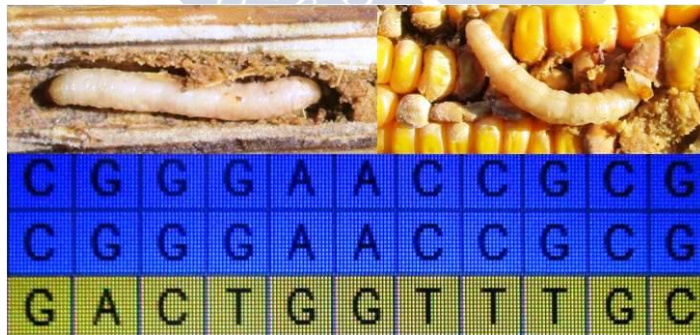


REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS A LA RESISTENCIA A INSECTOS Y AL RENDIMIENTO EN MAÍZ

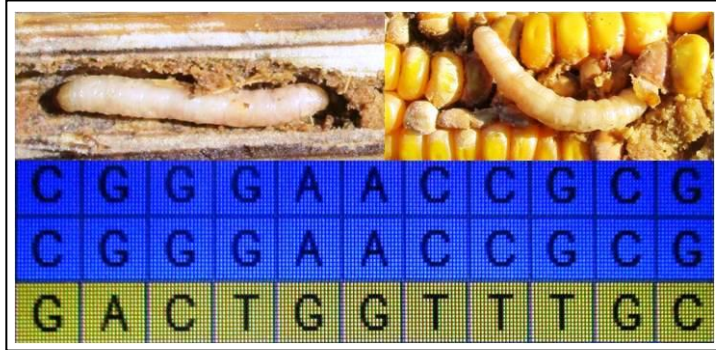
José Cruz Jiménez Galindo



Tesis Doctoral

Julio de 2017









Departamento de Producción Vegetal
Escuela Politécnica Superior
Universidad de Santiago de Compostela

José Cruz Jiménez Galindo

TESIS DOCTORAL

**REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS A LA
RESISTENCIA A INSECTOS Y AL RENDIMIENTO
EN MAÍZ**

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO





**REGIONES GENÓMICAS ASOCIADAS A LA
RESISTENCIA A INSECTOS Y AL RENDIMIENTO
EN MAÍZ**

Memoria para optar al grado de Doctor, que presenta

José Cruz Jiménez Galindo

Pontevedra, 20 de Junio de 2017





ROSA ANA MALVAR PINTOS, Profesora de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) y BERNARDO ORDÁS LOPEZ, Investigador contratado del CSIC, en calidad de directores y MARIA ROSA MOSQUERA LOSADA, Profesor titular del Departamento de Producción Vegetal - USC, en calidad de tutor.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Regiones genómicas asociadas a la resistencia a insectos y al rendimiento en maíz” para optar al grado de Doctor presentada por José Cruz Jiménez Galindo ha sido realizada bajo su dirección en la Misión Biológica de Galicia - CSIC. Considerando que el trabajo está finalizado y constituye tema de tesis doctoral, autorizan su presentación en la Universidad de Santiago de Compostela.

Para que conste se expide el presente certificado en Pontevedra a 27 de mayo del 2017.

Rosa Ana Malvar Pintos

Bernardo Ordás López

Rosa Mosquera Losada



Agradecimientos

Deseo agradecer a la Dra. Rosa Ana Malvar Pintos y al Dr. Bernardo Ordás López por la valiosa formación científica que me brindaron y por la excelente dirección de tesis. A la Dra. María Rosa Mosquera Losada tutora de tesis del Doctorado en Investigación Agraria y Forestal en la Universidad de Santiago de Compostela.

Agradecer también al Dr. Pedro Revilla Temiño, a la Dra. Elena Cartea y al Dr. Fernando Samayoa López. A la Dra. Ana Butrón Gómez y Dra. María de la Fuente por sus excelentes contribuciones científicas en la realización de este trabajo doctoral. Al personal técnico Beatriz Lago y Ana Alonso por su ayuda en la fase experimental y de laboratorio. A todo el personal técnico y de campo que han contribuido en la fase experimental de esta investigación.

Así mismo a los proyectos AGL2012-33415 y AGL2015-67313-C2-1-R ambos cofinanciados por FEDER y por el Plan Estatal de Ciencia y Tecnología de España por financiar esta investigación.

Agradecer también a la Misión Biológica de Galicia y al Consejo Superior de Investigaciones Científicas por la disponibilidad de los medios para llevar a cabo esta investigación.

Y por último agradecer al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales Agrícolas y Pecuarias (INIFAP), y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACyT) por la beca recibida durante el Doctorado.



A Dios, por darme la oportunidad de vivir.

A mi esposa Gloria Castellanos Pérez y nuestros pequeños Alan, José Cruz y Pablo.

A mis Padres Graciela Galindo V. y José Cruz Jiménez I.

A la memoria de mi abuelita Ma. Guadalupe Ibarra A.

José Cruz Jiménez G.



RESUMEN

El taladro mediterráneo del maíz (MCB), *Sesamia nonagrioides*, es la plaga más importante del maíz, *Zea mays*, en los países mediterráneos, causando pérdidas significativas de rendimiento. El conocimiento avanzado sobre la genómica de la resistencia natural del maíz al taladro podría ayudar a diseñar programas de mejora para obtener variedades con mayor resistencia y/o tolerancia a los ataques del taladro. El objetivo principal de este estudio fue validar QTL (“*quantitative trait loci*”) previamente detectados e identificar QTL y genes para resistencia y caracteres agronómicos bajo alta infestación con *S. nonagrioides*. Para ello utilizamos tres poblaciones de mapeo: HIF (“*heterogeneous inbred families*”), RIL (“*recombinant inbred lines*”) y MAGIC (“*multi-parent advanced generation inter-cross*”).

La población HIF se utilizó para validar QTL para longitud de galerías, rendimiento y floración, previamente detectados en el análisis de la población RIL de mapeo EP42 × EP39. La ubicación y el efecto del QTL para rendimiento de grano se confirmaron en el análisis de la población HIF. La fijación fuera de la región objetivo llevó a un aumento en la proporción de la varianza fenotípica explicada por el QTL (de 10,7% a 34,9%). Sin embargo, el QTL de longitud de galerías no fue validado probablemente debido a la fijación de genes relacionados con la resistencia al taladro del maíz o la floración. Por otra parte, el análisis HIF permitió la detección de nuevos QTL uno para la altura de la planta, no detectado previamente probablemente debido al efecto confundido de QTL múltiple segregantes, y otro QTL para la longitud de galerías, en una región no genotipada en la población biparental original.

Un segundo estudio se realizó con una población RIL con 162 líneas obtenidas de la cruz A637 × A509. Esta investigación se realizó para identificar QTL para la resistencia a *S. nonagrioides* y caracteres agronómicos. Además, se utilizaron cuatro índices para identificar QTL para mejorar dos o más caracteres simultáneamente. Se detectaron 12 QTL significativos para caracteres agronómicos y de resistencia. Los QTL en los bins 1.10 y 5.04 fueron interesantes porque la misma variante alélica en estos QTL mejoró simultáneamente el rendimiento y la resistencia a los insectos. Se encontraron algunos QTL para índices que combinan características de rendimiento y resistencia, especialmente en la región 10.02-10.03. La selección de

genotipos con el alelo favorable del QTL en el cromosoma 5 (bin 5.01) reducirá la longitud de galerías sin afectar al rendimiento, la floración y la altura de planta y el QTL en la región 5.04 podría utilizarse para mejorar la resistencia del tallo y el rendimiento simultáneamente. El alelo del QTL en la región 1.10 podría mejorar la resistencia en mazorca, en tallo y el rendimiento, sin efectos negativos secundarios sobre otros caracteres.

Una tercera investigación consistió en un estudio de asociación de todo el genoma (GWAS) en una población MAGIC con 607 líneas. Esta población se construyó con 8 padres (A509, EP125, EP86, PB130, F473, EP53, EP17 y EP43) con diferentes mecanismos de resistencia a *S. nonagrioides* y diferentes orígenes: EP17, EP43, EP53, EP86; PB130 y F473 provienen de germoplasma europeo; y A509 y EP125 de germoplasma de Estados Unidos. En este estudio se utilizaron dos conjuntos de datos con 29.292 y 224.363 SNPs (“*single nucleotide polymorphisms*”). En la población MAGIC identificamos 9 SNPs para resistencia en grano, correspondiente a 7 QTL en los que hay 6 genes candidatos con función descrita. También se encontraron 75 SNPs para altura de planta correspondiente a 48 QTL. Para floración se encontraron 47 SNPs significativos y 34 QTL. Para longitud de galerías se encontraron 5 SNPs significativos y 5 QTL con 9 genes candidatos con función descrita. Finalmente, para rendimiento de grano se encontraron 28 SNPs significativos y 15 QTL. La longitud de las galerías está positivamente correlacionada con el rendimiento, esto podría deberse a la relación de ambos caracteres con la altura de planta. Para resistencia en grano se localizó un gen candidato GRMZM2G178190 que codifica para una proteína macrofágica asociada a la resistencia natural. Para longitud de galerías se localizó el gen candidato GRMZM2G057140 que codifica una enzima: fosfatasa ácida, utilizada en la regeneración de la pared celular de las plantas. El papel de la pared celular como defensa frente al ataque de los taladros ya ha sido descrito, en concreto para la PB130 y la EP125, ambas parentales de la MAGIC. Con los 5 QTL detectados para longitud de galerías es posible diseñar un programa de mejora genética con MAS (“*marker assisted selection*”) para disminuir la longitud de galerías sin descuidar los QTL de mayor efecto en rendimiento, mejorando así favorablemente ambos caracteres.

RESUMO

O taladro mediterráneo do millo, *Sesamia nonagrioides*, é a praga máis importante do millo, *Zea mays*, nos países mediterráneos, causando perdas significativas de rendemento. O coñecemento avanzado sobre a xenómica da resistencia natural do millo ó taladro podería axudar a deseñar programas de mellora para obter variedades con maior resistencia e/ou tolerancia ós ataques do taladro. O obxectivo principal deste estudo foi validar QTL previamente detectados e identificar QTL e xenes para resistencia e caracteres agronómicos baixo alta infestación con *S. nonagrioides*. Para iso utilizamos tres poboacións de mapeo: HIF, RIL e MAGIC.

A poboación HIF utilizouse para validar QTL para a lonxitude de galerías, rendemento e floración, previamente detectados na análise da poboación RIL de mapeo EP42 × EP39. A localización e o efecto do QTL para rendemento de gran confirmáronse na análise da poboación HIF. A fixación fóra da rexión obxectivo levou a un aumento na proporción da varianza fenotípica explicada polo QTL (de 10,7% a 34,9%). Con todo, o QTL de lonxitude de galerías non foi validado probablemente debido á fixación de xenes relacionados coa resistencia ó taladro do millo, ou a floración. Por outra banda, a análise HIF permitiu a detección de novos QTL un para a altura da planta, non detectado anteriormente probablemente debido ó efecto confundido de QTL múlti segregantes, e outro QTL para a lonxitude de galerías, nunha rexión non xenotipada na poboación biparental orixinal.

Un segundo estudo foi feito cunha poboación RIL con 162 liñas obtidas do cruzamento A637 × A509. Esta investigación foi realizada para identificar QTL para resistencia a *S. nonagrioides* e caracteres agronómicos. Ademais, usáronse catro índices para identificar QTLs para mellorar dous ou máis caracteres simultaneamente. Doce QTL significativos foron detectados para caracteres agronómicos e de resistencia. QTL nos bins 1.10 e 5.04 foron interesantes porque a mesma variante alélica para estes QTL melloró ó mesmo tempo rendemento e a resistencia a insectos. Atopáronse algún QTL para índices que combinan as características de rendemento e resistencia, especialmente na rexión 10.02-10.03. A selección de xenótipos co alelo favorable do QTL non cromosoma 5 (bin 5.01) vai diminuír a lonxitude de galerías sen afectar ó rendemento, floración e altura da planta, e o QTL na rexión 5.04 podería

ser utilizada para mellorar a resistencia do tallo e o rendemento simultaneamente. O alelo do QTL na rexión 1.10 podería mellorar a resistencia na mazaroca, o tallo e o rendemento sen efectos secundarios noutros caracteres.

Unha terceira investigación consistiu nun estudo de asociación de todo o xenoma (GWAS) nunha poboación MAGIC con 607 liñas. Esta poboación construíuse con 8 pais (A509, EP125, EP86, PB130, F473, EP53, EP17 e EP43) con diferentes mecanismos de resistencia a *S. nonagrioides* e diferentes oríxenes: EP17, EP43, EP53, EP86; PB130 e F473 provenen de xermoplasma europeo; e A509 e EP125 de xermoplasma de Estados Unidos. Neste estudo utilizáronse dous conxuntos de datos con 29.292 e 224.363 SNPs. Na poboación MAGIC identificamos 9 SNPs para a resistencia en gran, correspondentes a 7 QTL nos que hai 6 xenes candidatos con función descrita. Tamén se atoparon 75 SNPs para altura da planta correspondente a 48 QTL. Para floración atopáronse 47 SNPs significativos e 34 QTL. Para lonxitude de galerías atopáronse 5 SNPs significativos e 5 QTL con 9 xenes candidatos con función descrita. Finalmente, para o rendemento de gran atopáronse 28 SNPs significativos e 15 QTL. A lonxitude das galerías está positivamente correlacionada co rendemento, isto podería deberse á relación de ambos os caracteres coa altura de planta. Para resistencia en gran localizouse un xene candidato GRMZM2G178190 que codifica para unha proteína macrofágica asociada á resistencia natural. Para lonxitude de galerías localizouse o xene candidato GRMZM2G057140 que codifica unha enzima: fosfatasa aceda, utilizada na rexeneración da parede celular das plantas. O papel da pared celular como defensa fronte ó ataque dos taladros xa ten sido descrito, en concreto para a PB130 e a EP125, ambas parentais da MAGIC. Cos 5 QTL detectados para lonxitude de galerías é posible deseñar un programa de mellora xenética con MAS para diminuír a lonxitude de galerías sen descoidar os QTL de maior efecto en rendemento, mellorando así favorablemente ambos os caracteres.

ABSTRACT

The Mediterranean corn borer (MCB), *Sesamia nonagrioides*, is a major pest of maize, *Zea mays*, in mediterranean countries, inflicting significant yield losses. The advanced knowledge on genomics of maize natural resistance to corn borer could help to design breeding programs to obtain varieties with higher resistance and/or tolerance to corn borer attacks. The main objective of this study was to validate QTL previously detected, and to identify QTL and genes for resistance and agronomic traits under high infestation with *S. nonagrioides*. For that we used three mapping populations: HIF, RIL and MAGIC.

The HIF population was used to validate QTL for stalk tunnels, yield and flowering, previously detected in the analysis of the EP42 × EP39 RIL mapping population. The location and effect of the QTL for grain yield was confirmed in the HIF population analysis. The fixation outside the target region led to an increase in the proportion of phenotypic variance explained by the QTL (from 10.7 % to 34.9 %). However, the stalk tunneling QTL was not validated probably due to fixation of genes related to corn borer resistance or to flowering. On the other hand, the HIF analysis allowed the detection of news QTL one for plant height, not previously detected probably due to the confounded effect of multiple segregating QTL, and other QTL for tunnel length, in a region that had not been genotyped in the original biparental population.

A second study was made with a RIL population with 162 lines released from the cross A637 × A509. This research was made to identify QTL for resistance to *S. nonagrioides* and agronomic traits. In addition, four indices were used to identify QTL to improve two or more traits simultaneously. Twelve significant QTL were detected for agronomic and resistance traits. QTL at bins 1.10 and 5.04 were interesting because the same allelic variant at these QTL simultaneously improved yield and insect resistance. Several QTL for indexes which combine yield and resistance traits were found, especially in the region 10.02-10.03. Selecting genotypes with the favorable allele for QTL on chromosome 5 (bin 5.01) will decrease tunnel length without affect yield, silking and plant height and QTL on the region 5.04 could be used to improve stalk resistance and yield simultaneously. The allele of QTL in

region 1.10 could improve ear and stalk resistance and yield without secondary negative effects on other traits.

A third research consisted in a genome wide association study (GWAS) in a MAGIC population with 607 lines. This population was constructed with 8 parents (A509, EP125, EP86, PB130, F473, EP53, EP17 and EP43) with different mechanisms of resistance to *S. nonagrioides* and different origins: EP17, EP43, EP53, EP86; PB130 and F473 come from european germplasm; and A509 and EP125 from United States germplasm. In this study two sets of 29,292 and 224,363 SNPs were used. In the MAGIC population we identify 9 SNPs for grain resistance, corresponding to 7 QTL in which there are 6 candidate genes with described function. Also 75 SNPs were found for plant height corresponding to 48 QTL. 47 significant SNPs and 34 QTL were found for silking. For tunnel length we found 5 significant SNPs and 5 QTL with 9 candidate genes with described function. Finally for grain yield 28 significant SNPs and 15 QTL were found. The tunnel length is positively correlated with yield, this could be due to the relationship of both traits with plant height. For grain resistance, a candidate gene was located: GRMZM2G178190 coding for a macrophage protein associated to the natural resistance. For tunnel length, the candidate gene GRMZM2G057140 was found to encode an enzyme: acid phosphatase, used in the regeneration of the cell wall of plants. The role of cell wall as mechanism of defense against MCB attack has already been reported, specifically for PB130 and EP125, both parents of the MAGIC. With the 5 QTL detected for tunnel length it is possible to design a breeding program with MAS to reduce the tunnel length without neglecting the QTL with the greatest effect on yield, thus improving both characters favorably.

ABREVIATURAS

A	Adenina
ADN	Acido desoxirribonucleico
ANOVA	Análisis de varianza
AP	Altura de planta
BC	Retrocruzamiento
bin	Región en el genoma
BLUE	Mejor estimador lineal no sesgado
BLUP	Mejor predictor lineal no sesgado
<i>Bt</i>	<i>Bacillus thuringiensis</i>
C	Citocina
CIM	Mapeo de intervalos compuesto
cM	Centi-morgan
DFE	Días a floración femenina
DH	Haploides dobles
DS	Conjunto de datos totales
DTR	Daño de tallo relativo
ECB	Taladro europeo del maíz
ES	Grupo de datos de estimación
F ₂	Cruzamiento en la generación 2
G	Guanina
GBS	Genotipado por secuenciación
GC	Control genómico
GLM	Modelo lineal generalizado
GS	Selección genómica
GWAS	Estudio de asociación de todo el genoma
HIF	Familias consanguíneas heterogéneas
HTP	Fenotipado de alto rendimiento
K	Matriz de parentesco
Kpb	Kilo pares de bases
LD	Desequilibrio de ligamiento
LG	Longitud de galerías
LOD	Logaritmo de probabilidades
LSIR	Tasa de daño en tallo y hoja
MAGIC	Poblaciones multiparentales con generaciones de recombinación
MCB	Taladro mediterráneo del maíz
MDS	Diferencia mínima significativa
MLM	Modelo lineal mixto

Mpb	Mega pares de bases
NAM	Población anidada para mapeo
NGS	Próxima generación de métodos de secuenciación
NIL	Líneas cuasi-isogénicas
pb	Pares de bases
Q	Matriz Q de estructura de la población
QTL	Loci de características cuantitativas
R	Rendimiento
RG	Resistencia en grano
RIL	Líneas recombinantes consanguíneas
SAM	Selección asistida por marcadores
SAS	Programa de análisis estadísticos
SIM	Mapeo de intervalos simples
SNP	Polimorfismo de nucleótido simple
T	Timina
TS	Grupo de datos de validación
VC	Validación cruzada



CONTENIDO

1. Introducción	3
1.1 Importancia del maíz y de los taladros	3
1.1.1 Importancia del maíz	3
1.1.2 Importancia de los taladros	3
1.1.2.1 Tipos de taladros y su distribución mundial	4
1.1.2.2 Ciclo de vida de <i>Sesamia nonagrioides</i>	5
1.1.2.3 Daño ocasionado a la planta de maíz por <i>S. nonagrioides</i>	5
1.2 Defensa del maíz contra el ataque de <i>S. nonagrioides</i>. Resistencia y tolerancia en sentido amplio	7
1.3 Métodos de control	8
1.3.1 Control químico	8
1.3.2 Control cultural	8
1.3.3 Control biológico	9
1.3.4 Control genético	10
1.3.4.1 Control con variedades de maíz transgénicas	10
1.3.4.2 Control con mejora genética convencional	10
1.4 Asociaciones entre genotipo y fenotipo: búsqueda de QTL y genes relacionados con la resistencia y la tolerancia	12
1.4.1 Poblaciones de mapeo	13
1.4.2 Análisis de QTL	17
1.4.2.1 Principios del análisis de QTL para genes cuantitativos	17
1.4.3 Métodos para detectar QTL	17
1.4.4 Validación de los QTL	21
1.4.4.1 Validación de QTL en campo	21
1.4.4.2 Uso de validación cruzada de QTL	22
1.4.5 Situación de los estudios de QTL de resistencia a los taladros del maíz	24
2. Objetivos	31
2.1 Objetivo general	31
2.2 Objetivos específicos	31
3. Materiales y métodos	35
3.1 Validación de QTL en una población HIF	35
3.1.1 Material vegetal	35
3.1.2 Datos fenotípicos	37
3.1.3 Datos genotípicos	37
3.1.4 Análisis estadístico de los datos fenotípicos	38
3.1.5 Análisis de QTL	38
3.1.6 Desequilibrio de ligamiento	38
3.2 Mapeo de QTL en una población RIL A637 × A509	39

3.2.1	Material vegetal	39
3.2.2	Datos fenotípicos	40
3.2.3	Datos genotípicos	40
3.2.4	Análisis estadístico de los datos fenotípicos	41
3.2.5	Análisis de QTL de características individuales	41
3.2.6	Análisis de QTL de índices	42
3.2.7	Análisis de QTL conjunto	42
3.3	Mapeo de asociación en una población MAGIC	43
3.3.1	Material vegetal	43
3.3.2	Diseño experimental	45
3.3.3	Datos fenotípicos	46
3.3.4	Datos genotípicos	47
3.3.5	Análisis estadísticos de datos fenotípicos	47
3.3.6	Mapeo de Asociación	48
3.3.6.1	Análisis de asociación	48
3.3.6.2	Construcción de la matriz de parentesco (kinship)	48
3.3.6.3	Umbral de significación	49
3.3.6.4	Desequilibrio de ligamiento y selección de genes candidatos	49
3.3.6.5	Desequilibrio de ligamiento y cálculo de efectos aditivos de los haplotipos	50
4.	Resultados	53
4.1	Validación de QTL en una población HIF	53
4.1.1	Análisis estadístico de los datos fenotípicos	53
4.1.2	Análisis de QTL	53
4.1.3	Desequilibrio de ligamiento	57
4.2	Mapeo de QTL en una población RIL A637 × A509	60
4.2.1	Análisis estadístico de los datos fenotípicos	60
4.2.2	Análisis de QTL de características individuales	61
4.2.3	Análisis de QTL de índices	62
4.2.4	Análisis de QTL conjunto	68
4.3	Mapeo de asociación en una población MAGIC	69
4.3.1	Análisis estadístico de datos fenotípicos	69
4.3.2	Análisis de correlación	70
4.3.3	SNPs significativos para resistencia en grano	71
4.3.4	Haplotipos del QTL por cada SNP significativo para resistencia en grano	74
4.3.5	Genes candidatos por cada SNP significativo para resistencia en grano	77
4.3.6	SNPs significativos para altura de planta	79
4.3.7	Haplotipos del QTL por cada SNP significativo para altura de planta	85
4.3.8	SNPs significativos para floración femenina	90
4.3.9	Haplotipos del QTL por cada SNP significativo para floración femenina	95
4.3.10	SNPs significativos para longitud de galerías	99
4.3.11	Haplotipos del QTL por cada SNP significativo para longitud de galerías	102

4.3.12	Genes candidatos para longitud de galerías	104
4.3.13	SNPs significativos para rendimiento	106
4.3.14	Haplotipos por cada SNP significativo para rendimiento	109
5.	Discusión	117
5.1	Validación de QTL en una población HIF	117
5.2	Mapeo de QTL en una población RIL A637 × A509	119
5.2.1	Análisis estadístico de los datos fenotípicos	119
5.2.2	Análisis de QTL de características individuales	120
5.2.3	Análisis de QTL de índices	122
5.2.4	Análisis de QTL conjunto	123
5.3	Mapeo de asociación en una población MAGIC	124
5.3.1	Análisis estadístico de datos fenotípicos	124
5.3.2	Análisis de correlación	124
5.3.3	Análisis de asociación	125
5.3.4	Desequilibrio de ligamiento de la población MAGIC	127
5.3.5	SNPs significativos para resistencia en grano	128
5.3.6	Genes candidatos por cada SNP significativo para resistencia en grano	128
5.3.7	SNPs significativos para altura de planta	129
5.3.8	SNPs significativos para floración femenina	129
5.3.9	SNPs significativos para longitud de galerías	129
5.3.10	Genes candidatos por cada SNP significativo para longitud de galerías	130
5.3.11	SNPs significativos para rendimiento	131
5.3.12	Diseño de un programa de mejora genética	131
6.	Conclusiones	135
6.1	Validación de QTL en una población HIF	135
6.2	Mapeo de QTL en una población RIL A637 × A509	135
6.3	Mapeo de asociación en una población MAGIC	136
7.	Bibliografía	139
8.	Anexos	161
A-I	Genes candidatos para altura de planta	161
A-II	Genes candidatos para floración femenina	167
A-III	Genes candidatos para rendimiento	171



INTRODUCCIÓN





1. INTRODUCCIÓN

1.1 IMPORTANCIA DEL MAÍZ Y DE LOS TALADROS

1.1.1 Importancia del maíz

La población total mundial creció un 125,4% desde el año 1961, con 3.100 millones de personas, hasta 6.900 millones en 2009 (FAOSTAT, 2017). La superficie cultivada se incrementó tan solo un 14,3% desde el año 1961 con 1.400 millones de hectáreas hasta 1.600 millones de hectáreas en 2010 (FAOSTAT, 2017). Por lo que se hace necesario mejorar los sistemas de producción agrícola y desarrollar variedades de mayor rendimiento, resistentes a factores bióticos y abióticos, como las plagas que son uno de los principales problemas de la producción de alimentos a nivel mundial (Ortega, 1987). Las variedades deben tener resistencia a las plagas para que los agricultores obtengan una mayor rentabilidad, satisfacer la demanda mundial de productos agrícolas y disminuir la contaminación del medio ambiente, al disminuir la aplicación de plaguicidas.

