>, Fenotipos de virulencia <sup>b</sup>, Grupos de virulencia <sup>c</sup> y localidades de origen <sup>d</sup> de los 65 aislamientos de *P. sorghi*.

Aislamiento	Localidad	Virulencia	Fenotipo de virulencia	Grupo de virulencia
CH11PIO19802	Chacabuco (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp-G, Rp1-M</i> , PIO19802	TRGB	1
S10RpGDJ	Salto (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp-G, Rp1-M</i>	TRBB	1
CAS11RpGDJ	Casilda (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp-G, Rp1-M</i>	TRBB	1
CB11RpGDJ	Corral de Bustos (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp-G, Rp1-M</i>	TRBB	1
MJ12H14371	Marcos Juárez (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i> , PIO68752	TTBG	1
MJ12PIO74876	Marcos Juárez (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i> , PIO68752	TTBG	1
CB12H11247	Corral de Bustos (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i>	TTBB	1
CB12Rp1J	Corral de Bustos (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i>	TTBB	1
GP11RpGI	General Pinto (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i>	TTBB	1
MJ12RpGI	Marcos Juárez (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i>	TTBB	1
RO10H11247	Rojas (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i>	TTBB	1
RO10RpGI	Rojas (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i>	TTBB	1
TE10H11247	Teodelina (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i>	TTBB	1
BV12Rp1K	Bell Ville (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i>	TTBB	1
CAS11H43627	Casilda (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp-G, Rp1-M</i>	TTBB	1
E10Rp3A	Etruria (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M, Rp3-A</i>	TCLB	2
J11Rp3A	Junín (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M, Rp3-A</i> , PIO68752	TCLG	2
AL10RpD5	Alberdi (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO68752	TCBG	2
CB11RpD5	Corral de Bustos (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp-G, Rp1-M</i> , PIO68752	TMBG	2
RU12H20684	Runciman (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp-G, Rp1-M</i>	TMBB	2
MT11Rp1M	María Teresa (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i>	TCBB	2
BI12Rp1C	Bigand (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i>	TCBB	2
CB11Rp1C	Corral de Bustos (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i>	TCBB	2
CB11PIO74876	Corral de Bustos (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-M</i> , PIO28760, PIO12345, PIO68752	THFG	3
RO11RpD5	Rojas (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-M</i> , PIO28760, PIO12345, PIO68752	THFG	3
CH11Rp1JF	Chacabuco (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp-G, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TRCG	3
CAS11PIO38360	Casilda (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-K, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TKCG	3

Continúa en la página siguiente

<sup>a</sup> Indica que genes o líneas resultaron susceptibles a cada aislamiento

<sup>b</sup> Código de 4 letras, adaptado de la nomenclatura de *P. triticina* propuesta por Long y Kolmer (1989).

<sup>c</sup> Los aislamientos fueron agrupados en 4 grupos de virulencia de acuerdo al análisis de UPGMA basado en las reacciones de avirulencia - virulencia de los 65 aislamientos sobre el set de 14 diferenciales.

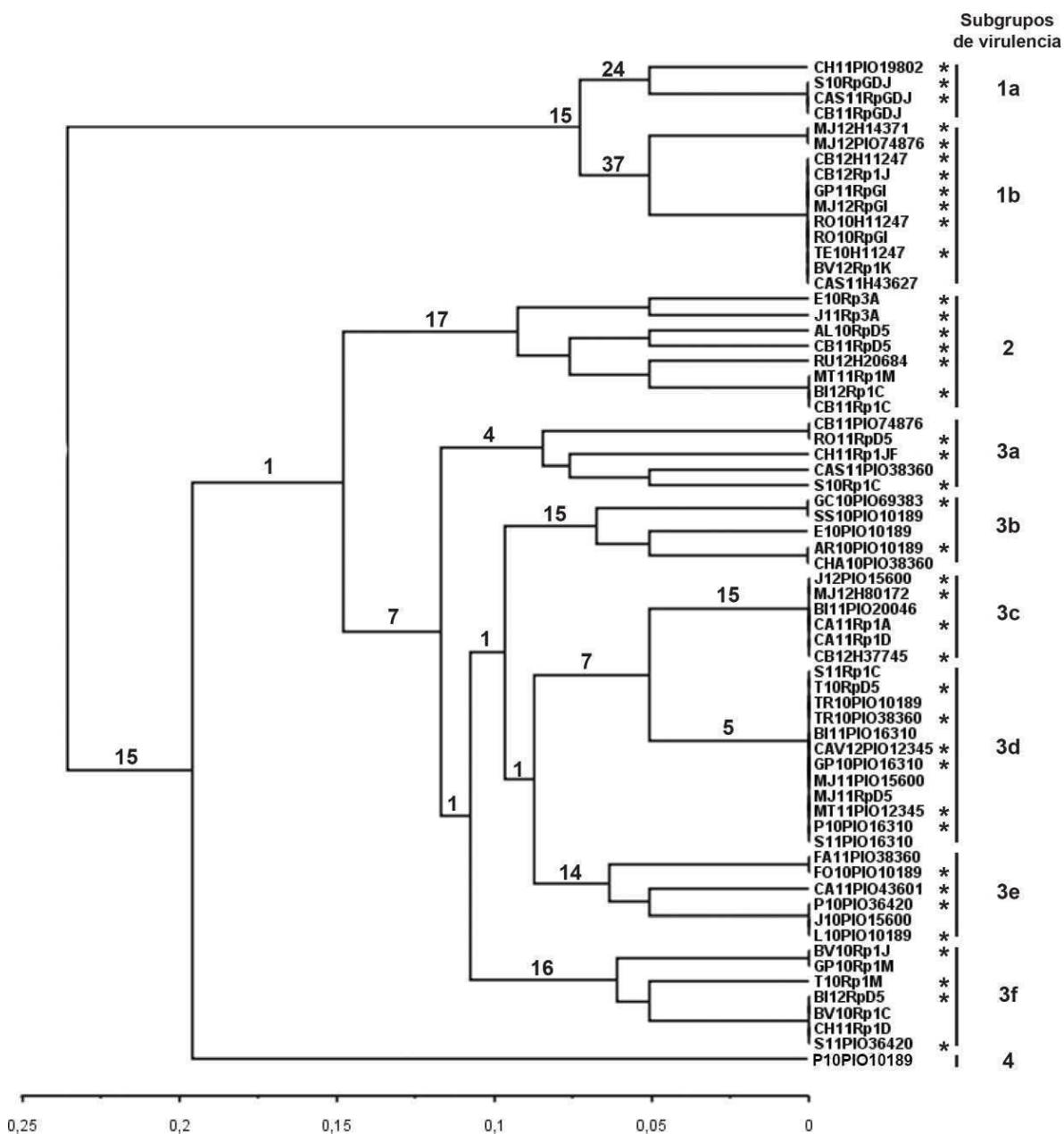
<sup>d</sup> BA, Buenos Aires; SF, Santa Fe; CO, Córdoba



Aislamiento	Localidad	Virulencia	Fenotipo de virulencia	Grupo de virulencia
S10Rp1C	Salto (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	THCG	3
GC10PIO69383	General Cabrera (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO17570, PIO68752	PCCQ	3
SS10PIO10189	Sancti Spiritu (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO17570, PIO68752	PCCQ	3
E10PIO10189	Etruria (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO28760, PIO12345, PIO68752	PCFG	3
AR10PIO10189	Alejandro Roca (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	PCCG	3
CHA10PIO38360	Chacabuco (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	PCCG	3
J12PIO15600	Junín (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO28760, PIO12345, PIO68752	TCFG	3
MJ12H80172	Marcos Juárez (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO28760, PIO12345, PIO68752	TCFG	3
BI11PIO20046	Bigand (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO28760, PIO12345, PIO68752	TCFG	3
CA11Rp1A	Carcarañá (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO28760, PIO12345, PIO68752	TCFG	3
CA11Rp1D	Carcarañá (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO28760, PIO12345, PIO68752	TCFG	3
CB12H37745	Corral de Bustos (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO28760, PIO12345, PIO68752	TCFG	3
S11Rp1C	Salto (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
T10RpD5	El Trébol (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
TR10PIO10189	Trongé (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO17570	TCCG	3
TR10PIO38360	Trongé (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
BI11PIO16310	Bigand (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
CAV12PIO12345	Cavanagh (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
GP10PIO16310	General Pinto (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
MJ11PIO15600	Marcos Juárez (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
MJ11RpD5	Marcos Juárez (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
MT11PIO12345	María Teresa (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
P10PIO16310	Pergamino (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
S11PIO16310	Salto (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO68752	TCCG	3
FA11PIO38360	Florentino Ameghino (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO17570, PIO68752	THCQ	3
FO10PIO10189	Fortín Olavarría (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO17570, PIO68752	THCQ	3
CA11PIO43601	Carcarañá (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO28760, PIO12345, PIO17570, PIO68752	TCFQ	3
P10PIO36420	Pergamino (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO17570, PIO68752	TCCQ	3
J10PIO15600	Junín (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO17570, PIO68752	TCCQ	3

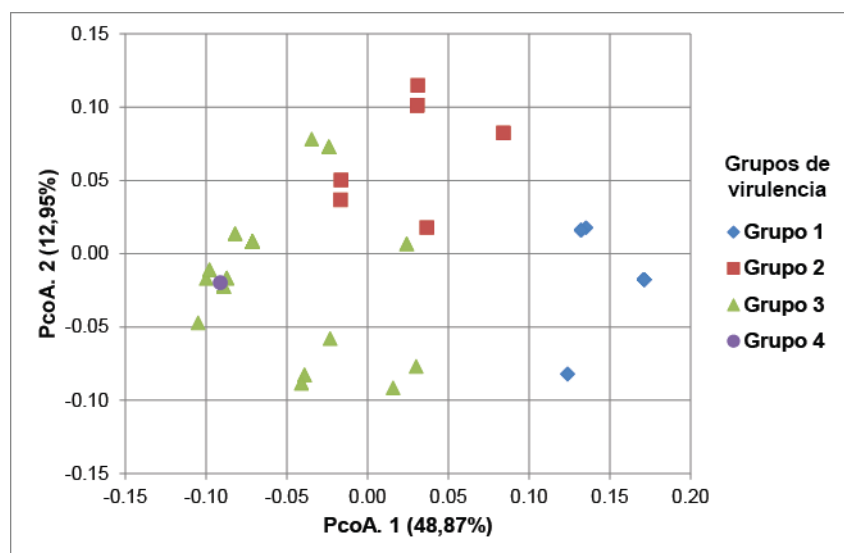
Aislamiento	Localidad	Virulencia	Fenotipo de virulencia	Grupo de virulencia
L10PIO10189	Landeta (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO17570, PIO68752	TCCQ	3
BV10Rp1J	Bell Ville (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-M</i> , PIO12345	THCB	3
GP10Rp1M	General Pinto (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-M</i> , PIO12345	THCB	3
T10Rp1M	El Trébol (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345	PCCB	3
BI12RpD5	Bigand (SF)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345	TCCB	3
BV10Rp1C	Bell Ville (CO)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345	TCCB	3
CH11Rp1D	Chacabuco (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345	TCCB	3
S11PIO36420	Salto (BA)	<i>Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M</i> , PIO12345	TCCB	3
P10PIO10189	Pergamino (BA)	<i>Rp1-B, Rp1-C, Rp1-M</i> , PIO12345, PIO17570, PIO68752	JCCQ	4

En función del análisis de UPGMA basado en las reacciones de avirulencia – virulencia de los 65 aislamientos evaluados sobre un set de 14 líneas diferenciales de maíz, los aislamientos fueron agrupados en 4 grupos de virulencia utilizando un valor de disimilitud umbral del 14 % (Tabla 12 y Fig. 12). El grupo 1 se separó del resto de los grupos a un valor de disimilitud del 23,55 %. Consistió en 15 aislamientos con fenotipos de virulencia TRGB, TRBB, TTBG y TTBB, donde todos resultaron virulentos sobre los genes *Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-J, Rp1-G* y *Rp1-M*. De este grupo se separaron dos subgrupos con un valor de disimilitud del 7,27 %; El subgrupo 1a consistió en los aislamientos con fenotipos de virulencia TRGB y TRBB, mientras que el subgrupo 1b agrupó a los aislamientos con fenotipos de virulencia TTBG y TTBB los cuales también fueron virulentos sobre el gen *Rp1-K*. El grupo 4 se distinguió de los grupos 2 y 3 con un valor de disimilitud del 19,59 %. Este grupo consistió en un único aislamiento con fenotipo de virulencia JCCQ que se distinguió del resto de los aislamientos por ser avirulento sobre gen *Rp1-A*. El grupo 2 se distinguió del grupo 3 con un valor de disimilitud del 14,77%. Consistió en 8 aislamientos con fenotipos de virulencia TCLB, TCLG, TCBG, TMBG, TMBB y TCBB donde todos resultaron virulentos sobre los genes *Rp1-A, Rp1-B, Rp1-C, Rp1-D* y *Rp1-M*. El grupo 3 fue compuesto por 41 aislamientos los cuales fueron virulentos sobre los genes y líneas *Rp1-A, Rp1-C, Rp1-D, Rp1-M* y PIO12345. Dentro de este grupo se identificaron 6 subgrupos designados como 3a a 3f. Los subgrupos se separaron a valores de disimilitud comprendidos entre 11,7 a 5,05 %. Cada subgrupo agrupó aislamientos con distintos fenotipos de virulencia (3a: THFG, TRCG, TKCG y THCG; 3b: PCCQ, PCFG y PCCG; 3c: TCFG; 3d: TCCG; 3e: THCQ, TCFQ y TCCQ; 3f: THCB, PCCB y TCCB). En los subgrupos 3a a 3e se observaron virulencias adicionales (3a: *Rp1-B, Rp1-J* y PIO68752; 3b: PIO68752; 3c: *Rp1-B*, PIO28760 y PIO68752; 3d: *Rp1-B* y PIO68752; 3e: *Rp1-B*, PIO68752 y PIO17570), mientras que los aislamientos del subgrupo 3f solo presentaron las virulencias que definen al grupo.



**Fig.12** Dendrograma basado en las reacciones de avirulencia - virulencia de 65 aislamientos sobre un set de 14 líneas diferenciales de maíz. \*Aislamientos seleccionados para el análisis molecular. Los números sobre cada nodo se corresponden a los valores porcentuales de bootstrap generados mediante 1001 permutaciones

En el análisis de coordenadas principales (PcoA) se agrupó a los aislamientos de manera similar a la observada en el dendrograma basado en las reacciones de avirulencia – virulencia (Fig. 13). Los aislamientos del grupo 1 de virulencia se agruparon en la parte media derecha del gráfico. Mientras que los aislamientos de los grupos 2 y 3 se agruparon en la mitad superior y en la parte inferior izquierda del gráfico, respectivamente. El aislamiento del grupo 4 de virulencia se agrupó con los aislamientos del grupo 3. Las coordenadas 1 (PcoA.1) y 2 (PcoA.2) representaron el 48,87% y 12,95% de la variación total, respectivamente.

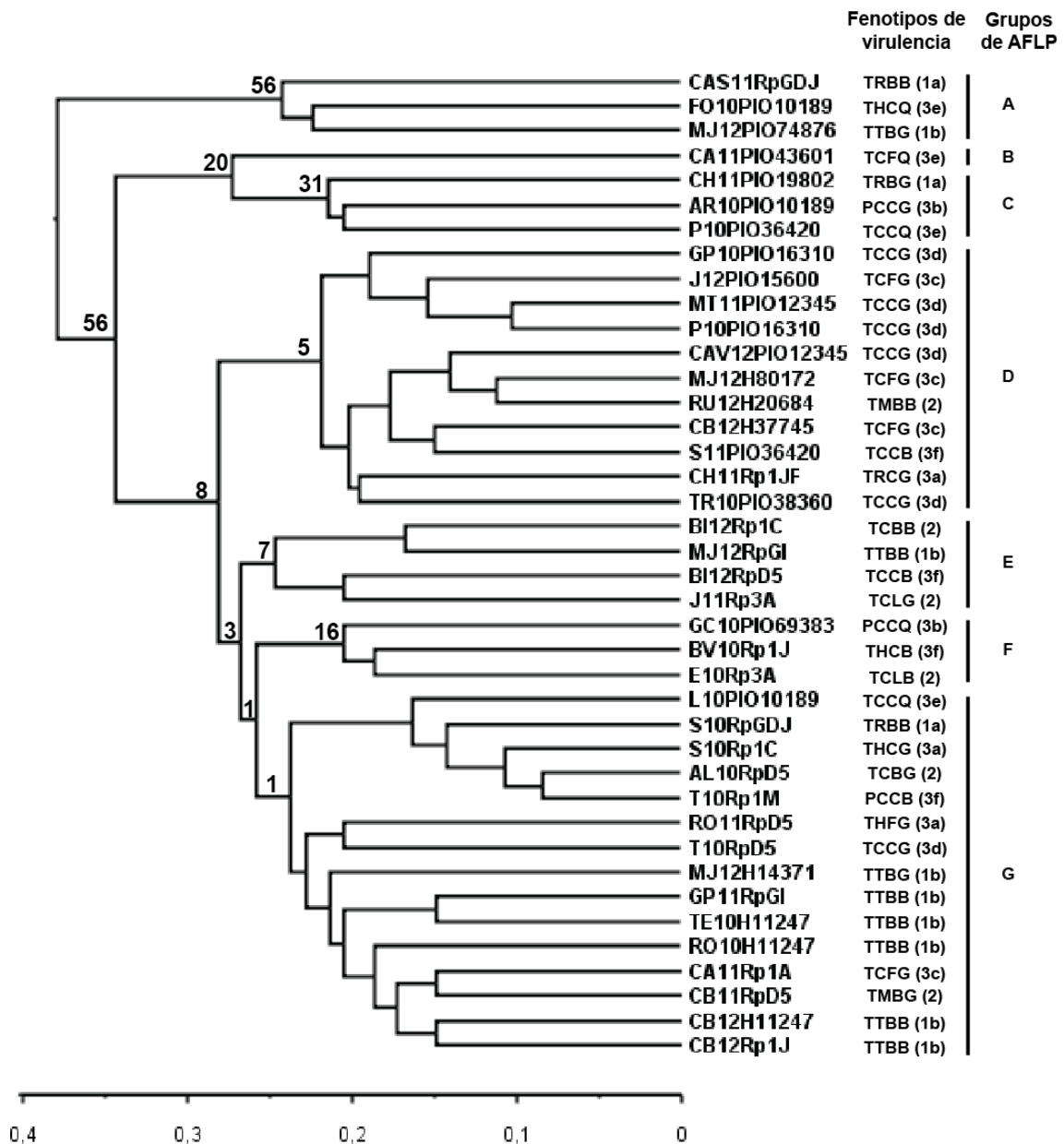


**Fig. 13.** Gráfico de Análisis de coordenadas principales basado en los tipos de reacción de 65 aislamientos sobre 14 líneas diferenciales. La matriz de distancia utilizada para el gráfico fue aquella calculada a partir de la distancia Euclidiana

Con el objetivo de evaluar si los grupos de virulencia diferían en el nivel estadístico, se realizó un análisis de AMOVA donde el grado de diferenciación en el nivel de virulencia se midió mediante  $\Phi_{PT}$  ( $\Phi_{PT}$ ). El análisis se realizó sobre los grupos 1, 2 y 3, sin incluir el grupo 4, porque el análisis requiere que cada grupo a comparar este compuesto de por lo menos 8 individuos cada uno (Peakall & Smouse 2006, 2012), tampoco se evaluaron diferencias entre subgrupos por la misma razón. Los 3 grupos se diferenciaron significativamente entre sí. El valor de  $\Phi_{PT}$  entre los grupos 1 y 2 fue 0,681 ( $P=0,001$ ), entre los grupos 1 y 3 fue 0,711 ( $P=0,001$ ) y entre los grupos 2 y 3 fue 0,453 ( $P=0,001$ ).