El área sembrada con maíz, a nivel mundial, excede los 184,8 millones de hectáreas, con una producción total de 1037,7 millones de toneladas en el año 2014 (FAOSTAT, 2017). Esto posiciona al cultivo del maíz en segundo lugar en importancia por superficie sembrada tan solo después del trigo y en primer lugar en importancia mundial de acuerdo a la producción en toneladas. En la Unión Europea el área excede los 9,5 millones de hectáreas, con una producción total de 75,8 millones de toneladas en 2014-2015 (COTRISA, 2017). La superficie sembrada de maíz en España en el año 2013 fue de 442.298 hectáreas, con una producción de 4.888.462 toneladas (MAPAMA, 2017).

1.1.2 Importancia de los taladros

La producción de maíz se ve limitada por factores bióticos y abióticos; dentro de los factores bióticos, los insectos son un limitante importante para la producción siendo los taladros uno de los insectos plaga que más daño ocasionan al cultivo de maíz. El taladro del maíz es el nombre genérico para diferentes especies de lepidópteros que se alimentan del maíz produciendo túneles en los tallos y que causan

pérdidas de rendimiento de alrededor del 30% (Meissle *et al.*, 2010); esto significa una pérdida de 311,3 millones de toneladas cada año en el mundo, cuatro veces más de lo que se produce en la Unión Europea (75,8 millones de toneladas). En el noroeste de España la pérdida media de rendimiento está en torno al 15% (Butrón *et al.*, 1999).

1.1.2.1 Tipos de taladros y su distribución mundial

Los taladros o barrenadores del maíz pertenecen a varias especies de lepidópteros, los más importantes a nivel mundial son agrupados dentro de dos familias: Crambidae y Noctuidae. Dentro de la primera destacan las especies: *Ostrinia nubilalis* Hubner (taladro europeo del maíz), presente en Norteamérica, Europa, norte de África y Asia central; el barrenador oriental o asiático del maíz *Ostrinia furnacalis* Guenée en Asia traslapándose en Asia central con *O. nubilalis*; el barrenador de la caña de azúcar, *Diatraea saccharalis* Fabricius, presente desde el sureste de Estados Unidos hasta Argentina; el barrenador moteado del tallo del sorgo, *Chilo partellus* Swinhoe, en Australia, África oriental y Asia suroriental; el barrenador neotropical del maíz, *Diatraea lineolata* Walker, en el este de México, Centro América y el Caribe; y el barrenador grande del maíz, *Diatraea grandiosella* Dyar, en Estados Unidos y México (Ortega, 1987). Dentro de las principales especies de la familia Noctuidae destacan: *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (taladro mediterráneo del maíz) en la región Mediterránea; el barrenador africano del tallo del maíz *Busseola fusca* Fuller en el África sub-Sahariana a altitudes de 500 m o más; y el barrenador rosado africano *Sesamia calamistis* Hampson en las costas más cálidas del oeste de África (Ortega, 1987).

El taladro europeo del maíz (ECB, “European Corn Borer”), *O. nubilalis* Hübner, y el taladro mediterráneo del maíz (MCB, “Mediterranean Corn Borer”), *S. nonagrioides* Lefebvre, son dos de las plagas de insectos más importantes, económicamente, en la producción de maíz en Norte América y Europa (Velasco *et al.*, 2007). El daño al cultivo ocurre durante el estado larvario del insecto. En España son estas dos especies las que causan importantes daños al maíz, siendo *S. nonagrioides* la más abundante y voraz (Lopez *et al.*, 2001; Malvar *et al.*, 2004; Eizaguirre y Fantinou, 2012), lo que la convierte en la plaga insectil más importante

para el cultivo del maíz en toda la cuenca Mediterránea y en España. *S. nonagrioides* es una especie polífaga que además de afectar a los principales cereales (maíz, trigo, arroz, sorgo, etc.) también afecta a otros cultivos como melón, banano, palma y espárrago (Uygun y Kayapinar, 1993; Tarasco, 2001).

1.1.2.2 Ciclo de vida de *Sesamia nonagrioides*

En Galicia, *S. nonagrioides* tiene 2 generaciones por año e incluso hasta tres generaciones dependiendo de las temperaturas alcanzadas durante el verano (Eizaguirre *et al.*, 1994; Velasco *et al.*, 2007) (Figura 1.1.2.2). La larva de *S. nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) se cría en condiciones óptimas a 25 °C y un fotoperiodo largo (16:8 h luz: oscuridad) y pupan en el 5° o 6° estadio larval principalmente (Eizaguirre *et al.*, 2005).

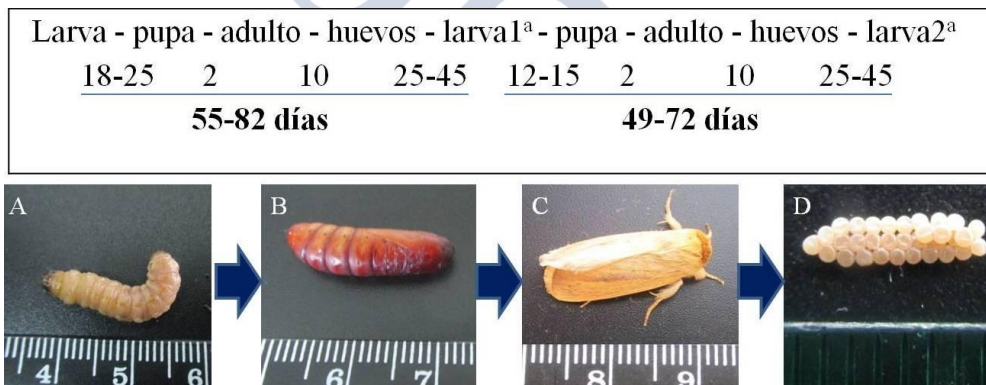


Figura 1.1.2.2 Ciclo de *Sesamia nonagrioides*. Larva de último estadio a punto de pupar (A), pupa (B), adulto (C) y ristra de huevecillos (D).

1.1.2.3 Daño ocasionado a la planta de maíz por *S. nonagrioides*

La primera generación de larvas coincide con la planta juvenil, la segunda generación con la planta adulta, alrededor de la floración del maíz. El mayor daño al cultivo lo producen las larvas de la segunda y subsecuentes generaciones; los adultos depositan sus huevos entre la caña y la vaina de las hojas, a continuación las larvas neonatas penetran en la caña del maíz y viven dentro alimentándose principalmente de la médula (Figura 1.1.2.3).

Las larvas de *S. nonagrioides* comen dentro del tallo de la planta de maíz y esto resulta en pérdidas de rendimiento de grano y forraje debido a que los daños en la medula reducen el movimiento de nutrientes para desarrollar las mazorcas con lo cual reducen considerablemente el contenido del grano y forraje producido. Las larvas pueden también atacar las mazorcas, que además del daño directo que producen promueven infecciones fúngicas que conducen a la contaminación del grano con micotoxinas que pueden afectar a la salud humana y animal (Avantaggiato *et al.* 2003; Butrón *et al.*, 2006). La larva de la primera generación come hojas de plantas jóvenes mientras la segunda y subsecuentes generaciones comen en la medula del tallo y en la mazorca, causando daños y reducción del rendimiento (Malvar *et al.*, 1993).



Figura 1.1.2.3 Larvas de *S. nonagrioides* y daño ocasionado en tallo (A) y en mazorca de maíz (B). Las plantas pequeñas pueden morir por el ataque y las plantas adultas se encaman ocasionando una pérdida indirecta de rendimiento (C). El daño favorece la entrada de hongos fitopatógenos que disminuyen el rendimiento y la calidad del grano (D).

1.2 DEFENSA DEL MAÍZ CONTRA EL ATAQUE DE *S. nonagrioides*. RESISTENCIA Y TOLERANCIA EN SENTIDO AMPLIO

Existen diferentes categorías de resistencia contra el ataque de insectos: antixenosis, antibiosis y tolerancia (Painter, 1951). La antixenosis reduce la probabilidad del contacto entre las plagas y las plantas (Cubero, 2013), por alguna característica repelente o por la ausencia de atrayentes que pueden ser compuestos volátiles, colores llamativos, características químicas internas y externas de los tejidos vegetales y características morfológicas (Poerschmann *et al.*, 2008). La antibiosis es la habilidad de la planta para reducir el crecimiento y desarrollo de la larva después de que el contacto ha sido iniciado (Cubero, 2013), inhibiendo o ralentizando su crecimiento, reproducción y supervivencia como por ejemplo mediante toxinas o inhibidores de proteasas liberados como respuesta al ataque de los insectos (Poerschmann *et al.*, 2008). La tolerancia es el mecanismo mediante el cual la planta manifiesta un buen desarrollo a pesar del daño ocasionado por los insectos, las plantas tolerantes minimizan el efecto del daño del insecto manteniendo su crecimiento sin mermar significativamente su producción. A diferencia de la antibiosis, las plantas tolerantes no tienen ningún efecto sobre el desarrollo del insecto.

Los estudios de antixenosis y antibiosis contra el ataque de los taladros son escasos porque implican vigilar el comportamiento de oviposición del insecto y el desarrollo larval (Butrón *et al.*, 1998a; Ordás *et al.*, 2002). La mayoría de los estudios en *S. nonagrioides* han evaluado la resistencia de los insectos en un sentido amplio; la resistencia de la caña se ha estimado como la menor longitud de galerías en la médula del tallo hechas por los taladros y la resistencia en mazorca mediante una escala subjetiva del ataque. En ambos casos no se tiene en cuenta la biología del insecto ni las pérdidas de rendimiento (Malvar *et al.*, 1993; Butrón *et al.*, 1999).

Por otra parte, para evaluar la tolerancia es necesario estimar pérdidas de rendimiento. Butrón *et al.* (1998b) detectaron distintos niveles de tolerancia al ataque de los taladros en líneas e híbridos de maíz. No obstante, los genotipos que presentaban menores pérdidas de rendimiento, es decir los más tolerantes, no siempre eran los que producían más en condiciones de alta infestación. Puesto que lo que más interesa es genotipos con alto rendimiento cuando el ataque de la plaga es severo se

consideró que una variedad es tolerante en sentido amplio cuando tiene un rendimiento alto en condiciones de alta intensidad de la plaga, independientemente de las pérdidas de rendimiento que ocasione el ataque de los taladros.

Así nos referiremos a variedades resistentes cuando éstas presenten poco daño y a variedades tolerantes cuando la pérdida de rendimiento de la variedad sea pequeña bajo el ataque de MCB.

1.3 MÉTODOS DE CONTROL

Los métodos de control para los taladros son diversos e incluyen el control químico, cultural, biológico y el control mediante la búsqueda de resistencia genética en el cual se incluyen también los cultivos transgénicos.

1.3.1 Control químico

El control químico de la plaga de los taladros implica el uso de insecticidas químicos (organofosforados y piretroides). El control es particularmente difícil debido al comportamiento endófito de las larvas de MCB. Las larvas ya en su primer estadio taladran el tallo (Gonzalez-Nunez *et al.*, 2000; Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2006) y pasan dentro la mayor parte de su vida en su interior, por lo que las aplicaciones deben realizarse coincidiendo con un periodo muy corto que va desde el eclosionado de los huevos hasta la penetración de las larvas en la caña (Velasco *et al.*, 1999). Además el control químico es poco seguro para la salud humana y animal, contribuye a la contaminación de los recursos naturales y es costoso para el agricultor.

1.3.2 Control cultural

Los métodos de control cultural como la rotación de cultivos, la eliminación de rastrojos y malas hierbas son métodos que previenen una infestación severa pero no son métodos que permitan mantener a la plaga bajo control. Para sistemas con maíz en rotación, la elección de cultivos rotacionales, como frijol o guisante, es un elemento importante para el manejo de plagas, malezas y enfermedades (Vasileiadis *et al.*, 2011).

1.3.3 Control biológico

El control biológico consiste en el uso de parasitoides, depredadores y entomopatógenos presentes de manera natural en la vegetación. Por estudios previos realizados en Pontevedra se sabe que el porcentaje de parasitismo en *S. nonagrioides* es muy reducido (Monetti *et al.*, 2003), lo que puede ser debido en parte a que el adulto deposita los huevos entre la vaina y el tallo, así que la vaina los puede proteger del ataque de los parasitoides. Aun así una de las principales especies parasitoides es *Trichogramma* (*Trichogramma* spp.) y puede ser una solución efectiva para el control de *S. nonagrioides* (Vasileiadis *et al.*, 2011). *Telenomus busseolae* Gahan (Hymenoptera: Scelionidae) también se ha encontrado como parasitoide de *S. nonagrioides* y pudiera ser usada como alternativa de control (Bayram *et al.*, 2005). Se han reportado también dos especies de moscas parasitoides encontradas para el taladro mediterráneo que son *Lydella thompsoni* Herting y *Pseudoperichaeta nigrolineata* Walker (Diptera: Tachinidae) (Agusti *et al.*, 2005).

Otra práctica usual dentro del control biológico de insectos es el uso de patógenos tales como bacterias y hongos. El bioinsecticida más ampliamente utilizado en la protección de cultivos consiste en aislados de la bacteria entomopatógena *Bacillus thuringiensis* Berliner, es uno de los bioinsecticidas más comunes en agricultura ecológica (Zehnder *et al.*, 2007). Las propiedades insecticidas de estos aislados se deben a la toxina proteica presente en los cuerpos parasporales (también conocidos como cristal proteico) de la bacteria (Lacey *et al.*, 2001). Dentro de los principales géneros de hongos entomopatógenos que pueden ser usados para controlar lepidópteros están: *Cordyceps*, *Hypocrella*, *Torrubiella*, *Aschersonia*, *Beauveria*, *Hirsutella*, y *Metarhizium* (Shah y Pell, 2003).

Otra alternativa para el control de la plaga de los taladros es el uso de feromonas con el objetivo de producir cierto grado de distorsión en el apareamiento de los insectos adultos. Se han aislado y caracterizado varios compuestos hormonales (Mazomenos *et al.*, 1989), los cuales han sido utilizados para monitorear el vuelo de la plaga en regiones determinadas (Velasco *et al.*, 2007) y como agentes de distorsión del apareamiento, consiguiendo una reducción del número de plantas de maíz atacadas y de las larvas encontradas en las plantas de maíz (Solé *et al.*, 2008).

1.3.4 Control genético

1.3.4.1 Control con variedades de maíz transgénicas

El maíz transgénico con toxinas Cry de *Bacillus thuringiensis* (maíz-Bt) está siendo comercializado para el control de *S. nonagrioides* y *O. nubilalis* y otros lepidópteros y coleópteros. La principal preocupación del éxito a largo plazo de esta tecnología, para las empresas, es el desarrollo potencial de resistencia en algunas poblaciones de insectos (Bates *et al.*, 2005).

El uso de maíz transgénico que produce toxinas Bt es un método eficaz para controlar *S. nonagrioides*, pero los cultivos transgénicos no están autorizados en algunos países de Europa (Meissle *et al.*, 2011). Desde su registro en 1996, el maíz Bt ha sido propagado rápidamente para su siembra. En 2014, 181,5 millones de hectáreas de cultivos genéticamente modificados se sembraron a nivel mundial, se estima que 0,1 millones de hectáreas de maíz Bt se sembraron en España (James, 2014). Sin embargo, estudios recientes han reportado una reducción de la eficacia de los transgenes Bt causada por la evolución de la resistencia de algunas plagas importantes (Campagne *et al.*, 2013; Gonzalez-Cabrera *et al.*, 2013) y este es el principal riesgo para el éxito de esta herramienta de control (McGaughey y Whalon, 1992).

1.3.4.2 Control con mejora genética convencional

La mejora genética trata de conseguir las mejores combinaciones de genes mediante selección de las variedades o líneas adecuadas y cruzamientos (Cubero, 2013). El primer paso en el desarrollo de variedades resistentes a insectos es identificar las mejores fuentes de resistencia (Malvar *et al.*, 1993). De la variación natural para resistencia a insectos presente en los cultivos y los parientes silvestres solo se ha utilizado una pequeña proporción (Broekgaarden *et al.*, 2011). En el caso de la resistencia del maíz a *S. nonagrioides*, se han identificado fuentes de resistencia y tolerancia en sentido amplio en la propia especie tanto en poblaciones como en líneas puras (Malvar *et al.*, 1993; Cartea *et al.*, 1994; Butrón *et al.*, 1999; Butrón *et al.*, 2004; Malvar *et al.*, 2004).

También se han llevado a cabo estudios acerca de la herencia de la resistencia (Cartea *et al.*, 1999; Butrón *et al.*, 2009b). Los efectos genéticos implicados en la

resistencia contra el ataque de los taladros se ajustan a un modelo aditivo-dominante, aunque los efectos aditivos parecen ser los más importantes en la determinación de la resistencia en caña (Cartea *et al.*, 1999; Cartea *et al.*, 2001). Se sabe que los efectos aditivos y dominantes son determinantes en la genética de los caracteres de resistencia en mazorca (Butrón *et al.*, 1998a; Cartea *et al.*, 2001), al igual que ocurre con la tolerancia (Butrón *et al.*, 2009b). Con este tipo de herencia esperaríamos una mejora, especialmente de la resistencia en caña, mediante programas de selección fenotípica.

Aun ahora no existen materiales comerciales con altos niveles de resistencia a *S. nonagrioides* a pesar de la mejora genética para aumentar la resistencia a los taladros del maíz que se ha llevado a cabo durante las últimas tres décadas en diferentes regiones de todo el mundo. Klenke *et al.* (1986) publicaron una disminución de la longitud de galerías de entre 4 y 6 cm después de cuatro ciclos de selección recurrente para resistencia a la primera y segunda generación de *O. nubilalis*, respectivamente. Sandoya *et al.* (2009) obtuvieron una reducción de 1.8 cm por ciclo de selección recurrente para longitud de galerías causadas por *S. nonagrioides* en los tres primeros ciclos de selección. En este programa se seleccionaron las familias que tenían menor longitud de galerías producidas por las larvas pero que superaban el rendimiento medio del ensayo con el fin de evitar un hecho común en los programas de mejora de la resistencia que es la reducción del rendimiento (Schulz *et al.*, 1997; Krepes *et al.*, 1998). En los tres primeros ciclos de selección hubo una reducción no significativa del rendimiento pero esta tendencia se confirma con una reducción significativa en el quinto ciclo de selección. Este hecho puede tener dos explicaciones: la reducción del rendimiento se produce por deriva genética debido a la selección de pocas familias durante el proceso de selección o a la existencia de una correlación negativa entre resistencia y rendimiento. Butrón *et al.* (2012) confirmaron la segunda hipótesis ya que con un ciclo adicional de selección pero sólo para rendimiento se recuperaba la pérdida y se aumentaba la longitud de las galerías producidas por las larvas.

Oloyede-Kamiyo *et al.* (2014) también encontraron que los parámetros de resistencia se correlacionaron negativamente con rendimiento de grano y otras características agronómicas, mientras que se encontraron correlaciones positivas entre

los parámetros de daño. Asimismo, Sekhar *et al.* (2015) en su estudio acerca de la resistencia a *Sesamia inferens* encontraron una correlación negativa entre tasas de daño en tallo y hoja (LSIR) y rendimiento.

Los programas de selección fenotípica han demostrado algún mejoramiento exitoso en resistencia al taladro del maíz, pero los niveles naturales de resistencia en cultivares elite son insuficientes para poder manejar la plaga (Samayoa *et al.*, 2015b). Una alternativa es centrar los programas de mejora en la tolerancia en sentido amplio, o lo que es lo mismo, en el rendimiento en condiciones de alta infestación. En este caso, la selección sí ha sido eficaz, lográndose un mayor rendimiento sin variar la resistencia (Ordás *et al.*, 2012).

En este contexto, es necesario investigar acerca del porqué de la relación negativa entre resistencia y rendimiento, y si otro tipo de selecciones basados en el genotipo como la selección asistida por marcadores (SAM) ligados a QTL o la selección genómica (GS) podrían conseguir una mejora simultánea de ambos caracteres.

La SAM es recomendable para caracteres con baja heredabilidad, correlación genética negativa con otros caracteres de interés, o difíciles y costosos de evaluar, como todos aquellos que implican inoculaciones o infestaciones; aunque muchas veces la proporción de la varianza genética explicada por los QTL es muy pequeña y se hace necesario usar la SG, que se basa en seleccionar individuos con un buen valor genotípico para el carácter deseado utilizando todos los marcadores moleculares disponibles y no sólo aquellos relacionados significativamente con el carácter que queremos mejorar. En cualquier caso debemos conocer las relaciones que existen entre genotipo y fenotipo.

1.4 ASOCIACIONES ENTRE GENOTIPO Y FENOTIPO: BÚSQUEDA DE QTL Y GENES RELACIONADOS CON LA RESISTENCIA Y LA TOLERANCIA

Muchas características agronómicas importantes como el rendimiento, tamaño del grano y algunas características de resistencia a enfermedades (Collard *et al.*, 2005) y plagas (Malvar *et al.*, 2004) son controladas por muchos genes y en

genética se les llama cuantitativas o poligénicas (Collard *et al.*, 2005). Las regiones del genoma de las plantas que contienen genes ligados a una característica cuantitativa en particular son conocidas como QTL.

Para realizar la asociación entre fenotipo y genotipo es necesario contar con una población de mapeo que no es otra cosa que una población segregante para el carácter de interés. Dependiendo del tipo de población que se utilice, la eficacia en la detección de QTL asociados a la característica de interés varía. La población de mapeo se genotipa, si es necesario se sitúan los marcadores en los cromosomas construyendo un mapa de ligamiento; se fenotipa, utilizando un diseño experimental adecuado y se procede a la búsqueda de QTL mediante distintos análisis estadísticos.

1.4.1 Poblaciones de mapeo

Se distinguen dos tipos de poblaciones de mapeo: estructuradas y no estructuradas. Las poblaciones de mapeo estructuradas son aquellas en las que conocemos las relaciones familiares entre los miembros de la población. Entre las poblaciones estructuradas, las poblaciones biparentales, cuya base es el cruzamiento entre dos líneas puras, son las más utilizadas para la búsqueda de QTL. Entre ellas las más simples son las poblaciones F_2 y los retrocruzamientos (BC, por su nombre en inglés "Backcross"), estas últimas construidas a partir del cruce de la generación F_1 por una de las líneas parentales. Las poblaciones más costosas y más difíciles de construir son aquellas en las que son necesarios varios ciclos de autofecundación (6-8 ciclos) a partir de una población F_2 . El resultado es un conjunto de líneas puras recombinantes (RIL) con una combinación única de segmentos cromosómicos de ambos padres. Frente al tiempo consumido las RIL tienen la ventaja de la repetitividad. Con la producción de dobles haploides (DH) mediante inductores de haploidia también se obtienen líneas homocigóticas con la ventaja de que se reduce el tiempo de obtención de las mismas. Las poblaciones biparentales son muy útiles para detectar QTL pero tienen dos problemas: 1) escaso muestreo del conjunto de las variantes genéticas posibles (como máximo 2) y 2) que la localización de los QTL abarca regiones muy amplias del genoma, especialmente si la F_2 no se ha recombinado antes de la evaluación o de la obtención de las RIL. Por lo tanto, para

localizar el QTL de una forma más precisa es necesario realizar un mapeo fino o posicional utilizando líneas cuasi-isogénicas que sólo segregan para la región de interés, donde está el QTL.

Las poblaciones biparentales que se han utilizado hasta la fecha para el mapeo genético de resistencia al taladro mediterráneo y características agronómicas son RIL (Ordás *et al.*, 2009; Ordás *et al.*, 2010; Butrón *et al.*, 2012; Samayoa *et al.*, 2014; Samayoa *et al.*, 2015a; Santiago *et al.*, 2016; Jiménez-Galindo *et al.*, 2017). Después de detectar QTL mayores en poblaciones biparentales algunos autores han realizado mapeo fino, utilizando poblaciones NIL o HIF para ubicar a los QTL de forma más precisa para características del grano de maíz (Raihan *et al.*, 2016), número de granos y longitud de mazorca en maíz (Huo *et al.*, 2016) y el enanismo en maíz (Tao *et al.*, 2013).

La construcción de la población MAGIC es compleja pero el genoma de estas líneas es mezclado mediante varios ciclos de cruzamientos y subsecuentes ciclos de autofecundación que permiten generar un panel estable de líneas puras (Mackay y Powell, 2007). La recombinación en las poblaciones MAGIC puede aumentarse porque se entrecruzan múltiples accesiones genéticamente diversas antes de establecer las RIL (Korte y Farlow, 2013). Las poblaciones multiparentales con generaciones avanzadas de recombinación denominadas MAGIC resuelven ambos problemas de las poblaciones biparentales: tienen mayor variabilidad porque la forman varios padres (8 es un número común) y localizan de una forma más precisa los QTL detectados porque las generaciones de recombinación rompen los bloques de ligamiento. Poblaciones MAGIC han sido utilizadas en *Arabidopsis* (Kover *et al.*, 2009), y en cultivos como el trigo (Huang *et al.*, 2012; Mackay *et al.*, 2014), tomate (Pascual *et al.*, 2015), arroz (Bandillo *et al.*, 2013; Meng *et al.*, 2016) y algodón (Islam *et al.*, 2016). Se ha reportado el uso de una población MAGIC de maíz para mapeo de rendimiento y floración (Dell'Acqua *et al.*, 2015), pero ninguna ha sido utilizada para el mapeo de resistencia y rendimiento bajo infestación con *S. nonagrioides* ni con ninguna otra plaga.

Las poblaciones anidadas para mapeo de asociación (NAM: *Nested Association Mapping* por sus siglas en inglés) son un tipo de población de mapeo que

consiste en cruzar un número de líneas puras de origen totalmente distinto con un único parental en común, a partir de estos cruces se crean familias de RIL que forman la población NAM. El mejor ejemplo de esto es la NAM creada en maíz en Estados Unidos, que ha sido ampliamente usada para mapear genes y diseccionar caracteres complejos (McMullen *et al.*, 2009).

Los paneles de asociación, son poblaciones no estructuradas donde la relación familiar es desconocida. Los estudios de asociación en humanos son realizados principalmente sobre este tipo de poblaciones (Donnelly, 2008). En plantas, las poblaciones naturales no estructuradas tales como los paneles de asociación básicamente son grupos de líneas de diverso origen que representan la variabilidad de la especie en estudio. Esto repercute en un mayor poder de detección de QTL comparado con las poblaciones derivadas de cruces biparentales o multiparentales (Holland, 2007; Myles *et al.*, 2009). En maíz se han creado algunos paneles de asociación para mejorar la resolución en los estudios de caracteres complejos. Camus-Kulandaivelu *et al.* (2006) reportaron un panel construido con 375 líneas de tipo tropical, dentado y liso que representan la variabilidad americana y europea del maíz. En Europa se han creado dos paneles de maíz derivados de germoplasma europeo uno de ellos incluye 300 líneas tipo dentado y el otro 300 líneas tipo liso provenientes de diversos países de la Unión Europea (Rincet *et al.*, 2012). Otra población de maíz de este tipo es un panel de asociación compuesto por 302 líneas que representan la variabilidad disponible de maíz utilizado en los programas de mejora genética del sector público alrededor del mundo (Liu *et al.*, 2003; Flint-Garcia *et al.*, 2005) y que ha sido ampliamente utilizado para desarrollar estudios de asociación y para búsqueda de genes de resistencia a *S. nonagrioides* (Samayoa *et al.*, 2015b). En la tabla 1.4.1 se pueden ver los diferentes tipos de poblaciones de mapeo y sus ventajas y desventajas.

Tabla 1.4.1 Ventajas y desventajas de las principales poblaciones de mapeo adaptada de Samayoa-López, (2015).

Característica	F ₂	BC	RIL (por autofecundación)	DH (RIL por DH)	MAGIC	NAM	Panel de asociación
Tiempo de construcción (generaciones)	2-3	2-3	≥ 6	2-3	≥ 6	≥ 6	1
Costo Desarrollo	Bajo Simple	Bajo Simple	Alto Complicado, requiere mucho trabajo	Alto Complicado, equipo y personal especializado y/o requiere el uso de un buen inductor.	Alto Complicado, requiere mucho trabajo	Alto Complicado, requiere mucho trabajo y es más compleja que la MAGIC ya que implica la obtención de mayor número de líneas	Bajo Simple
Restringida a ciertas especies	No	No	No	Solo especies que permiten el cultivo de tejidos o si existen inductores.	No	No	No
Inmortalidad	No	No	Si	Si	Si	Si	Si
Homocigosis verdadera	-	No	No	Si	No	No	No
Permite estimar efectos de dominancia	Si	Si	No	No	No	No	No
Resolución de mapeo	Baja	Baja	Media	Baja	Más alta que las RIL debido a que se explora un mayor rango de variabilidad.	Más alta que las RIL debido a que se explora un mayor rango de variabilidad.	Alta

DH: haploide doble o “doubled haploid”.

1.4.2 Análisis de QTL

1.4.2.1 Principios del análisis de QTL para genes cuantitativos

El análisis de QTL se basa en detectar una asociación entre el fenotipo y el genotipo de los marcadores. Estos se utilizan para dividir la población de mapeo en diferentes grupos genotípicos basándose en la presencia o ausencia de un locus particular y para determinar si existen diferencias significativas entre los grupos con respecto a la característica que se mide (Young, 1996). Una diferencia entre las medias fenotípicas de los grupos, indica que el locus está ligado a un QTL que controla el carácter.

Cuanto más cerca está un marcador de un QTL, menor es la probabilidad de la recombinación que ocurre entre el marcador y el QTL, por lo que el marcador y el QTL serán heredados juntos y la media del grupo con un alelo del marcador estrechamente unido será significativamente diferente ($P < 0,05$) de la media del grupo con el otro alelo del marcador. Cuando un marcador está ligeramente unido o no ligado a un QTL, existe una segregación independiente del marcador y el QTL. En esta situación, no habrá diferencia significativa entre las medias de los grupos de genotipo con distintos alelos del marcador ligeramente ligado (Collard *et al.*, 2005).

1.4.3 Métodos para detectar QTL

Los métodos utilizados para la detección de QTL cuando se utilizan poblaciones estructuradas y que se basan en el análisis de ligamiento son tres: 1) análisis de un solo marcador, 2) mapeo de intervalos simple y 3) mapeo de intervalos compuestos (Tanksley, 1993; Liu, 1997). El análisis de marcador único, es el método más sencillo para detectar QTL asociados con marcadores individuales. Los métodos estadísticos utilizados para el análisis de un solo marcador incluyen pruebas de t , análisis de varianza y regresión lineal. La regresión lineal es más comúnmente utilizada porque el coeficiente de determinación (R^2) indica la variación fenotípica explicada por el marcador que está ligado al QTL. Este método no requiere un mapa de ligamiento completo y puede realizarse con programas de software estadísticos básicos. La desventaja principal con este método es que no posiciona el QTL ni da el efecto correcto, sino que da el efecto que tendría si coincidiera con el marcador. Esto

es porque la recombinación puede ocurrir entre el marcador y el QTL. Esto hace que la magnitud del efecto de un QTL sea subestimada (Tanksley, 1993). El uso de un gran número de marcadores de ADN segregantes que cubren todo el genoma (normalmente a intervalos menores de 15 cM) puede minimizar el problema (Tanksley, 1993). QGene y MapManager QTX son programas informáticos de uso común para realizar análisis de marcador único (Manly *et al.*, 2001).

El método de mapeo por intervalos simples SIM (por sus siglas en inglés “simple interval mapping”) hace uso de mapas de ligamiento y analiza los intervalos entre pares de marcadores adyacentes ligados a lo largo de los cromosomas, simultáneamente, en lugar de analizar marcadores simples (Lander y Botstein, 1989). El uso de marcadores ligados para el análisis compensa para la recombinación entre los marcadores y el QTL, y se considera estadísticamente más potente en comparación con el análisis de un solo marcador (Lander y Botstein, 1989; Liu, 1997). Muchos investigadores han utilizado MapMaker / QTL (Lincoln *et al.*, 1993) y QGene (Nelson, 1997) para realizar SIM.

El mapeo de intervalos compuesto o CIM (por sus siglas en inglés CIM: “composite interval mapping”) es uno de los más populares para mapear QTL. Este método combina el mapeo de intervalos con la regresión lineal e incluye marcadores genéticos adicionales en el modelo estadístico, además de un par adyacente de marcadores ligados para el mapeo de intervalos (Jansen y Stam, 1994). La principal ventaja del CIM es que es más preciso y eficaz en el mapeo de QTL en comparación con el análisis de un solo punto. Muchos investigadores han utilizado QTL Cartographer (Basten *et al.*, 2001), MapManager QTX (Manly *et al.*, 2001) y PLABMQTL (Utz y Melchinger, 1996) para realizar CIM. El CIM es el análisis que se ha usado más ampliamente para estudiar la resistencia a *S. nonagrioides* (Ordás *et al.*, 2009; Ordás *et al.*, 2010; Samayoa *et al.*, 2014; Samayoa *et al.*, 2015a).

El mapeo de QTL en poblaciones biparentales ofrece, sin embargo, una resolución que no es adecuada para identificar los genes implicados en un carácter determinado; mientras que el mapeo de asociación, al usar una población no estructurada (un conjunto de líneas de distinto origen o también llamados Paneles de Asociación), ofrecen la posibilidad de identificar regiones o directamente las

variantes que determinan la variación del carácter en estudio (Oraguzie y Wilcox, 2007). Hasta hace pocos años este tipo de mapeo en especies alógamas como el maíz en las que el desequilibrio de ligamiento (LD por sus siglas en inglés “linkage disequilibrium”) es muy bajo se hacía tan sólo para genes concretos porque el estudio de asociación de todo el genoma (GWAS: “genome wide association study” por sus siglas en inglés) suponía el uso de un elevadísimo número de marcadores y esto era muy costoso. Hoy en día con los avances en las nuevas tecnologías de secuenciación conocidas como la próxima generación de secuenciación o NGS (por sus siglas en inglés “Next Generation Sequencing”) (Metzker, 2010) y el fenotipado de alto rendimiento (HTP, “High-Throughput Phenotyping”) es posible explorar esa variación genética que está detrás de características cuantitativas (Broekgaarden *et al.*, 2011). El GWAS es una herramienta poderosa que ofrece una primera observación valiosa para la búsqueda de loci candidatos para su posterior validación. Al aumentar la recombinación disminuye el desequilibrio de ligamiento y así se hace más precisa la posición del QTL. En la tabla 1.4.3 se hace una comparación entre la búsqueda de QTL con CIM y con GWAS.

Tabla 1.4.3 Comparación entre mapeo de QTL con uso de CIM y el mapeo de asociación GWAS adaptada de Oraguzie y Wilcox, (2007).

Atributo	QTL-CIM	GWAS
Objetivo de detección	QTL, regiones amplias	QTN, posición física
Resolución	Baja con una moderada densidad de marcadores en el mapa	Alta
Población experimental	Población estructurada: F ₂ , BCs, RIL, NIL, DH, etc.	Población no estructurada, o estructurada con alto número de recombinaciones individuos no relacionados
Desequilibrio de ligamiento (DL)	Alto, pocos eventos de recombinación	Bajo, históricamente muchos eventos de recombinación
Nº marcadores requeridos	Bajo-moderado	Alto debido a que el DL es bajo
Pedigrí	Es necesario poblaciones con pedigrí definido	No es necesario

NIL o líneas isogénicas cercanas, por sus siglas en inglés: *Near isogenic lines*.

La resolución y eficacia del mapeo de asociación depende de la extensión y naturaleza del desequilibrio de ligamiento que a su vez depende de otros factores

(Oraguzie y Wilcox, 2007) como son: 1) la tasa de recombinación, 2) el tamaño y estructura de la población, 3) edad del alelo bajo estudio, 4) grado de selección natural o artificial, 5) tasa de cruzamiento, y 6) localización en el cromosoma.

Existen diferentes enfoques o metodologías para detectar genes mediante estudios de asociación. La mayoría de estos enfoques han sido usados ampliamente para la disección de caracteres complejos en humanos (Schulze y McMahon, 2002), en donde miles de variantes genéticas asociadas a enfermedades y otros caracteres han sido identificadas por GWAS (Li *et al.*, 2011). Algunas de estas metodologías han sido aplicadas en plantas y otras requieren modificaciones para su aplicación (Soto-Cerda y Cloutier, 2012), pero en general los métodos utilizados en los estudios de asociación podrían variar dependiendo de si los caracteres son discretos o cuantitativos (Nielsen y Zaykin, 2001).

La detección de genes mediante GWAS se basa en asociaciones estadísticas entre un marcador y un QTL. Los métodos estadísticos utilizados en los estudios de asociación van desde simples pruebas de *t* o modelos lineales generales (GLM), que incluyen el análisis de varianza (ANOVA por sus siglas en inglés “analysis of variance”), hasta modelos más complejos como el uso de modelos lineales mixtos (MLM).

En los estudios de asociación es bastante usual que se encuentren falsas asociaciones debido a la estructura poblacional (Pritchard *et al.*, 2000), especialmente grave cuando se usan poblaciones no estructuradas. Esta estructura se forma debido a la adaptación local de ciertos individuos en una zona geográfica determinada, por selección natural o artificial o porque hay cierto parentesco entre individuos debido a la existencia de un ancestro reciente. Por lo tanto es necesario hacer una corrección por estructura poblacional para evitar asociaciones falsas. Se han propuesto algunos métodos estadísticos para corregir este problema tales como la asociación estructurada (SA, *Structured Association*) y el control genómico (GC, “Genomic Control”), ambos utilizan un conjunto de marcadores aleatorios para estimar la estructura poblacional (Q) de la muestra e incorporarla en los análisis posteriores (Pritchard *et al.*, 2000). La corrección por estructura poblacional puede ser incorporada en modelos de análisis basados tanto en GLM como en MLM. Yu *et al.*

(2006) propusieron un método basado en MLM que utiliza tanto la matriz Q, que corrige por la estructura poblacional, como una matriz de similitud K que corrige por la relación familiar dentro de una muestra o población. La matriz K (nombre derivado del inglés *kinship matrix*) indica el parentesco o relación media entre individuos o líneas dentro de la población (Ritland, 1996) y puede ser estimada mediante pedigrí o mediante un conjunto de marcadores aleatorios distribuidos en todo el genoma. El uso de las matrices Q y K a la vez sobre-corrige las bases de datos, por lo tanto, los resultados de los estudios de asociación suelen ser satisfactorios siempre que se corrija por estructura poblacional usando sólo una matriz K ya sea en modelos basados en GLM o MLM, aunque algunos autores han obtenido una mayor robustez y efectividad al usar MLM (Yu *et al.*, 2006; Zhao *et al.*, 2007).

El único estudio de asociación del genoma completo que se realizó en maíz para resistencia y rendimiento al taladro es reportado por Samayoa *et al.* (2015b), quienes usaron un panel de asociación con 302 líneas y 246.477 SNPs y encontraron 10 SNPs significativamente asociados con longitud de galerías, y 11 con resistencia en grano. Los genes candidatos que se encontraron para características de resistencia a *S. nonagrioides* en maíz son: 7 para longitud de galerías, 4 para porcentaje de tallo dañado y 10 para resistencia en grano (Samayoa *et al.*, 2015b).

1.4.4 Validación de los QTL

La detección de QTL se ve influenciada por muchos factores (Tanksley, 1993; Doohan *et al.*, 2002). Los principales son: propiedades genéticas de los QTL, efectos medioambientales, tamaño de la población y el error experimental. Un mapeo confiable de QTL solo puede ser producido con datos fenotípicos confiables.

1.4.4.1 Validación de QTL en campo

Los marcadores deben ser validados mediante la prueba de la presencia del marcador en un grupo de variedades elite (Sharp *et al.*, 2001). Algunos estudios han advertido del peligro de suponer que los enlaces marcador-QTL permanecerán en diferentes orígenes genéticos, especialmente para características complejas como el rendimiento (Reyna y Sneller, 2001). Incluso cuando se estudian genes mayores

donde un gen controla una característica, no hay seguridad de que los marcadores de ADN identificados en una población sean útiles en diferentes poblaciones, especialmente cuando las poblaciones se originan de germoplasma distante (Yu *et al.*, 2000). Para que los marcadores sean más útiles en los programas de mejora, deben revelar el polimorfismo en diferentes poblaciones derivadas de una amplia gama de diferentes genotipos parentales o bien poder utilizar el padre donante de una característica en particular en la mayoría de variedades elite (Langridge *et al.*, 2001).

1.4.4.2 Uso de validación cruzada de QTL

El objetivo principal que se persigue en todo estudio de QTL en plantas es poder disponer de marcadores fiables y validarlos en campo. Se sabe que con un tamaño de muestra limitado se produce una sobreestimación de los efectos de los QTL y de la proporción de la varianza genética explicada por ese QTL (Utz y Melchinger, 1994; Beavis, 1998).

El método de la validación cruzada (VC) ha sido propuesto por varios autores como uno de los mejores métodos de remuestreo para obtener estimaciones asintóticamente no sesgadas de los verdaderos efectos del QTL y de la proporción de la varianza genética que explica dicho QTL (Utz *et al.*, 2000).

El enfoque consiste en dividir el conjunto de datos totales (llamado por simplicidad DS del inglés “Data Set”) en sub grupos. Uno o varios sub grupos combinados forman un grupo denominado grupo de estimación o calibración (llamado por simplicidad ES del inglés “Estimation Set”) que se utiliza para detectar QTL. El o los restantes subgrupos forman el grupo de validación (llamado por simplicidad TS del inglés “Test Set”), con lo cual se prueban las estimaciones derivadas del ES mediante la correlación de los datos predichos y los datos observados (Utz *et al.*, 2000). Este enfoque permite testar el error causado por los ambientes (VC/E), el error causado por el muestreo de los genotipos (VC/G) y el de ambos factores (VC/GE). El principio básico para hacer VC/G es sencillo, en un experimento en el que se realiza cinco veces VC, se dispone de una muestra de 100 individuos o genotipos ($DS = 100$) los cuales se dividen en 5 subgrupos ($k = 5$) de 20 individuos, cuatro subgrupos formarán el ES ($ES = 80$) y el subgrupo restante será

utilizado para la validación ($TS = 20$). Consecutivamente se permutan los k subgrupos y se obtiene el número de VC. Por ejemplo si se permutan 20 veces obtendremos $(20 \times k)$ 100 VC.

Los estudios de mapeo de QTL deben ser validados de forma independiente (Lander y Kruglyak, 1995). Tales estudios de validación Lander y Kruglyak, (1995) pueden incluir poblaciones independientes construidas a partir de los mismos genotipos parentales o relacionados utilizados en el estudio de mapeo de QTL. En estudios recientes se han propuesto que las posiciones y los efectos de los QTL deben evaluarse en poblaciones independientes, porque el mapeo de QTL basado en tamaños normales de población da como resultado una baja potencia de detección de QTL y un gran sesgo de efectos en los QTL (Melchinger *et al.*, 1998; Utz *et al.*, 2000). Debido a múltiples factores tales como la falta de financiación de la investigación y el tiempo que se requiere, y probablemente a una falta de necesidad de confirmar los resultados, los estudios de mapeo de QTL rara vez se confirman. Con excepciones notables como la confirmación de los QTL asociados con la resistencia a los nematodos de los nudos de raíz (Li *et al.*, 2001) y la resistencia al tizón en la soja (Fasoula *et al.*, 2003).

Un método muy utilizado para confirmar QTL ha sido el uso de poblaciones NIL. Estas poblaciones resultan de cruzar un padre donante (silvestre) con un progenitor recurrente (cultivar élite). El híbrido F_1 es entonces retrocruzado con padre recurrente para producir una primera generación de retrocruzamiento (BC_1). El BC_1 es repetidamente retrocruzado con padre recurrente durante varias generaciones. El BC_7 contendrá prácticamente todo el genoma del padre recurrente excepto la región cromosómica pequeña que contiene un gen o QTL de interés. Las líneas F_2 homocigóticas pueden obtenerse por autofecundación de la planta BC_7 . Para producir una población NIL, el gen tiene que ser seleccionado en cada ronda de retrocruzamiento. Se han reportado estudios que utilizan NIL para confirmar QTL para rasgos agronómicos en tomate (Bernacchi *et al.*, 1998), resistencia a la herrumbre de hojas en cebada (van Berloo *et al.*, 2001), resistencia a nematodos en soja (Glover *et al.*, 2004) y la absorción de fósforo en el arroz (Wissuwa y Ae, 2001).

En el presente estudio se utilizó el método de familias consanguíneas

heterogéneas HIF para desarrollar una población de mapeo NIL usada para validar QTL previamente detectados (Tuinstra *et al.*, 1997). Las NIL son reservas genéticas eficaces para estudiar QTL porque el efecto interferente del fondo genético se reduce (Pumphrey *et al.*, 2007). Tuinstra *et al.* (1997) propusieron identificar las líneas endogámicas que son altamente homocigotas, excepto para la región del estudio genético y llamó a las NIL como HIF. El método puede aplicarse directamente a las RIL para validar un QTL previamente detectado en las líneas RIL, siempre y cuando se logre encontrar una RIL heterocigota en la región de interés. El análisis HIF se ha utilizado para validar QTL relacionados con la altura de planta y el rendimiento (Pea *et al.*, 2009), número de hojas (Li *et al.*, 2016), número de haces vasculares (Huang *et al.*, 2016) y características del grano (Raihan *et al.*, 2016) en maíz. El análisis HIF podría ser particularmente útil para validar QTL relacionados a resistencia a insectos porque la precisión del mapeo de QTL para características relacionadas a resistencia a plagas es baja debido a las características intrínsecas del carácter de resistencia que depende de la variación de la planta y del insecto. El análisis HIF ha sido exitosamente usado para validar QTL relacionados a resistencia a enfermedades, por ejemplo, resistencia al tizón foliar (Chung *et al.*, 2010) y el enanismo en maíz (Tao *et al.*, 2013).