Para los análisis moleculares, 11, 6 y 23 aislamientos fueron seleccionados de los grupos de virulencia 1, 2 y 3, respectivamente, con el objetivo de tener una muestra representativa del número total de aislamientos (Fig. 12). No todos los aislamientos del grupo 2 pudieron ser evaluados ya que dos de los mismos perdieron su viabilidad a pesar de estar almacenados en nitrógeno líquido. Setenta y seis bandas polimórficas de AFLPs derivadas de 26 combinaciones de cebadores fueron evaluadas sobre los aislamientos seleccionados (Tabla 6). Cada aislamiento mostró un genotipo único de AFLPs, es decir que pudieron diferenciarse los 40 aislamientos. En el dendrograma basado en los genotipos de AFLP, los 40 aislamientos fueron agrupados en 7 grupos

designados de la A a la G utilizando un valor de disimilitud umbral de 25% (Fig. 14). Los valores de bootstrap fueron bajos indicando que las diferencias genéticas entre los grupos no son lo suficientemente importantes para validar el agrupamiento observado. Sin embargo, en el análisis de AMOVA los grupos D y G con 11 y 15 aislamientos, respectivamente mostraron diferencias genéticas significativas ( $\Phi_{PT} = 0,237$ ,  $P=0,001$ ). Los grupos de AFLP agruparon aislamientos de distintos grupos de virulencia, solamente el grupo D tendió a agrupar aislamientos derivados de un mismo grupo de virulencia, 10 de los 11 aislamientos de este grupo pertenecían al grupo 3. El aislamiento CA11PIO43601 resultó bastante distinto del resto de los aislamientos separándose con un valor de disimilitud de 27,31%. Los 6 aislamientos con fenotipo TTBB analizados fueron agrupados en los grupos G y E, los 4 aislamiento con fenotipo TCFG y los 6 aislamientos con fenotipo TCCG analizados fueron agrupados tanto en el grupo D como en el grupo G. De cada uno de los siguientes fenotipos TRBB, TTBG, TCCB y TCCQ fueron analizados dos aislamientos que también fueron agrupados en distintos grupos de AFLP. Mediante el test de Mantel se evaluó la existencia de correlación entre la matriz de distancia basada en los marcadores de AFLP para los 40 aislamientos con la matriz basada en los fenotipos de virulencia calculada para estos aislamientos. El coeficiente de correlación fue de 0,156 ( $P=0,013$ ), indicando una baja pero positiva correlación. La existencia de diferencias en el nivel molecular entre los grupos de virulencia 1, 2 y 3 fue evaluado mediante AMOVA, para ello los genotipos de AFLP de los 40 aislamientos fueron agrupados de acuerdo a los 3 grupos de virulencia a los cuales pertenecían. Solo los grupos de virulencia 1 y 3 mostraron diferencias significativas ( $\Phi_{PT} 0,067$ ,  $P=0,011$ ), mientras que los aislamientos del grupo 2 no se distinguieron de los aislamientos del grupo 1 ( $\Phi_{PT} 0,015$ ,  $P= 0,288$ ) y del grupo 3 ( $\Phi_{PT} 0,006$ ,  $P= 0,367$ ).



**Fig. 14** Dendrograma basado en los genotipos de AFLP de 40 aislamientos de *P. sorghi* seleccionados de los grupos de virulencia 1, 2 y 3. Los números sobre cada nodo se corresponden a los valores porcentuales de bootstrap generados mediante 1001 permutaciones. Entre paréntesis se indica al subgrupo al cual pertenece cada aislamiento

- Trigo

### Detección de genes de resistencia

Buck Poncho (BP), Purple Straw (P) y la población F<sub>9</sub> de 96 líneas RILs fueron inoculadas en el estadio de plántula y planta adulta con las ocho razas del patógeno (Tabla 13). Purple Straw resultó susceptible en ambos estadios. BP resultó susceptible en el estadio plántula frente a las razas Ca07DMC y Ma07KE y resistente a las razas Ma07BG, 66, Ba08A801, Ba08Bg18, Ba08PIG y 77M. Las razas Ma07BG, 66, Ba08Bg18 y Ba08PIG detectaron un único gen de resistencia mientras que las razas Ba08A801 y 77M detectaron dos genes de resistencia cada una (Tabla 14). El gen detectado por la raza Ma07BG fue designado *LrBP1* porque resultó distinto de los detectados por las razas 66, Ba08Bg18 y Ba08PIG (Tabla 15). Mientras que las razas 66, Ba08Bg18 y Ba08PIG detectaron el mismo gen de plántula y fue designado *LrBP2*. Los genes de plántula detectados por las razas 77M y Ba08A801 fueron los designados *LrBP1* y *LrBP2*. Estos genes segregaron independientemente uno del otro.

**Tabla 13** Tipos de reacción producidos por Buck Poncho y Purple Straw cuando fueron inoculados con las ocho razas de *P. triticina*.

Razas <sup>a</sup>	Designación de la razas <sup>b</sup>	Buck Poncho		Purple Straw	
		Plántula	Adulta	Plántula	Adulta
Ma07BG	CHTNMQB	0;	0;	4	2++34
66	DBBSKBB	0;	0;	4	2++34
Ba08A801	MFPNQQB	0;1	0;1	34	2++34
Ba08Bg18	MFPSQLB	0;1	0;1	4	2++34
Ba08PIG	MFPSQLL	1+2 <sup>c</sup>	0;1	4	34
Ca07DMC	MFTSSQB	22+	22+	4	34
Ma07KE	TFTSSQB	2++3	22+	4	34
77M <sup>c</sup>	TGDBPLB	0;1	0;1	4	2++3

<sup>a</sup> Razas designadas en función de la nomenclatura utilizada en el Instituto de Genética.

<sup>b</sup> Razas designadas de acuerdo a la nomenclatura propuesta por Long y Kolmer (1989)

<sup>c</sup> Raza que detectó resistencia en planta adulta

**Tabla 14** Segregación para los tipos de reacción de las 96 F<sub>9</sub> líneas RILs producto del cruzamiento entre Buck Poncho x Purple Straw para seis razas de *P. triticina*.

Estadio	Raza	Genes detectados	Nro. de líneas		Segregación esperada	P
			Res	Sus		
Plántula	Ma07BG	<i>LrBP1</i>	55	41	1:1	0.15
Plántula	66, Ba08Bg18, Ba08PIG	<i>LrBP2</i>	47	49	1:1	0.84
Plántula	Ba08A801, 77M	<i>LrBP1+LrBP2</i>	76	20	3:1	0.35
Adulta	77M <sup>a</sup>	<i>LrBP3</i>	9	11	1:1	0.65

<sup>a</sup> Resultado obtenido para las líneas que no poseen los genes *LrBP1* y *LrBP2*.

**Tabla 15** Análisis genético de independencia para los genes de resistencia detectados en plántula y planta adulta en las 96 F<sub>9</sub> líneas RILs del cruzamiento entre Buck Poncho x Purple Straw.

Genes	Segregación				Segregación esperada	P
	R-R	R-S	S-R	S-S		
<i>LrBP1</i> versus <i>LrBP2</i>	26	29	21	20	1:1:1:1	0.8
<i>LrBP1</i> versus <i>LrBP3</i>	0	0	10	10	0:0:1:1	1
<i>LrBP2</i> versus <i>LrBP3</i>	0	0	10	10	0:0:1:1	1

R, resistente; S, susceptible.

Teniendo en cuenta los genes identificados por cada raza y comparando los tipos de reacción producidos por las ocho razas sobre las líneas isogénicas portadoras cada una de un gen de resistencia y BP, se evaluó si los genes *LrBP1* y *LrBP2* podían ser genes de resistencia en plántula ya descritos. Como las razas Ca07DMC y Ma07KE resultaron avirulentas sobre las líneas NILs portadoras de los genes *Lr2a*, *2c*, *9*, *16*, *18*, *19*, *21*, *25*, *28*, *29* y *32* y resultaron virulentas sobre BP, es que estos genes pueden ser descartados como candidatos (Tabla 16). Las razas 66, Ba08Bg18 y Ba08PIG detectaron al gen *LrBP2* y compartieron avirulencias sobre los genes *Lr2a*, *9*, *11*, *16*, *18*, *21*, *25*, *29* y *32*. Si de este set de genes se descartan los genes detectados por las razas Ca07DMC y Ma07KE, el único gen candidato para el *LrBP2* fue el *Lr11*. Por otra parte, la raza Ma07BG que detectó al *LrBP1* resultó avirulenta sobre las líneas NILs con los genes *Lr1*, *2a*, *2c*, *9*, *10*, *14b*, *18*, *19*, *20*, *21*, *24*, *25*, *29* y *32*. Omitiendo las líneas NILs resistentes a las razas Ca07DMC y Ma07KE, los genes *Lr1*, *Lr10*, *Lr14b*, *Lr20* y *Lr24* resultaron como posibles candidatos para el *LrBP1*. Las razas Ba08A801 y 77M también detectaron al gen *LrBP1*, por lo tanto en función de las líneas NILs a las cuales estas dos razas y la raza Ma07BG resultaron avirulentas, el único gen candidato para el *LrBP1* fue el *Lr10*.

**Tabla 16** Análisis de genes de resistencia candidatos en Buck Poncho

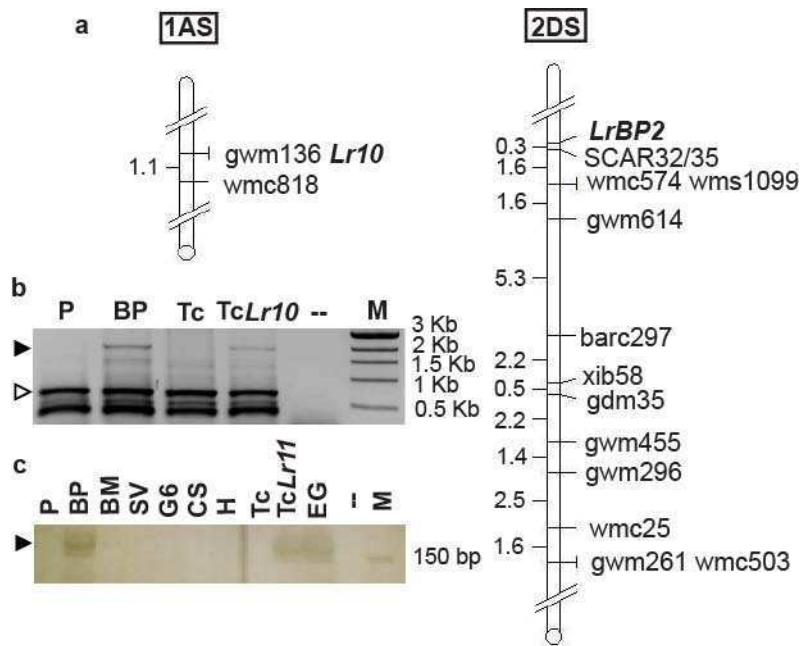
Raza	Genes detectados	Avirulencias sobre líneas NILs	Genes candidatos
Ma07BG	<i>LrBP1</i>	<i>1</i> , <i>2a</i> , <i>2c</i> , <i>9</i> , <i>10</i> , <i>14b</i> , <i>18</i> , <i>19</i> , <i>20</i> , <i>21</i> , <i>24</i> , <i>25</i> , <i>29</i> , <i>32</i>	<i>10</i>
66	<i>LrBP2</i>	<i>1</i> , <i>2a</i> , <i>3a</i> , <i>3ka</i> , <i>3bg</i> , <i>9</i> , <i>11</i> , <i>15</i> , <i>16</i> , <i>17</i> , <i>18</i> , <i>19</i> , <i>21</i> , <i>24</i> , <i>25</i> , <i>26</i> , <i>29</i> , <i>30</i> , <i>32</i>	<i>11</i>
Ba08Bg18	<i>LrBP2</i>	<i>2a</i> , <i>2c</i> , <i>9</i> , <i>11</i> , <i>16</i> , <i>18</i> , <i>19</i> , <i>20</i> , <i>21</i> , <i>23</i> , <i>25</i> , <i>28</i> , <i>29</i> , <i>32</i>	<i>11</i>
Ba08PIG	<i>LrBP2</i>	<i>2a</i> , <i>2c</i> , <i>9</i> , <i>11</i> , <i>16</i> , <i>18</i> , <i>20</i> , <i>21</i> , <i>23</i> , <i>25</i> , <i>28</i> , <i>29</i> , <i>32</i>	<i>11</i>
Ba08A801	<i>LrBP1</i> , <i>LrBP2</i>	<i>2a</i> , <i>2c</i> , <i>9</i> , <i>10</i> , <i>11</i> , <i>16</i> , <i>18</i> , <i>19</i> , <i>20</i> , <i>21</i> , <i>25</i> , <i>28</i> , <i>29</i> , <i>32</i>	<i>10</i> , <i>11</i>
77M	<i>LrBP1</i> , <i>LrBP2</i>	<i>3ka</i> , <i>9</i> , <i>10</i> , <i>11</i> , <i>14a</i> , <i>14b</i> , <i>18</i> , <i>19</i> , <i>21</i> , <i>23</i> , <i>24</i> , <i>25</i> , <i>26</i> , <i>29</i> , <i>30</i> , <i>32</i> , <i>B</i>	<i>10</i> , <i>11</i>
Ca07DMC	-	<i>2a</i> , <i>2c</i> , <i>9</i> , <i>16</i> , <i>18</i> , <i>19</i> , <i>21</i> , <i>25</i> , <i>28</i> , <i>29</i> , <i>32</i>	-
Ma07KE	-	<i>9</i> , <i>16</i> , <i>18</i> , <i>19</i> , <i>21</i> , <i>25</i> , <i>28</i> , <i>29</i> , <i>32</i>	-



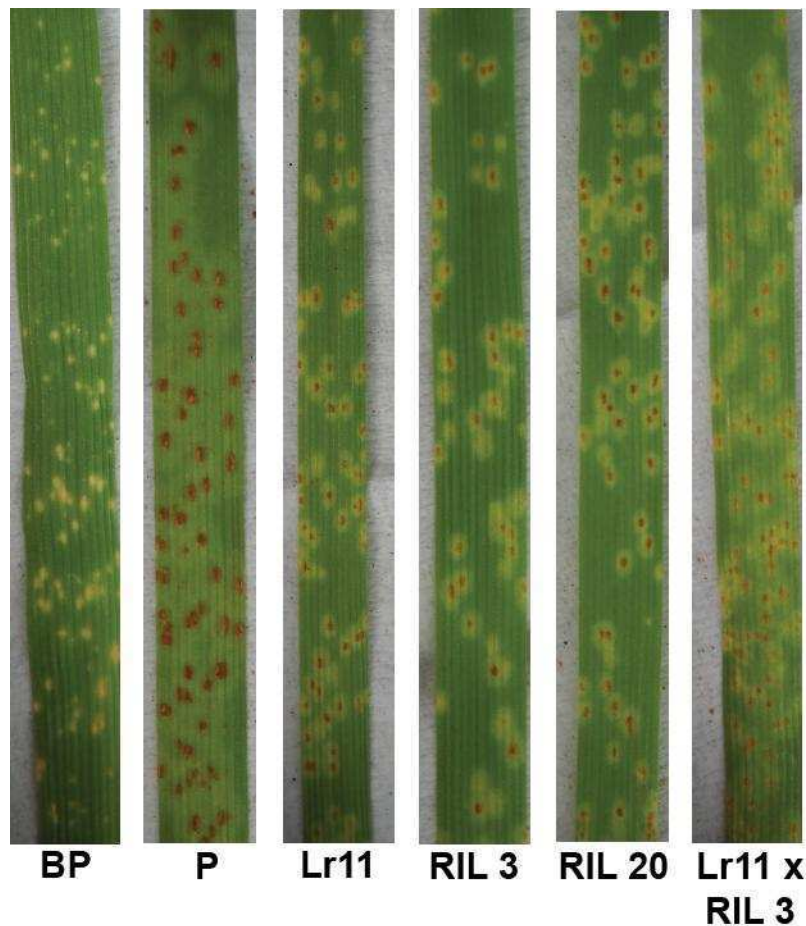
## Marcadores asociados a los genes de resistencia

Con el objetivo de evaluar si el gen *LrBP1* podría ser el gen *Lr10*, los marcadores microsatélites (SSR) *gwm136* y *wmc818*, previamente reportados ligados al gen *Lr10* en el cromosoma 1AS (Somers y col. 2004), fueron evaluados sobre la población de 196 líneas RILs donde previamente se había genotipado el gen *LrBP1* para el resto de las líneas mediante la raza Ma07BG (Tabla A5). El marcador *gwm136* co-segregó con el gen *LrBP1* mientras que el marcador *wmc818* se posicionó a 1,1 cM proximal al mismo (Fig. 15a). La identidad de este gen fue confirmada en BP mediante la amplificación del fragmento de 1.956 pb esperado mediante los cebadores THLr10H y THLr10E desarrollados a partir de la secuencia del gen *Lr10* (Fig. 15b).

Una prueba de alelismo fue llevada a cabo entre los genes *LrBP2* y *Lr11*. Todas las 608 F<sub>2</sub> plántulas producto del cruzamiento entre dos líneas RIL portadoras del gen *LrBP2* y la línea isogénica portadora del gen *Lr11* (Thatcher\*6/El Gaucho) resultaron resistentes a la raza 66 indicando que los genes *Lr11* y *LrBP2* son alélicos o genes estrechamente ligados (Fig. 16). Aunque el *Lr11* fue originalmente reportado en el cromosoma 2A (Soliman y col. 1964), mediante la metodología de BSA se identificaron once SSRs: *barc297*, *gdm35*, *gwm261*, *gwm296*, *gwm455*, *gwm614*, *wmc25*, *wmc503*, *wmc574*, *wms1099* y *Xib58* asociados al gen *LrBP2* y localizados en el cromosoma 2DS al evaluarlos sobre la colección de líneas nulli-tetrasómicas y ditelosómicas del cultivar Chinese Spring. Estos marcadores fueron evaluados sobre la población completa de líneas RILs donde previamente se había genotipado el *LrBP2* para el resto de las líneas mediante la raza 66 (Tabla A5). Todos los marcadores formaron un grupo de ligamiento, donde los marcadores *wmc574* y *wms1099* se localizaron a 1,9 cM proximales al gen de resistencia (Fig. 15a). En un intento por encontrar marcadores más cercanos se evaluaron, por BSA 100 combinaciones de cebadores AFLP y se identificó una banda de AFLP (P32/M35<sub>275</sub>) ligada a 0,3 cM proximal al gen *LrBP2*. Esta banda fue utilizada para desarrollar un marcador SCAR32/35 que amplificó la banda del tamaño esperado de 150pb en BP (Fig. 15a y c).