1.4.5 Situación de los estudios de QTL de resistencia a los taladros del maíz

Varios estudios de mapeo de QTL en los que se han utilizado algunas poblaciones biparentales segregantes descritas anteriormente han dado como resultado la identificación de regiones que contienen QTL para longitud de galerías y resistencia al daño de hoja causados por *O. nubilalis* (Schön *et al.*, 1993; Cardinal *et al.*, 2001; Krakowsky *et al.*, 2004). Un estudio de QTL realizado en la MBG-CSIC para resistencia a esta plaga tuvo como propósito explorar la variabilidad de este carácter en el grupo heterótico Reid × Lancaster. El estudio se realizó en una población de 243 RIL derivadas del cruce de las líneas B73 × Mo17, se identificaron 2 QTL para longitud de galerías en los cromosomas 1 y 9 (bins 1.06 y 9.04, respectivamente) y otro QTL para daño de grano en el cromosoma 8 (bin 8.05) (Ordás *et al.*, 2009). Un segundo estudio se realizó para localizar QTL entre dos líneas

europas tipo liso en una población de 178 RIL derivadas del cruce EP39 × EP42 y se identificaron tres QTL para longitud de galerías en los cromosomas 1, 3 y 8 (bins 1.03, 3.05 y 8.05, respectivamente) y un QTL para daño en mazorca en el cromosoma 1 (bin 1.12) (Ordás *et al.*, 2010). Además en ese estudio se identificaron cuatro QTL para rendimiento en los cromosomas 4, 5 y 8 (bins 4.08, 5.05, 8.05 y 8.08, respectivamente). A su vez Santiago *et al.* (2016) encontró tres QTL para longitud de galerías en el cromosoma 1, 2 y 6 (bins 1.03-1.05, 2.06-2.08 y 6.05-6.07).

Alrededor de 10-15 QTL relacionados con la resistencia a *O. nubilalis* se detectaron en experimentos que explicaron, aproximadamente, 50 y 60% de la varianza fenotípica y genotípica, respectivamente (Cardinal *et al.*, 2001; Krakowsky *et al.*, 2004). En un experimento de QTL con 3 poblaciones conectadas y con números de RIL (521) y marcadores (2.411) relativamente altos, se encontraron 10 QTL relacionados con la resistencia a *O. nubilalis* y la proporción de la varianza fenotípica explicada por los QTL es baja, de un 37% (Foiada *et al.*, 2015).

Se encontraron cuatro QTL para rendimiento bajo infestación con *S. nonagrioides*, en una población RIL de EP39 × EP42 en los cromosomas 4, 5 y dos en el 8, bins 4.08, 5.05, 8.05 y 8.08 respectivamente (Ordás *et al.*, 2010). Solo un QTL para rendimiento se encontró en el cromosoma 5, bin 5.03 en una población de líneas recombinantes de A637 × EP42 (Samayoa *et al.*, 2014). También Samayoa *et al.* (2015a) encontraron tres QTL en los cromosomas 1, 6 y 7 bins 1.10, 6.01 y 7.05-7.06 respectivamente.

Para la característica de resistencia en grano, la mayoría de los estudios se realizaron en poblaciones biparentales que expresaban baja variabilidad genética para dicho carácter, pero aún así se descubrieron QTL en los bins 2.05-2.06, 5.00-5.01, 5.04-5.05, 8.05, 9.02-9.04 y 9.07 (Ordás *et al.*, 2009; Samayoa *et al.*, 2014; Samayoa *et al.*, 2015a). Sin embargo en un estudio posterior, se estudiaron las regiones genómicas en un panel de asociación que representa una alta proporción de la variabilidad genética del maíz disponible en el sector público de todo el mundo (Liu *et al.*, 2003; Flint-García *et al.*, 2005; Samayoa *et al.*, 2015b). Este estudio de asociación Samayoa *et al.* (2015b) reveló que los genes involucrados en resistencia en grano a *S. nonagrioides* podría encontrarse también en nueve regiones genómicas de

los cromosomas 3, 4, 5, 6, y 7. Se encontraron de 1-3 QTL por experimento relacionados con la resistencia a *S. nonagrioides* detectados y se consideró un número de QTL bajo y la varianza genotípica explicada por los QTL es baja (usualmente entre 20 y 30%) (Ordás *et al.*, 2009; Ordás *et al.*, 2010; Samayoa *et al.*, 2014; Samayoa *et al.*, 2015a; Santiago *et al.*, 2016). En algunos estudios, QTL detectados para longitud de galerías co-localizaron con QTL para otras características agronómicas tales como altura de planta (Samayoa *et al.*, 2014; Samayoa *et al.*, 2015a), días a floración (Krakowsky *et al.*, 2004; Foiada *et al.*, 2015), o rendimiento de grano (Ordás *et al.*, 2010).

Los QTL significativos detectados con poblaciones biparentales estándar deberían ser verificados en experimentos adicionales antes de continuar con estudios más profundos de descubrimiento y caracterización de genes. En las poblaciones de mapeo biparentales, el efecto de la segregación múltiple de QTL puede ser confuso, lo que puede conducir a una reducción de la potencia en la detección de los QTL o sobreestimación de los efectos (Szalma *et al.*, 2007). Las NIL o HIF son reservas genéticas eficaces para el estudio de los efectos fenotípicos atribuibles a un QTL ya que el fondo genético que comúnmente influye en las evaluaciones fenotípicas de características cuantitativas está estandarizado (Pumphrey *et al.*, 2007). Sin embargo, aunque numerosos QTL para resistencia a insectos han sido mapeados en maíz con poblaciones biparentales estándar, no se han verificado con NIL o HIF.

La búsqueda de QTL para resistencia y rendimiento en poblaciones biparentales segregantes para ambas características sería un método adecuado para descubrir factores genéticos contribuyendo a la relación negativa entre resistencia y rendimiento. En previos estudios de mapeo usando poblaciones biparentales, no se reportó una correlación genética entre rendimiento y resistencia a galerías causadas por *S. nonagrioides* y pocos QTL con efectos opuestos en rendimiento y resistencia se detectaron (Ordás *et al.*, 2010; Samayoa *et al.*, 2014; Samayoa *et al.*, 2015a; Santiago *et al.*, 2016). En contraste se ha confirmado una correlación genética desfavorable entre rendimiento y resistencia en la población sintética EPS12 (Butrón *et al.*, 2012). Las diferencias entre ambos tipos de estudios podrían basarse en la cantidad de variabilidad genética disponible para cada característica. La variabilidad genética para

rendimiento y resistencia en EPS12 es alta porque los programas de selección para mejorar cada característica han sido exitosos (Butrón *et al.*, 2012), pero las poblaciones de mapeo biparentales se diseñaron para segregar el rendimiento o la resistencia pero no para ambos simultáneamente. Por lo tanto, la población biparental usada en el presente estudio ofrece una ventaja adicional sobre las otras previamente usadas para revelar los factores genéticos detrás de la desfavorable correlación genética. La presente población es derivada de un cruce entre dos líneas con valores contrastantes para rendimiento y resistencia en tallo causadas por *S. nonagrioides* (Butrón *et al.*, 1998b). Además, la actual población de mapeo se espera que segregue para resistencia en mazorca a MCB. Para estudiar la resistencia en tallo y en mazorca separadamente es importante porque la heredabilidad de la resistencia en mazorca es compleja y no completamente independiente de la resistencia en tallo (Cartea *et al.*, 2001; Velasco *et al.*, 2004). Por otra parte la búsqueda de QTL para resistencia y rendimiento ha sido enfocada más en características individuales y menos en índices que combinan varias características. El uso de índices es común en programas de mejora para mejorar dos o más características simultáneamente (Sandoya *et al.*, 2008). En este estudio, se buscaron QTL que pudieran ser utilizados para mejorar conjuntamente resistencia y rendimiento.

Como ya se comentó, los programas de selección que se han realizado para mejorar la resistencia a insectos suelen tener como respuesta indirecta la reducción del rendimiento (Klenke *et al.*, 1986; Schulz *et al.*, 1997; Sandoya *et al.*, 2008; Butrón *et al.*, 2012). Los programas para mejorar la resistencia del maíz a *S. nonagrioides* no han sido la excepción. Debido a lo anterior es crítico conocer y entender las causas de esta relación resistencia-rendimiento. Un enfoque es la búsqueda de regiones del genoma o de genes relacionados con ambos caracteres pero los resultados previos no han esclarecido el porqué de esta relación. Así que profundizaremos en el estudio con nuevos materiales. Los resultados permitirán diseñar un programa de mejoramiento utilizando la selección fenotípica, la selección asistida por marcadores y/o la selección genómica para obtener la mejora simultánea de ambos caracteres.

Para conseguir esto se buscaron regiones genómicas asociadas al rendimiento y a la resistencia en:

1) Una población de líneas HIF construida para validar los QTL encontrados para rendimiento y longitud de galerías en la región 8.03-8.05. Las líneas se crearon a partir de una F_7 proveniente del cruce EP39 x EP42 (Liso Europeo x Liso Europeo) que debería presentar un alto grado de homocigosis (en torno al 98%) para todo el genoma, pero que seguía segregando en la región 8.03-8.05. En esta región se detectaron QTL para longitud de galerías causadas por *S. nonagrioides*, rendimiento de grano y floración en el análisis de la población RIL obtenida a partir del cruce EP42 x EP39. E39 ha sido reportado como resistente a MCB (Butrón *et al.*, 1999) y EP42 como susceptible (Butrón *et al.*, 1999).

2) En una población de RIL desarrolladas a partir del cruce A637 x A509, ambas líneas pertenecientes al grupo heterótico Corn Belt Dent pero que difieren para rendimiento y resistencia. Como novedad frente a los trabajos de mapeo previos, la búsqueda de QTL no sólo se hizo para cada uno de los caracteres individuales sino también para determinados índices que combinaban 2 o 3 caracteres. La línea A509 es sensible (alta pérdida de rendimiento) y resistente (con pequeñas galerías y resistencia en mazorca), mientras la línea A637 se comportó como tolerante (pérdidas de rendimiento bajas) pero susceptible (grandes galerías y menos resistencia en mazorca) (Butrón *et al.*, 1998b).

3) En una población multi-parental o MAGIC, desarrollada a partir del sintético EPS21. Este sintético está compuesto de 8 líneas muy variables y se seleccionaron para formar el sintético debido a que presentaban diferentes mecanismos de resistencia a *S. nonagrioides*. La resistencia de los parentales de la MAGIC puede ser revisada en los siguientes manuscritos, para EP17 (Malvar *et al.*, 1995), EP43 (Butrón *et al.*, 1999), EP53 (Butrón *et al.*, 1999), EP86, antes PB60 (Butrón *et al.*, 1998b), PB130 (Butrón *et al.*, 1999; Ordás *et al.*, 2002), F473 (Ordás *et al.*, 2002), EP125 antes CO125 (Butrón *et al.*, 1999; Ordás *et al.*, 2002), y A509 ; (Butrón *et al.*, 1998b; Ordás *et al.*, 2002). Con esto se pretende completar el estudio de las regiones genómicas relacionadas con el rendimiento y la resistencia utilizando las ventajas de una población diversa y estructurada.

OBJETIVOS





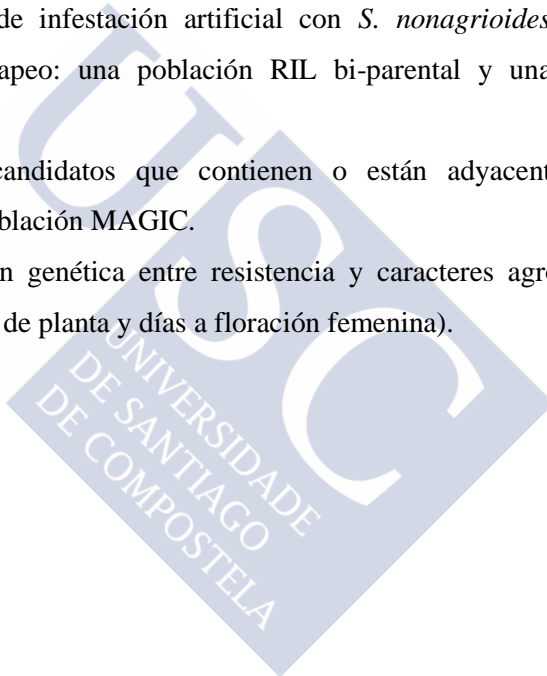
2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GENERAL

Identificar QTL y genes de resistencia y rendimiento al ataque de las larvas de MCB en maíz.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Validación de QTL previamente detectados usando una población HIF.
2. Mapear y caracterizar QTL para rendimiento, resistencia y caracteres agronómicos bajo condiciones de infestación artificial con *S. nonagrioides* en dos nuevas poblaciones de mapeo: una población RIL bi-parental y una población RIL MAGIC.
3. Localizar genes candidatos que contienen o están adyacentes a los SNPs detectados en la población MAGIC.
4. Estudiar la relación genética entre resistencia y caracteres agronómicos (como rendimiento, altura de planta y días a floración femenina).





MATERIALES Y MÉTODOS





3. MATERIALES Y MÉTODOS

La metodología empleada en esta investigación se divide en tres apartados principales. Los primeros dos apartados se refieren al mapeo de QTL en poblaciones HIF y RIL biparentales y el tercero al mapeo de asociación o GWAS en una MAGIC. En cada apartado se describe el material vegetal, los caracteres evaluados y los métodos estadísticos utilizados en cada estudio.

3.1 VALIDACIÓN DE QTL EN UNA POBLACIÓN HIF

3.1.1 Material vegetal

Se utilizó el método HIF para desarrollar una población de mapeo NIL para validar QTL previamente detectados (Tuinstra *et al.*, 1997). Se analizaron 188 RIL F_5 derivadas de la (EP42 \times EP39) F_2 para detectar un individuo RIL heterocigoto para los marcadores en la región 8.03 - 8.05. Esta población RIL se usó previamente para mapear los QTL que se validaron en el presente estudio (Ordás *et al.*, 2010). Tanto la EP42 como la EP39 son líneas puras lisas europeas. La línea EP42 procede de una población del norte de España y es susceptible al ataque de los taladros mientras que EP39 procede de una población del centro de España y es resistente al ataque de las larvas. La RIL seleccionada se autofecundó dos veces para incrementar el nivel de homocigocis fuera de la región 8.03-8.05 y se eligió una línea F_7 heterocigota en 8.03-8.05: Se sembraron 150 plantas de dicha línea F_7 y se hicieron cruzamientos entre plantas para incrementar el nivel de recombinación en la región 8.03-8.05, las 38 mazorcas obtenidas constituyeron la población de 38 líneas HIF y cada una de ellas se multiplicó mediante un ciclo de autofecundación para obtener suficiente semilla para las evaluaciones posteriores (Figura 3.1.1).

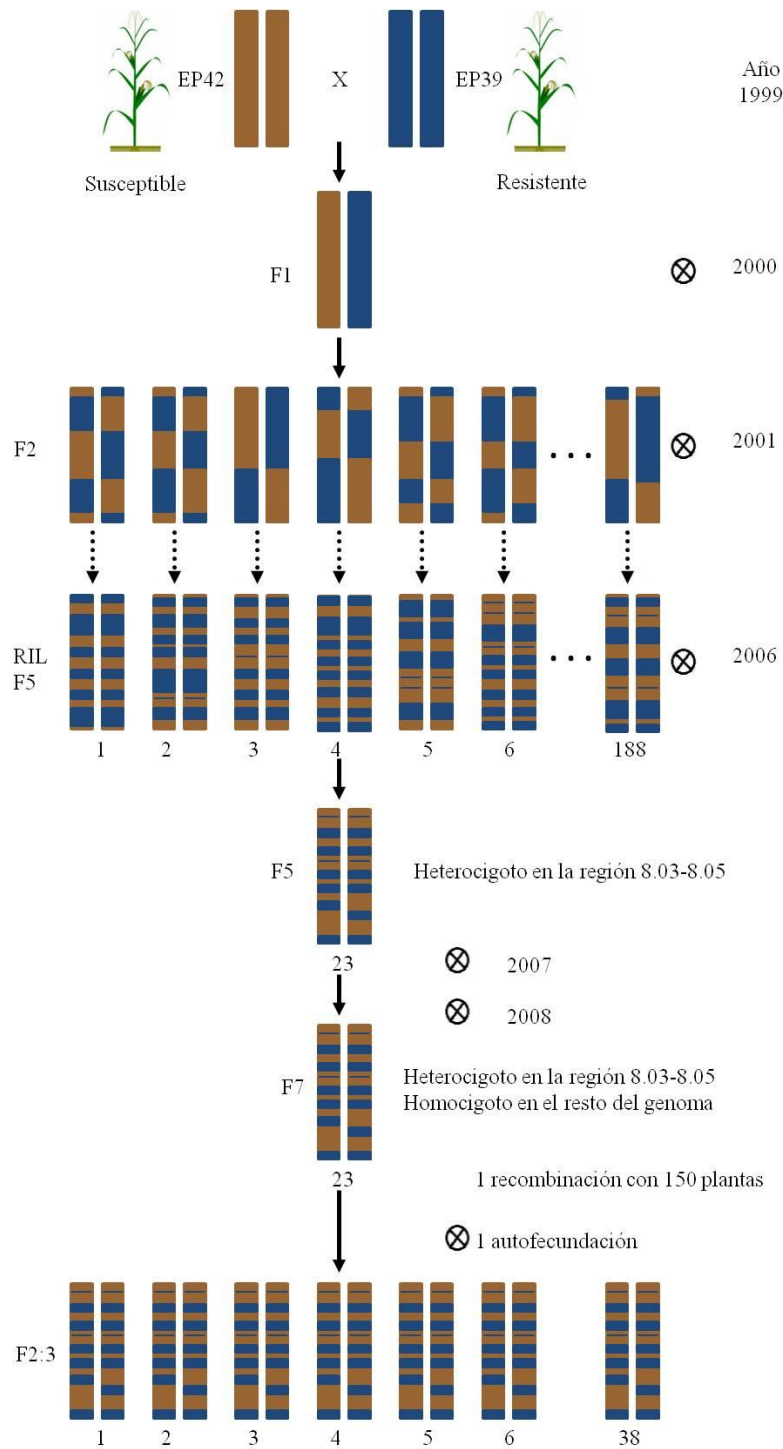


Figura 3.1.1 Esquema de la obtención de 38 HIF a partir de una línea F₇ (LR-23), que se obtuvo a partir del cruce de las líneas EP42 × EP39.

3.1.2 Datos fenotípicos

Las 38 HIF se sembraron en Pontevedra, 42° 24'N, 8° 38'O, y 20 m sobre el nivel del mar, en tres años diferentes. Las 38 HIF se evaluaron junto con las líneas parentales EP42, EP39 y LR-23 usando un diseño en látice 6 x 7 con tres repeticiones. Los experimentos se sembraron a mano y cada parcela experimental consistió de un surco espaciado 0,8 m, con 15 golpes de dos granos por golpe con separación de 0,21 m entre golpes. Las parcelas se ralearon para obtener una densidad final de ~60.000 plantas ha⁻¹. Las evaluaciones se realizaron bajo infestación artificial con huevos de *S. nonagrioides* obtenidos en la Misión Biológica de Galicia criando el insecto como es descrito por Eizaguirre y Albajes, (1992) y Khan y Saxena, (1997) con algunas modificaciones. Antes de la floración, se infestaron cinco plantas de cada parcela con ~40 huevos de *S. nonagrioides* colocados entre el tallo y la vaina de una de las hojas basales. Se tomaron los datos: días a floración femenina, medidos como los días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas presentan flores femeninas; altura de planta, medida como el promedio de la longitud en centímetros desde el suelo hasta la parte más alta de la flor masculina de cinco plantas representativas; rendimiento de grano, estimado en la parcela como Mg ha⁻¹ a 140 g H₂O kg⁻¹; y longitud de galerías, medida como el promedio de la longitud en centímetros de los túneles hechos por los taladros en las cinco plantas infestadas.

3.1.3 Datos genotípicos

Las 38 HIF derivadas de la línea LR-23 y los dos padres se genotiparon por secuenciación (GBS: por sus siglas en inglés “genotyping by sequencing”) en el Instituto de Biotecnología de la Universidad de Cornell. La base de datos total de las líneas HIF consta de 38 líneas y 2 padres (EP42 y EP39) y 955.690 SNPs. Es importante que los SNPs estén secuenciados en la mayoría de las líneas, solo se tuvieron en cuenta los SNPs que estaban presentes 39 líneas de las 40 analizadas para que los SNPs seleccionados estuvieran al menos en el 97,5% de las entradas de la base de datos total (constituida por las 38 líneas HIF y los dos padres). También es importante en este paso seleccionar SNPs polimórficos y eliminar alelos raros así que

se estableció una frecuencia alélica mínima de 0,001 con lo cual resultó una nueva matriz con 40 líneas y 12.436 SNPs a lo largo de todo el genoma.

Posteriormente, se seleccionaron los SNPs sin alelos raros que se localizaron en el cromosoma 8, que es donde se esperaría más variabilidad. El resultado ha sido una matriz con 40 líneas y 109 SNPs. Finalmente, 17 SNPs polimórficos en la región 8.03-8.05 del cromosoma 8 (24 Mpb-139 Mpb) con bajo porcentaje de datos perdidos (2,5%) se usaron en el análisis. Para la búsqueda de haplotipos en Haploview se comenzó a trabajar con los 109 SNPs seleccionados; eliminando multialelos quedaron 85 SNPs polimórficos. Después se eliminaron también SNPs muy lejanos a los QTL, sin romper los bloques formados con los 85 SNPs, quedando solo 22 SNPs para ver el desequilibrio de ligamiento entre los QTL.

3.1.4 Análisis estadístico de los datos fenotípicos

Los datos fenotípicos se analizaron usando el procedimiento de modelo mixto (PROC MIXED) de SAS (SAS Institute 2016) considerando todos los factores aleatorios excepto familias que se consideró como efecto fijo. El mejor estimador lineal no sesgado (por sus siglas en inglés BLUE: best linear unbiased estimator) se obtuvo para estimar valor fenotípico medio de cada línea en cada ambiente y en el conjunto de los tres ambientes.

3.1.5 Análisis de QTL

La detección de QTL y la estimación de los efectos se realizaron mediante CIM usando el programa PlabMQTL (Utz, 2012). Un umbral de LOD (por sus siglas en inglés: “logarithm of odds”) de 1,2 se determinó por prueba de permutación que asegura una tasa de $p < 0,30$. Siguiendo a Utz *et al.* (2000). Se usó validación cruzada (VC) para calcular la proporción de veces que se detecta un QTL realizando análisis en 1.000 permutaciones.

3.1.6 Desequilibrio de ligamiento

El desequilibrio de ligamiento local medido como r^2 entre pares de SNPs y los haplotipos en la región bajo estudio se evaluaron en Haploview versión 4.2

(Barrett *et al.*, 2005) con bloques de haplotipos definidos con el método de intervalo de confianza (Gabriel *et al.*, 2002).

3.2 MAPEO DE QTL EN UNA POBLACIÓN RIL A637 × A509

3.2.1 Material vegetal

En este estudio usamos 162 RIL (F_6) derivadas del cruzamiento A637 × A509. La línea A509 es sensible (sufre una pérdida de rendimiento más alta que la media frente al ataque del taladro) y resistente (con pequeñas galerías en el tallo y resistencia más alta en mazorca que el promedio) al ataque de *S. nonagrioides*, mientras la línea A637 se comportó como tolerante (pérdidas de rendimiento más bajas que el promedio) pero susceptible (grandes galerías en tallo y menos resistencia en mazorca que el promedio) a *S. nonagrioides* (Butrón *et al.*, 1998b). El proceso de obtención de las RIL se esquematiza en la Figura 3.2.1.

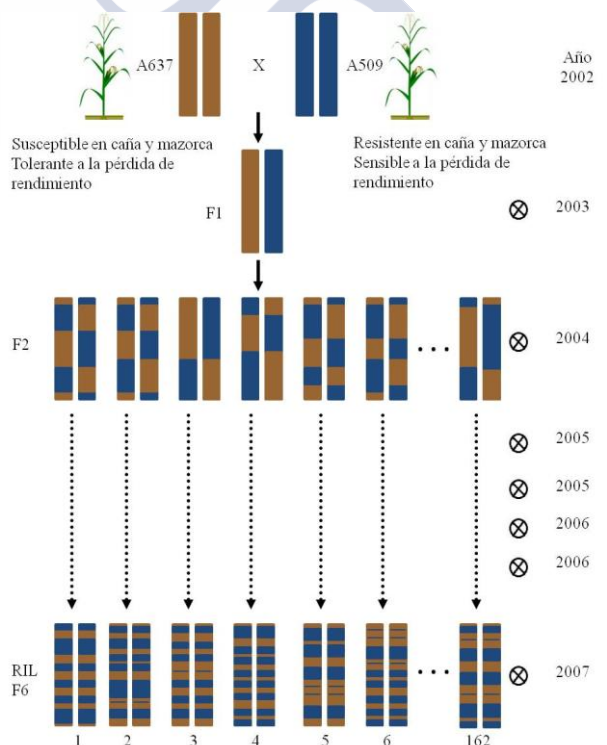


Figura 3.2.1 Esquema de la obtención de 162 RIL a partir del cruce de las líneas A637 × A509. Los años que se repiten son debido a la generación de invierno llevada a cabo en Chile.

3.2.2 Datos fenotípicos

En 2014 y 2015, 171 RIL se evaluaron junto con las dos líneas parentales A637 y A509 y nueve líneas más como controles (EP125, EP39, EP42, EP47, EP53, EP86, F473, PB130, y W182B) usando un diseño en látice simple 13 x 14. Los experimentos se sembraron en Pontevedra, en el noroeste de España (42° 25' N, 8° 38' O, y 20 msnm). Se sembraron a mano y cada parcela experimental consistió de un surco de 2,16 m de longitud y 0,80 m entre surcos, con 13 golpes y dos granos por golpe a un espacio de 0,18 m entre golpes. Las parcelas se ralearon obteniendo una densidad final de ~70.000 plantas ha⁻¹. Las evaluaciones se realizaron bajo infestación artificial con huevos de *S. nonagrioides* siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.2. La recolección de datos se realizó como sigue: días a floración femenina, que son los días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas presentan flores femeninas; altura de planta, medido como el promedio de la longitud en centímetros desde el suelo hasta la parte más alta de la flor masculina de cinco plantas representativas; resistencia en grano a la larva de *S. nonagrioides*, medido mediante la evaluación del nivel de daño de mazorca de las cinco plantas infestadas utilizando una escala visual subjetiva de 1 a 9 en la que 1 indicó daño completo y 9 indicó ausencia de daño (Malvar *et al.*, 2004); longitud de galerías, los tallos de 5 plantas infestadas se cortaron longitudinalmente para medir la longitud en centímetros de los túneles en el tallo hechos por las larvas de los taladros; daño de tallo relativo, calculado como la longitud de galerías dividida por la altura de planta y multiplicada por 100; y rendimiento de grano, estimado en toda la parcela como Mg ha⁻¹ a 140 g H₂O kg⁻¹.

3.2.3 Datos genotípicos

Los padres y las 171 RIL se genotiparon usando GBS resultando en un total de 955.690 SNPs, el genotipado se realizó en el instituto de Biotecnología de la Universidad de Cornell. Las posiciones de los SNPs que se muestran están referidas a la versión 2 del mapa físico de la línea versión: Maize (B73 RefGen_v2) (Sen *et al.*, 2010). Los SNPs polimórficos entre A637 y A509 secuenciados en al menos el 95% de las líneas recombinantes se seleccionaron. SNPs muy cercanos a otros no proveen

información útil adicional así que se redujeron los SNPs eliminando aquellos que tuvieran una distancia menor de 1,5 Mpb entre SNPs adyacentes y se obtuvo una base de datos de genotipado de 1.165 SNPs. Finalmente, las RIL con un número de marcadores heterocigotos $\geq 20\%$ se eliminaron, dejando 162 líneas. Basados en la conclusión de investigaciones previas comparando el uso de mapas con alta y baja densidad de marcadores (Li *et al.*, 2010; Stange *et al.*, 2013) y nuestra propia experiencia, se construyó un mapa genético usando el software MAPMAKER (Lander *et al.*, 2009) con una base de datos de genotipado de 285 marcadores, el mapa resultante tuvo un promedio de intervalo entre marcadores de 8,6 cM.

3.2.4 Análisis estadístico de los datos fenotípicos

Los datos de las parcelas experimentales de las RIL se analizaron con el paquete estadístico SAS usando el procedimiento de modelo mixto (PROC MIXED) de SAS (SAS Institute, 2016) donde ambientes, repeticiones, bloques dentro de repeticiones, RIL y las correspondientes interacciones se consideraron efectos aleatorios. El mejor predictor lineal no sesgado (por sus siglas en inglés BLUP: *best linear unbiased predictor*) se obtuvo para estimar la media del valor fenotípico de cada línea, de los datos individuales por experimento y combinados de ambos experimentos. Las heredabilidades (\hat{h}^2) a través de ambientes se estimaron para cada característica como describe Holland *et al.* (2002). Las correlaciones genotípicas (r_g) y fenotípicas (r_p) entre características se calcularon siguiendo a Holland (2006). Todos los análisis previos se realizaron con SAS versión 9.4.

3.2.5 Análisis de QTL de características individuales

El análisis de QTL se realizó usando el programa PlabMQTL (Utz, 2012). El método de CIM se realizó para detectar QTL y para estimar los efectos de los QTL. De acuerdo con una prueba de permutación ejecutada previamente con 1000 permutaciones aleatorias (Churchill y Doerge, 1994), se eligió un umbral de LOD de 3,55 con un valor empírico crítico de 30% para declarar significativo un QTL putativo. El mapeo de QTL se realizó en dos pasos. En el primer paso, el genoma entero se escaneó para dibujar las curvas de LOD e identificar los picos donde se

localiza el QTL putativo; en este ajuste preliminar, se estimaron los efectos aditivos de todos los cofactores preseleccionados. En el segundo paso, los QTL detectados en el paso previo se evaluaron utilizando el criterio de información Bayesiano (por sus siglas en inglés BIC: *Bayesian information criterion*) como criterio de selección por el procedimiento de regresión paso a paso (Utz, 2012). El método de validación cruzada (VC/G) se utilizó para obtener el predictor no sesgado del efecto aditivo ($\hat{\alpha}$) (Utz *et al.*, 2000). Para cada característica, la VC/G se realizó con la base de datos total de BLUP a través de ambientes. Un total de 130 entradas se usaron como base de datos de estimación (ES) para la calibración, y 32 entradas se usaron como la base de datos de prueba (TS) para validación. Mil VC/G se realizaron para determinar la frecuencia del QTL y la contracción de las estimaciones para los efectos de los QTL detectados en el conjunto de datos original (Melchinger *et al.*, 2004). Los porcentajes de los sesgos de las estimas de los efectos aditivos $\hat{\alpha}_i$ se calcularon con la fórmula: $\text{sesgo} = (\text{EfectoTS} - \text{EfectoES}) / \text{EfectoES}$.

3.2.6 Análisis de QTL de índices

Además del análisis de QTL para los caracteres individuales se realizó un análisis para una serie de índices donde se combinan dos o más caracteres. Los índices se calcularon utilizando los datos originales estandarizados para evitar problemas de escala. La estandarización se llevó a cabo usando la fórmula $Z = \frac{x - \mu}{\sigma}$, donde x son los datos originales, μ es la media ponderada de la característica, y σ es la desviación estándar. Así todos los caracteres tienen una media de 0 y una desviación estándar igual a 1. Con los datos estandarizados se calcularon cuatro índices: 1) R+rg-lg (rendimiento más resistencia en grano menos longitud de galerías); 2) R-lg (rendimiento menos longitud de galerías); 3) R+rg (rendimiento más resistencia en grano) y 4) Rg-lg (resistencia en grano menos longitud de galerías).

3.2.7 Análisis de QTL conjunto

Un análisis de QTL combinado para co-localizar QTL de características agronómicas y de resistencia relacionadas se realizó usando la opción JointQTL de

PlabMQTL (Utz, 2012). Un umbral de LOD de 5.8 se eligió para usarse como umbral para detectar QTL significativos con lo que se garantiza una probabilidad de error en el experimento $< 0,10$.

3.3 MAPEO DE ASOCIACIÓN EN UNA POBLACIÓN MAGIC

3.3.1 Material vegetal

Los padres de la población MAGIC son 8 líneas puras: EP17, EP43, EP53, EP86; PB130 y F473 provienen de germoplasma europeo; y A509 y EP125 de germoplasma de Estados Unidos. Los parentales se eligieron porque mostraron resistencia frente al ataque de los taladros y son de orígenes diversos, pero no emparentadas con la población “Reid”. El pedigrí de cada línea se puede ver en la Tabla 3.3.1. El proceso de obtención de las líneas de la MAGIC se esquematiza en la Figura 3.3.1.

El sintético (nombrado como EPS21) para la obtención de la población MAGIC se desarrolló por el método de cruzamiento convergente (c) con cruces específicos involucrando 8 líneas parentales. Los ocho padres se cruzaron en pares, entonces los cuatro híbridos se cruzaron para hacer dos cruza dobles, y así hasta la cruza final involucrando todos los padres.

En el método de cruza convergente, las cruza simples, $A509 \times EP125$, $EP86 \times PB130$, $F473 \times EP53$ y $EP17 \times EP43$, se hicieron en 1995 como el primer paso en la formación de la variedad sintética balanceada EPS21. Las cruza dobles, $(A509 \times EP125) \times (EP86 \times PB130)$ y $(F473 \times EP53) \times (EP17 \times EP43)$ en 1996. Finalmente, en 1997 se hizo la cruza entre los dos dobles cruzamientos híbridos y se obtuvieron aproximadamente 20 mazorcas (Butrón *et al.*, 2003). En la población resultante se realizaron 6 generaciones de recombinación para romper el desequilibrio de ligamiento. En cada uno de estos ciclos, se sembraron 300 semillas (cada mazorca obtenida en el cruzamiento de los híbridos dobles o en la recombinación previa contribuyó con el mismo número de semillas) en 10 surcos, cada uno con 15 golpes y dos semillas por golpe. Las plántulas se ralearon a una planta por golpe dejando 150 plantas para cruza planta a planta. Cada planta se utilizó sólo como macho o hembra

y se obtuvieron más de 50 mazorcas. A partir de este momento, se inició el proceso de autofecundaciones que llevaría a la obtención de RIL F₆ a partir de EPS21.

Después del sexto ciclo de recombinación se inició en proceso de obtención de RIL mediante autofecundación. En los años sucesivos, para garantizar que cada RIL proviniera de una planta distinta del sintético EPS21, de cada una de las mazorcas obtenidas en el año anterior se seleccionó una sola que se autofecundó, de modo que al cabo de 6 autofecundaciones se obtuvieron 672 RIL F_{5,6} que constituyeron la población MAGIC. En la tabla 3.3.1 se describen las principales características de los padres de la población MAGIC.

Tabla 3.3.1 Líneas puras de maíz que son base de la variedad sintética EPS21, y sus pedigríes.

Líneas puras	Color de grano	Pedigrí	Tipo de grano
EP17	Amarillo	A1267 ^b	Liso
EP43	Amarillo	Parderrubias ^b	Liso
EP53	Amarillo	Laro ^b	Liso
EP86	Amarillo	Nostrano dell'Isola ^b	Liso
PB130	Amarillo	Rojo Vinoso de Aragón ^b	Liso
F473	Blanco	Doré de Gomer ^b	Liso
EP125	Amarillo	Selección de CO125 ^a	Dentado
A509	Amarillo	A78 × A109 ^a	Dentado

^a Pedigrí para las líneas de Estados Unidos son reportadas en Butrón *et al.* (2009a). ^b Variedades de maíz locales europeas.

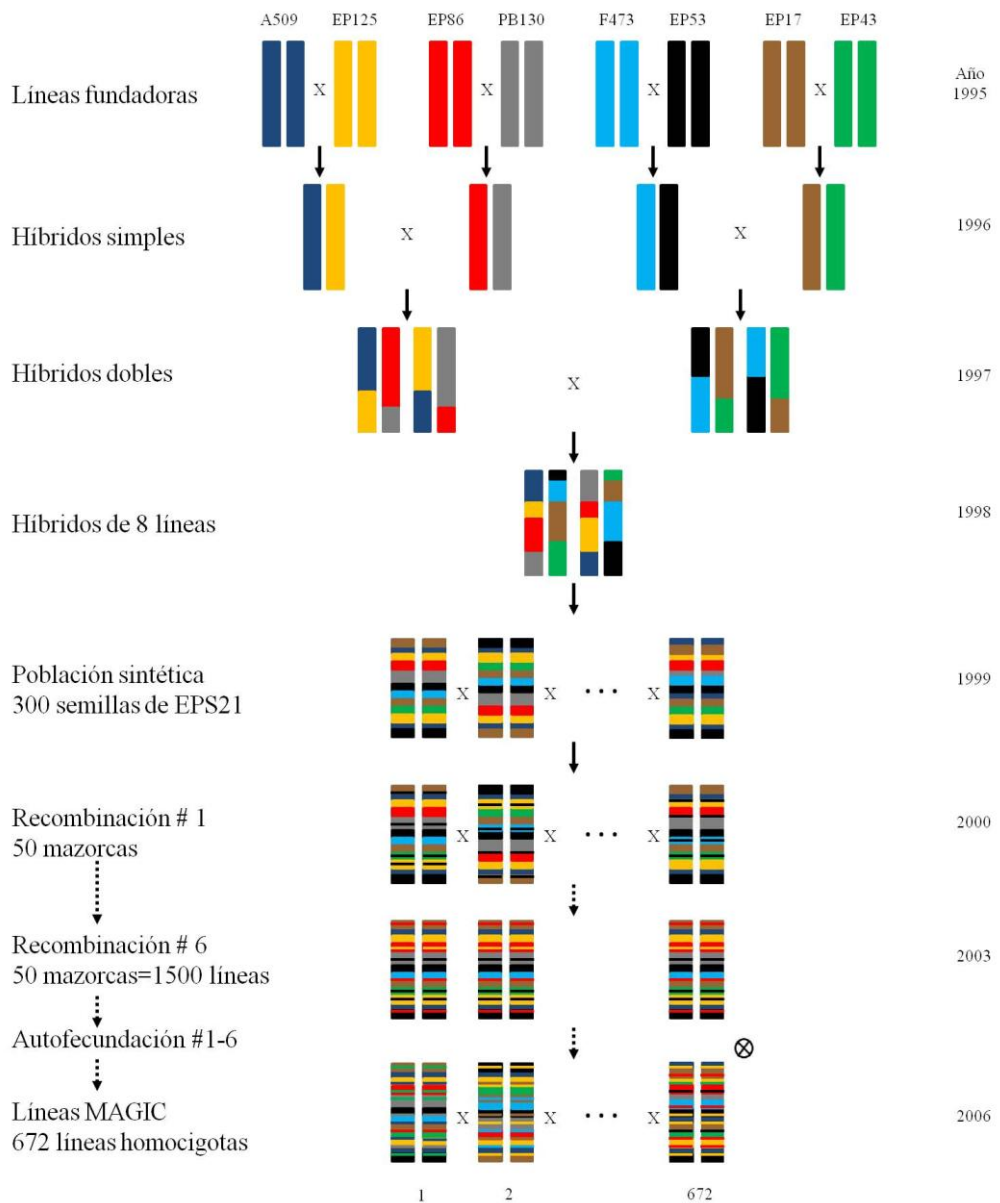


Figura 3.3.1 Esquema de la obtención de 672 líneas a partir del cruce de 8 líneas puras. EP17, EP43, EP53, EP86; PB130 y F473 provienen de germoplasma europeo; y A509 y EP125 de germoplasma de Estados Unidos.

3.3.2 Diseño experimental

Se evaluaron 672 líneas en Pontevedra (42°24'N, 8°38'O y 20 m sobre el nivel del mar) durante dos años, 2014 y 2015, junto con las ocho líneas puras

parentales usando un diseño aumentado modificado ya que los testigos se distribuyen al azar pero siempre en posiciones fijas dentro del bloque (1, 8, 15, 22, 29, 36, 43 y 50). Se utilizaron 16 bloques; en cada bloque se evaluaron 42 líneas y los 8 padres que actuaban como testigos. En 2014, las 672 RIL se evaluaron sin ningún tipo de réplica, pero en 2015 se desecharon algunas por presentar un alto grado de heterocigosis y/o datos perdidos en el genotipado y la evaluación de las 607 RIL resultantes se hizo mediante un diseño aumentado duplicado (o bien dos diseños aumentados adyacentes) con 2 réplicas para cada RIL. Los experimentos se plantaron manualmente y cada parcela experimental consistió de un surco espaciado a 0,8 m del otro, con 17 granos a lo largo del surco espaciados 0,18 m en 2014, obteniendo una densidad final de ~ 70.000 plantas ha^{-1} . En 2015, uno de los diseños aumentados fue igual al de 2014 y el segundo similar, pero con parcelas más reducidas de solo 9 granos.

3.3.3 Datos fenotípicos

Se colectaron los siguientes datos de resistencia: longitud de galerías (LG) que es la media de la longitud, en centímetros, de las galerías o túneles producidos por las larvas de *S. nonagrioides* en la caña de las cinco plantas infestadas; y resistencia en grano (RG) que se determina en cinco plantas infestadas de acuerdo a una escala visual subjetiva de 1 a 9 en la cual el valor de 1 indica totalmente dañado y 9 indica totalmente sano. Se colectaron también los siguientes datos agronómicos: días a floración femenina (DFF) que son los días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas presentan flores femeninas; altura de planta (AP) que se toma después de la floración en cinco plantas representativas de la parcela y se refiere a la longitud media de la planta, en centímetros, desde el punto de inserción de las raíces en el suelo hasta el extremo superior de la inflorescencia masculina y rendimiento (R) que se expresa como el peso del grano en g planta^{-1} a $140 \text{ g H}_2\text{O kg}^{-1}$ (14% de humedad en grano). Humedad de grano: Esta variable se registró en el momento de la cosecha utilizando un medidor de humedad de grano Kett modelo PM-400 en una muestra de 240 cm^3 y se expresó en porcentaje.

3.3.4 Datos genotípicos

672 líneas derivadas del sintético EPS21 y los 8 padres, EP17, EP43, EP53, EP125, EP86, PB130, F473, y A509, se genotiparon por GBS con un total de 955.690 SNPs y la posición de éstos está referida a la versión de la secuencia de B73: Maize B73 RefGen v_2. La base total de datos de genotipado, 955.690 SNPs, se filtró en Tassel seleccionando los SNPs secuenciados en al menos el 95% de las líneas recombinantes y que fueran polimórficos, por lo tanto se estableció una frecuencia alélica mínima de 0,05 para eliminar SNPs monomórficos o con alelos raros, además se eliminaron los SNPs con más de 2 alelos, deleciones e inserciones. También se eliminaron las RIL y los parentales que tenían más del 5% de SNPs heterocigotos (quedando 607 RIL y 7 líneas parentales). Los genotipos heterocigotos se consideraron como datos perdidos en el análisis de la base de datos final que contuvo información de 607 RIL y de las líneas parentales para 224.363 SNPs. También se construyó otra base reducida en la que se eliminaron aquellos SNPs que presentaban algún dato perdido para alguno de los 7 parentales restantes conteniendo 29.292 SNPs.

3.3.5 Análisis estadísticos de datos fenotípicos

El experimento de las líneas se analizó con el software SAS 9.4 usando el procedimiento de modelos mixtos (PROC MIXED) de SAS (SAS Institute 2016) considerando ambientes, repeticiones y bloques se consideraron como factores aleatorios y líneas como efectos fijos. Los BLUE se obtuvieron para estimar el valor fenotípico medio de cada línea en cada ambiente y en el conjunto de los ambientes. Las heredabilidades (\hat{h}^2) se estimaron siguiendo a Holland *et al.* (2002). Las correlaciones genéticas (r_g) y fenotípicas (r_p) entre características se calcularon siguiendo a Holland, (2006). Todos los análisis previos se realizaron en el software SAS versión 9.4.

Los datos fenotípicos obtenidos en las evaluaciones de los padres se analizaron separadamente usando el programa PROC GLM del paquete estadístico SAS (SAS Institute 2016) considerando ambientes, repeticiones dentro de ambientes y la interacción genotipo \times ambiente como efectos aleatorios y las líneas parentales

como efecto fijo. Las medias de las líneas parentales se compararon utilizando la diferencia mínima significativa protegida de Fisher (MDS).

3.3.6 Mapeo de Asociación

En esta investigación se utilizaron 607 RIL de una población MAGIC para detectar SNPs significativos para características de resistencia: resistencia en grano y longitud de galerías y características agronómicas: altura de planta, floración y rendimiento.

3.3.6.1 Análisis de asociación

El análisis de asociación basado en el modelo MLM se realizó en el programa informático Tassel 5.0 (Bradbury *et al.*, 2007). El MLM utilizado por Tassel fue:

$$y = \mathbf{X}\beta + \mathbf{Z}u + e$$

Donde y es el vector de los fenotipos (BLUE de las RIL), β es un vector de efectos fijos, incluyendo el marcador SNP testado, u es un vector de efectos aditivos aleatorios, \mathbf{X} y \mathbf{Z} representan matrices de diseño que relacionan y con β y u , respectivamente, y e es un vector de residuos aleatorios. Las varianzas de las líneas aleatorias se modelaron como:

$$\text{Var}(u) = \mathbf{K}\sigma_a^2$$

Donde \mathbf{K} es la matriz $n \times n$ de coeficientes de parentesco y σ_a^2 es la varianza genética aditiva estimada (Yu *et al.*, 2006).

3.3.6.2 Construcción de la matriz de parentesco (kinship)

Con el fin de evitar falsas asociaciones se construyeron las matrices de parentesco genético (\mathbf{K} o kinship dominante centralizada) en Tassel 5.0, utilizando las dos bases de datos 29.292 y 224.363 SNPs polimórficos.

Las estimas de la máxima verosimilitud restringida de los componentes de la varianza se obtuvieron utilizando la opción de nivel de compresión óptimo o MLM comprimido y la opción de los parámetros de población previamente determinados (P3D) descritas por Zhang *et al.* (2010) e incluidas en Tassel.

3.3.6.3 Umbral de significación

Para elegir el umbral al que un determinado SNP se puede considerar significativamente asociado a una característica se utilizó la siguiente fórmula:

$$p = \text{nivel de significación del experimento} / \text{número de comparaciones independientes}$$

Para calcular el número de comparaciones independientes se calculó el número de SNPs que segregaban independientemente, utilizando el programa Haploview (Barrett *et al.*, 2005). Para determinar si dos SNPs son independientes se usó la regla de los cuatro gametos con una probabilidad del 20% (Wang *et al.*, 2002). Como nivel de significación del experimento se eligió el 30%.

3.3.6.4 Desequilibrio de ligamiento y selección de genes candidatos

En Haploview, se determinaron los bloques de ligamiento en las regiones que contenían cada uno de los SNPs significativamente asociados con caracteres de resistencia a *S. nonagrioides* y/o caracteres agronómicos con el método de columna vertebral sólida de LD (“solid spine of LD”). Este método desarrollado por Barrett, (2009) define bloques de LD en los que el primer y el último marcador en el bloque están en LD fuerte con todos los marcadores intermedios pero en los que los marcadores intermedios no están necesariamente en LD entre sí. Se buscaron genes candidatos dentro de esos bloques de LD siempre que no fueran mayores de 1 Mbp utilizando el navegador del genoma del sitio web MaizeGDB (Harper *et al.*, 2011) disponible en <http://www.maizegdb.org/>. La selección de los genes candidatos dentro de cada bloque de ligamiento se hizo en base a las evidencias previamente publicadas y, de todos los genes posibles dentro de un bloque se eligió el gen más cercano al

SNP como candidato y los otros genes se comentan como genes de interés que podrían estar involucrados en los mecanismos de defensa de la planta contra insectos.