**Fig. 15 a)** Mapas genéticos de los brazos cromosómicos 1AS y 2DS del cruzamiento entre Buck Poncho X Purple Straw (190 RILs). Los marcadores están indicados a la derecha y las distancias genéticas (cM) están del lado izquierdo del mapa, respectivamente. **b)** Confirmación por PCR de la presencia del gen *Lr10* en Buck Poncho. P, Purple Straw; BP, Buck Poncho; Tc, Thatcher; Tc*Lr10*, línea NIL del cultivar Thatcher portadora del *Lr10*; --, control negativo (sin ADN); M, marcador molecular de 1Kb. Puntas de flechas llena y no llena indican los fragmentos de amplificación correspondientes al *Lr10* y actina, respectivamente. **c)** Gel de poliacrilamida mostrando la presencia de la banda del SCAR32/35 en Buck Poncho, Thatcher\*6/El Gaucho y El Gaucho. P, Purple Straw; BP, Buck Poncho; BM, Buck Manantial; SV, Sinvalocho MA; G6, Gamma 6; CS, Chinese Spring; H, Hope; Tc, Thatcher; Tc*Lr11*, Thatcher\*6/El Gaucho; EG, El Gaucho; --, control negativo (sin ADN); M, marcador molecular de 100pb. La punta de flecha llena indica el fragmento de PCR correspondiente al SCAR32/35



**Fig. 16.** Tipo de reacción para distintas líneas trigo inoculadas en plántula con la raza 66. BP: Buck Poncho, P: Purple Straw, *Lr11*: Thatcher\*6/El Gaucho, RILs 3 y 20: líneas portadoras del gen *LrBP2* y utilizadas para los cruzamientos en la prueba de alelismo, Lr11 x RIL 3: línea F<sub>2</sub> derivada del cruzamiento entre la línea NIL portadora del *Lr11* y la línea RIL 3. Puede observarse que las líneas portadoras del *Lr11* o *LrBP2* poseen un tipo de reacción similar (reacción tipo 1+2). BP resultó más resistente (reacción tipo 0;) que el resto de estas líneas debido a probables efectos menores de otros genes presente en su fondo genético. P se observó completamente susceptible (reacción tipo 4)

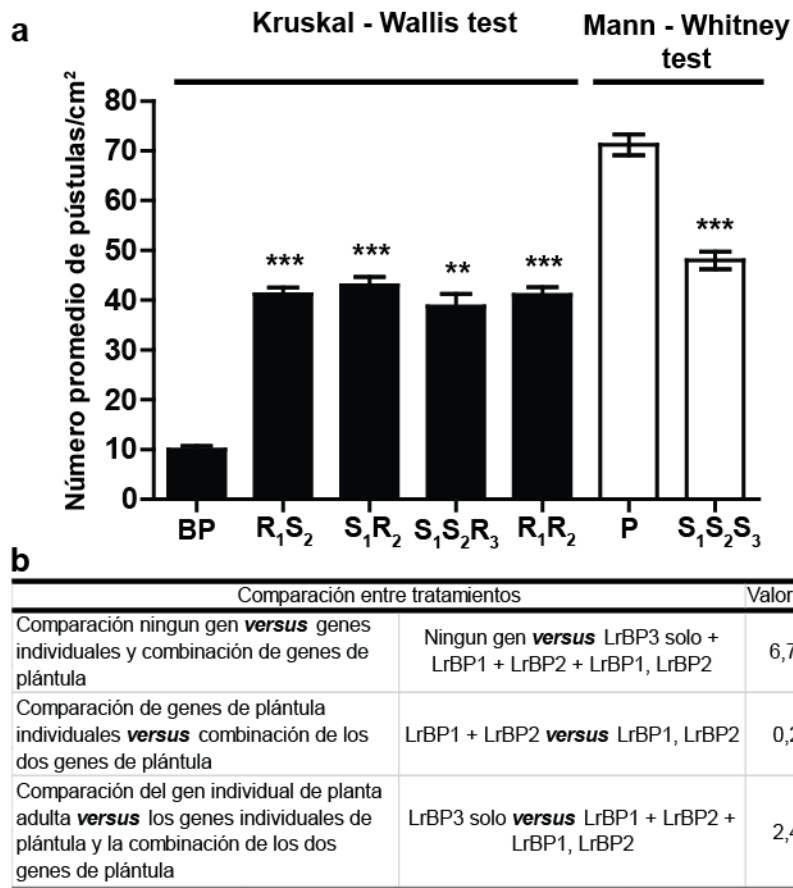
El SCAR32/35 fue evaluado sobre BP, Thatcher\*6/El Gaucho, El Gaucho y variedades control que no poseen el *Lr11*, como Purple Straw, Buck Manantial, Sivalocho MA, Gamma 6, Chinese Spring, Thatcher y Hope (Fig. 15c). El fragmento de PCR del SCAR32/35 solo amplificó en Buck Poncho, Thatcher\*6/El Gaucho y El Gaucho.

La raza 77M resultó avirulenta para los genes *LrBP1* y *LrBP2* en el estadio de plántula. Al evaluar la población de RILs con esta raza se identificaron 39 líneas RILs susceptibles al estadio de plántula, que al infectarlas con la misma raza al estadio de planta adulta permitió detectar la segregación de un gen de expresión en planta adulta, denominado *LrBP3*. El mismo segregó independientemente de los genes de plántula (Tabla 15). Mediante BSA, 13 marcadores SSRs fueron encontrados ligeramente asociados al gen *LrBP3*. Los SSRs: *barc118*, *barc171*, *barc146*, *cf190*, *gpw4257*, *gpw4312*, *gpw4347* y *gwm4675* cosegregaron y se encontraron a 13,2 cM del gen

mientras que los SSRs: *barc3*, *gwm1296*, *gwm1458*, *gwm1465* y *gpw7592* también cosegregaron y se encontraron a 17,4 cM del gen. Al evaluar la colección de líneas nulli-tetrasómicas y ditelosómicas de Chinese Spring con los 13 marcadores, los SSRs: *barc3*, *barc146*, *cf190*, *gpw4257*, *gpw4347*, *gpw7592*, *gwm1465* y *gwm4675* fueron localizados físicamente en el cromosoma 6AS, mientras que los marcadores *barc118*, *barc171*, *gpw4312*, *gwm1296* y *gwm1458* fueron localizados en el cromosoma 6AL.

### **Evaluaciones a campo**

Se debe aclarar que la presencia del gen *LrBP3* en las líneas RILs conteniendo uno o ambos genes de plántula no pudo ser determinada debido a que la raza 77M resultó avirulenta sobre los genes *LrBP1* y *LrBP2*. Las líneas RILs sin ninguno de los tres genes mostraron un mayor número de pústulas/cm<sup>2</sup> ( $P < 0,01$ ) que las líneas portadores únicamente del gen *LrBP3*, los genes individuales de plántula *LrBP1* o *LrBP2* y la combinación de ambos genes de plántula *LrBP1* + *LrBP2*, (valores promedio de pústulas/cm<sup>2</sup> 48 versus 38, 41, 43 y 41) (Fig. 17a y b). El número de pústulas/cm<sup>2</sup> resultó similar entre las líneas portadoras de ambos genes de plántulas (*LrBP1* + *LrBP2*) y las líneas portadoras de los genes individuales de plántula (*LrBP1* o *LrBP2*). Las líneas portadoras solamente del gen *LrBP3* no mostraron diferencias significativas en el número de pústulas con respecto a las líneas portadoras de un único gen de plántula (*LrBP1* o *LrBP2*) o de las líneas portadoras de ambos genes de plántula (*LrBP1* + *LrBP2*) (Fig. 17b). El número promedio de pústulas/cm<sup>2</sup> en BP (10 pústulas/cm<sup>2</sup>) fue significativamente menor al de las líneas portadoras solamente del *LrBP3*, de los genes de plántula *LrBP1* o *LrBP2* y de la combinación de ambos genes de plántula. El número promedio de pústulas/cm<sup>2</sup> en P (71 pústulas/cm<sup>2</sup>) resultó significativamente mayor al de las líneas sin ninguno de los tres genes indicando la presencia adicional de otros genes de resistencia (Fig. 17a).



**Fig. 17 a)** Número promedio de pústulas/cm<sup>2</sup> y desvíos estándar para las líneas parentales Buck Poncho (BP), Purple Straw (P) y las líneas RILs portadoras de los distintos genes de resistencia y sus combinaciones. R y S indican la presencia o ausencia del gen de resistencia, respectivamente. R<sub>1</sub>, *Lr10*; R<sub>2</sub>, *LrBP2*; R<sub>3</sub>, *LrBP3*. Las diferencias significativas entre BP y R<sub>1</sub>S<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>R<sub>2</sub>, S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>R<sub>3</sub>, R<sub>1</sub>R<sub>2</sub> (Kruskal-Wallis test), y P con S<sub>1</sub>S<sub>2</sub>S<sub>3</sub> (Mann-Whitney test) están indicadas con asteriscos arriba de las columnas. **b)** Contrastes ortogonales para comparaciones entre tratamientos. \*  $p < 0,05$ , \*\*  $p < 0,01$  y \*\*\*  $p < 0,001$

## **COLABORACIONES**

La evaluación de los marcadores AFLP sobre los aislamientos de *P. sorghi* fue realizado en colaboración con la Lic. Lucia Rochi (Instituto de Genética, INTA Castelar).

El análisis de los datos moleculares y fenotípicos de los aislamientos de *P. sorghi* fue realizado en colaboración con la Dra. Verónica Viviana Lia (Instituto de Biotecnología, INTA Castelar).

## DISCUSIÓN

### Evaluación del set de líneas de maíz

Ninguno de los genes *Rp* individuales, combinaciones de genes *Rp* y las líneas endocriadas de Pioneer resultaron resistentes a todos los aislamientos de *P. Sorghi* colectados en la zona núcleo maicera Argentina durante 2010 a 2012. Las líneas *Rp3-A* y PIO19802 resultaron ser las más resistentes en las evaluaciones en invernáculo con los distintos aislamientos, mientras que la línea PIO28760 resultó resistente en todas las evaluaciones realizadas a campo. Los genes *Rp* individuales: *Rp-G* y *Rp1-K*, las combinaciones de genes *Rp*: *Rp-G5*, *Rp-GI*, *Rp-GDJ*, *Rp-G5JD* y *Rp1-JC* y las líneas endocriadas PIO28760 y PIO17570 también mostraron un buen comportamiento tanto en las evaluaciones en invernáculo con los distintos aislamientos como en las distintas localidades evaluadas. La combinación de los genes mencionados arriba permitiría el desarrollo de una línea de maíz con buen nivel de tolerancia a la enfermedad. Por ejemplo la combinación en un solo genotipo por simple recombinación del gen *Rp3-A*, localizado en el cromosoma 3 con genes del área *rp1*, localizados en el cromosoma 10, con las líneas portadoras de genes *Rp*: *Rp1-K*, *Rp-G5*, *Rp-GI* y *Rp-G5JD* (líneas con genes *Rp* con mejor comportamiento frente a roya en ambas condiciones de evaluación), resultarían en una línea no solo tolerante a todos los aislamientos evaluados sino también de muy buen comportamiento a campo. Con respecto a las líneas Pioneer, PIO19802, PIO28760 y PIO17570, una vez conocida su composición genética de resistencia se podrían llevar a cabo una estrategia similar. Sin embargo, la durabilidad de un genotipo con múltiples genes de resistencia no puede ser predicha debido a que las poblaciones patógenas resultan ser altamente variables (McDonald & Linde 2002).

En las líneas PIO68752, PIO19802, PIO28760, PIO12345 y PIO17570 se observó resistencia en plántula. Los patrones de resistencia - susceptibilidad de estas 5 líneas frente a los 11 aislamientos no se encontraron correlacionados con los patrones observados para las líneas portadoras de genes *Rp* individuales o combinaciones de genes *Rp*. Posiblemente las líneas Pioneer sean portadoras de genes de resistencia no identificados. Sin embargo, pruebas de patogenicidad con distintos aislamientos que incluyan a las líneas Pioneer y todos los genes *Rp* identificados hasta el momento son necesarias para probar esta hipótesis.

Los patrones de resistencia - susceptibilidad para las líneas portadoras de combinaciones de genes *Rp* se encontraron correlacionados con los patrones de sus respectivos genes *Rp* individuales. Sin embargo, se observaron diferencias entre *Rp-G5* y *Rp-G* para 26 de los 66 aislamientos evaluados. Para estos aislamientos, *Rp-G5* tendió a ser más resistente que la línea *Rp-G* (Tabla 10 y A1). Un efecto mayor aditivo en la resistencia por parte del gen *Rp5* puede ser descartado por que la línea *Rp-D5* resultó susceptible a la mayoría de los aislamientos. Además, evaluaciones a campo realizadas en la Argentina reportaron un comportamiento susceptible para la línea *Rp5* (González 2000). Efectos residuales en la resistencia por parte del gen *Rp5* sobre el gen *Rp-G* podrían explicar los mayores niveles de resistencia observados. La resistencia residual

fue definida como el efecto de un gen mayor de resistencia sobre razas del patógeno virulentas para el gen (Pedersen & Leath 1988). Uno de los casos más estudiados es el caso del gen *Lr13* que confiere resistencia a roya de la hoja del trigo (*P. triticina*) en el estadio de planta adulta. Se observó en una línea de trigo portadora de los genes *Lr13* y *Lr16*, un incremento en la resistencia cuando fue inoculada en el estadio de plántula con razas del patógeno virulentas para el *Lr16*. Efectos residuales del gen *Lr16* producto de su interacción con el gen *Lr13*, el cual es inefectivo el plántula, podrían explicar el incremento en la resistencia (Samborski & Dyck 1982). Aunque los patrones de resistencia - susceptibilidad de las líneas *Rp1-J* y *Rp1-JC* se encontraron correlacionados en las evaluaciones en invernáculo con los distintos aislamientos; en las evaluaciones a campo la línea *Rp1-JC* resultó más resistente que la línea *Rp1-J* (Tabla 9 y A2). Posibles efectos residuales del gen *Rp1-C* sobre el gen *Rp1-J* que pudieron ser detectados en el estadio de planta adulta (R1) podrían explicar las diferencias en los tipos de reacción entre invernáculo y campo. En estudios previos los genes *Rp1-I*, *Rp1-E* y *Rp1-K* no pudieron ser distinguidos en su reacción de resistencia y en el nivel molecular poseen el mismo haplotipo Rp1 (Hulbert y col. 1991; Hulbert y col. 2001). En el presente trabajo se observó correlación en los patrones de resistencia - susceptibilidad entre las líneas *Rp-GI* con los genes *Rp-G* y *Rp1-K*, indicando que los genes *Rp1-I* y *Rp1-K* podrían ser los mismos (Tabla 10 y A1).

### **Resistencia en estadios posteriores a V2**

En maíz, el desarrollo vegetativo se puede dividir en dos fases: juvenil y adulta (Bongard-Pierce y col. 1996). Ambas fases poseen características morfológicas y fisiológicas que las distinguen. De la primera a la cuarta hoja se expresan los caracteres juveniles, de la quinta a la octava hoja se considera la zona de transición donde las hojas expresan características morfológicas y fisiológicas tanto de la fase juvenil como de la fase adulta. De la novena a la inflorescencia terminal (flor masculina) se expresan las características de la fase adulta (Abedon & Tracy 1996; Poething 1990). Con respecto a estas evidencias los estadios vegetativos V2 y V4, definidos por el número de hojas con collar foliar visible, podrían considerarse como juvenil o plántula al estadio V2 mientras que el estadio V4 podría considerarse un juvenil más avanzado. El estadio V6 representaría la zona de transición. Las líneas PIO68752, PIO28427 y PIO36420 resultaron más resistentes en las evaluaciones a campo de lo esperado en función del comportamiento observado en plántula frente a los distintos aislamientos. En estas tres líneas se identificó un nuevo tipo de resistencia a roya común cuya expresión comienza en el estadio foliar V4 a partir de la cuarta hoja. En trigo existe un tipo de resistencia denominado resistencia en planta adulta donde la expresión de la misma puede comenzar en cualquier estadio posterior al de plántula (primera y segunda hoja) (Samborski 1985). La resistencia identificada en estas tres líneas de maíz sería de este tipo pero se decidió llamarla resistencia de expresión tardía en plántula debido a que en maíz la resistencia de planta adulta se la asocia como un tipo especial de resistencia parcial o general (Headrick & Pataky 1987). En las hojas evaluadas de los estadios



foliares V4 y V6 se observó en general en la base de las hojas un mayor número de pústulas esporulantes que hacia la punta de las mismas. Estas evidencias sugieren que la resistencia de expresión tardía en plántula podría asociarse con la reacción Z, la cual se caracteriza por fleck necrótico hipersensible hacia la punta de las hojas y pústulas esporulantes hacia la base de la misma (Van Dyke & Hooker 1968). Sin embargo, estudios que cuantifiquen el tamaño y número de pústulas esporulantes en la base y punta de las hojas de las líneas PIO68752, PIO28427 y PIO36420 son necesarios para probar esta hipótesis.

Como se mencionó más arriba, a medida que la planta de maíz se desarrolla, las hojas poseen características morfológicas y fisiológicas que las distinguen (Abedon & Tracy 1996; Poething 1990). La tendencia en el aumento de la resistencia en el estadio foliar V6 con respecto al estadio foliar V4 podría ser consecuencia de dichas características en las hojas. Estudios que correlacionen la severidad de la enfermedad con características morfológicas y fisiológicas de las hojas en los estadios juveniles, de transición y de planta adulta son necesarios para probar esta hipótesis.

La acumulación de genes de resistencia podría ser una estrategia que incremente la durabilidad frente a la enfermedad. Flor (1971) señaló que cultivares con dos o más genes de resistencia tendrían una menor posibilidad de sucumbir a la enfermedad que cultivares que solo posean un gen de resistencia. Por lo tanto la durabilidad de la resistencia dependería del número de genes de resistencia y la habilidad del patógeno de acumular en un solo genotipo las virulencias correspondientes. Por este motivo es que la durabilidad de una combinación de genes no puede ser predicha. El desarrollo de genotipos con combinaciones de los genes provenientes de las líneas *Rp1-K*, *Rp3-A*, *Rp-G5*, *Rp-GI*, *Rp-G5JD*, PIO19802, PIO28760, PIO17570, PIO68752 y PIO28427 conferiría buenos niveles de tolerancia frente a la enfermedad. Sin embargo dichas combinaciones deben ser evaluadas varios años en distintas localidades de la zona núcleo Argentina y con aislamientos del patógeno para determinar cuáles puedan resultar durables.

## Resistencia parcial

Para el caso de maíz no existen reportes acerca de metodologías que permitan medir el período de latencia en condiciones de invernáculo de forma sencilla y que no insuman demasiado tiempo de trabajo. Shaner (1980) adaptó la transformación probit propuesta por Finney (1952) para el análisis de curvas sigmoideas, al análisis de resistencia parcial para la interacción *P. triticina* – *T. aestivum*. La transformación probit permite medir el período de latencia ( $T_{50}$ ) mediante el conteo alternado de la proporción de pústulas esporulantes que surgen los *ith* días luego de la inoculación, reduciendo el tiempo de evaluación. En las últimas décadas con el desarrollo de programas informáticos, el período de latencia se pudo calcular mediante la utilización de fórmulas que describen curvas del tipo sigmoidea que se ajusta a la proporción de pústulas en función de los *ith* días luego de la inoculación (Webb & Nutter Jr 1997). El objetivo de una regresión es encontrar los parámetros de una recta (pendiente y ordenada al origen) o curva que mejor se ajusten a nuestros datos. En función de esta premisa es que debe tenerse cuidado al momento de elegir un modelo, en general se tiende a utilizar la regresión lineal porque resulta más sencilla de interpretar por el ojo humano. Sin embargo, la transformación de nuestros datos para que se ajusten a una regresión lineal puede llevar a errores en el cálculo de nuestras variables. El modelo de dosis – respuesta se ajustó mejor a los datos siendo el valor promedio de  $R^2$  igual a  $99,6\pm 0,008\%$  mientras que el modelo de transformación probit se ajustó a los datos con un valor promedio de  $R^2$  igual  $95,4\pm 0,055\%$ . Por otra parte la transformación probit no utiliza los valores de proporción de pústulas iguales a 0 y 1 ya que la transformación de los mismos tiende a menos y más infinito, respectivamente. El modelo de dosis – respuesta utiliza todo los valores para el cálculo de los parámetros de la curva de manera que se podría obtener un valor del  $T_{50}$  más exacto. Sin embargo, para las tres líneas evaluadas no se observaron diferencias en el período de latencia promedio, tanto fuera calculado mediante la transformación probit o el modelo de dosis – respuesta. Solo la línea PIO12345 mostró diferencias significativas para el  $T_{50}$  promedio calculado mediante ambos métodos, sin embargo el valor de la significación resultó ser bajo ( $P < 0,05$ ). Para determinar cuál de los dos modelos resulta más exacto se debería comparar para cada método los valores del  $T_{50}$  promedio calculados a partir de conteos diarios y alternados de pústulas y evaluar si algún método de desvía más del valor real.