3.3.6.5 Desequilibrio de ligamiento y cálculo de efectos aditivos de los haplotipos

Para cada SNP significativo se estableció el desequilibrio de ligamiento usando el software Haploview, cada bloque de ligamiento se considera como un QTL asociado significativamente al carácter de interés. Los efectos aditivos de cada haplotipo se calcularon sumando los valores fenotípicos de los haplotipos que muestran valores mayores para el carácter y restando los valores fenotípicos de los haplotipos que muestran valores menores para el carácter.



RESULTADOS





4. RESULTADOS

4.1 VALIDACIÓN DE QTL EN UNA POBLACIÓN HIF

El objetivo del presente estudio fue la validación de los QTL previamente reportados con RIL del cruce EP42 × EP39 para longitud de galerías, rendimiento de grano y floración bajo alta infestación que se localizaron en los bins 8.03-8.05. Para validar esos QTL y estudiar en más detalle la relación entre las características en la región, se desarrollaron un grupo de 38 líneas HIF las cuales eran altamente homocigotas, excepto en la región bajo estudio. Las líneas HIF se evaluaron en tres ambientes bajo infestación artificial con MCB y se genotiparon con SNPs.

4.1.1 Análisis estadístico de los datos fenotípicos

Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre EP42, EP39 y LR-23, para floración femenina, altura de planta, rendimiento y longitud de galerías. LR-23 tiene la misma altura de planta y rendimiento que EP42 y valores intermedios para floración femenina y longitud de galerías entre EP42 y EP39 (Tabla 4.1.1).

Tabla 4.1.1 Medias ± errores estándar de una población de 38 líneas HIF derivadas de LR-23, procedente de la cruce EP39 × EP42 para características relacionadas con la resistencia a MCB y características agronómicas evaluadas en dos años.

	DFE (días)	AP (cm)	R (Mg ha ⁻¹)	LG (cm)
Familias F_{2:3}				
Media	81,4 ± 0,31	109,4±2,25	1,65±0,06	31,4±0,48
Padres y LR-23				
EP42	73,6 b	111,1 a	3,2 a	35,2 a
EP39	76,5 a	64,4 b	0,95 b	16,2 b
LR-23	75,1 ab	94,1 a	3,0 a	27,7 ab
LSD 0.05	1,5	19,5	0,79	12,1

DFE, floración femenina; R, rendimiento de grano; AP, altura de planta; LG, longitud de galerías; RG, resistencia en grano.

4.1.2 Análisis de QTL

De los 955.690 SNPs con los que se genotiparon las 38 líneas HIF 73.316 SNPs no presentaban datos perdidos. Estudiando el polimorfismo en todo el genoma se observó que el porcentaje de loci polimórficos en el genoma completo fue de 0,5%,

mientras que el porcentaje fue del 2,0% en el cromosoma 8. Dentro de este cromosoma, las HIF fueron polimórficas para la mayoría de los SNPs polimórficos entre EP39 y EP42 en la región donde los QTL fueron localizados en la población RIL derivada de EP39 × EP42 (79-138 Mbp). Además, también presentaron variabilidad genética en la población HIF para la región 24-79 Mbp que no fue genotipada en la población RIL. En total, en la población HIF había una región donde se localizaron los QTL en las HIF, dentro de los bins 8.03 a 8.05 desde 24 Mpb a 139 Mpb del cromosoma 8 con 3,2% de polimorfismos. Al construir el mapa en MAPMAKER quedaron fuera los SNPs del bin 8.05, quedando SNPs para analizar solo en los bins 8.03 y 8.04 (Figura 4.1.2.1).



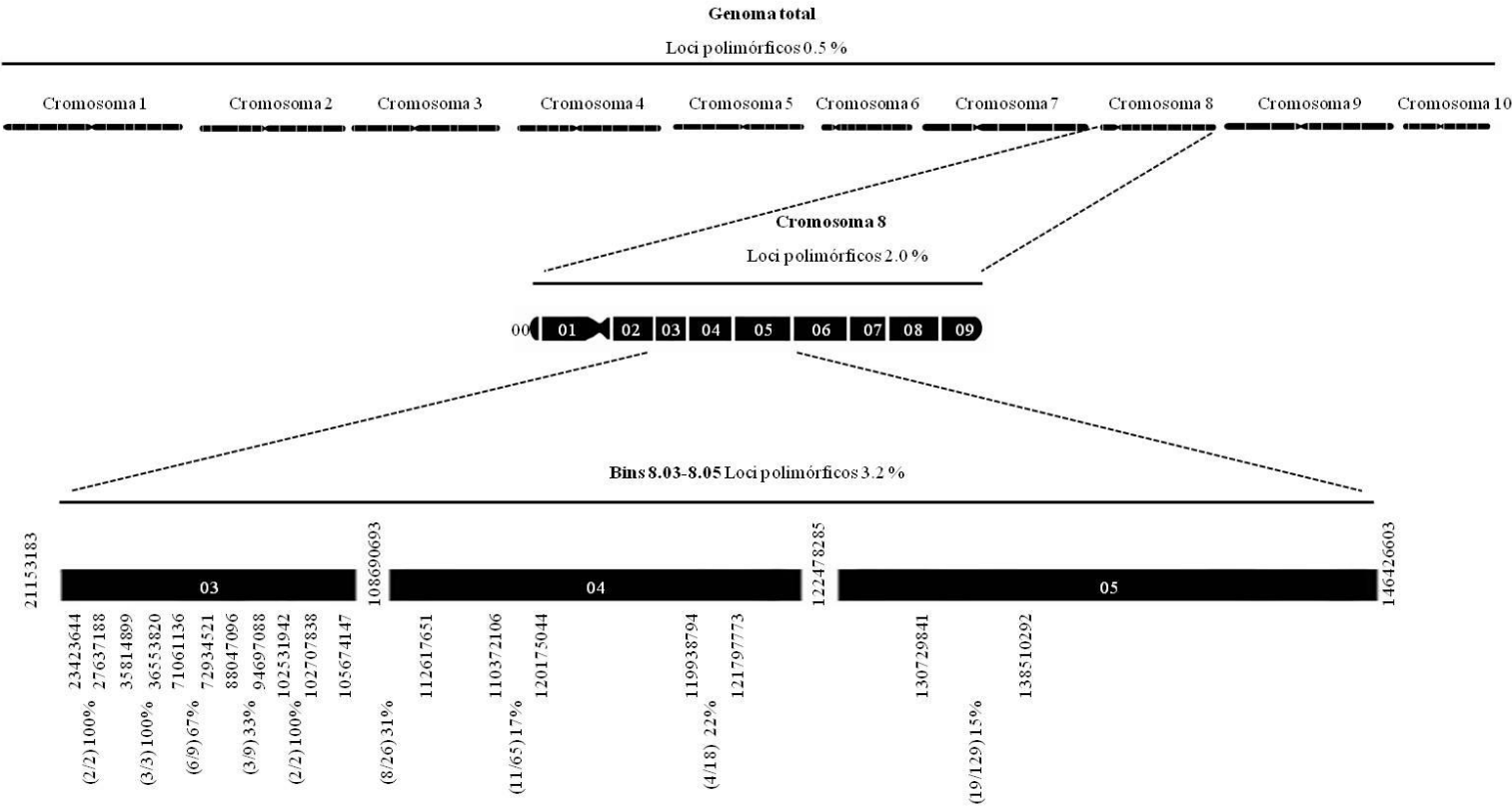


Figura 4.1.2.1 Loci polimórficos para el genoma completo de la población HIF, en el cromosoma 8 y la región genómica localizada en los bins 8.03-8.05 del cromosoma 8.

En el análisis de las HIF, se encontraron QTL para rendimiento de grano, longitud de galerías, altura de planta y floración femenina en la cual el alelo de EP42 proporcionó más rendimiento, galerías grandes y floración temprana en congruencia con el experimento de mapeo original EP39 × EP42 (Tabla 4.1.2 y Figura 4.1.2.2). Los QTL para floración femenina y rendimiento están localizados en el cromosoma 8, bin 8.04; y el QTL de longitud de galerías y altura de planta están en el cromosoma 8 bin 8.03. El porcentaje de la varianza fenotípica es de bajo a alto, en un rango de 10.7-34.9. Los alelos derivados de EP42 incrementan longitud de galerías (0,37 cm), altura de planta (4,7 cm) y rendimiento (0,21 Mg ha⁻¹) y disminuyen floración femenina (0,19 días) (Tabla 4.1.2 y Figura 4.1.2.2).

Tabla 4.1.2 Resumen de QTL mapeados en las líneas HIF derivadas de EP39 × EP42 las cuales se evaluaron en tres años de experimentos bajo infestación con MCB.

Posición del QTL bin ^a	LOD	Posiciones de marcadores flanqueantes (pb)	Efecto aditivo medio ^c					Frec ^d	V. Fenot. (R ²) ^e
			DS ^b ($\hat{\alpha}$)	ES	TS ^f	Sesgo			
Floración Femenina (días)									
8.04	1,4	112617651-116854699	-0,44	-0,51	-0,19	0,63	0,48	10,7	
Altura de planta (cm)									
8.03-8.04	3,0	108499269-112617651	5,5	5,4	4,7	0,13	0,95	26,7	
Rendimiento (Mg ha⁻¹)									
8.04	3,9	112617651-116854699	0,31	0,32	0,21	0,23	0,87	34,9	
Longitud de galerías (cm)									
8.03-8.04	1,5	27637188-35814899	1,6	1,7	0,37	0,79	0,49	11,4	

^a Las posiciones de los bin se designaron por un código X.Y, donde X es el grupo de ligamiento conteniendo el bin y Y la posición del bin dentro del grupo de ligamiento (Gardiner *et al.*, 1993).

^b DS es la estimación para el conjunto de datos completos; ES es el valor promedio para 1000 conjuntos de estimación; TS es el valor promedio de los 1000 conjuntos de prueba en la VC; el bias se calculó como la diferencia entre las estimaciones ES y TS divididas por la estimación ES.

^c El efecto aditivo del QTL se estimó como la mitad de la diferencia entre los valores genotípicos de los dos homocigotos.

^d Es la frecuencia de detección del QTL en la prueba de VC.

^e Proporción de la varianza fenotípica explicada por cada QTL.

^f Una estimación positiva significa que EP42 lleva el alelo con el valor más alto.

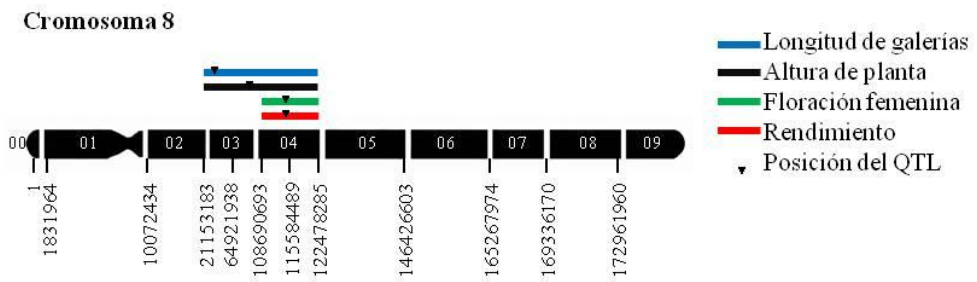


Figura 4.1.2.2 Mapa genético de una población de 38 RIL derivadas del cruce EP39 × EP42 sobre el que se han situado los QTL encontrados para diferentes caracteres. Se utilizaron 17 marcadores SNPs en el cromosoma 8 bin 8.03-8.04. Los números negros debajo de cada cromosoma indican la posición en pb de cada marcador SNP y los números blancos en cada cromosoma indican el número de bin. Los intervalos de confianza del 95% están indicados por la longitud de la barra del QTL.

4.1.3 Desequilibrio de ligamiento

El rendimiento de las líneas con el haplotipo de EP42 en la región donde el QTL para rendimiento se detectó (de 112,6 a 117,7 Mpb) no se superpone con el rendimiento de las HIF con el haplotipo de EP39, con excepción de la HIF_2 (Tabla 4.1.3). Así, la mendelización de este QTL casi se logró con el desarrollo de las familias HIF, a pesar del efecto moderado del QTL el cual explicó un 10% de la varianza fenotípica en el análisis en la población RIL EP39 × EP42. La HIF_40 tiene el haplotipo de EP39 excepto para dos SNPs en 116.9 Mpb para los cuales éste tiene los alelos de EP42 y esta HIF tuvo un alto rendimiento similar a las HIF con el haplotipo de EP42 en toda la región (de 112,6 a 117,7 Mpb). Por el contrario, la HIF_37 tiene el haplotipo de EP42 excepto para los dos SNPs en 116.9 para los cuales fue heterocigota y esta HIF tuvo un rendimiento similar a las HIF con el haplotipo de EP39 en la región entera (de 112,6 a 117,7 Mpb) (Tabla 4.1.3). Así, un cambio en los alelos a 116.9 Mpb tuvo un gran impacto en el rendimiento de la HIF_40 e HIF_37 lo cual sugiere que el QTL para rendimiento de grano bajo alta infestación podría estar ubicado alrededor de esta posición.

El análisis de la población RIL de EP39 × EP42 co-localizó dos QTL para longitud de galerías y rendimiento de grano con alelos antagonistas favorables los

cuales podrían dificultar su uso en mejora y contribuir a efectos no deseables en programas de selección para rendimiento y resistencia. Sin embargo, el QTL para rendimiento estaba segregante en las líneas HIF mientras que el QTL para longitud de galerías se fijó, indicando que los QTL para ambas características podrían ser manejados de forma independiente con fines de mejora. Pero esto no excluye que en la región fijada pueda haber otro QTL para rendimiento porque con el que se detectó solo se explica un 35% de la variación. En este estudio el QTL de longitud de galerías está en un bloque de ligamiento diferente del QTL de rendimiento (Figura 4.1.3).

Tabla 4.1.3 SNPs en la región de los QTL detectados para rendimiento (Mg ha⁻¹) por mapeo de intervalos para características agronómicas y de resistencia en una población de mapeo HIF. Los haplotipos con loci heterocigotos, datos perdidos o más de dos eventos de recombinación no son mostrados.

	Posiciones de los SNPs (pb)					Rendimiento (Mg ha ⁻¹)			
	112617651	113871058	113871078	116854699	116854725	117747302	Haplotipo	Media	Rango
Haplotipos de EP42									
EP42	G	A	G	C	G	A		3,2	
HIF_19	G	A	G	C	G	A		2,0	
HIF_21	G	A	G	C	G	A		2,1	
HIF_25	G	A	G	C	G	A		2,0	2,11
HIF_42	G	A	G	C	G	A		2,1	1,7-3,2
HIF_46	G	A	G	C	G	A		1,7	
HIF_47	G	A	G	C	G	A		1,7	
Haplotipos de EP39									
EP39	A	G	T	A	A	G		0,9	
HIF_12	A	G	T	A	A	G		1,4	
HIF_24	A	G	T	A	A	G		0,9	
HIF_27	A	G	T	A	A	G		1,6	
HIF_34	A	G	T	A	A	G		1,3	
HIF_3	A	G	T	A	A	G		0,9	1,28
HIF_49	A	G	T	A	A	G		1,2	0,9-2,0
HIF_5	A	G	T	A	A	G		1,3	
HIF_8	A	G	T	A	A	G		1,2	
HIF_26	A	G	T	A	A	G		1,2	
HIF_2	A	G	T	A	A	G		2,0	
HIF_9	A	G	T	A	A	G		1,5	
Haplotipos recombinantes									
HIF_40	A	G	T	C	G	G		1,9	
HIF_37	G	A	G	A:C	A:G	A		1,5	

Alelos rojos vienen de EP42; alelos azules vienen de EP39.

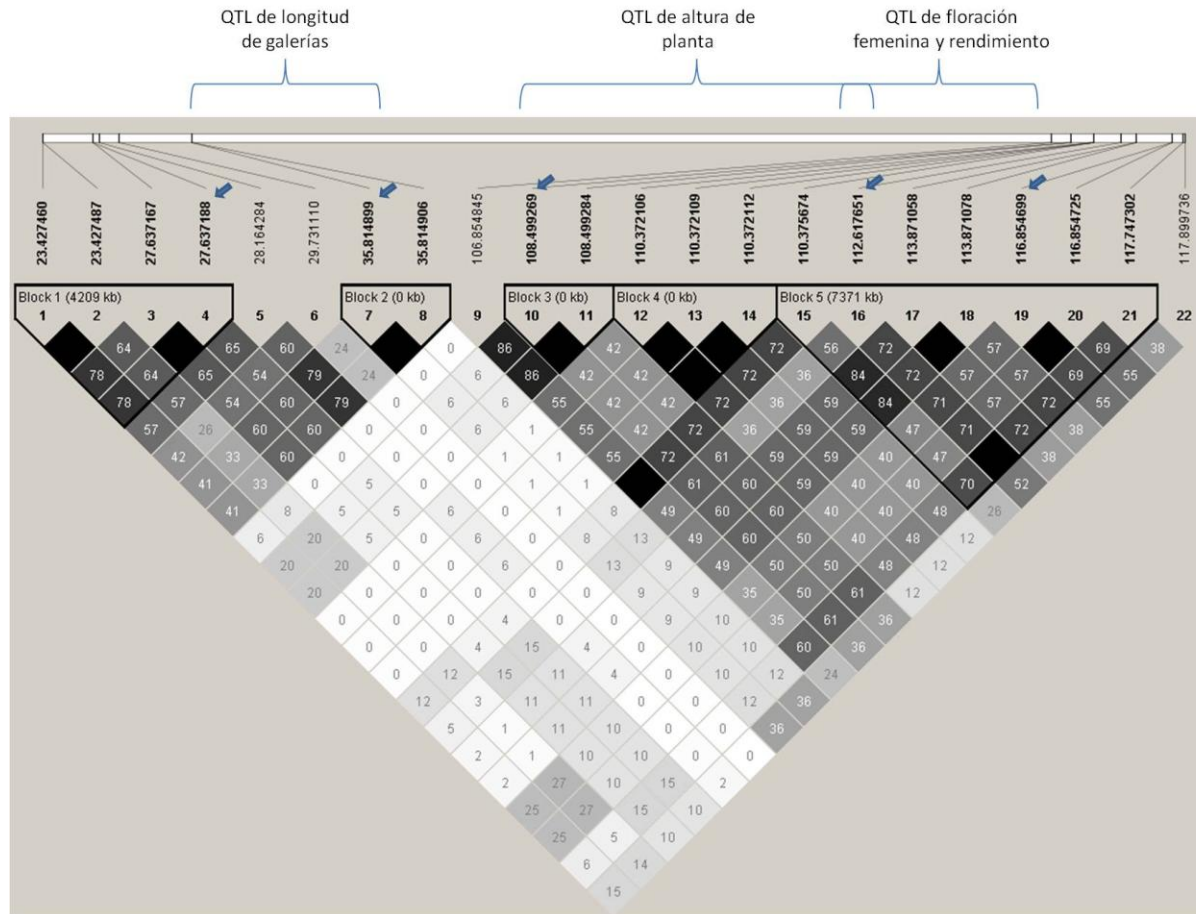


Figura 4.1.3 Desequilibrio de ligamiento local, medido como r^2 entre pares de SNPs (blanco, $r^2=0$, sombreados de gris= $0 < r^2 < 1$, negros $r^2=1$) y bloques de ligamiento para la región genómica localizada en 8.03-8.04 y estudiada para el análisis de las líneas HIF.

4.2 MAPEO DE QTL EN UNA POBLACIÓN RIL A637 × A509

4.2.1 Análisis estadístico de los datos fenotípicos

Se encontraron diferencias estadísticas significativas entre A637 y A509 solo para días a floración, y altura de planta (Tabla 4.2.1.1). El rango de las heredabilidades fue de bajo para resistencia en grano (0,36) a alto para floración (0,88) (Tabla 4.2.1.1). La altura de planta mostró correlaciones genéticas moderadas con rendimiento ($r_g=0,65$). Los coeficientes de correlación genética entre longitud de galerías y rendimiento ($r_g=0,59$) y entre longitud de galerías y altura de planta ($r_g=0,63$) fueron moderados. El coeficiente de correlación genética más alto fue entre resistencia en grano y floración femenina ($r_g=0,86$). Por otro lado, las correlaciones fenotípicas fueron bajas; excepto la correlación entre altura de planta y rendimiento que excedió 0,50 (Tabla 4.2.1.2).

Tabla 4.2.1.1 Medias ± errores estándar, rango y heredabilidades (h^2) de la población RIL derivada de A637 × A509 para características de resistencia y agronómicas evaluadas en dos años de experimentos bajo infestación con MCB. Las comparaciones de medias de las líneas parentales también se muestran.

	Características agronómicas			Características de resistencia		
	DFE (días)	R (Mg ha ⁻¹)	AP (cm)	LG (cm)	DTR (%)	RG (1-9) ^a
RIL						
Media	75,7±0,35	5,07±0,09	136,1±0,79	27,8±0,43	20,5±0,30	7,5±0,05
Rango	60-93	0,2-12,5	66-194	2,2-67,8	1,91-43,2	2,3-9,0
h^2	0,88	0,69	0,83	0,52	0,43	0,36
Padres						
A509	73,7 b	3,1 a	119,5 b	26,2 a	22,1 a	6,8 a
A637	77,5 a	4,1 a	134,5 a	38,1 a	30,2 a	7,0 a

Heredabilidades (h^2) para cada característica se estimaron siguiendo a Holland *et al.* (2002). ^a La resistencia en grano se midió con una escala visual subjetiva de 1 a 9 en la cual 1 indicó completamente dañado y 9 indicó sin daño. DFE, floración femenina; R, rendimiento de grano; AP, altura de planta; LG, longitud de galerías; DTR, daño de tallo relativo; RG, resistencia en grano.

Tabla 4.2.1.2 Coeficientes de correlación genotípica (debajo de la diagonal) y fenotípica (encima de la diagonal) entre características agronómicas y de resistencia a MCB de una población RIL derivada de A637 × A509 evaluada en dos años de experimentos bajo infestación con MCB.

	DFF	R	AP	LG	DTR	RG
DFF		0,11*	0,26*	0,19*	0,08	0,29*
R	0,37*		0,55*	0,22*	-0,004	0,31*
AP	0,45*	0,65*		0,35*	-0,08	0,30*
LG	0,45*	0,59*	0,63*		0,88*	-0,02
DTR	0,17	0,14	-0,13	0,66*		-0,16
RG	0,86*	0,32	0,42*	0,35	-0,02	

DFF, floración femenina; R, rendimiento de grano; AP, altura de planta; LG, longitud de galerías; DTR, daño de tallo relativo; RG, resistencia en grano. *Coeficientes de correlación genética y fenotípica que superan dos veces su error estándar.

4.2.2 Análisis de QTL de características individuales

El mapa se construyó en MAPMAKER iniciando con 171 RIL y 955.690 SNPs. Los SNPs polimórficos entre A637 y A509 secuenciados en al menos el 95% de las líneas recombinantes se seleccionaron. SNPs muy cercanos a otros no proveen información útil adicional así que se redujeron los SNPs eliminando aquellos que tuvieran una distancia mínima de 1,5 Mpb entre SNPs adyacentes para obtener una base de datos de genotipado de 1.165 SNPs. Finalmente, las RIL con un número de marcadores heterocigotos $\geq 20\%$ se eliminaron, quedando 162 líneas. Con una base de datos de genotipado de 285 marcadores, el mapa resultante tuvo un promedio de intervalo entre marcadores de 8,6 cM. El mapa genético cubrió una longitud de 2372,1 cM con una distancia genética media entre marcadores de 8,6 cM. No se observó distorsión de la segregación esperada para ningún marcador.

Doce QTL se identificaron para características de resistencia y agronómicas (Tabla 4.2.2, Figura 4.2.2). Cinco QTL para características de resistencia se encontraron en esta población RIL (Tabla 4.2.2, Figura 4.2.2). Tres QTL para longitud de galerías se localizaron en los cromosomas 5, 8, y 10 y representaron más del 44% del total de la varianza genotípica y 23% de la varianza fenotípica. Los valores absolutos de los efectos aditivos tuvieron un rango de 0,79 a 1,12 cm. Un QTL para daño de tallo relativo se localizó en el cromosoma 10 y explicó más del

30,3% de la varianza genotípica y 13,1% de la varianza fenotípica. El valor absoluto del efecto aditivo para este QTL fue de 0,65%. Un QTL para resistencia en grano se localizó en el cromosoma 9 y explicó el 20,1% de la varianza genotípica y 7,2% de la varianza fenotípica. El valor absoluto del efecto aditivo para este QTL fue de 0,07 (en escala de 1 a 9) y la frecuencia de detección a través de la VC/G fue de 49%.

Para rendimiento, solo un QTL localizado en el cromosoma 8 se detectó. La proporción de la varianza genotípica y fenotípica explicada por el QTL fue de 23,01% y 15,90%, respectivamente. El valor absoluto del efecto aditivo fue 0,49 Mg ha⁻¹ y la frecuencia de detección a través de la VC/G fue de 79% (Tabla 4.2.2, Figura 4.2.2).

Tres QTL para floración se localizaron en los cromosomas 1, 8, y 9. Estos QTL representaron el 50,54% del total de la varianza genotípica y 44,50% del total de la varianza fenotípica. Los valores absolutos de los efectos aditivos fueron 0,71, 1,38, y 0,83 días para los QTL en los cromosomas 1, 8, y 9, respectivamente, el porcentaje de estimación del sesgo para los efectos aditivos fue entre 1,1 y 12,7%. La frecuencia de detección en la VC del QTL en el cromosoma 9 fue más alta (0,90) que la observada para los QTL en los cromosomas 1 y 8. Tres QTL para altura de planta se localizaron en los cromosomas 2, 4 y 8. Estos QTL representaron el 33,0% del total de la varianza genotípica y 21,1% del total de la varianza fenotípica. Los valores absolutos de los efectos aditivos estimados fueron 4,03, 4,89, y 5,48 cm para los QTL en los cromosomas 2, 4 y 8, respectivamente. La frecuencia de detección en la VC de los QTL en el cromosoma 8 fue más alta (0,67) que la observada para los QTL en los cromosomas 2 (0,32) y 4 (0,34) (Tabla 4.2.2, Figura 4.2.2).

4.2.3 Análisis de QTL de índices

Dos QTL para el índice R+rg-lg se localizaron en los cromosomas 1 y 10 y explicaron más del 37% de la varianza genotípica y el 17% de la varianza fenotípica. Los valores absolutos para los efectos aditivos de los QTL fueron 0,46 y 0,61 con estimaciones de sesgo de 54 y 6,3%. Dos QTL para el índice de R-lg se localizaron en los cromosomas 5 y 10 y explican más del 31% de la varianza genotípica y 15% de la varianza fenotípica. El valor absoluto de los efectos aditivos para los QTL en los cromosomas 5 y 10 fue de 0,30 y 0,41 con sesgos de estimación de 58,7% y 21,2%,

respectivamente. Un QTL para el índice R+rg se localizó en el cromosoma 8 y representa un 8,87% de la varianza genotípica y 5,0% de la varianza fenotípica, respectivamente. El valor absoluto del efecto aditivo para este QTL fue de 0,31. Otro QTL localizado en el cromosoma 10 para el índice Rg-Ig representa un 47,6% de la varianza genotípica y 15,7% de la varianza fenotípica. El valor absoluto del efecto aditivo para este QTL fue de 0,58 (Tabla 4.2.2, Figura 4.2.2).



Tabla 4.2.2. Resumen de QTL mapeados en la población RIL derivada de A637 × A509 evaluada en dos años de experimentos bajo infestación con MCB usando un mapa genético con un intervalo promedio entre marcadores de 8,6 cM.

Posición del QTL				Efecto aditivo medio ^e							
bin ^a	cM	95% CI ^b (cM)	LOD ^c	Posiciones de los marcadores flanqueantes (pb)	DS ^d	ES	TS	Sesgo	Freq ^f	V. Fenot. (R ²) ^g	V. Genética
Características individuales											
Longitud de galerías (cm)											
5.01	31	24-40	3,94	4582822- 6113453	-0,79	-0,90	-0,33	0,631	0,292	5,57	10,71
8.05	103	93-108	3,92	132298557- 141751336	0,89	0,952	0,478	0,498	0,375	7,12	13,68
10.02-10.03	60	54-68	6,20	12084489- 78061189	1,12	1,102	0,952	0,136	0,728	10,40	19,98
Resistencia en grano (1-9) ^h											
9.07	141	136-145	5,44	150244089- 151819320	0,067	0,069	0,047	0,319	0,498	7,20	20,13
Daño de tallo relativo (%)											
10.02-10.03	60	54-67	5,50	12084489- 78061189	0,652	0,657	0,603	0,082	0,874	13,10	30,37
Rendimiento (Mg ha ⁻¹)											
8.04	91	88-97	8,23	113297722- 119720129	0,488	0,507	0,468	0,077	0,790	15,90	23,01
Floración femenina (días)											
1.01	14	9-19	8,42	4772203- 6533500	-0,71	-0,74	-0,65	0,127	0,677	8,27	9,40
8.04-8.05	98	95-105	9,38	119720129-132298557	1,379	1,352	1,269	0,061	0,843	23,90	27,14
9.07	144	140-149	8,22	150244089- 151819320	0,834	0,853	0,844	0,011	0,909	12,33	14,00
Altura de planta (cm)											
2.04	113	109-125	4,11	40439132- 43556793	4,028	4,164	1,652	0,603	0,323	5,08	7,94
4.02	65	56-72	4,30	8197994- 11255195	4,885	4,941	3,286	0,335	0,342	6,90	10,79
8.04-8.05	99	94-105	8,27	119720129- 132298557	5,478	5,445	4,801	0,118	0,674	9,12	14,27
Índices											
R+rg-1g											
1.10	277	273-281	3,55	275382135- 280088982	0,457	0,523	0,239	0,543	0,208	6,59	18,89
10.02-10.03	60	55-67	8,08	12084489- 78061189	-0,61	-0,63	-0,59	0,063	0,854	10,91	18,28
R-1g											
5.04	137	131-142	4,21	161477213-170970936	-0,30	-0,34	-0,14	0,587	0,282	5,64	11,78
10.03	65	52-70	4,30	78061189-86414417	-0,41	-0,43	-0,34	0,212	0,555	9,46	19,76
R+rg											

Posición del QTL					Efecto aditivo medio ^e							
bin ^a	cM	95% CI ^b (cM)	LOD ^c	Posiciones de los marcadores flaqueantes (pb)	DS ^d	ES	TS	Sesgo	Freq ^f	V. Fenot. (R ²) ^g	V. Genética	
8.03-8.04	85	80-89	3,63	94799312-113297722	0,314	0,355	0,152	0,572	0,234	5,00	8,87	
Rg-1g												
10.02-10.03	61	56-67	7,60	12084489-78061189	-0,58	-0,58	-0,56	0,034	0,860	15,70	47,68	

^a La posición de los bin se designaron por un código X.Y, donde X es el grupo de ligamiento conteniendo el bin, e Y es la posición del bin dentro del grupo de ligamiento (Gardiner *et al.*, 1993). Los bins estuvieron basados en la posición física de los marcadores flaqueantes. B73 RefGen_v3 se usó para el cromosoma 1, y para los cromosomas 2, 4, 5, 8, 9, y 10 B73 RefGen_v2 se usó (disponibles en: http://www.maizegdb.org/bin_viewer) (Sen *et al.*, 2010).

^b Intervalos de confianza del 95% como se explica en Utz (2012).

^c La calificación de LOD en el LOD-profile utilizado para escanear QTL. ^d DS es la estimación para el conjunto de datos completo; ES el valor promedio para los 1.000 conjuntos de estimación (80% de los genotipos de DS) en la VC; TS es el valor promedio para los 1.000 conjuntos de validación (20% de los genotipos de DS) en la VC; y el error de estimación (bias) se calculó como la diferencia entre las estimaciones de ES y TS dividida por la estimación ES.

^e El efecto aditivo del QTL se estimó como la mitad de la diferencia entre el valor genotípico de los dos homocigotos. Una estimación positiva significa que la línea A637 lleva el alelo con más alto valor.

^f Frecuencia de detección del QTL en el test de VC.

^g Proporción de la varianza fenotípica explicada por cada QTL.

^h Escala visual subjetiva de 1 a 9 en el cual 1 indico completamente dañado y 9 sin daño por las larvas.

R+rg-1g: índice de rendimiento mas aspecto de grano menos longitud de galerías. **R-1g:** índice de rendimiento menos longitud de galerías. **R+rg:** índice de rendimiento más resistencia en grano; **Rg-1g:** índice de resistencia en grano menos longitud de galerías; El Daño de tallo relativo en % se calculó como el porcentaje de la altura de planta con daño.

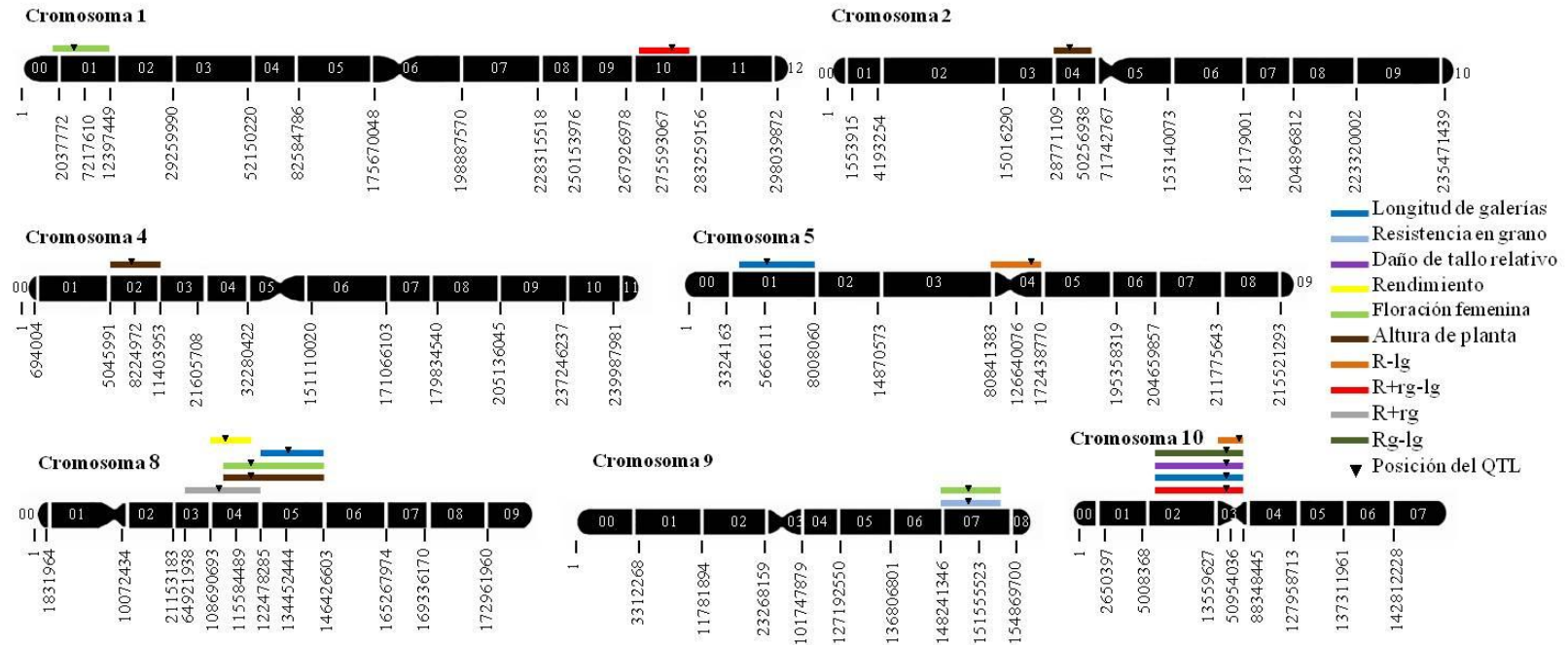


Figura 4.2.2 Mapa genético de una población de 162 RIL derivadas del cruce A637 × A509 sobre el que se han situado los QTL encontrados para diferentes caracteres. Se utilizaron 285 marcadores SNPs y solo se muestran los cromosomas donde se localizaron QTL significativos. Los números negros debajo de cada cromosoma indican la posición en pb de cada marcador SNP y los números blancos en cada cromosoma indican el número de bin. Los intervalos de confianza del 95% están indicados por la longitud de la barra del QTL. **R+*rg-ig***: índice de rendimiento más resistencia en grano menos longitud de galerías; **R-*lg***: índice de rendimiento menos longitud de galerías;

R+rg: rendimiento más resistencia en grano; **Rg-lg:** índice de resistencia en grano menos longitud de galerías. El Daño de tallo relativo se calculó en porcentaje con respecto a la altura de planta.



4.2.4 Análisis de QTL conjunto

Para estudiar la co-localización de QTL para características agronómicas y de resistencia, relacionadas, se analizó el efecto de dos características juntas (análisis de QTL conjunto) se confirmó que el QTL en los bins 8.04-8.05 incrementa significativamente rendimiento y longitud de galerías (Tabla 4.2.4). El análisis simultáneo de QTL con efecto sobre varios caracteres también mostró co-localización de QTL para floración, altura de planta y resistencia en grano en la misma región (Tabla 4.2.4). En el cromosoma 9, el QTL en el bin 9.07 incrementa significativamente floración femenina y resistencia en grano. Y finalmente en el cromosoma 10, el QTL en el bin 10.02-10.03 incrementa significativamente longitud de galerías y resistencia en grano (Tabla 4.2.4).



Tabla 4.2.4 Lista de QTL del análisis conjunto de varios caracteres usando un LOD > 5,8 (90% confiabilidad). Los QTL se mapearon en la población RIL derivada de A637 × A509 para caracteres de daño y agronómicos evaluados en dos años de experimentos bajo infestación con MCB.

Cromosoma	Posición (cM)	Característica 1	Efecto aditivo	Característica 2	Efecto aditivo
8	95	R (Mg ha ⁻¹)	0,498**	LG (cm)	0,849**
8	96	DFE (días)	1,368**	R (Mg ha ⁻¹)	0,522**
8	96	R (Mg ha ⁻¹)	0,540**	AP (cm)	5,993**
8	99	DFE (días)	1,370**	LG (cm)	0,948**
8	99	AP (cm)	5,784**	LG (cm)	0,920**
8	96	R (Mg ha ⁻¹)	0,492**	RG (1-9) ^a	0,049**
8	103	LG (cm)	0,861**	RG (1-9) ^a	0,058**
9	144	DFE (días)	0,806**	RG (1-9) ^a	0,057**
10	59	LG (cm)	1,149**	RG(1-9) ^a	-0,046**

^a La resistencia en grano se midió con una escala visual subjetiva de 1 a 9 en la cual 1 indicó completamente dañado y 9 indicó no dañado por la larva. ** Significativamente diferente de cero a P<0,01 de nivel de probabilidad. R=rendimiento, DFE= floración femenina, AP= altura de planta, LG= longitud de galerías, RG= resistencia en grano.

4.3 MAPEO DE ASOCIACIÓN EN UNA POBLACIÓN MAGIC

4.3.1 Análisis estadístico de datos fenotípicos

El parental EP17 se eliminó de los análisis estadísticos porque la semilla utilizada en las evaluaciones estaba contaminada de acuerdo a resultados del genotipado por secuenciación. El rango de las medias de las RIL para longitud de galerías fue de 0-59 cm con un promedio general de 24,6 cm. Las medias de las líneas para resistencia de grano oscilaron entre 1 y 9 puntos con un promedio general de 7,4 puntos. Las medias de las líneas puras para días a floración femenina variaron de 56 a 90 días con un promedio general de 69,8 días. El rango de variación de las medias de las líneas para rendimiento fue de 0 a 114 g planta⁻¹, con un promedio general de 40,0 g planta⁻¹. Y por último se observó que las medias de las líneas para altura de planta variaron de 67 a 227 cm con un promedio de 147,6 cm. En el análisis de varianza se observaron diferencias estadísticas altamente significativas para los 3 caracteres de resistencia y los 3 caracteres agronómicos entre los 7 parentales de la MAGIC (Tabla 4.3.1).

Tabla 4.3.1 Medias \pm errores estándar y heredabilidades (h^2) de la población MAGIC para características agronómicas y de resistencia a MCB. La comparación de medias de los 8 padres y EP42 como testigo son mostrados.

	Características de resistencia		Características agronómicas		
	LG (cm)	RG (1-9) ^a	DFF (días)	R (g planta ⁻¹)	AP (cm)
RIL					
Media	24,6 \pm 0,36	7,4 \pm 0,03	69,8 \pm 0,15	40,0 \pm 0,46	147,6 \pm 0,73
Rango	0-59	1-9	56-90	0-114	67-227
h^2	0,30	0,24	0,84	0,53	0,82
Padres y controles					
EP42	50,1 a	7,3 abc	67,1 cde	42,4 a	159,7 ab
EP17	--	--	--	--	--
EP125	12,8 d	7,7 a	64,8 ef	42,6 a	141,0 bcd
EP86	32,9 b	7,2 abc	70,4 abc	40,3 a	181,0 a
EP53	24,9 c	7,5 ab	62,5 f	39,9 a	132,7 cd
A509	22,3 c	7,4 abc	65,9 def	34,0 a	126,3 d
PB130	24,2 c	6,1 d	69,5 bcd	33,5 a	154,8 bc
F473	23,2 c	6,7 bcd	74,2 a	33,4 a	150,1 bcd
EP43	30,2 bc	6,5 cd	73,2 ab	11,0 b	161,5 ab
LSD P>0,05	7,9	0,9	4,0	12,4	25,5

LG, longitud de galerías; RG, resistencia en grano; DFF, días a floración femenina; R, rendimiento de grano; AP, altura de planta. Las heredabilidades (h^2) para cada característica se estimaron siguiendo a Holland *et al.* (2002). ^aLa resistencia en grano se midió con una escala visual subjetiva de 1 a 9 en el cual 1 indica completamente dañado y 9 indica sin daño. EP42 se eligió como un control más y no forma parte de las líneas de la población MAGIC.

4.3.2 Análisis de correlación

Los coeficientes de correlación genética entre longitud de galerías y rendimiento ($r_g=0,53$) y entre longitud de galerías y altura de planta ($r_g=0,67$) fueron positivos y moderados (Tabla 4.3.2).

Tabla 4.3.2 Coeficientes de correlación genética (debajo de la diagonal) y fenotípica (encima de la diagonal) para características agronómicas y relacionadas con la resistencia a MCB.

	LG	RG	DFE	R	AP
LG (cm)		-0,14	0,13*	0,06	0,25*
RG (1-9) ^a	0,30		-0,01	0,31*	0,22
DFE (días)	0,36	0,12		-0,13	0,25*
R (g)	0,53*	0,13	-0,11		0,30*
AP (cm)	0,67*	0,31	0,39*	0,27	

LG, longitud de galerías; RG, resistencia en grano; DFE, días a floración femenina; R, rendimiento de grano; AP, altura de planta. *Coeficientes de correlación genética y fenotípica que superan dos veces su error estándar.

4.3.3 SNPs significativos para resistencia en grano

El nivel de corte para la base de datos de 29.292 SNPs es de $9,75 \times 10^{-5}$ o bien 4,01 en \log_{10} (*valor-P*). Y el nivel de corte para la base de datos de 224.363 SNPs es de $2,42 \times 10^{-5}$ o bien 4,61 en \log_{10} (*valor-P*) como puede verse en las figuras 4.3.3, 4.3.6, 4.3.8, 4.3.10 y 4.3.13.

Se identificaron 9 SNPs significativos asociados al carácter de resistencia en grano bajo infestación con *S. nonagrioides*. Tan solo el primero se localizó con la base de datos de 29.292 SNPs en el cromosoma 5 ($p = 5,41 \times 10^{-05}$). Los 8 restantes se localizaron con la base de datos de 224.363 SNPs, uno en el cromosoma 2 ($p = 2,17 \times 10^{-06}$), dos en el cromosoma 3 ($p = 6,66 \times 10^{-07}$ y $p = 7,23 \times 10^{-06}$), tres en el cromosoma 7 ($p = 2,15 \times 10^{-05}$, $p = 9,45 \times 10^{-06}$ y $p = 9,45 \times 10^{-06}$), uno en el cromosoma 9 ($p = 1,49 \times 10^{-05}$) y uno en el cromosoma 10 ($p = 1,28 \times 10^{-05}$). Los alelos de mayor frecuencia, en cada uno de estos SNPs incrementó la resistencia en grano. La proporción de la varianza fenotípica (R^2) explicada por cada SNP significativamente asociado a este carácter vario de 3,0 a 8,9. Los efectos aditivos, oscilan entre 0,18 y 0,47 puntos para los SNPs significativamente asociados con el carácter de resistencia en grano (Tabla y Figura 4.3.3).

Tabla 4.3.3 Base de datos utilizados, variantes alélicas, efecto aditivo, valores para las pruebas de significación (Valor- p) y proporción de la varianza total explicada por cada SNP significativamente asociado a la resistencia en grano de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	A509 ^c	EP125 ^c	EP17 ^c	EP43 ^c	EP53 ^c	EP86 ^c	F473 ^c	PB130 ^c	Alelos ^c	(No) ^d	Efecto aditivo ^e	Valor- p ^f	R^2 ^g
S5_9090576	29.292	G	G	G	T	T	G	G	G	G/T	445/132	0,18	5,41E-05	0,030
S2_20109642	224.363	G	G	N	G	N	N	G	G	G/C	389/28	0,42	2,17E-06	0,050
S3_220658669	224.363	G	G	G	G	N	N	G	G	G/A	278/28	0,46	6,66E-07	0,089
S3_220658703	224.363	A	A	A	A	N	A	A	A	A/G	326/20	0,47	7,23E-06	0,060
S7_958414	224.363	N	C	N	C	N	C	C	N	C/T	448/38	0,32	2,15E-05	0,039
S7_1952227	224.363	T	T	N	T	N	T	N	C	T/C	312/113	0,22	9,45E-06	0,050
S7_1952249	224.363	G	G	N	G	N	G	N	A	G/A	312/113	0,22	9,45E-06	0,050
S9_147511039	224.363	G	N	N	G	G	N	G	N	G/A	353/24	0,41	1,49E-05	0,046
S10_136106669	224.363	A	N	N	A	G	N	A	N	A/G	350/28	0,39	1,28E-05	0,059

^a El número antes del guion bajo () indica el número del cromosoma y el número después del guion bajo () indica la posición física del SNP en pb dentro del cromosoma.

^b Se utilizaron dos bases de datos para buscar SNPs significativos, una de 29.292 y otra de 224.363 SNPs.

^c Los alelos de los padres se obtuvieron de las bases de datos originales de genotipado.

^d No = número de líneas homocigotas para una variante determinada. El efecto aditivo siempre es positivo porque el alelo antes de la diagonal (/) aumenta el carácter; y el alelo después de la diagonal (/) disminuye el carácter.

^e El efecto aditivo se calculó como la mitad de la diferencia entre la media de los homocigotos para el alelo que aumenta el carácter y la media del homocigoto que disminuye el carácter.

^f p = valores de significación de los SNPs significativos.

^g R^2 , proporción de la varianza fenotípica explicada por el SNP.