En función de que los  $T_{50}$  promedio resultaron significativamente mayores en las líneas PIO74876 y PIO12345 con respecto a la línea control PIO16310 puede determinarse la existencia de resistencia parcial en las mismas. La línea PIO74876 resultó ser la de mayor  $T_{50}$  promedio,  $9,58\pm 0,43$  días para el modelo probit y  $9,38\pm 0,41$  días para el modelo de dosis - respuesta, diferenciándose significativamente del resto de las líneas. La línea PIO12345 exhibió un  $T_{50}$  promedio,  $8,56\pm 0,46$  y  $8,18\pm 0,32$  días para los modelos de probit y dosis – respuesta, respectivamente menor al de PIO74876 pero se diferenció significativamente de la línea PIO16310 que resultó ser la de menor  $T_{50}$  promedio,  $7,73\pm 0,44$  y  $7,43\pm 0,31$  días para los modelos de probit y dosis – respuesta, respectivamente.

La medición del  $T_{50}$  promedio mediante estas metodologías en una población segregante resultaría complejo por el elevado número de líneas a evaluar. Por lo tanto estas metodologías serían útiles para detectar resistencia parcial en líneas de maíz. Si el objetivo es identificar genes responsables de este tipo de resistencia se debería seleccionar como padres a líneas con fenotipos extremos para el período de latencia y evaluar a las líneas de la población mediante algún tipo de escala visual. Por ejemplo la mayoría de las réplicas de la línea PIO74876 no exhibieron pústulas esporulantes el día 6 luego de la inoculación, mientras que para la mayoría de las réplicas de la línea PIO16310, si se observaron pústulas esporulantes en el día 6 (Tabla A3). Evaluaciones sobre la población segregante al día 6 luego de la inoculación permitiría identificar líneas con menor o mayor grado de resistencia parcial.

### **Estudio de la estructura poblacional de *P. sorghi***

La roya común es una importante enfermedad del maíz en la Argentina, pero hasta el momento no se han realizado estudios acerca de su población. Los 65 aislamientos analizados se agruparon en 4 grupos de virulencia, en función del análisis de UPGMA basado en las reacciones de avirulencia – virulencia de los aislamientos evaluados sobre un set de 14 líneas diferenciales de maíz. El agrupamiento observado fue definido en función de un valor de disimilitud arbitrario y los valores de bootstrap resultaron bajos para los distintos grupos o subgrupos como consecuencia del bajo número de líneas diferenciales utilizadas como caracteres. Sin embargo, los análisis realizados mediante PcoA y AMOVA validaron la existencia de por lo menos los grupos 1, 2 y 3 de virulencia. En el dendrograma basado en las reacciones de avirulencia - virulencia el aislamiento del grupo 4, se distinguió del resto de los aislamientos como consecuencia de ser el único avirulento sobre el gen *Rp1-A* y su separación se debería al bajo número de líneas diferenciales utilizadas. En el PcoA no se distinguió del grupo 3 y exhibió un patrón de avirulencia - virulencia similar a los aislamientos del subgrupo 3e, donde los aislamientos de este último se distinguieron del aislamiento del grupo 4 en las virulencias sobre los genes *Rp1-A* y *Rp1-D*. Si bien no fue evaluado mediante marcadores moleculares estas evidencias indicarían que el aislamiento del grupo 4 habría derivado de algún aislamiento del grupo 3.

Estudios realizados sobre las poblaciones de roya de la hoja del trigo en América del Norte, utilizando marcadores SSRs, un set de líneas diferenciales del hospedante y aislamientos colectados desde 1980 a 2005 identificaron la existencia de por lo menos 5 grupos o poblaciones que no solo poseían diferencias en el nivel molecular sino también en el nivel de virulencia. Las diferencias entre grupos se deberían: a la introducción de aislamientos foráneos que habrían dado origen a cada uno de los grupos; la especialización observada en uno de los grupos por los cultivares de trigo denominados soft white wheat y soft red wheat (sembrados a lo largo de la costa este), y la reproducción clonal o asexual que promueve las diferencias entre grupos (Ordoñez & Kolmer 2009). En las poblaciones de roya estriada del trigo en Estados Unidos y de roya del tallo de la avena (*Puccinia graminis* f. sp. *avenae*) en Australia, también se

observaron grupos de aislamientos que diferían en los niveles molecular y de virulencia. Las diferencias entre grupos se podrían deber a la introducción de aislamientos foráneos y la reproducción clonal o asexual (Cheng & Chen 2014; Haque y col. 2008). Los grupos 1, 2 y 3 de virulencia no mostraron diferencias significativas a nivel molecular. Aunque el AMOVA realizado mostró diferencias en el nivel genético entre los grupos 1 y 3, el valor de  $\Phi_{PT}$  fue bajo (0,067). Además, no se observó correlación entre los dendrogramas basados en los fenotipos de virulencia y loci AFLP, ya que el coeficiente de correlación fue bajo ( $R = 0,156, P=0,013$ ). Estas evidencias indicaron que los grupos de virulencias observados no diferían a nivel genético y que los aislamientos de un mismo grupo pueden tener distintos orígenes dentro de la población. Por otra parte, tampoco se observaron valores de bootstrap altos (mayores al 95%) para los 7 grupos definidos en el dendrograma basado en los genotipos de AFLP, indicando que no existen diferencias genéticas importantes entre los grupos como para validar dichos agrupamientos. La falta de diferencias genéticas entre los grupos de virulencia y grupos de AFLP indicaría que la población de *P. sorghi* se habría originado a partir de una sola introducción de la cual derivaron todos aislamientos colectados. Sin embargo, el análisis de AMOVA mostró diferencias significativas importantes ( $\Phi_{PT}= 0,237 P=0,001$ ) entre los grupos de AFLP D y G lo cual indicaría que estos dos grupos podrían tener orígenes distintos. La evaluación de un mayor número de aislamientos de manera de poseer por lo menos 10 aislamientos para cada uno de los siete grupos de AFLP, permitirían identificar la existencia de otros grupos con diferencias en el nivel genético mediante AMOVA. Con el objetivo de profundizar el estudio acerca de la estructura de la población de *P. sorghi*, la utilización de marcadores SSRs permitiría la utilización del enfoque Bayesiano implementado en el programa Structure propuesto por Pritchard y col. (2000) para el estudio de la estructura poblacional, de esta manera se podría comparar el número de grupos obtenidos por ambos métodos con el fin de determinar si en la población *P. sorghi* existen grupos con diferencias genéticas que puedan indicar que los grupos hayan derivado de distintas introducciones del patógeno

Como se mencionó previamente, ninguna de las líneas del set de maíz resultó resistente a todos los aislamientos evaluados. Se identificaron 26 fenotipos de virulencia o razas, pero si se considera al análisis de AFLPs para definir razas estas ascienden a 40. Las variaciones en el nivel molecular no solo fueron observadas entre aislamientos con diferentes fenotipos de virulencia sino también en aislamientos con el mismo fenotipo, los cuales no se agruparon en el mismo grupo en el dendrograma basado en los loci AFLPs, lo cual coincide con la falta de diferencias genéticas entre grupos de virulencia. Aislamientos con igual fenotipo de virulencia pero con diferencias en su genotipos también fueron observados en aislamientos de distintas especies de *Puccinia* analizadas por marcadores del tipo AFLP y RAPD (Chen y col. 1993; Kolmer 2001; Sun y col. 2007). Posiblemente aislamientos con el mismo fenotipo de virulencia puedan ser distinguidos con un mayor número de líneas diferenciales (Sun y col. 2007), lo cual sería cierto, ya que en el presente trabajo solo se utilizaron 14 líneas diferenciales de maíz, donde las líneas *Rp1-A*, *Rp1-C* y *Rp1-M* resultaron susceptibles a casi todas las razas evaluadas. Por otra parte, estas evidencias también sugieren que la población de *P.*

*sorghii* es altamente variable. La existencia de diferentes fenotipos de virulencia se debería a la utilización de distintas fuentes de resistencia por parte de las compañías semilleras de maíz, que seleccionarían distintos fenotipo de virulencia. Evaluaciones realizadas en el estadio de plántula sobre 13 híbridos comerciales de maíz provenientes de las 4 compañías más importantes de la Argentina (Pioneer, Dekalb, Syngenta y Nidera) con los 65 aislamientos, mostraron diferencias en sus patrones de resistencia – susceptibilidad indicando que las compañías emplean distintas fuentes de resistencia en sus programas de mejoramientos (*Información no mostrada*).

La variación observada en las especies de *Puccinia* puede ser explicada por reproducción sexual, mutación e hibridación somática (Liu & Kolmer 1998; Park y col. 1999; Steele y col. 2001). El ciclo sexual de *P. sorghii* puede ocurrir sobre *Oxalis corniculata* L (Hooker 1985). Sin embargo, en la Argentina la presencia de *O. corniculata* ha sido observada en distintas localidades sin síntomas de la enfermedad sugiriendo que la especie de *O. corniculata* es resistente a la enfermedad o que las condiciones ambientales no son propicias para el desarrollo del ciclo sexual. Posiblemente las fuentes de variación en la población de *P. sorghii* sean la mutación o la hibridación somática, sin embargo se requiere realizar estudios genéticos para probar esta hipótesis.

En poblaciones de Puccinias como la de roya de la hoja del trigo (*P. triticina*) en América del Norte o la de roya estriada del trigo (*P. striiformis*) en Francia evaluadas mediante aislamientos colectados por más de 10 años sobre un set de líneas diferenciales del hospedante y variedades comerciales, se observaron cambios en las virulencias a lo largo de los años como consecuencia de la implementación de nuevos genes de resistencia en las variedades comerciales, indicando que las poblaciones están sujetas a presión de selección por parte de estos genes (De Vallavieille-Pope y col. 2012; Kolmer y col. 2008). Dentro de este contexto cabe destacar que no se realizaron evaluaciones para determinar la existencia de diferencias genéticas o de fenotipos de virulencia entre los años de evaluación ya que el número de aislamientos colectados por año y evaluados mediante marcadores AFLP resultaron ser bajos, por lo tanto las potenciales diferencias entre años podrían deberse a efectos de muestreo más que a un efecto propio en la población. La evaluación a lo largo de los años de un mayor número de aislamientos sobre un set de líneas diferenciales de maíz e híbridos comerciales, y mediante marcadores moleculares permitiría obtener información más robusta acerca de los cambios genéticos y de virulencia a lo largo de los años.

Como se mencionó en la introducción distintos coeficientes son utilizados para establecer relaciones de semejanza entre dos OTU sin que en dicho trabajos se discuta la elección del mismo (Kosman & Leonard 2005). Para el caso de análisis mediante AFLP se propone la utilización del coeficiente de Jaccard que a diferencia de la distancia Euclidiana no utilizan la doble ausencia para el cálculo de la similitud entre dos OTU. La doble ausencia es particularmente susceptible a homoplasia porque existen independientes caminos por el cual un fragmento se pierda (Meudt & Clarke 2007). Sin embargo, otros autores postulan que este argumento ignora el alto grado de identidad de

secuencia de ADN que existe entre individuos de una misma especie de hongos y proponen utilizar la doble ausencia en el cálculo (Kosman & Leonard 2005).

Con el objetivo de comparar si existían diferencias en las relaciones de similitud calculadas por la distancia Euclidiana y el coeficiente de Jaccard se calcularon los coeficientes de correlación entre matrices mediante el test de Mantel. Los coeficientes de correlación calculados tanto para los datos moleculares como para los fenotipos de virulencia resultaron ser mayores al 85% (Tabla 17), indicando que ambos coeficientes podían ser utilizados. Se decidió realizar los análisis con la distancia Euclidiana ya que incorpora mayor información al momento de calcular el grado de semejanza entre individuos. Además puede ser utilizada para el cálculo del AMOVA ya que se trata de una distancia métrica a diferencia del coeficiente de Jaccard.

**Tabla 17.** Coeficientes de correlación (R) calculados para las comparaciones entre matrices de similitud obtenidas por distintos coeficientes.

Comparación entre coeficientes	Tipo de información	
	Fenotipos de virulencia	Loci AFLP
distancia Euclidiana <i>versus</i> coeficiente de Jaccard	R=0,977; P=0,001	R=0,856; P=0,001
distancia Euclidiana <i>versus</i> distancia binaria haploide <sup>a</sup>	R=1,000; P=0,001	R=0,967; P=0,001
coeficiente de Jaccard <i>versus</i> distancia binaria haploide	R=0,977; P=0,001	R=0,883; P=0,001

<sup>a</sup> La distancia binaria haploide es una variante de la distancia Euclidiana utilizada por el programa GenAlex para los cálculos de AMOVA.

### Estudios de las bases genéticas de resistencia durable en Buck Poncho

Tres genes de resistencia a roya de la hoja fueron identificados en el cruzamiento entre la variedad de resistencia durable Buck Poncho y Purple Straw. Los tres genes designados como *LrBP1*, *LrBP2* y *LrBP3* resultaron raza-específica y exhibieron la típica respuesta hipersensible frente a las razas avirulentas. Doscientos aislamientos colectados durante 9 años en la región pampeana Argentina, siempre que resultaron avirulentos sobre BP en el estadio de plántula también resultaron avirulentos sobre el *Lr10*, *Lr11* o en ambos genes (Sacco, *información no publicada*). La identificación del *LrBP1* como el *Lr10* fue confirmado mediante el análisis de las razas sobre las líneas NILs portadoras de genes individuales de resistencia, el ligamiento con los SSRs: *gwm136* y *wmc818* previamente reportados ligados al gen *Lr10* (Somers y col. 2004), y la amplificación en BP del fragmento de tamaño esperado de 1.956 pb para la combinación de cebadores desarrolladas a partir de la secuencia del *Lr10* por Feuillet y col. (2003). El gen *LrBP2* se encontró ligado a 11 SSRs: *barc297*, *gdm35*, *gwm261*, *gwm296*, *gwm455*, *gwm614*, *wmc25*, *wmc503*, *wmc574*, *wms1099* y *Xib58*, los cuales localizaron el cromosoma 2DS en función del análisis realizado con la colección de líneas nulli-tetrasómicas y ditelosómicas. Los genes de resistencia de expresión en plántula *Lr2a*, *Lr2b*, *Lr2c*, *Lr15* y *Lr39/Lr41* han sido localizados en el cromosoma 2DS

y podrían ser candidatos genéticos o alélicos para el gen *LrBP2* (McIntosh y col. 1995; Raupp y col. 2001; Singh y col. 2004). Sin embargo, la relación entre los genes *LrBP2* y *Lr11* observada en las pruebas de patogenicidad, la prueba de alelismo que indicó que ambos genes podrían ser alélicos o genes estrechamente ligados y la amplificación de la banda de tamaño esperada del SCAR32/35 en BP, Thatcher\*6/El Gaucho y El Gaucho indicarían que los genes *LrBP2* y *Lr11* serían el mismo gen. El *Lr11* fue originalmente localizado en el cromosoma 2A mediante análisis de monosómicos (Soliman y col. 1964). Esta técnica consiste en cruzar la línea portadora del gen de interés con una colección de líneas desarrolladas en el cultivar Chinese Spring donde a cada una le falta un cromosoma. Las progenies F<sub>2</sub> de cada cruzamiento son inoculadas con una raza avirulenta para el gen. La identificación del cromosoma “crítico” portador del gen de interés se basa en la detección de una segregación aberrante en donde el número de líneas susceptibles a la infección es nulo o resultan escasas como consecuencia de la falta del par cromosómico lo cual en general es inviable (Sears 1954). Recientemente, nuevos análisis de monosómicos fueron realizados por investigadores australianos que determinaron que el gen *Lr11*, en realidad localiza en el cromosoma 2DS (McIntosh, *comunicación personal*). Esta última evidencia estaría de acuerdo con el análisis molecular y genético realizado en este trabajo.

Los genes *LrBP2* y *Lr39/Lr41* comparten marcadores moleculares ligados, *gwm261*, *gwm296*, *gwm455* y *gdm35*, y para ambos genes no fue posible encontrar marcadores moleculares lo suficientemente distales que pudieran flanquearlo (Raupp y col. 2001; Singh y col. 2004; Sun y col. 2009); indicando que los loci de estos genes pueden estar relacionados y que localizaría en el extremo distal del brazo cromosómico. Además, genes de resistencia en planta adulta como el *Lr22* (alelos a y b) y *LrSV1* también fueron mapeados en la región distal del cromosoma 2DS (Ingala y col. 2012; McIntosh y col. 1995). Estudios genéticos y moleculares que estudien la relación entre estos genes son necesarios.

El gen *LrBP3* fue localizado en el cromosoma 6A, los genes *Lr56*, *Lr62* y *Lr64* de las especies *Aegilops sharonensis*, *Aeg. Neglecta* y *T. dicoccoides*, respectivamente también fueron localizados en ese cromosoma (Marais y col. 2010; McIntosh y col. 1998). Estos genes pueden ser descartados como posibles candidatos para el gen *LrBP3* porque fueron transferidos recientemente a trigo, mientras que Buck Poncho fue liberada comercialmente en 1986 (Antonelli 2003). Treinta tres SSRs, reportados en el cromosoma 6A fueron evaluados mediante BSA sin encontrar ninguno estrechamente ligado al gen. Los trece SSRs asociados ligeramente al gen, fueron agrupados en dos grupos. Los SSRs dentro del mismo grupo no pudieron ser distinguidos uno de los otros y fueron localizados en brazos cromosómicos distintos de acuerdo al análisis con las líneas nulli-tetrasómicas y ditelosómicas. Los marcadores centroméricos se caracterizan por tener baja tasa de recombinación y en mapas genéticos pueden encontrarse estrechamente ligados pero pueden estar separados en mapas físicos (Sourdille y col. 2004). Las evidencias presentadas sugieren que el *LrBP3* se localizaría en la región pericentromérica del 6A. Estudios que involucren una población segregante de un

mayor número de líneas (alrededor de 100 líneas) que permita confirmar si los marcadores evaluados están ligados o no al gen como así también encontrar marcadores estrechamente ligados, son necesarios para confirmar la localización cromosómica de este gen.

Durante las evaluaciones a campo de la población de RILs, no se encontraron líneas con el nivel de resistencia observado en BP. Líneas portadoras únicamente del gen *LrBP3*, de los genes individuales de plántula *Lr10* o *LrBP2* y la combinación de estos dos últimos (con un número promedio de pústulas/cm<sup>2</sup> de 38, 41, 43 y 41, respectivamente) pudieron ser distinguidas de las líneas sin ninguno de estos tres genes de resistencia (48 pústulas/cm<sup>2</sup>). Sin embargo, el número de promedio de pústulas/cm<sup>2</sup> observado en BP fue 10 pústulas/cm<sup>2</sup>; para el caso de Purple Straw el número de pústulas fue 71 pústulas/cm<sup>2</sup>, el cual fue mayor al observado en las líneas sin los tres genes de resistencia. Por lo tanto los tres genes detectados en BP solo explican parcialmente el nivel de resistencia observado en esta variedad. Posiblemente otros componentes genéticos involucrados en la resistencia no identificados en este trabajo, sean los que determinen la durabilidad de la resistencia. Genes o QTLs con efectos menores en la resistencia cuyos efectos individuales son difíciles de identificar en poblaciones segregantes ya sea en evaluaciones en invernáculo mediante el uso de razas del patógeno o en evaluaciones a campo podrían ser los responsables de la resistencia durable. Poblaciones segregantes de mayor tamaño a las utilizada en este trabajo permitirían obtener líneas que combinen este tipo de genes, de manera que la combinación de sus efectos en la resistencia pueda ser detectada tanto en evaluaciones en invernáculo como en evaluaciones a campo. Por otro lado la construcción de un mapa saturado con marcadores moleculares y la evaluación del tipo de reacción mediante el conteo de pústulas/cm<sup>2</sup> permitirían identificar QTLs mediante programas informáticos.

La tendencia actual en la agricultura moderna es la identificación de nuevos genes de resistencia que puedan ser introgresados en las variedades comerciales. Cuando estas variedades son extensivamente utilizadas en agricultura, la presión de selección sobre las poblaciones patógenas lleva al incremento de razas raras previamente no identificadas o de nuevas variantes producidas por mutación que pueden llevar a eventuales epidemias (Kolmer 1996; McIntosh y col. 1995; Samborski 1985). El estudio de variedades con resistencia durable es de utilidad porque permite identificar combinaciones de genes que resulten efectivas o genes individuales que puedan ser utilizados para alcanzar la resistencia durable en programas de mejoramiento. Por ejemplo, el gen de resistencia en planta adulta *Lr34* que confiere resistencia durable a dos especies de roya posee especial interés en los últimos años a nivel mundial (McIntosh, *comunicación personal*). Una característica observada en las variedades de resistencia durable es la presencia de genes de resistencia de expresión en planta adulta, como es el caso de los genes *LrSV1* y *LrSV2* en Sinvalocho (Ingala y col. 2012). Si bien cabe recordar que no todos los genes de este tipo confieren resistencia durable. Dentro de este contexto, los genes de expresión tardía en plántula detectados en las líneas de maíz podrían combinarse en un solo genotipo con el objetivo de evaluar si los mismos



confieren resistencia durable. Si bien estos genes no fueron evaluados frente a un amplio set de aislamientos, los genes de las líneas PIO68752 y PIO28427 mostraron un muy buen comportamiento a campo y podrían ser utilizados para tal fin.

## CONCLUSIONES

**Ninguna de las líneas confirió resistencia frente a todos los aislamientos pero su combinación en un solo genotipo podría resultar en resistencias más durables.**

Ninguno de los genes *Rp* individuales, combinaciones de genes *Rp* o líneas endocriadas de Pioneer confirieron resistencia frente a todos los aislamientos evaluados. Un nuevo tipo de resistencia denominada resistencia de expresión tardía en plántula fue identificada en maíz. La expresión de la misma comienza en el estadio V4 a partir de la cuarta hoja. El desarrollo de genotipos con combinaciones de los genes provenientes de las líneas: *Rp3-A*, *Rp1-K*, *Rp-G1*, *Rp-G5*, *Rp-G5DJ*, PIO19802, PIO28760, PIO17570, PIO68752 y PIO28427 conferirían buenos niveles de tolerancia frente a la enfermedad. Sin embargo dichas combinaciones deben ser evaluadas varios años mediante aislamientos del patógeno y en condiciones de campo en distintas localidades.

**Ambos métodos de regresión resultaron factibles para el análisis de resistencia parcial en maíz y permitieron la detección de la misma en las líneas PIO74876 y PIO12345.**

En las líneas PIO74876 y PIO12345 se detectó resistencia parcial mediante el cálculo del período de latencia. El período de latencia calculado para cada línea mediante los dos modelos resultaron ser similares. La línea PIO74876 resultó ser la de mayor período de latencia, mientras que la línea PIO16310 resultó ser la de menor período de latencia. La línea PIO12345 exhibió un período de latencia intermedio entre ambas líneas. Resta evaluar el cálculo del período de latencia mediante días continuos de conteo de pústulas para ambos modelos y compararlos con los valores de período de latencia obtenidos para días alternados de conteo y determinar qué modelo puede ser más apropiado.

**En la población de *P. sorghi* se identificaron por lo menos 3 grupos de virulencia los cuales no difirieron a nivel molecular. Veintiséis fenotipos de virulencia o razas fueron identificadas, pero si se considera al análisis de AFLPs para definir razas estas ascienden a 40.**

En la población de *P. sorghi* presente en la zona núcleo Argentina se identificaron por lo menos 3 grupos de virulencia y se detectaron 26 fenotipos de virulencia o razas que podrían ascender a 40 si se considera el análisis de AFLPs. Los grupos de virulencia no se diferenciaron en el nivel molecular indicando que aislamientos dentro de un mismo grupo de virulencia pueden tener distintos orígenes dentro de la población patógena. En el dendrograma basado en los genotipos de AFLP, los grupos mostraron bajos valores de bootstrap indicando que los grupos no poseen diferencias genéticas importantes. Sin embargo, mediante AMOVA se lograron distinguir dos grupos. Restan evaluaciones con un mayor número de aislamientos y el empleo de otro tipo de marcadores moleculares como los SSRs para establecer si en la población de *P. sorghi* existen grupos de

aislamientos con diferencias genéticas los cuales se puedan haber originado por introducciones independientes del patógeno.

**Los tres genes raza específicas identificados en Buck Poncho solo explican parcialmente la resistencia observada.**

Tres genes raza específica fueron identificados en el cruzamiento entre la variedad de resistencia durable a roya de la hoja Buck Poncho (BP) y el cultivar susceptible a roya Purple Straw (P). Dos genes fueron identificados en el estadio de plántula y fueron designados *LrBP1* y *LrBP2*. El tercer gen fue identificado en el estadio de planta adulta y fue llamado *LrBP3*. Mediante la evaluación de ocho razas sobre un set de líneas isogénicas portadoras de genes individuales y sobre BP indicaron que los genes *Lr10* y *Lr11* eran candidatos para el *LrBP1* y *LrBP2*, respectivamente. La identificación del *LrBP1* como el *Lr10* fue confirmada mediante el ligamiento con dos marcadores microsatélites previamente reportados ligados al *Lr10* y la amplificación en BP del fragmento de tamaño esperado de PCR mediante la utilización de un par de cebadores diseñados a partir de la secuencia del gen *Lr10*. *LrBP2* resultó ligado a 12 marcadores localizados en el brazo corto del cromosoma 2D donde el más cercano fue un SCAR32/35 a 0,3cM. La presencia del fragmento de PCR del SCAR32/35 en Buck Poncho y líneas portadoras del *Lr11* y el resultado de la prueba de alelismo entre estos dos genes, indicaron que el *LrBP2* podría ser el *Lr11*. Trece marcadores microsatélites localizados en el cromosoma 6A fueron encontrados ligeramente asociados al gen *LrBP3*. Las líneas portadoras de estos tres genes fueron evaluadas a campo frente a la población patógena. Ninguna de las combinaciones de genes evaluadas mostraron niveles de infección similar al de BP, indicando que estos tres genes sólo explican parcialmente la resistencia observada en BP.

## Referencias

- Abedon B, Tracy W (1996) Corngrass 1 of Maize (*Zea mays* L.) Delays Development of Adult Plant Resistance to Common Rust (*Puccinia sorghi* Schw.) and European Corn Borer (*Ostrinia nubilalis* Hubner). *J Hered* 87:219-223
- Abendroth LJ, Elmore RW, Boyer MJ, Marlay SK (2011) Corn growth and development. Ed. Iowa State University, Iowa, US.
- Antonelli EF (2003) La roya anaranjada (*Puccinia triticina* Erikss) sobre la efimera resistencia observada en la última década en cultivares comerciales de trigo de amplia difusión en la Argentina. Instituto de Genética "Ewald. A. Favret", Argentina
- Bassam BJ, Caetano-Anollés G, Gresshoff PM (1991) Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. *Analytical biochemistry* 196:80-83
- Bongard-Pierce D, Evans M, Poethig R (1996) Heteroblastic features of leaf anatomy in maize and their genetic regulation. *Int J Plant Sci (Chicago, IL, US)*:331-340
- Brewbaker JL (1983) Breeding for disease resistance. In: Kommedahl T, Williams PH (eds) *Challenging Problems in Plant Health*. American Phytopathological Society, St. Paul, Minnesota
- Chen X, Line RF, Leung H (1993) Relationship between virulence variation and DNA polymorphism in *Puccinia striiformis*. *Phytopathol* 83:1489-1497
- Cheng P, Chen X (2014) Virulence and Molecular Analyses Support Asexual Reproduction of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in the US Pacific Northwest. *Phytopathol* 104:1208-1220
- Cheng Y, Zhang H, Yao J, Wang X, Xu J, Han Q, Wei G, Huang L, Kang Z (2012) Characterization of non-host resistance in broad bean to the wheat stripe rust pathogen. *BMC plant biology* 12:96
- Crisci JV, Lopez Armengol MF (1983) *Introducción a la Teoría y Práctica de la Taxonomía Numérica*. The general Secretariat of the Organization of American States, Washington. D.C
- De Givry S, Bouchez M, Chabrier P, Milan D, Schiex T (2005) Carht a Gene: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinform* 21:1703-1704
- De Vallavieille-Pope C, Ali S, Leconte M, Enjalbert J, Delos M, Rouzet J (2012) Virulence dynamics and regional structuring of *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* in France between 1984 and 2009. *Plant Dis* 96:131-140
- Delaney DE, Webb CA, Hulbert SH (1998) A novel rust resistance gene in maize showing overdominance. *Mol Plant-Microbe Interact* 11:242-245
- Dyck P (1987) The association of a gene for leaf rust resistance with the chromosome 7D suppressor of stem rust resistance in common wheat. *Genome* 29:467-469
- Efron E (1979) Bootstrap methods: another look at the Jackknife. *The annals of statistics* 7:1-26

- Favret EA, Saione HA, Franzone PM (1983) New approaches in breeding for disease resistance. Argentina International Wheat Symposium, Cordoba, pp 397-411
- Felsenstein J (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39:783-791
- Felsenstein J (1989) PHYLIP-Phylogeny Inference Package (Version 3.2). *Cladistics* 5:164-166
- Feuillet C, Travella S, Stein N, Albar L, Nublát A, Keller B (2003) Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene *Lr10* from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15253-15258
- Finney DJ (1952) Probit Analysis; a Statistical treatment of the sigmoid response curve. 2nd Ed. Cambridge University Press, Cambridge, England. 256pp
- Flangas AL, Dickson JG (1961) The genetic control of pathogenicity, serotypes and variability in *Puccinia sorghi*. *Am J Bot* 48:275-285
- Flor HH (1942) Inheritance of pathogenicity in *Melampsora lini*. *Phytopathol* 32:653-669
- Flor HH (1971) Current status of the gene-for-gene concept. *Annu Rev Phytopathol* 9:275-296
- Formento AN, Velazquez PD, Carmona MA, Scandiani MM (2012) Manifestacion de las enfermedades foliares del maiz (*Zea mays*) segun diferentes ambientes durante el ciclo agricola 2011/12. XIV Jornadas Fitosanitarias Argentinas, Potrero de los Funes, San Luis, Argentina
- Fyo (2014). Futuros y Opciones.com SA. <http://portal.fyo.com/especiales/maiz/mapa.html>. Última entrada Diciembre 2014.
- Gingera G, Davis D, Groth J (1995) Identification and inheritance of delayed first pustule appearance to common leaf rust in sweet corn. *J Am Soc Hortic Sci* 120:667-672
- González M (2000) First report of virulence in Argentine populations of *Puccinia sorghi* to *Rp* resistance genes in corn. *Plant Dis* 84:921-921
- Groth JV, Pataky JK, Gingera GR (1992) Virulence in eastern North American populations of *Puccinia sorghi* to *Rp* resistance genes in corn. *Plant Dis* 76:1140-1144
- Hagan WL, Hooker AL (1965) Genetics of reaction to *Puccinia sorghi* in eleven corn inbred lines from Central and South America. *Phytopathol* 55:193-197
- Hamilton MB (2009) Populations Genetics. Wiley-Blackwell, West Sussex, UK
- Haque S, Park R, Keiper F, Bariana H, Wellings C (2008) Pathogenic and molecular variation support the presence of genetically distinct clonal lineages in Australian populations of *Puccinia graminis f. sp. avenae*. *Mycological research* 112:663-673
- Headrick J, Pataky J (1987) Expression of partial resistance to common rust in sweet corn hybrids at various host growth stages. *Phytopathol* 77:454-458
- Hooker AL (1969) Widely based resistance to rust in corn. In: Browning JA (ed) Diseases Consequences of Intensive and Extensive Culture of Field Crops, Spec Rep No 64, Iowa Agric. Home Econ. Exp. Stn., Ames, pp 28-34

- Hooker AL (1973) Maize. In: Nelson RR (ed) Breeding Plant for Disease Resistance. University Park, Pennsylvania, pp 132-154
- Hooker AL (1985) Corn and sorghum rusts. In: Roelfs A, Bushnell W (eds) The Cereal Rust. Academic Press, New York, pp 207-236
- Hooker AL, Le Roux PM (1957) Sources of protoplasmic resistance to *Puccinia sorghi* in corn. Phytopathol 47:187-191
- Hooker AL, Russell WA (1962a) Development of nearly isogenic rust-resistant lines of corn. Phytopathol 52:14
- Hooker AL, Russell WA (1962b) Inheritance of resistance to *Puccinia sorghi* in six corn inbred lines. Phytopathol 52:122-128
- Hooker AL, Saxena KMS (1971) Genetics of disease resistance in plants. Annu Rev Genet 5:407-424
- Hu G, Hulbert S (1996) Construction of 'compound' rust resistance genes in maize. Euphytica 87:45-51
- Hulbert SH (1997) Structure and evolution of the *rp1* complex conferring rust resistance in maize. Annu Rev Phytopathol 35:293-310
- Hulbert SH, Bennetzen JL (1991) Recombination at the *Rp1* locus of maize. Mol Gen Genet 226:377-382
- Hulbert SH, Lyons PC, Bennetzen JL (1991) Reactions of maize lines carrying *Rp* resistance genes to isolates of the common rust pathogen, *Puccinia sorghi*. Plant Dis 75:1130-1133
- Hulbert SH, Webb CA, Smith SM (2001) A modified set of *Rp* differential lines. Maize genetics cooperation newsletter 75:40
- Ingala L, López M, Darino M, Pergolesi MF, Diéguez MJ, Sacco F (2012) Genetic analysis of leaf rust resistance genes and associated markers in the durable resistant wheat cultivar Sinvalocho MA. Theor Appl Genet 124:1305-1314
- Ingala LR (2008) Estudios de las bases genéticas de la resistencia durable a roya de la hoja en trigo. Facultad de Ciencias Exactas y Naturales. Universidad de Buenos Aires, Buenos Aires, Argentina
- Johnson R (1981) Durable resistance: definition of genetic control and attainment in plant breeding. Phytopathol 71:567-568
- Jones JDG, Dangl JL (2006) The plant immune system. Nature 444:323-329
- Kim SK, Brewbaker JL (1977) Inheritance of general resistance in maize to *Puccinia sorghi* Schw. Crop Sci 17:456-461
- Kolmer J (1996) Genetics of resistance to wheat leaf rust 1. Annu Rev Phytopathol 34:435-455
- Kolmer J (2001) Molecular polymorphism and virulence phenotypes of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Canada. Cana J Bot 79:917-926

- Kolmer J, Liu J, Sies M (1995) Virulence and molecular polymorphism in *Puccinia recondita* f. *sp. tritici* in Canada. *Phytopathol* 85:276-285
- Kolmer J, Long D, Hughes M (2008) Physiologic specialization of *Puccinia triticina* on wheat in the United States in 2006. *Plant Dis* 92:1241-1246
- Kosman E, Leonard KJ (2005) Similarity coefficients for molecular markers in studies of genetic relationships between individuals for haploid, diploid, and polyploid species. *Mol Ecol* 14:415-424
- Lannou C (2012) Variation and selection of quantitative traits in plant pathogens. *Annual review of Phytopathol* 50:319-338
- Lee BH, Hooker A, Russell W, Dickson J, Flanga A (1963) Genetic relationships of alleles on chromosome 10 for resistance to *Puccinia sorghi* in 11 corn lines. *Crop Sci* 3:24-26
- Liu J, Kolmer J (1998) Molecular and virulence diversity and linkage disequilibria in asexual and sexual populations of the wheat leaf rust fungus, *Puccinia recondita*. *Genome* 41:832-840
- Liu K, Muse SV (2005) PowerMarker: an integrated analysis environment for genetic marker analysis. *Bioinformatics* 21:2128-2129
- Long DL, Kolmer JA (1989) A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. *sp. tritici*. *Phytopathol* 79:525-529
- Macagno LF, Pizarro JB, Cordone GE (1993) Dirección Nacional Asistente de Planificación. INTA, Argentina, pp 15-28
- Mains E, Jackson H (1926) Physiologic specialisation in the leaf rust of Wheat, *Puccinia triticina* Erikks. *Phytopathol* 16:89-120.
- Mantovani P, Maccaferri M, Tuberosa R, Kolmer J (2010) Virulence phenotypes and molecular genotypes in collections of *Puccinia triticina* from Italy. *Plant Dis* 94:420-424
- Marais GF, Badenhorst PE, Eksteen A, Pretorius ZA (2010) Reduction of *Aegilops sharonensis* chromatin associated with resistance genes *Lr56* and *Yr38* in wheat. *Euphytica* 171:15-22
- McDonald BA, Linde C (2002) Pathogen population genetics, evolutionary potential and durable resistance. *Annu Rev Phytopathol* 40:349-379
- McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Morris C, Appels R, Xia XC (1998) Catalogue of gene symbols for wheat: 2009 supplement. <http://www.shigen.nig.ac.jp/wheat/komugi/genes/symbolClassList.jsp>. Última entrada Diciembre 2014
- McIntosh RA, Wellings CR, Park RF (1995) Wheat rusts: an atlas of resistance genes. CSIRO PUBLISHING, Australia
- Meudt HM, Clarke AC (2007) Almost forgotten or latest practice? AFLP applications, analyses and advances. *Trends in Plant Science* 12:106-117

Michelmore RW, Paran I, Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc Natl Acad Sci USA* 88:9828-9832

Neervoort WJ, Parlevliet JE (1978) Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. V. Analysis of the components of partial resistance in eight barley cultivars. *Euphytica* 27:33-39

Ohm HW, Shaner GE (1976) Three components of slow leaf rusting at different growth stages in wheat. *Phytopathol* 66:1356-1360

Ordoñez M, Kolmer J (2009) Differentiation of molecular genotypes and virulence phenotypes of *Puccinia triticina* from common wheat in North America. *Phytopathol* 99:750-758

Park R, Burdon J, Jahoor A (1999) Evidence for somatic hybridization in nature in *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*, the leaf rust pathogen of wheat. *Mycological Research* 103:715-723

Parlevliet JE (1985) Resistance of the Non-Race-Specific Type. In: Roelfs A, Bushnell W (eds) *The cereal rusts*. Academic Press, pp 501-520

Parlevliet JE (2002) Durability of resistance against fungal, bacterial and viral pathogens; present situation. *Euphytica* 124:147-156

Parlevliet JE, Kuiper HJ (1977) Partial resistance of barley to leaf rust, *Puccinia hordei*. IV. Effect of cultivar and development stage on infection frequency. *Euphytica* 26:249-255

Pataky JK (1986) Partial rust resistance in sweet corn hybrid seedlings. *Phytopathol* 76:702-707

Pataky JK (1987) Reaction of sweet corn germplasm to common rust and an evaluation of *Rp* resistance in Illinois. *Plant Dis* 75:824-828

Pataky JK, Pate MC, Hulbert SH (2001) Resistance genes in the *rp1* region of maize effective against *Puccinia sorghi* virulent on the *Rp1-D* gene in North America. *Plant Dis* 85:165-168

Peakall R, Smouse PE (2006) GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular ecology notes* 6:288-295

Peakall R, Smouse PE (2012) GenALEX 6.5: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research—an update. *Bioinformatics* 28:2537-2539

Pedersen WL, Leath S (1988) Pyramiding major genes for resistance to maintain residual effects. *Annu Rev Phytopathol* 26:369-378

Pellegrineschi A, Reynolds M, Pacheco M, Brito RM, Almeraya R, Yamaguchi-Shinozaki K, Hoisington D (2004) Stress-induced expression in wheat of the *Arabidopsis thaliana* DREB1A gene delays water stress symptoms under greenhouse conditions. *Genome* 47:493-500

Poethig RS (1990) Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science* 250:923-930

Pritchard JK, Stephens M, Donnelly P (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959



Rambaut A (2009) FigTree v1.4.2: Tree figure drawing tool. <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>. Última entrada Diciembre 2014

Raupp WJ, Brown-Guedira GL, Gill BS (2001) Cytogenetic and molecular mapping of the leaf rust resistance gene *Lr39* in wheat. *Theor Appl Genet* 102:347-352

Rodriguez Amieva PJ, Tessi JL, Frecha JH, Vallega J (1961) Estimación de los daños producidos en la Argentina por las royas del tallo y de la hoja del trigo durante el período 1949-1958. *Robigo* 12:18-22

Rozen S, Skaletsky H (1999) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Misener S, Krawetz SA (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, New Jersey, USA, pp 365-386

Russell W, Hooker A (1959) Inheritance of resistance in corn to rust, *Puccinia sorghi* Schw., and genetic relationships among different sources of resistance. *Agron J* 51:21-24

Samborski D, Dyck P (1982) Enhancement of resistance to *Puccinia recondita* by interactions of resistance genes in wheat. *Can J Plant Pathol* 4:152-156

Samborski DJ (1985) Wheat leaf rust. In: Roelfs A, Bushnell W (eds) *The cereal rusts*. Academic Press, pp 39-59

Samborski DJ, Dyck PL (1976) Inheritance of virulence in *Puccinia recondita* on six backcross lines of wheat with single genes for resistance to leaf rust. *Can J Bot* 54:1666-1671

Sanz-Alferez S, Richter TE, Hulbert SH, Bennetzen JL (1995) The *Rp3* disease resistance gene of maize: Mapping and characterization of introgressed alleles. *Theo Appl Genet* 91:25-32

Saxena KMS, Hooker AL (1968) On the structure of a gene for disease resistance in maize. *Proc Natl Acad Sci USA* 68:1300-1305

Sears E (1954) The Aneuploids of Common Wheat. *Mo Agric Exp Stn Res Bull* 572:1-59

Sears ER, Sears LMS (1978) The telocentric chromosomes of common wheat. In: Ramanujam S (ed) *Proceedings of the 5th International Wheat Genetics Symposium*. Indian Society of Genetics and Plant Breeding, New Delhi, pp 389-407

SIIA (2014) Siembra, cosecha, producción y rendimiento. Sistema integrado de información agropecuaria. [http://www.sii.gov.ar/\\_apps/siia/estimaciones/estima2.php](http://www.sii.gov.ar/_apps/siia/estimaciones/estima2.php). Última entrada Diciembre 2014

Shaner GE (1980) Probits for analyzing latent period data in studies of slow rusting resistance. *Phytopathol* 70:1179-1182

Shaner GE, Hess FD (1978) Equations for integrating components of slow leaf-rusting resistance in wheat. *Phytopathol* 68:1464-1469

Singh S, Franks CD, Huang L, Brown-Guedira GL, Marshall DS, Gill BS, Fritz A (2004) *Lr41*, *Lr39*, and a leaf rust resistance gene from *Aegilops cylindrica* may be allelic and are located on wheat chromosome 2DS. *Theor Appl Genet* 108:586-591

- Sneath PHA, Sokal RR (1973) Numerical Taxonomy. The Principles and Practice of Numerical Classification. Freeman, San Francisco, California
- Soliman AS, Heyne EG, Johnson C (1964) Genetic analysis of leaf rust resistance in eight differential varieties of wheat. *Crop Sci* 4:246-248
- Somers DJ, Isaac P, Edwards K (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 109:1105-1114
- Sourdille P, Singh S, Cadalen T, Brown-Guedira GL, Gay G, Qi L, Gill BS, Dufour P, Murigneux A, Bernard M (2004) Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Funct Integr Genomics* 4:12-25
- Stakman EC, Stewart D, Loegering WQ (1962) Identification of physiologic races of *Puccinia graminis* var. *tritici*. US Dept Agric, Agric Res Serv E-617:53
- Steele KA, Humphreys E, Wellings C, Dickinson M (2001) Support for a stepwise mutation model for pathogen evolution in Australasian *Puccinia striiformis* f. sp. *tritici* by use of molecular markers. *Plant Pathol* 50:174-180
- Suarez EY, Favret EA (1984) Reaction to leaf rust of "Sinvalocho" wheat gene in hemizygous condition. *Z Pflanzenzuchtg* 92:289-294
- Sun X, Bai G, Carver BF (2009) Molecular markers for wheat leaf rust resistance gene *Lr41*. *Mol Breed* 23:311-321
- Sun Y, Neate S, Zhong S, Steffenson B, Friesen T (2007) Amplified fragment length polymorphism and virulence polymorphism in *Puccinia hordei*. *Can J Plant Pathol* 29:25-34
- USDA FAS (2014). World agricultural production. United States Department of Agriculture - Foreign Agricultural Service. <http://www.fas.usda.gov/data/world-agricultural-production>. Última entrada Julio 2014.
- Van Dyke CG, Hooker AL (1968) The Z Reaction in Corn to *Puccinia sorghi*. *Phytopathol* 59:33-36
- Varshney RK, Nayak SN, May GD, Jackson SA (2009) Next-generation sequencing technologies and their implications for crop genetics and breeding. *Trends in biotech* 27:522-530
- Voorrips RE (2002) MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *J Hered* 93:77-78
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Friters A, Pot J, Paleman J, Kuiper M (1995) AFLP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic acids research* 23:4407-4414
- Webb CA, Richter TE, Collins NC, Nicolas M, Trick HN, Pryor T, Hulbert SH (2002) Genetic and molecular characterization of the maize *rp3* rust resistance locus. *Genetics* 162:381-394

Webb D, Nutter Jr F (1997) Effects of leaf wetness duration and temperature on infection efficiency, latent period, and rate of pustule appearance of rust in alfalfa. *Phytopathol* 87:946-950

White DG (1999) *Compendium of corn diseases* 3rd ed. APS Press, St. Paul, Minnesota, USA

Wilkinson DR, Hooker AL (1968) Genetics of reaction to *Puccinia sorghi* in ten corn inbred lines from Africa and Europe. *Phytopathol* 58:605-608

Wright S (1951) The genetical structure of Populations. *Ann Eugenics* 15:323-354

## ANEXOS

**Tabla anexa 1.** Designación<sup>a</sup>, localidad<sup>b</sup> y tipo de reacción<sup>c</sup> de los 66 aislamientos evaluados sobre 27 líneas de maíz

Designación	Localidad	Líneas de maíz															
		<i>Rp1-A</i>	<i>Rp1-B</i>	<i>Rp1-C</i>	<i>Rp1-D</i>	<i>Rp-D5</i>	<i>Rp-G</i>	<i>Rp-G5</i>	<i>Rp-GI</i>	<i>Rp-GDJ</i>	<i>Rp-G5JD</i>	<i>Rp1-J</i>	<i>Rp1-JC</i>	<i>Rp1-FJ</i>	<i>Rp1-K</i>	<i>Rp1-M</i>	<i>Rp3-A</i>
AR10PIO10189	Alejandro Roca (Cor)	MS	MR	MS	MS	MS	MR	R	R	R	R	R	R	MR	R	MS	R
AL10RpD5	Alberdi (BA)	S	MS	S	S	S	MR	R	MR	MR	R	R	R	R	R	S	R
BV10Rp1C	Bell Ville (Cor)	MS	MS	S	S	S	MR	R	MR	MR	R	R	MS	MR	MR	MS	R
BV10Rp1J	Bell Ville (Cor)	MS	MS	MS	MS	MS	R	R	R	R	R	MS	MS	MS	R	MS	R
GC10PIO69383	General Cabrera (Cor)	MS	MR	MS	MS	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R
CHA10PIO38360	Chaján (Cor)	MS	MR	S	MS	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	R	S	R
T10RpD5	El Trébol (SF)	MS	MS	MS	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MR	S	R
T10Rp1M	El Trébol (SF)	MS	MR	MS	MS	MS	MR	R	R	MR	R	R	MR	MR	R	MS	R
E10PIO10189	Etruria (Cor)	MS	R	MS	MS	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	MR	MS	R
E10Rp3A	Etruria (Cor)	MS	MS	S	MS	S	R	R	MR	R	R	R	R	R	MR	S	S
FO10PIO10189	Fortín Olavarría (BA)	MS	MS	S	MS	MS	MR	R	MR	MS	R	MS	MS	MS	R	MS	R
GP10PIO16310	General Pinto (BA)	S	MS	S	S	S	R	R	R	R	R	R	MR	MR	R	MS	MR
GP10Rp1M	General Pinto (BA)	MS	MS	S	MS	S	MR	R	MS	MS	MR	MS	-	MS	R	MS	R
J10PIO15600	Junín (BA)	MS	MS	MS	MS	MS	R	R	R	-	R	R	MR	R	R	MS	R
L10PIO10189	Landeta (SF)	MS	MS	MS	MS	MS	R	R	R	R	R	R	MS	MR	R	MS	R
P10PIO16310	Pergamino (BA)	S	MS	S	MS	S	R	R	R	R	R	R	MR	R	MR	MS	MR
P10PIO10189	Pergamino (BA)	MR	MS	MS	MR	MR	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R
P10PIO36420	Pergamino (BA)	MS	MS	S	MS	S	R	R	R	R	R	R	R	R	R	MS	R
P10PIO17570	Pergamino (BA)	R	MR	R	R	R	R	R	R	R	MR	R	R	R	R	MR	R
RO10H11247	Rojas (BA)	S	MS	S	S	S	S	MS	S	S	MR	S	S	S	S	S	MR
RO10RpGI	Rojas (BA)	S	MS	S	S	S	S	MS	S	S	MR	S	S	S	S	MS	R
SS10PIO10189	Sancti Spiritu (SF)	MS	R	MS	MS	MS	R	-	R	R	R	R	R	R	R	MS	R

<sup>a</sup> Los aislamientos fueron designados con el nombre del hospedante y la localidad donde fueron colectados, y el año de colecta.

<sup>b</sup> Localidades donde los aislamientos fueron colectados. Entre paréntesis se indica la abreviatura de la provincia a la cual pertenece cada localidad. BA, Buenos Aires; Cor, Córdoba; SF, Santa Fe

<sup>c</sup> Los tipos de reacción fueron clasificados como: R, 0; a 11+; MR, 11+2' a 1+2; MS: 22+ a 2++3 y S: 2++34 a 4.

Designación	Localidad	Líneas de maíz										
		PIO68752	PIO28427	PIO15600	PIO36420	PIO20046	PIO19802	PIO28760	PIO16310	PIO12345	PIO74876	PIO17570
AR10PIO10189	Alejandro Roca (Cor)	S	S	S	MS	MS	R	MR	MS	S	MS	MR
AL10RpD5	Alberdi (BA)	MS	S	S	MS	S	R	R	S	MR	MR	R
BV10Rp1C	Bell Ville (Cor)	R	S	MS	MS	MS	R	R	S	S	MS	R
BV10Rp1J	Bell Ville (Cor)	R	MR	MS	MS	MS	R	R	MS	MS	MS	R
GC10PIO69383	General Cabrera (Cor)	S	MS	MS	S	MS	R	R	MS	S	MS	MS
CH10PIO38360	Chacabuco (BA)	MS	MS	MS	MS	MS	R	R	MS	MS	MS	MR
T10RpD5	El Trébol (SF)	S	S	MS	S	S	R	MR	MS	MS	-	R
T10Rp1M	El Trébol (SF)	R	S	MS	MS	S	R	R	S	MS	MS	R
E10PIO10189	Etruria (Cor)	S	MS	S	MS	MS	R	MS	MS	MS	MS	MR
E10Rp3A	Etruria (Cor)	R	MS	S	MS	MS	R	MR	MS	R	MS	R
FO10PIO10189	Fortín Olavarría (BA)	S	MS	MS	MS	MS	R	R	S	MS	MS	MS
GP10PIO16310	General Pinto (BA)	MS	S	MS	MS	S	R	R	MS	MS	MS	MR
GP10Rp1M	General Pinto (BA)	R	MS	MS	S	MS	R	R	MS	MS	MS	MR
J10PIO15600	Junín (BA)	MS	MS	MS	S	MS	R	R	MS	MS	MS	MS
L10PIO10189	Landeta (SF)	MS	MS	MS	MS	MS	R	MR	MS	MS	MS	MS
P10PIO16310	Pergamino (BA)	S	S	S	S	S	R	MR	S	MS	MS	MR
P10PIO10189	Pergamino (BA)	S	MS	S	S	MS	R	MR	MS	MS	MS	MS
P10PIO36420	Pergamino (BA)	S	S	S	S	S	R	R	MS	S	MS	MS
P10PIO17570	Pergamino (BA)	S	S	MS	S	X	R	MR	MS	MS	MS	MS
RO10H11247	Rojas (BA)	R	S	MS	MS	S	R	R	S	MR	MR	R
RO10RpGI	Rojas (BA)	MR	-	MS	MS	MS	R	R	MS	R	MS	R
SS10PIO10189	Sancti Spiritu (SF)	MS	MS	MS	MS	MS	R	R	MR	MS	MS	MS

Designación	Localidad	Líneas de maíz															
		<i>Rp1-A</i>	<i>Rp1-B</i>	<i>Rp1-C</i>	<i>Rp1-D</i>	<i>Rp-D5</i>	<i>Rp-G</i>	<i>Rp-G5</i>	<i>Rp-GI</i>	<i>Rp-GDJ</i>	<i>Rp-G5JD</i>	<i>Rp1-J</i>	<i>Rp1-JC</i>	<i>Rp1-FJ</i>	<i>Rp1-K</i>	<i>Rp1-M</i>	<i>Rp3-A</i>
S10Rp1C	Salto (BA)	MS	MS	MS	MS	MS	R	R	R	R	R	MS	MS	MS	R	MS	R
S10RpGDJ	Salto (BA)	MS	S	MS	S	S	S	MR	MR	S	MR	S	S	S	MR	S	R
TE10H11247	Teodelina (SF)	MS	MS	S	MS	S	S	MR	S	S	MR	MS	MS	MS	MS	S	R
TR10PIO10189	Tronge (BA)	MS	MS	S	S	MS	R	R	R	R	R	MR	MR	R	MR	MS	MR
TR10PIO38360	Tronge (BA)	S	MS	S	MS	MS	R	R	R	R	R	R	MR	R	R	MS	MR
BI11PIO16310	Bigand (SF)	S	MS	MS	S	S	R	R	R	R	R	MR	MR	R	MR	MS	MR
BI11PIO20046	Bigand (SF)	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	MR	R	MR	S	MR
CB11PIO74876	Corral de Bustos (Cor)	MS	MS	MS	MS	S	MR	MR	R	MR	MR	MS	R	MR	R	MS	R
CB11Rp1C	Corral de Bustos (Cor)	MS	MS	MS	MS	S	MR	MR	R	MS	MR	MR	MR	MR	MR	MS	MR
CB11RpD5	Corral de Bustos (Cor)	MS	MS	MS	MS	S	MS	MR	MR	MS	MS	MR	MR	MR	MR	MS	R
CB11RpGDJ	Corral de Bustos (Cor)	S	MS	S	S	MS	S	MS	MR	S	S	MS	S	MS	MR	MS	MR
CA11PIO43601	Carcarañá (SF)	MS	S	MS	S	MS	R	R	R	R	MR	R	MR	MR	MR	MS	MR
CA11Rp1A	Carcarañá (SF)	S	S	S	S	MS	MR	R	MR	MR	MR	R	R	MR	MR	S	MR
CA11Rp1D	Carcarañá (SF)	S	S	S	S	S	MR	R	R	MR	R	MR	MR	S	MR	S	MR
CAS11H43627	Casilda (SF)	S	MS	S	S	S	S	MS	MS	S	S	S	MS	S	MS	S	MR
CAS11PIO38360	Casilda (SF)	MS	S	S	MS	S	MR	MR	MS	MS	MS	MS	MR	MR	MS	MS	MR
CAS11RpGDJ	Casilda (SF)	MS	S	S	S	S	MS	MS	MR	MS	R	MS	MS	S	MR	S	MR
CH11PIO19802	Chacabuco (BA)	S	MS	S	S	S	S	S	R	S	S	S	S	S	R	S	MR
CH11Rp1D	Chacabuco (BA)	MS	MS	S	MS	S	MR	R	R	-	R	MR	MR	MR	MR	S	R
CH11Rp1FJ	Chacabuco (BA)	S	MS	S	S	S	MS	MR	MS	MS	MS	MS	MS	S	MR	MS	MR
FA11PIO38360	Florentín Ameghino (BA)	S	MS	S	MS	MS	R	R	R	R	R	MS	R	R	MR	MS	R
GP11RpGI	General Pinto (BA)	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	MS	MS	S	MS	MS	S	R
J11Rp3A	Junín (BA)	S	MS	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MR	MS	MS
MJ11PIO15600	Marcos Juárez (Cor)	MS	MS	MS	MS	MS	MR	R	R	MR	MR	MR	MR	MR	MR	MS	MR
MJ11RpD5	Marcos Juárez (Cor)	S	S	S	S	S	MR	MR	R	MR	MR	MR	MR	MR	MR	S	MR

Designación	Localidad	Líneas de Maíz										
		PIO68752	PIO28427	PIO15600	PIO36420	PIO20046	PIO19802	PIO28760	PIO16310	PIO12345	PIO74876	PIO17570
S10Rp1C	Salto (BA)	MS	-	MS	S	MS	R	R	MS	S	MS	R
S10RpGDJ	Salto (BA)	MR	MS	S	S	S	R	R	S	R	MS	R
TE10H11247	Teodelina (SF)	R	MS	MS	S	S	MR	R	MS	R	MR	R
TR10PIO10189	Tronge (BA)	MS	S	S	MS	MS	R	MR	MS	MS	MS	MR
TR10PIO38360	Tronge (BA)	MS	S	S	MS	S	R	MR	MS	MS	MS	MR
BI11PIO16310	Bigand (SF)	MS	S	-	MS	S	R	MR	MS	S	MS	R
BI11PIO20046	Bigand (SF)	MS	-	-	-	-	R	MS	MS	MS	MS	R
CB11PIO74876	Corral de Bustos (Cor)	MS	MS	MS	S	MS	R	MS	MS	S	MS	MR
CB11Rp1C	Corral de Bustos (Cor)	MR	MS	MS	MS	MS	MR	MR	MS	MR	MS	R
CB11RpD5	Corral de Bustos (Cor)	MS	MS	MS	MS	MS	MR	MR	MS	MR	MS	R
CB11RpGDJ	Corral de Bustos (Cor)	R	MS	MS	MS	S	MR	R	MS	R	MS	R
CA11PIO43601	Carcarañá (SF)	S	-	-	MS	-	R	MS	MS	S	MS	MS
CA11Rp1A	Carcarañá (SF)	S	MS	-	MS	S	R	MS	S	MS	MS	R
CA11Rp1D	Carcarañá (SF)	MS	MS	-	MS	S	R	MS	S	MS	S	R
CAS11H43627	Casilda (SF)	MR	S	S	MS	MS	MR	R	S	R	MS	R
CAS11PIO38360	Casilda (SF)	MS	MS	-	S	MS	R	MR	MS	S	MS	R
CAS11RpGDJ	Casilda (SF)	MR	MS	-	MS	-	MR	R	-	R	S	R
CH11PIO19802	Chacabuco (BA)	R	MS	MS	S	S	MS	R	S	R	MS	R
CH11Rp1D	Chacabuco (BA)	MR	S	-	S	S	MR	R	S	MS	MR	R
CH11Rp1FJ	Chacabuco (BA)	MS	MS	MS	S	MS	R	R	S	MS	MS	R
FA11PIO38360	Florentín Ameghino (BA)	MS	-	MS	S	S	R	MR	MS	MS	MS	MS
GP11RpGI	General Pinto (BA)	R	MS	MS	S	S	R	R	MS	R	MS	R
J11Rp3A	Junín (BA)	MS	-	S	MS	S	R	R	S	MR	MS	R
MJ11PIO15600	Marcos Juárez (Cor)	MS	MS	MS	MS	MS	MR	MR	MS	MS	MS	MR
MJ11RpD5	Marcos Juárez (Cor)	MS	MS	-	MS	MS	R	R	S	MS	MS	R

Designación	Localidad	Líneas de Maíz															
		<i>Rp1-A</i>	<i>Rp1-B</i>	<i>Rp1-C</i>	<i>Rp1-D</i>	<i>Rp-D5</i>	<i>Rp-G</i>	<i>Rp-G5</i>	<i>Rp-GI</i>	<i>Rp-GDJ</i>	<i>Rp-G5JD</i>	<i>Rp1-J</i>	<i>Rp1-JC</i>	<i>Rp1-FJ</i>	<i>Rp1-K</i>	<i>Rp1-M</i>	<i>Rp3-A</i>
MT11PIO12345	María Teresa (SF)	S	MS	MS	MS	MS	R	R	R	R	R	R	R	R	MR	MS	R
MT11Rp1M	María Teresa (SF)	S	S	S	S	S	R	R	MR	MR	MR	MR	MR	R	MR	S	MR
RO11RpD5	Rojas (BA)	S	S	S	S	S	MR	MR	MR	MS	MS	MS	MS	MS	MR	S	MR
S11PIO16310	Salto (BA)	S	S	S	S	S	MR	MS	R	MS	MS	R	MS	MR	MR	MS	MR
S11PIO36420	Salto (BA)	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	MR	MR	R	MR	S	MR
S11Rp1C	Salto (BA)	S	S	S	S	S	R	R	R	R	R	R	R	R	MR	S	MR
BV12Rp1K	Bell Ville (Cor)	MS	S	MS	S	S	MS	MR	MS	S	MS	MS	S	MS	S	MS	R
BI12Rp1C	Bigand (SF)	S	MS	S	S	S	MR	R	MS	MS	MR	MR	MR	MR	MR	MS	MR
BI12RpD5	Bigand (SF)	S	MS	MS	S	S	MR	R	MR	MR	MR	MR	MR	MR	MR	MS	MR
CB12H37745	Corral de Bustos (Cor)	S	MS	MS	MS	S	R	R	R	MR	R	R	R	R	MR	MS	R
CB12H11247	Corral de Bustos (Cor)	S	MS	MS	S	S	MS	MR	MS	S	MS	MS	MS	MS	MS	MS	R
CB12Rp1J	Corral de Bustos (Cor)	MS	MS	MS	S	S	S	MR	MS	S	MS	MS	MS	MS	MS	MS	R
CAV12PIO12345	Cavanagh (Cor)	MS	S	MS	MS	MS	R	R	R	R	R	MR	R	R	MR	MS	R
J12PIO15600	Junín (BA)	MS	MS	MS	MS	MS	MR	R	R	MR	R	MR	R	MR	MR	MS	MR
MJ12H80172	Marcos Juárez (Cor)	S	S	S	S	S	R	R	MR	-	-	MR	MR	MR	MR	S	R
MJ12H14371	Marcos Juárez (Cor)	S	MS	S	S	S	MS	MS	S	S	S	MS	MS	MS	MS	MS	MR
MJ12PIO74876	Marcos Juárez (Cor)	S	S	MS	S	S	MS	MS	MS	S	MS	MS	S	MS	S	MS	MR
MJ12RpGI	Marcos Juárez (Cor)	S	MS	MS	S	S	MS	MS	S	S	S	MS	MS	MS	S	MS	R
RU12H20684	Runciman (SF)	MS	MS	S	MS	MS	MS	R	MS	MR	MR	MR	MR	MR	MR	MS	MR



Designación	Localidad	Líneas de Maíz										
		PIO68752	PIO28427	PIO15600	PIO36420	PIO20046	PIO19802	PIO28760	PIO16310	PIO12345	PIO74876	PIO17570
MT11PIO12345	María Teresa (SF)	MS	MS	MS	S	MS	R	R	MS	MS	MS	MR
MT11Rp1M	María Teresa (SF)	R	S	MS	S	S	R	R	S	MR	MS	R
RO11RpD5	Rojas (BA)	MS	MS	MS	S	S	R	MS	S	MS	MS	R
S11PIO16310	Salto (BA)	S	S	MS	S	S	R	R	S	MS	S	R
S11PIO36420	Salto (BA)	MR	S	-	MS	S	R	MR	S	MS	S	R
S11Rp1C	Salto (BA)	MS	S	-	S	S	R	R	S	MS	S	R
BV12Rp1K	Bell Ville (Cor)	MR	MS	MS	MS	-	R	R	S	R	MS	R
BI12Rp1C	Bigand (SF)	MR	S	MS	S	MS	R	R	S	MR	MS	R
BI12RpD5	Bigand (SF)	MR	S	MS	S	-	R	MR	MS	MS	MS	R
CB12H37745	Corral de Bustos (Cor)	MS	MS	MS	S	S	R	MS	S	MS	MS	R
CB12H11247	Corral de Bustos (Cor)	MR	MS	MS	S	MS	R	R	S	R	MS	R
CB12Rp1J	Corral de Bustos (Cor)	MR	MS	MS	S	-	MR	R	MS	R	MS	R
CAV12PIO12345	Cavanagh (Cor)	MS	S	MS	S	MS	R	MR	MS	S	MS	MR
J12PIO15600	Junín (BA)	MS	MS	MS	MS	MS	R	MS	S	MS	MS	MR
MJ12H80172	Marcos Juárez (Cor)	S	S	MS	S	-	R	MS	S	MS	MS	R
MJ12H14371	Marcos Juárez (Cor)	MS	MS	S	S	S	MR	MR	S	MR	MS	R
MJ12PIO74876	Marcos Juárez (Cor)	MS	MS	-	S	MS	MR	R	S	MR	MS	R
MJ12RpGI	Marcos Juárez (Cor)	MR	MS	MS	S	S	R	R	S	R	MS	R
RU12H20684	Runciman (SF)	MR	MS	MS	S	-	R	MR	S	MR	MS	MR

**Tabla anexa 2.** Localidades donde el set de 27 líneas de maíz fue evaluado bajo infección natural de la población patógena durante los años 2010 a 2012.

Localidad	Provincia <sup>a</sup>	Año de Evaluación	Líneas de maíz															
			<i>Rp1-A</i>	<i>Rp1-B</i>	<i>Rp1-C</i>	<i>Rp1-D</i>	<i>Rp-D5</i>	<i>Rp-G</i>	<i>Rp-G5</i>	<i>Rp-GI</i>	<i>Rp-GDJ</i>	<i>Rp-G5JD</i>	<i>Rp1-J</i>	<i>Rp1-JC</i>	<i>Rp1-FJ</i>	<i>Rp1-K</i>	<i>Rp1-M</i>	<i>Rp3-A</i>
Alejandro Roca	Córdoba	2010	S	MR	R	MS	MS	R	R	R	R	R	MR	R	MR	MR	MS	MR
Alberdi	Buenos Aires	2010	MS	MR	MR	MS	MS	-	R	R	R	R	MR	R	MR	R	MR	R
Bell Ville	Córdoba	2010	MS	MR	MS	MS	MS	R	R	R	R	R	MR	R	MR	MR	MR	R
General Cabrera	Córdoba	2010	MS	MR	R	MR	MS	-	R	R	R	R	MR	R	R	R	MS	R
Chaján	Córdoba	2010	MS	MS	MR	MR	MS	-	R	R	R	R	MR	MR	R	R	MR	R
El Trébol	Santa Fe	2010	S	MR	MR	MS	MS	R	R	R	R	R	MR	R	R	R	MS	MR
Etruria	Córdoba	2010	S	MS	MR	S	S	R	R	R	R	R	MS	MR	MR	R	S	MS
General Pinto	Buenos Aires	2010	S	MS	MR	MS	S	-	R	R	R	R	MR	MR	MR	R	MS	MR
Junín	Buenos Aires	2010	S	MS	MR	MS	S	-	R	R	R	R	MR	MS	MR	R	MS	MR
Landeta	Santa Fe	2010	S	MR	MR	MR	S	R	R	R	R	R	MR	R	R	R	MR	R
Pergamino	Buenos Aires	2010	S	MS	MR	MS	MS	-	R	R	R	R	MR	MR	MR	MR	MS	MR
Rojas	Buenos Aires	2010	S	S	MS	MS	S	R	MR	MR	MR	R	MR	MR	MR	MR	MS	MR
Sancti Spiritu	Santa Fe	2010	S	MS	MR	S	S	-	R	R	R	R	MR	R	MR	MR	MS	MS
Salto	Buenos Aires	2010	S	MS	MR	MS	S	R	R	R	R	R	MR	MR	MR	R	MS	MR
Bigand	Santa Fe	2011	S	MS	MS	S	MS	-	MR	R	MR	MS	MS	MR	MS	R	MS	MR
Carcarañá	Santa Fe	2011	S	MS	MS	S	S	R	R	R	R	R	MR	R	MS	R	MS	MR
Casilda	Santa Fe	2011	S	MS	MS	MS	MS	-	R	MR	MR	R	MS	MR	MS	MR	MS	MR
Chacabuco	Buenos Aires	2011	S	MS	S	MS	S	MS	R	R	R	R	MS	MS	MS	R	S	MS
Corral de Bustos	Córdoba	2011	S	MS	MS	S	S	-	-	R	MR	R	MR	MR	MS	R	MS	MR
Junín	Buenos Aires	2011	S	MS	S	S	S	R	MR	R	MR	R	MS	R	MS	MS	S	MR
Marcos Juárez	Córdoba	2011	S	MS	MS	S	MS	-	R	R	R	R	MR	R	MR	R	MS	MR
María Teresa	Santa Fe	2011	S	MS	S	MS	MS	R	-	R	R	R	MS	R	MS	R	MS	R

<sup>a</sup> Indica a que provincia pertenece cada localidad

Localidad	Provincia	Año de Evaluación	Líneas de Maíz										
			PIO68752	PIO28427	PIO15600	PIO36420	PIO20046	PIO19802	PIO28760	PIO16310	PIO12345	PIO74876	PIO17570
Alejandro Roca	Córdoba	2010	R	MR	MS	MS	-	R	R	MS	MR	MR	MR
Alberdi	Buenos Aires	2010	MR	MR	MS	MR	-	R	R	MS	MR	R	MR
Bell Ville	Córdoba	2010	R	MR	MR	MR	-	R	R	MS	MR	R	R
General Cabrera	Córdoba	2010	MR	MR	MR	MR	-	R	R	MS	MR	R	MS
Chaján	Córdoba	2010	MR	MR	MR	MS	-	R	R	S	MR	MR	MR
El Trebó1	Santa Fe	2010	MR	MR	MS	MR	-	R	R	S	R	R	MR
Etruria	Córdoba	2010	MR	MS	MS	MS	-	R	R	S	MR	MR	MR
General Pinto	Buenos Aires	2010	MR	MR	MS	MR	-	R	R	S	MR	MR	MS
Junín	Buenos Aires	2010	MR	MR	S	MS	-	R	R	S	MS	MR	MS
Landeta	Santa Fe	2010	R	MR	MR	R	-	R	R	S	R	MR	R
Pergamino	Buenos Aires	2010	MR	MR	MS	-	-	R	R	S	MR	MR	MR
Rojas	Buenos Aires	2010	MR	MR	S	MS	S	MR	R	S	MR	MR	MR
Sancti Spiritu	Santa Fe	2010	R	MR	S	MR	-	R	R	S	MR	MR	MR
Salto	Buenos Aires	2010	MR	MR	S	MS	-	R	R	S	MS	MR	MS
Bigand	Santa Fe	2011	MS	MR	MS	MS	S	R	R	S	MS	MS	MR
Carcaraña	Santa Fe	2011	MR	R	MS	MS	S	R	R	S	MR	MR	R
Casilda	Santa Fe	2011	MR	MR	MS	MS	S	R	R	S	MS	MS	R
Chacabuco	Buenos Aires	2011	MS	MR	S	MS	S	MS	R	S	MS	MR	R
Corral de Bustos	Córdoba	2011	R	MS	MS	MS	S	MR	R	S	MS	MS	R
Junín	Buenos Aires	2011	MR	MR	MR	MS	S	R	R	S	R	MS	R
Marcos Juárez	Córdoba	2011	MR	MR	S	MS	S	R	MR	S	MR	MS	R
María Teresa	Santa Fe	2011	R	R	MS	MS	S	R	R	MS	MS	R	R

Localidad	Provincia	Año de Evaluación	Líneas de Maíz															
			Rp1-A	Rp1-B	Rp1-C	Rp1-D	Rp-D5	Rp-G	Rp-G5	Rp-GI	Rp-GDJ	Rp-G5JD	Rp1-J	Rp1-JC	Rp1-FJ	Rp1-K	Rp1-M	Rp3-A
Rojas	Buenos Aires	2011	MS	S	MS	S	S	MR	R	MR	MR	R	MS	MS	MS	MR	S	MR
Salto	Buenos Aires	2011	MS	MS	MS	MS	MS	R	-	R	R	-	MR	R	MS	R	MS	MR
Alberdi	Buenos Aires	2012	MS	MS	MS	MS	MS	-	R	MS	MS	MR	MS	MR	MS	MR	MS	MR
Bell Ville	Córdoba	2012	S	MS	MS	MS	MS	-	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MS	R
Bigand	Santa Fe	2012	MS	MR	S	MS	MS	R	R	R	R	R	MR	MR	MS	R	MS	MS
Corral de Bustos	Córdoba	2012	S	MS	S	MS	S	-	MR	MS	R	MR	MS	MR	MS	MS	MS	MS
Cavanagh	Córdoba	2012	S	MS	S	MS	MS	R	MR	MS	MR	MR	MS	MR	MR	MR	MS	MS
Chacabuco	Buenos Aires	2012	MS	MS	MS	MS	MS	R	R	MR	MR	MR	MR	MS	MR	MR	MS	R
Etruria	Córdoba	2012	MS	MR	MS	MS	MS	MR	MR	MR	MR	MR	MS	MR	MR	MR	MS	MR
Junín	Buenos Aires	2012	S	MS	S	MS	S	-	R	MS	MS	MS	MS	MS	MS	MR	MS	MS
Marcos Juárez	Córdoba	2012	S	MS	S	S	S	MS	MS	MS	MS	MS	S	MS	MS	MS	S	MR

Localidad	Provincia	Año de Evaluación	Líneas de Maíz										
			PIO68752	PIO28427	PIO15600	PIO36420	PIO20046	PIO19802	PIO28760	PIO16310	PIO12345	PIO74876	PIO17570
Rojas	Buenos Aires	2011	R	MS	MS	MS	S	R	R	S	MR	MS	R
Salto	Buenos Aires	2011	MR	MS	R	MS	S	R	R	MS	R	-	R
Alberdi	Buenos Aires	2012	R	MS	MS	MS	S	MR	R	MS	R	MS	R
Bell Ville	Córdoba	2012	R	MS	MS	MS	S	MR	R	MS	MR	MS	R
Bigand	Santa Fe	2012	R	MR	MS	MR	S	R	R	MS	MR	MS	R
Corral de Bustos	Córdoba	2012	R	MR	MS	MS	S	MS	R	MS	MS	MS	R
Cavanagh	Córdoba	2012	MR	MR	S	MS	S	MR	MR	S	MS	MR	R
Chacabuco	Buenos Aires	2012	R	MS	MS	MS	S	R	R	MS	MR	MR	R
Etruria	Córdoba	2012	R	MR	MS	MR	MS	MR	R	MS	MR	R	R
Junín	Buenos Aires	2012	MS	MR	S	MS	S	R	MR	S	MS	MR	R
Marcos Juárez	Córdoba	2012	MR	MS	MS	MS	S	MR	R	S	MR	MS	R

**Tabla anexa 3.** Proporción de pústulas esporulantes que emergen los días posteriores a la inoculación.

Línea – replica	Días después de la Inoculación					
	4	6	8	10	12	14
PIO12345-1	0	0	0,424	0,849	0,970	1
PIO12345-2	0	0,053	0,447	0,868	0,895	1
PIO12345-3	0	0,024	0,262	0,786	0,738	1
PIO12345-4	0	0	0,415	0,878	0,976	1
PIO12345-5*	0	0	0,486	1	-	-
PIO12345-6	0	0,026	0,539	0,974	1	-
PIO12345-7	0	0,026	0,359	0,872	1	-
PIO12345-8	0	0,023	0,386	0,682	0,864	1
PIO12345-9	0	0,025	0,350	1	-	-
PIO12345-10	0	0,023	0,500	0,864	0,909	1
PIO12345-11	0	0,016	0,436	0,790	1	-
PIO12345-12	0	0,065	0,484	0,887	1	-
PIO12345-13	0	0,031	0,492	0,831	0,892	1
PIO12345-14	0	0,033	0,492	0,951	0,902	1
PIO12345-15	0	0,034	0,407	0,864	0,898	1
PIO12345-16	0	0,029	0,382	0,897	0,927	1
PIO12345-17	0	0,029	0,429	1	-	-
PIO12345-18	0	0,021	0,362	0,915	0,957	1
PIO12345-19	0	0,058	0,615	0,981	1	-
PIO12345-20	0	0,031	0,585	0,908	0,985	1
PIO74876-1	0	0	0,087	0,761	0,870	1
PIO74876-2	0	0	0,089	0,689	0,867	1
PIO74876-3	0	0	0,044	0,689	0,867	1
PIO74876-4	0	0	0,056	0,426	0,889	1
PIO74876-5	0	0	0,023	0,455	0,932	1
PIO74876-6	0	0	0,037	0,685	1	-
PIO74876-7	0	0	0,045	0,552	0,881	1
PIO74876-8	0	0	0,057	0,914	1	-
PIO74876-9*	0	0	0	0,621	1	-
PIO74876-10	0	0	0,039	0,596	1	-
PIO74876-11	0	0,029	0,200	0,800	1	-
PIO74876-12	0	0,013	0,187	0,720	0,920	1
PIO74876-13	0	0	0,205	0,739	1	-
PIO74876-14	0	0	0,169	0,880	0,964	1
PIO74876-15	0	0	0,132	0,737	0,895	1

*Continúa en la página siguiente*

\*Replicas no consideradas en el análisis debido a que solo se realizaron dos conteos sobre las mismas como consecuencia de la rápida emergencia de las pústulas.

*Continuación de la página siguiente*

Línea – replica	Días después de la Inoculación					
	4	6	8	10	12	14
PIO74876-16	0	0,013	0,163	0,700	0,963	1
PIO74876-17	0	0	0,093	0,613	0,893	1
PIO74876-18	0	0,012	0,136	0,691	1	-
PIO74876-19	0	0,014	0,206	0,795	1	-
PIO74876-20	0	0	0,209	0,659	0,989	1
PIO16310-1	0	0,118	0,647	1	-	-
PIO16310-2	0	0,129	0,968	1	-	-
PIO16310-3*	0	0	0,366	1	-	-
PIO16310-4	0	0,054	0,595	1	-	-
PIO16310-5*	0	0	0,632	1	-	-
PIO16310-6*	0	0	0,600	1	-	-
PIO16310-7*	0	0	0,683	1	-	-
PIO16310-8*	0	0	0,773	1	-	-
PIO16310-9	0	0,029	0,706	1	-	-
PIO16310-10	0	0,031	0,938	1	-	-
PIO16310-11	0	0,098	0,754	0,951	1	-
PIO16310-12	0	0,053	0,684	0,947	1	-
PIO16310-13	0	0,017	0,583	0,917	1	-
PIO16310-14	0	0,064	0,571	0,825	1	-
PIO16310-15	0	0,050	0,750	0,900	1	-
PIO16310-16	0	0,044	0,638	0,928	1	-
PIO16310-17	0	0,062	0,692	0,862	0,954	1
PIO16310-18	0	0,036	0,600	0,782	1	-
PIO16310-19	0	0,015	0,831	1	-	-
PIO16310-20	0	0,050	0,783	0,917	1	-

**Tabla anexa 4.** Parámetros de las rectas o curvas calculadas para cada una de las replicas.

Línea – replica	Método de regresión lineal <sup>a</sup>				Método de regresión no lineal <sup>b</sup>		
	Pendiente	Ordenada	R <sup>2</sup>	T <sub>50</sub>	Pendiente	R <sup>2</sup>	T <sub>50</sub>
PIO12345-1	0,517	0,735	0,989	8,249	9,755	0,997	8,255
PIO12345-2	0,493	0,714	0,907	8,687	8,459	0,994	8,160
PIO12345-3	0,464	0,524	0,860	9,641	7,2	0,959	8,974
PIO12345-4	0,547	0,507	0,977	8,220	10,73	0,998	8,234
PIO12345-5	-	-	-	-	-	-	-
PIO12345-6	0,975	-2,769	0,999	7,967	14,50	1	7,857
PIO12345-7	0,771	-1,563	1,000	8,509	11,07	0,999	8,374
PIO12345-8	0,503	0,295	0,939	9,358	6,569	0,991	8,763
PIO12345-9	0,788	-1,686	1,000	8,489	29,12	0,999	8,114
PIO12345-10	0,555	0,109	0,888	8,806	8,843	0,992	8,033
PIO12345-11	0,738	-1,399	0,962	8,677	8,570	0,992	8,298
PIO12345-12	0,682	-0,575	0,998	8,170	9,530	0,999	7,999
PIO12345-13	0,515	0,441	0,896	8,851	7,88	0,991	8,110
PIO12345-14	0,554	0,289	0,817	8,512	11,57	0,992	7,964
PIO12345-15	0,532	0,293	0,912	8,855	9,015	0,994	8,290
PIO12345-16	0,579	-0,082	0,920	8,773	10,72	0,996	8,297
PIO12345-17	0,861	-2,069	1,000	8,209	23,12	0,998	8,042
PIO12345-18	0,649	-0,661	0,940	8,727	12,34	0,999	8,313
PIO12345-19	0,911	-2,028	1,000	7,711	12,49	0,999	7,640
PIO12345-20	0,660	-0,483	0,955	8,307	10,96	0,997	7,742
PIO74876-1	0,621	-1,053	0,871	9,746	13,50	0,98	9,273
PIO74876-2	0,615	-1,062	0,924	9,862	11,54	0,999	9,452
PIO74876-3	0,703	-2,066	0,905	10,047	13,32	0,999	9,516
PIO74876-4	0,704	-2,221	1,000	10,264	12,66	0,999	10,22
PIO74876-5	0,873	-3,936	0,998	10,238	15,33	1	10,12
PIO74876-6	1,135	-5,864	1,000	9,572	18,38	0,999	9,581
PIO74876-7	0,719	-2,319	0,976	10,179	11,85	0,999	9,878
PIO74876-8	0,737	-1,984	0,750	9,478	22,13	0,999	9
PIO74876-9	-	-	-	-	-	-	-
PIO74876-10	1,006	-4,818	1,000	9,759	18,54	0,999	9,785
PIO74876-11	0,686	-1,122	0,983	8,924	12,21	0,999	8,901
PIO74876-12	0,617	-0,834	0,988	9,455	10,18	0,999	9,152
PIO74876-13	0,732	-1,685	1,000	9,128	11,05	0,999	9,032
PIO74876-14	0,689	-1,224	0,910	9,028	15,37	0,999	8,807
PIO74876-15	0,593	-0,672	0,929	9,568	11,64	0,995	9,241
PIO74876-16	0,679	-1,340	0,999	9,339	11,08	0,999	9,237
PIO74876-17	0,641	-1,343	0,979	9,891	11,04	0,998	9,636
PIO74876-18	0,687	-1,446	0,991	9,383	12,28	0,997	9,313
PIO74876-19	0,757	-1,793	0,998	8,971	12,02	0,999	8,902
PIO74876-20	0,775	-2,124	0,985	9,188	9,939	0,995	9,218

*Continúa en la página siguiente*

Valor R<sup>2</sup> es una forma de interpretar el valor r (coeficiente de correlación). Es un valor comprendido entre cero y uno e indica la fracción de la varianza que es compartida por ambas variables (X y Y).

<sup>a</sup> Rectas obtenidas mediante transformación probit. A partir de la ecuación de la recta y mediante extrapolación se obtiene el día al cual el 50% de las pústulas esporulantes emergieron (T<sub>50</sub>).

<sup>b</sup> Curvas obtenidas mediante el modelo de dosis – respuesta. Los parámetros pendiente y T<sub>50</sub> son calculados por el programa.

*Continuación de la página siguiente*

Línea – replica	Método de regresión lineal <sup>a</sup>				Método de regresión no lineal <sup>b</sup>		
	Pendiente	Ordenada	R <sup>2</sup>	T <sub>50</sub>	Pendiente	R <sup>2</sup>	T <sub>50</sub>
PIO16310-1	0,782	-0,881	1,000	7,517	10,39	0,999	7,44
PIO16310-2	1,490	-5,070	1,000	6,758	19,22	1	6,655
PIO16310-3	-	-	-	-	-	-	-
PIO16310-4	0,923	-2,145	1,000	7,741	13,65	0,999	7,708
PIO16310-5	-	-	-	-	-	-	-
PIO74876-6	-	-	-	-	-	-	-
PIO74876-7	-	-	-	-	-	-	-
PIO74876-8	-	-	-	-	-	-	-
PIO74876-9	1,216	-4,185	1,000	7,553	16,25	0,999	7,525
PIO74876-10	1,698	-7,053	1,000	7,098	22,22	1	7,032
PIO74876-11	0,736	-0,538	0,962	7,524	11,76	0,999	7,240
PIO74876-12	0,810	-1,322	0,972	7,803	12,53	0,999	7,483
PIO74876-13	0,878	-2,200	0,965	8,202	11,97	0,999	7,755
PIO74876-14	0,616	-0,062	0,953	8,222	8,256	0,999	7,812
PIO74876-15	0,732	-0,750	0,898	7,859	13,20	0,999	7,347
PIO74876-16	0,792	-1,306	0,970	7,958	11,77	0,999	7,598
PIO74876-17	0,513	0,815	0,893	8,157	10,14	0,98	7,455
PIO74876-18	0,643	-0,400	0,895	8,395	8,039	0,97	7,814
PIO74876-19	1,559	-6,513	1,000	7,385	20,85	1	7,359
PIO74876-20	0,757	-0,883	0,892	7,771	14,38	0,999	7,288



**Tabla anexa 5.** Tipos de reacción y pústulas/cm<sup>2</sup> de 196 líneas RILs producto del cruzamiento entre Buck Poncho X Purple Straw a 8 razas de *P. triticina*.

Razas	Líneas RILs																			
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20
Ma07BG	R	R	S	S	R	S	S	R	R	R	R	MR	S	R	MR	S	MR	S	R	S
66	R	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	MS	MS	S	S	R	S	R	R
Ba08PIG	MR	S	R	MR	MR	S	S	MR	MR	MR	MR	S	MS	MS	S	S	MR	S	MR	MR
Ba08Bg18	R	MS	MR	MR	R	S	S	R	R	R	R	MS	MS	MS	MS	S	R	S	R	MR
Ba08A801	MR	MR	MR	MR	R	S	S	MR	R	MR	R	MR	S	MR	MR	S	MR	S	MR	MR
77M	R	R	R	MR	R	S	S	R	R	R	R	MR	S	MR	MR	S	MR	MS	R	MR
77M <sup>a</sup>						S	-						R			R		MS		
Ca07DMC	S	S	MS	MS	MS	S	S	MS	MS	S	S	S	S	MS	MS	S	S	S	S	S
Ma07KE	S	S	S	S	MS	S	S	S	S	S	MS	S	S	MS	S	S	S	S	S	S
Pústulas/cm <sup>2</sup>	33,75	62,50	51,25	45,00	32,50	56,25	-	45,00	57,50	45,00	43,75	58,75	31,25	41,25	56,25	28,33	51,25	37,50	51,25	62,50

<sup>a</sup> Raza que detectó resistencia en planta adulta, solo las líneas susceptibles en plántula a la infección de esta raza fueron evaluadas en planta adulta

Para algunas líneas el número promedio de pústulas/cm<sup>2</sup> no fue considerado debido a que no se tenía el dato de los tres años de evaluación como consecuencia de que las hojas se secaron por los golpes de calor sufridos y no se pudo realizar el conteo correctamente.

R: 0; - 11+, MR: 11+2<sup>-</sup> - 1+2, MS: 22+ - 2++3, S: 2++34 - 4.

Razas	Líneas RILs																			
	21	22	23	24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	35	36	37	38	39	40
Ma07BG	R	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	MS	R	S	S	R	S	R
66	S	S	MS	R	S	R	R	S	R	R	S	R	S	R	R	MS	R	S	S	MS
Ba08PIG	S	S	S	MR	S	MR	MR	S	MR	MR	S	MR	MS	MR	MR	S	MR	S	S	MS
Ba08Bg18	MS	S	MS	MR	MS	R	MR	S	MR	R	MS	R	MS	MR	R	MS	MR	MS	S	MR
Ba08A801	MR	S	S	MR	MR	R	MR	S	MR	MR	MR	R	MR	MR	MR	S	MR	MR	S	MR
77M	R	S	S	MR	R	R	R	S	MR	R	R	R	R	MR	R	S	MR	R	S	R
<b>77M</b>		MS	MS					MR								MR			S	
Ca07DMC	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MS	MS	S	S	MS
Ma07KE	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	MS
Pústulas/cm <sup>2</sup>	52,50	41,25	41,25	51,25	43,75	35,00	46,25	50,00	47,50	61,25	43,75	43,75	55,00	43,75	60,00	57,50	63,75	55,00	57,50	48,75
Razas	Líneas RILs																			
	41	42	43	44	45	46	47	48	49	50	51	52	53	54	55	56	57	58	59	60
Ma07BG	S	S	R	MR	S	R	R	S	R	R	MS	S	R	R	R	R	S	S	S	MS
66	S	S	S	R	S	MS	S	R	R	S	R	MS	S	S	R	R	R	MR	R	S
Ba08PIG	S	S	S	MR	S	S	S	MR	MR	S	R	S	S	MS	R	MR	MR	MR	MR	S
Ba08Bg18	S	MS	MS	MR	S	MS	MS	MR	MR	MS	MR	S	MS	MR	R	MR	R	MR	MR	S
Ba08A801	S	S	MR	MR	S	R	MR	MR	R	MR	MR	S	MR	R	R	MR	MR	MR	MR	MS
77M	S	MS	R	R	MS	R	R	MR	R	MR	MR	S	MR	R	R	R	MR	MR	MR	MS
<b>77M</b>	MS				MS							MR								
Ca07DMC	S	S	S	S	S	MS	S	S	MS	S	S	S	S	S	MS	MS	S	S	S	S
Ma07KE	MS	S	S	S	S	MS	S	S	MS	S	S	S	S	S	MS	MS	S	S	S	S
Pústulas/cm <sup>2</sup>	50,00	-	36,25	43,75	56,25	43,75	38,75	53,75	36,25	48,75	21,25	38,33	36,25	37,50	23,75	47,50	36,25	43,75	50,00	-

Razas	Líneas RILs																			
	61	62	63	64	65	66	67	68	69	70	71	72	73	74	75	76	77	78	79	80
Ma07BG	S	S	S	-	S	R	R	S	S	R	S	S	S	R	MR	R	R	S	MR	MR
66	R	S	S	MR	MR	S	S	S	S	S	MR	R	R	R	S	R	MS	R	S	S
Ba08PIG	MR	S	S	MR	MR	S	S	S	S	S	MR	MR	MR	MR	S	MR	S	MR	S	S
Ba08Bg18	R	S	S	MR	MR	MS	MS	MS	S	MS	MR	MR	R	R	MS	MR	S	MR	MS	MS
Ba08A801	R	S	MS	MR	MR	MR	MR	MS	MS	MR	MR	MR	MR	R	MR	MR	MR	MR	MR	MR
77M	MR	S	S	MR	MR	R	MR	S	MS	MR	MR	MR	MR	R	R	R	R	MR	MR	R
<b>77M</b>		MR	R					R	R											
Ca07DMC	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
Ma07KE	S	S	S	S	S	S	MS	S	S	S	S	S	-	S	S	S	S	S	S	S
Pústulas/cm <sup>2</sup>	57,50	41,75	41,25	-	33,75	51,25	46,25	46,25	31,25	41,25	51,25	37,50	31,25	51,25	26,25	33,75	52,50	40,00	50,00	56,25
Razas	Líneas RILs																			
	81	82	83	84	85	86	87	88	89	90	91	92	93	94	95	96	97	98	99	100
Ma07BG	R	S	S	MR	S	MR	S	S	R	R	S	R	MR	R	R	R	R	R	R	S
66	S	S	MS	S	MR	R	R	R	R	S	S	R	S	R	R	S	R	S	R	S
Ba08PIG	S	S	MS	S	MR	MR	MR	MR	MR	S	S	MR	S	MR	MR	S				
Ba08Bg18	MS	S	S	MS	MR	MR	MR	MR	R	MS	S	MR	MS	MR	R	MS				
Ba08A801	MR	S	MS	MR	MR	MR	MR	MR	R	MR	MS	MR	MR	R	MR	MR				
77M	MR	S	S	MR	MR	MR	MR	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	R	R	S
<b>77M</b>		MS	MR								S									S
Ca07DMC	S	S	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S				
Ma07KE	S	S	MS	S	S	S	S	S	S	S	S	S	-	S	S	S				
Pústulas/cm <sup>2</sup>	40,00	41,25	50,00	31,25	42,50	38,75	63,75	41,25	36,25	36,25	53,75	53,75	37,50	48,75	36,25	56,25	-	-	60	55

Razas	Líneas RILs																			
	101	102	103	104	105	106	107	108	109	110	111	112	113	114	115	116	117	118	119	120
Ma07BG	R	R	S	R	R	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S	S	R	S	R	S
66	S	S	MR	R	R	R	S	R	MR	R	MR	S	MS	MR	R	MR	MS	S	S	S
Ba08PIG																				
Ba08Bg18																				
Ba08A801																				
77M	R	R	MR	R	R	MR	R	R	R	R	MR	R	R	R	MR	MR	R	MS	R	MS
<b>77M</b>																		MS		R
Ca07DMC																				
Ma07KE																				
Pústulas/cm <sup>2</sup>	52,5	48,5	45	52,5	45	40	47,5	22,5	37,5	42,5	55	32,5	40	37,5	42,5	42,5	42,5	47,5	48,5	37,5
Razas	Líneas RILs																			
	121	122	123	124	125	126	127	128	129	130	131	132	133	134	135	136	137	138	139	140
Ma07BG	R	R	S	S	S	S	S	R	R	R	S	S	R	R	R	R	MS	R	S	S
66	MS	MS	R	MR	S	MR	R	R	MR	S	R	S	MS	R	S	S	R	MS	MR	S
Ba08PIG																				
Ba08Bg18																				
Ba08A801																				
77M	R	R	R	S	S	MR	R	R	R	R	R	S	R	R	R	R	R	R	MR	S
<b>77M</b>				MS	MS							MR								MS
Ca07DMC																				
Ma07KE																				
Pústulas/cm <sup>2</sup>	41	40	38,5	-	47,5	42,5	42,5	35	-	37,5	27,5	40	26	32,5	22,5	32,5	18,5	47,5	37,5	-

Razas	Líneas RILs																			
	141	142	143	144	145	146	148	149	150	151	152	153	154	155	156	157	158	159	160	161
Ma07BG	S	S	R	S	R	S	R	S	R	R	-	S	R	S	S	MS	S	R	R	S
66	S	MS	MS	S	MS	R	S	R	MS	S	MR	MR	R	S	S	R	MR	MS	MS	MR
Ba08PIG																				
Ba08Bg18																				
Ba08A801																				
77M	MS	S	R	S	R	MR	MR	MR	R	R	R	S	R	S	S	R	MR	R	R	MR
77M	MR	MR		MS										MR	MS					
Ca07DMC																				
Ma07KE																				
Pústulas/cm <sup>2</sup>	22,5	27,5	27,5	-	27,5	50	47,5	30	45	37,5	-	40	27,5	22,5	50	35	55	32,5	42,5	47,5
Razas	Líneas RILs																			
	162	163	164	165	166	167	168	169	170	171	172	173	174	175	176	177	178	179	180	181
Ma07BG	R	S	R	R	S	-	R	R	R	S	S	R	R	R	R	S	R	R	R	S
66	MR	R	MS	MR	MS	R	MS	S	R	MS	R	MR	MR	R	R	MS	R	S	S	MS
Ba08PIG																				
Ba08Bg18																				
Ba08A801																				
77M	R	MR	MR	R	MS	MR	R	R	R	S	MR	R	R	R	R	S	R	R	R	S
77M					MS					MS						MR				MR
Ca07DMC																				
Ma07KE																				
Pústulas/cm <sup>2</sup>	43,5	45	47,5	42,5	-	-	27,5	13,5	40	37,5	42,5	-	45	35	-	-	37,5	43,5	-	37,5

Razas	Líneas RILs																	
	182	183	184	185	186	187	188	189	190	191	193	194	195	196	197	198	P	BP
Ma07BG	R	R	R	R	R	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	R	S	R
66	S	MR	S	S	R	MS	MS	S	R	R	MS	S	R	S	S	S	S	R
Ba08PIG																	S	MR
Ba08Bg18																	S	R
Ba08A801																	S	R
77M	R	R	R	R	R	R	S	MS	MR	R	R	R	R	MS	S	S	S	R
<b>77M</b>							MR	MS						MS	S		MS	R
Ca07DMC																	S	MS
Ma07KE																	S	MS
Pústulas/cm <sup>2</sup>	23,5	32,5	37,5	42,5	40	27,5	37,5	47,5	17,5	17,5	17,5	40	27,5	-	-	50	71	10