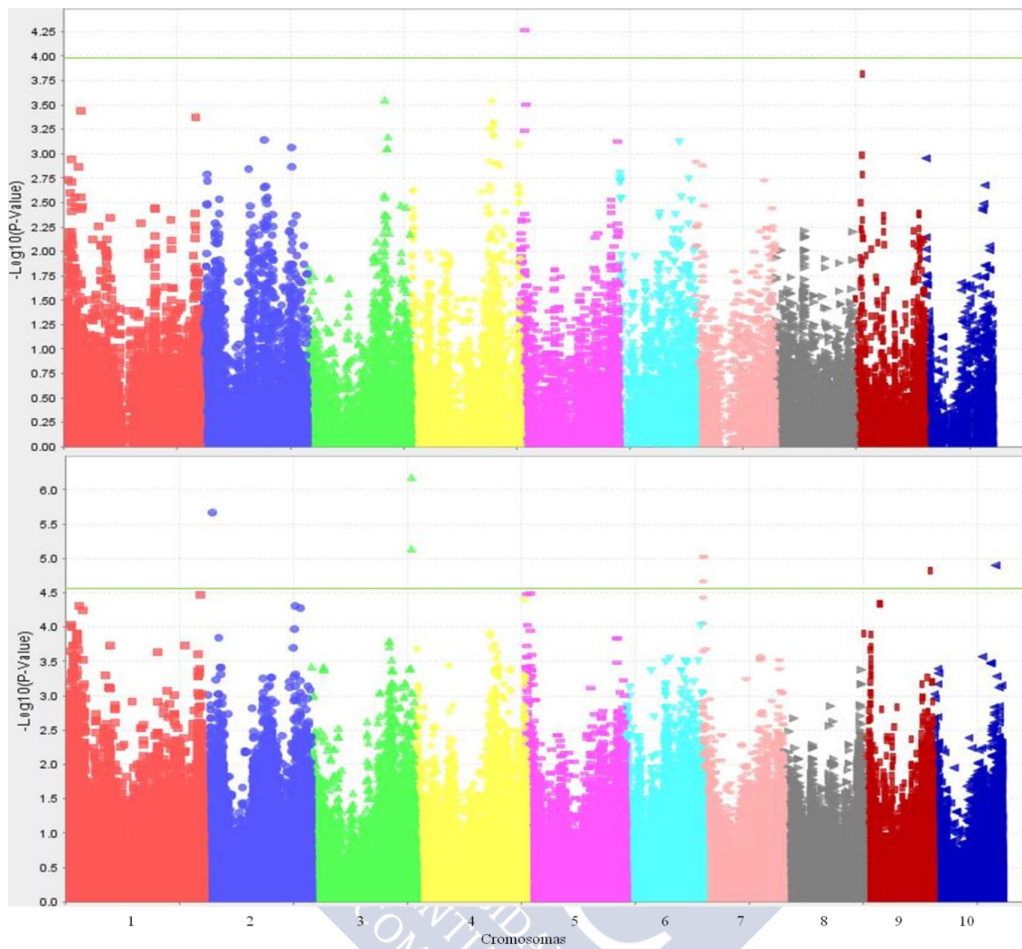


Figura 4.3.3 Resultados del GWAS para el carácter resistencia en grano al ataque de *S. nonagrioides* en la población MAGIC de maíz de este estudio. Cada punto representa los valores de significación (p) para los 29.292 SNPs (arriba) y los 224.363 SNPs (abajo). Los puntos sobre la línea verde corresponden a los SNPs significativamente asociados al carácter de resistencia en grano.

4.3.4 Haplotipos del QTL por cada SNP significativo para resistencia en grano

Para cada SNP significativo se estableció el bloque de ligamiento usando el software Haploview, cada bloque de ligamiento se considera que delimita el intervalo de confianza del QTL asociado significativamente al carácter de interés. Los 9 SNPs significativos para el carácter de resistencia en grano se correspondieron con 7 bloques de ligamiento posibles, por lo que es muy probable que solo hayamos identificado 7 QTL. Los haplotipos con mayores efectos aditivos teóricos se encontraron en los cromosomas 5 (S5_9090576) y 7 (S7_958414) con 1,43 y 1,70 puntos para el carácter de resistencia en grano (Tabla y Figura 4.3.4).



Tabla 4.3.4 Base de datos utilizados, marcadores flanqueantes, efecto aditivo de los parentales, longitud del QTL, haplotipo que incrementa, haplotipo de disminuye, Σ del efecto aditivo real del haplotipo que incrementa la resistencia en grano y Σ del efecto aditivo teórico por cada SNP o grupo de SNPs significativamente asociados a la resistencia en grano de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	Marcadores Flanqueantes ^c	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Haplotipo que incrementa ^f	Σ efecto aditivo real ^f	Haplotipo que disminuye ^g	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S2_20109642	224.363	S2_20103737-S2_20109642	0,3	0,3-0,5	-0,5-0,4	0,5	-0,5-0,4	ND	0,3-0,5	0,3	5 Kpb	TAG	0,52	CCC	0,52
S3_220658669-S3_220658703	224.363	S3_220658669-S3_220678250	1,0	1,0	1,0	1,0	-0,9-1	-0,1-0,9	1,0	1,0	19 Kpb	GAAC	1,01	AGCG	1,01
S5_9090576	29.292	S5_8814761-S5_9107053	0,3-1,2	0-0,4	-0,1-1,1	-0,9-0	-1,4	0,6-1,1	0-1,2	-0,9-0,7	292 Kpb	GTATTGAA GGAATATG	1,29	TCGCGCGG TCGGATGA	1,43
S7_958414	224.363	S7_955705-S7_985913	-0,6-0,7	1,2-1,2	-1-1,3	1,5	-0,1-1,4	0,8-1,2	0,6-0,8	-1,7-1,1	30 Kpb	CAAGAGCC TTCTGC	1,58	TGGTGAAT CATCCA	1,70
S7_1952227-S7_1952249	224.363	S7_1952107-S7_1953342	0,6-1,3	1,0	ND	0,5-0,7	-1,3-1,1	0,7-1	-1,2-1,2	-0,8--0,2	1 Kpb	CAACTTGG CCT	1,17	TGGTGCAA AGC	1,32
S9_147511039	224.363	S9_147504167-S9_147513446	-0,2	-0,96-0,53	-1,01-0,93	0,6	0,3	-1,05-0,43	-0,5-0,46	-0,93-0,79	9 Kpb	TGCAGACTG CGTGTGAC	0,62	GAAGAGTGA TTGCCCTGT	1,05
S10_136106669	224.363	S10_136106137-S10_136107078	0,5	-0,8-0	-0,8-0,6	0,3	-0,6	-0,8-0,3	0-0,3	-0,8-0,0	941 pb	GAACG	0,65	TGGAC	0,79

^a SNPs significativos detectados en la tabla 4.3.3.

^b Significa la base de datos con la que se calculó cada SNP significativo, es decir con la 29.292 SNPs o con la base de datos de 224.363 SNPs.

^c Marcadores flanqueantes del bloque de ligamiento.

^d Cuando había datos perdidos en el efecto aditivo de los parentales se calculó el rango, solo en los SNPs significativos de la base de datos de 224.363 SNPs.

^e Tamaño del QTL en Kpb o pb.

^f Haplotipo que incrementa el efecto aditivo si lleva estos alelos.

^g Haplotipo que disminuye el efecto aditivo si lleva estos alelos.

^h Suma de los efectos aditivos de todos los SNPs significativos en el bloque de ligamiento.

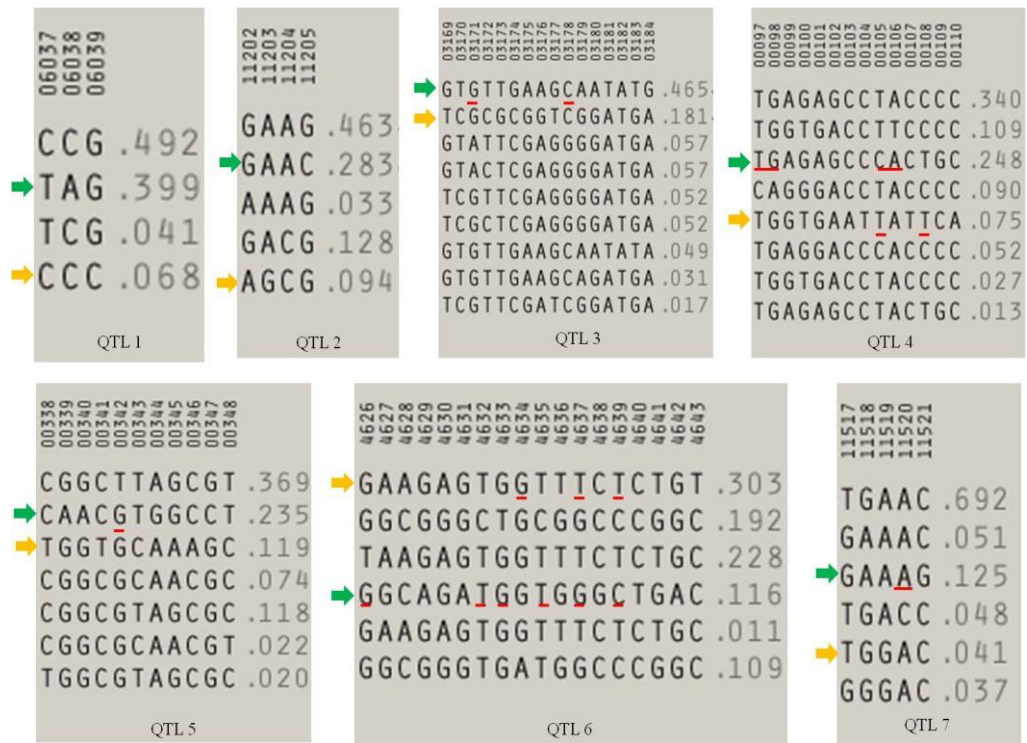


Figura 4.3.4 Haplotipos de los QTL para resistencia en grano. Los haplotipos que incrementan considerablemente la resistencia en grano están marcados con flechas verdes y los haplotipos que disminuyen la resistencia en grano en flechas amarillas. Los alelos que no coinciden con el haplotipo total que disminuye la resistencia en grano están subrayados con línea roja (QTL 3, 4, 5, 7 y 7).

4.3.5 Genes candidatos por cada SNP significativo para resistencia en grano

En los 7 QTL se identificaron 6 genes candidatos (GRMZM2G130375, GRMZM2G019958, GRMZM2G020281, GRMZM2G019200, GRMZM2G178190 y el GRMZM2G040359) los cuales están adyacentes a los SNPs asociados al carácter de resistencia en grano (Tabla 4.3.5).



Tabla 4.3.5 Cromosoma, base de datos utilizados, marcadores flanqueantes, longitud del QTL y genes candidatos por cada SNP o grupo de SNPs significativamente asociados a la resistencia en grano de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP Significativo ^a	Cromosoma ^b	Base de datos ^c	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S2_20109642	2	224.363	S2_20103737- S2_20109642	5 Kpb	a) ---	a) ---
S3_220658669, S3_220658703	3	224.363	S3_220658669- S3_220678250	19 Kpb	a) GRMZM2G130375 (220.651.907-220.659.037) ⁺	a) Enzyme: Beta-galactosidase (Bian <i>et al.</i> , 2014). (Catalysis of the hydrolysis of terminal, non-reducing beta-D-galactose residues in beta-D-galactosides)
S5_9090576	5	29.292	S5_8814761- S5_9107053	292 Kpb	a) GRMZM2G019958 (8.814.234-8.822.053) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G019958
S7_958414	7	224.363	S7_955705- S7_985913	30 Kpb	a) GRMZM2G020281 (955.781-960.882) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G020281
S7_1952227, S7_1952249	7	224.363	S7_1952107- S7_1953342	1 Kpb	a) GRMZM2G019200 (1.946.510-1.952.092) ⁺	a) Polypeptide: LOC100278925
S9_147511039	9	224.363	S9_147504167- S9_147513446	9 Kpb	a) GRMZM2G178190 (147.509.942-147.513.411) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G178190 Natural-resistance-associated-macrophage-protein NRAMP also known as divalent metal transporter, have been reported to play important roles in the absorption and translocation of ferrous Fe (Nozoye <i>et al.</i> , 2013).
S10_136106669	10	224.363	S10_136106137- S10_136107078	941 pb	a) GRMZM2G040359 (136.105.904-136.107.567) ⁺	a) Enzyme: Triacylglycerol lipase (Triacylglycerol (TAG) degradation is critical to many plants for which lipids rather than carbohydrates are the major seed storage reserves. The breakdown of the seed storage lipid provides carbon skeletons and energy that can drive postgerminative plant growth before the plant root system and photosynthetic capacity are fully established)

^a SNPs significativos detectados.

^b Cromosoma en el que se detectó cada SNP significativo.

^c Base de datos con la que se detectó cada SNP significativo.

^d Marcadores flanqueantes del bloque de ligamiento.

^e Tamaño del QTL en Kpb o pb.

^f Gen o genes candidatos localizados en la página www.maizegdb.org dentro o cerca de la posición del bloque de ligamiento. Cada a) en la columna ^f se corresponde con a) en la columna ^g, cada b) en la columna ^f con b) en la columna ^g etc.

^g Proteína codificada por el gen candidato y su función.

⁺ Posición del gen en el mapa de la página www.maizegdb.org.

4.3.6 SNPs significativos para altura de planta

Se identificaron 75 SNPs significativos asociados al carácter de altura de planta bajo infestación con *S. nonagrioides*. De ellos, 63 se localizaron con la base de datos de 29.292 SNPs en los cromosomas 1, 3, 4, 7, 8 y 9. Siete SNPs se encontraron en el cromosoma 1, ocho en el cromosoma 3, tres en el cromosoma 4, uno en el cromosoma 7, cuarenta y tres en el cromosoma 8 y uno en el cromosoma 9. Los doce restantes se localizaron con la base de datos de 224.363 SNPs en los cromosomas 1, 3, 7, 8 y 9. Ocho SNPs en el cromosoma 1, uno en el cromosoma 3, uno en el cromosoma 7, uno en el cromosoma 8 y uno en el cromosoma 9. La proporción de la varianza fenotípica (R^2) explicada por cada SNP significativamente asociado a este carácter vario de 2,7 a 6,3. Los efectos aditivos, oscilan entre 3,54 y 8,14 cm para los SNPs significativamente asociados con el carácter de altura de planta (Tabla y Figura 4.3.6).



Tabla 4.3.6 Base de datos utilizados, variantes alélicas, efecto aditivo, valores para las pruebas de significación (Valor-*p*) y proporción de la varianza total explicada por cada SNP significativamente asociado a altura de planta de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	A509 ^c	EP125 ^c	EP17 ^c	EP43 ^c	EP53 ^c	EP86 ^c	F473 ^c	PB130 ^c	Alelos ^c	(No) ^d	Efecto aditivo ^e	Valor- <i>p</i> ^f	R ² ^g
S1_38130432	29.292	C	C	C	C	C	C	C	G	G/C	61/432	5,74	6,76E-05	0,033
S1_81431429	29.292	C	C	C	C	C	T	C	C	T/C	33/367	7,48	7,65E-05	0,039
S1_82703052	29.292	C	C	T	C	C	C	C	C	C/T	539/50	6,23	5,25E-05	0,028
S1_84413650	29.292	C	C	T	C	C	C	C	C	C/T	530/50	7,27	2,10E-06	0,039
S1_198478892	29.292	G	G	G	G	G	G	G	A	A/G	136/438	4,11	6,33E-05	0,029
S1_198739522	29.292	G	G	G	G	G	G	G	A	A/G	117/416	4,34	7,23E-05	0,030
S1_201847366	29.292	G	G	G	G	G	G	G	A	A/G	141/373	4,41	2,28E-05	0,035
S3_135308624	29.292	T	T	T	T	T	C	C	T	C/T	260/284	3,54	9,35E-05	0,028
S3_135309026	29.292	A	A	A	A	A	G	G	G	G/A	325/247	3,96	1,02E-05	0,034
S3_135695835	29.292	T	T	T	T	T	C	C	C	C/T	298/253	3,98	1,10E-05	0,035
S3_138740291	29.292	G	G	G	G	G	G	A	G	A/G	244/257	4,34	4,28E-06	0,042
S3_143181265	29.292	T	C	C	C	T	C	C	C	C/T	359/209	3,84	2,75E-05	0,032
S3_155961960	29.292	C	C	C	G	C	C	G	G	G/C	248/319	3,94	1,08E-05	0,034
S3_156363028	29.292	T	T	T	C	T	C	C	C	C/T	335/226	4,03	8,85E-06	0,035
S3_156964693	29.292	G	A	A	A	G	A	A	A	A/G	317/252	3,86	1,47E-05	0,033
S4_62353257	29.292	A	G	A	G	A	G	G	G	G/A	477/69	5,69	3,72E-05	0,031
S4_96326739	29.292	A	C	C	C	C	C	A	C	C/A	366/156	4,27	2,52E-05	0,035
S4_159994299	29.292	C	T	C	T	T	T	T	T	T/C	459/77	5,38	2,91E-05	0,033
S7_146118757	29.292	G	G	G	G	G	G	G	A	G/A	439/132	4,07	9,02E-05	0,027
S8_18350213	29.292	T	T	T	G	T	T	T	T	T/G	363/209	3,69	4,78E-05	0,029
S8_27127641	29.292	A	A	A	C	A	C	A	A	A/C	276/204	4,16	2,08E-05	0,037
S8_28291128	29.292	A	A	A	C	A	A	A	A	A/C	347/229	3,62	6,28E-05	0,028
S8_28525959	29.292	G	G	G	A	A	G	G	G	G/A	273/271	3,82	2,62E-05	0,033
S8_29016818	29.292	G	G	G	A	G	G	G	G	G/A	357/189	3,95	3,99E-05	0,031

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	A509 ^c	EP125 ^c	EP17 ^c	EP43 ^c	EP53 ^c	EP86 ^c	F473 ^c	PB130 ^c	Alelos ^c	(No) ^d	Efecto aditivo ^e	Valor- <i>p</i> ^f	R ² ^g
S8_29715673	29.292	C	C	C	T	T	C	C	C	C/T	201/294	3,88	5,36E-05	0,033
S8_29715718	29.292	G	G	G	C	C	G	G	G	G/C	201/293	3,88	5,35E-05	0,033
S8_29715719	29.292	C	C	C	T	T	C	C	C	C/T	201/293	3,88	5,35E-05	0,033
S8_29730975	29.292	C	G	C	G	G	C	G	C	C/G	153/392	3,94	8,27E-05	0,029
S8_29731110	29.292	A	G	A	G	G	A	G	A	A/G	154/431	4,07	3,84E-05	0,030
S8_34580216	29.292	A	A	A	T	A	A	A	A	A/T	393/191	4,02	2,24E-05	0,031
S8_35462167	29.292	A	A	A	C	A	A	A	A	A/C	374/187	3,98	3,59E-05	0,030
S8_63269011	29.292	C	C	C	T	C	C	C	C	C/T	380/177	4,02	3,73E-05	0,031
S8_63269014	29.292	A	A	G	G	A	A	A	A	A/G	379/178	3,91	5,88E-05	0,029
S8_64650372	29.292	T	A	T	A	T	T	T	T	T/A	355/217	4,19	5,02E-06	0,036
S8_65178433	29.292	A	A	A	G	A	A	A	A	A/G	327/193	4,26	1,04E-05	0,038
S8_65235694	29.292	C	C	C	A	C	C	C	C	C/A	315/195	3,94	4,82E-05	0,033
S8_65235699	29.292	C	C	C	T	C	C	C	C	C/T	322/194	3,83	7,43E-05	0,032
S8_65235702	29.292	T	T	T	C	T	T	T	T	T/C	326/192	3,81	8,32E-05	0,031
S8_65235708	29.292	G	G	G	A	G	G	G	G	G/A	322/194	3,83	7,43E-05	0,032
S8_65565478	29.292	C	C	C	G	C	C	C	C	C/G	311/191	4,52	4,00E-06	0,042
S8_65565516	29.292	G	G	G	A	G	G	G	G	G/A	311/191	4,52	4,00E-06	0,042
S8_65565566	29.292	T	T	T	C	T	T	T	T	T/C	316/196	4,26	1,06E-05	0,038
S8_65699016	29.292	G	G	G	T	G	G	G	G	G/T	366/185	3,98	3,82E-05	0,030
S8_65750661	29.292	C	C	C	T	C	C	C	C	C/T	342/197	4,33	5,76E-06	0,040
S8_65750670	29.292	T	T	T	C	T	T	T	C	T/C	313/222	3,78	5,00E-05	0,032
S8_65750859	29.292	C	C	C	T	C	C	C	T	C/T	321/214	3,74	6,42E-05	0,030
S8_65753556	29.292	A	A	A	G	A	A	A	A	A/G	338/193	4,12	1,85E-05	0,035
S8_65753664	29.292	A	A	A	G	A	A	A	A	A/G	342/194	4,22	1,10E-05	0,037
S8_65753745	29.292	T	T	T	C	T	T	T	T	T/C	381/199	4,27	5,23E-06	0,037
S8_65784434	29.292	C	C	C	G	C	C	C	C	C/G	333/202	4,27	6,78E-06	0,038
S8_65981915	29.292	C	C	C	T	C	C	C	C	C/T	355/191	4,18	1,31E-05	0,036

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	A509 ^c	EP125 ^c	EP17 ^c	EP43 ^c	EP53 ^c	EP86 ^c	F473 ^c	PB130 ^c	Alelos ^c	(No) ^d	Efecto aditivo ^e	Valor- <i>p</i> ^f	R ² ^g
S8_65982580	29.292	G	G	G	A	G	G	G	G	G/A	350/198	3,99	2,65E-05	0,033
S8_66142546	29.292	G	G	G	C	G	G	G	G	G/C	369/204	4,23	5,67E-06	0,037
S8_66176488	29.292	T	T	T	C	T	T	T	T	T/C	328/195	3,95	4,07E-05	0,033
S8_66556197	29.292	A	A	A	G	A	A	A	A	A/G	337/215	3,74	5,24E-05	0,030
S8_66556208	29.292	T	T	T	A	T	T	T	T	T/A	338/216	3,70	6,01E-05	0,029
S8_68298442	29.292	A	A	A	G	A	A	A	A	A/G	380/190	3,75	7,73E-05	0,028
S8_68692692	29.292	G	G	G	C	G	G	C	G	G/C	255/297	3,60	7,14E-05	0,029
S8_69119155	29.292	T	C	C	C	T	T	T	T	T/C	369/203	3,84	3,68E-05	0,030
S8_73852929	29.292	A	G	A	G	G	A	G	A	A/G	136/400	4,29	3,97E-05	0,032
S8_73852948	29.292	T	C	T	C	C	T	C	T	T/C	136/400	4,29	3,97E-05	0,032
S8_79127682	29.292	C	C	C	G	C	C	C	C	C/G	382/183	4,09	2,27E-05	0,032
S9_154098509	29.292	G	G	G	A	A	A	A	G	A/G	204/378	3,82	2,57E-05	0,031
S1_38008787	224.363	C	C	C	C	N	C	C	T	T/C	54/307	6,85	1,58E-05	0,052
S1_38130561	224.363	T	T	T	T	T	T	N	A	A/T	58/383	6,60	1,18E-05	0,046
S1_52632335	224.363	G	G	G	N	G	N	G	A	A/G	76/414	6,08	8,19E-06	0,040
S1_84413650	224.363	C	C	T	C	C	C	C	C	C/T	530/50	7,28	3,22E-06	0,038
S1_84414237	224.363	C	C	N	C	C	C	C	C	C/A	382/32	8,14	1,56E-05	0,043
S1_85051701	224.363	C	T	T	T	T	C	N	T	C/T	149/407	4,96	3,51E-06	0,039
S1_85051713	224.363	A	C	C	C	C	A	N	C	A/C	149/408	4,97	3,22E-06	0,040
S1_164954300	224.363	T	T	N	T	N	T	T	T	T/C	387/36	7,72	1,74E-05	0,042
S3_184059175	224.363	T	C	N	C	N	C	T	N	C/T	184/183	4,86	1,78E-05	0,049
S7_149915464	224.363	C	C	C	N	N	A	N	N	C/A	269/100	5,28	2,40E-05	0,046
S8_71975885	224.363	G	G	G	N	N	N	G	G	G/A	262/100	6,15	2,80E-06	0,063
S9_154098509	224.363	G	G	G	A	A	A	A	G	A/G	204/378	4,25	7,08E-06	0,035

^a El número antes del guion bajo () indica el número del cromosoma y el número después del guion bajo () indica la posición física del SNP en pb dentro del cromosoma.

^b Se utilizaron dos bases de datos para buscar SNPs significativos, una de 29.292 y otra de 224.363 SNPs.

^c Los alelos de los padres se obtuvieron de las bases de datos originales de genotipado.

^d No = número de líneas homocigotas para una variante determinada. El efecto aditivo siempre es positivo porque el alelo antes de la diagonal (/) aumenta el carácter; y el alelo después de la diagonal (/) disminuye el carácter.

^e El efecto aditivo se calculó como la mitad de la diferencia entre la media de los homocigotos para el alelo que aumenta el carácter y la media del homocigoto que disminuye el carácter.

^f p = valores de significación de los SNPs significativos.

^g R^2 , proporción de la varianza fenotípica explicada por el SNP.



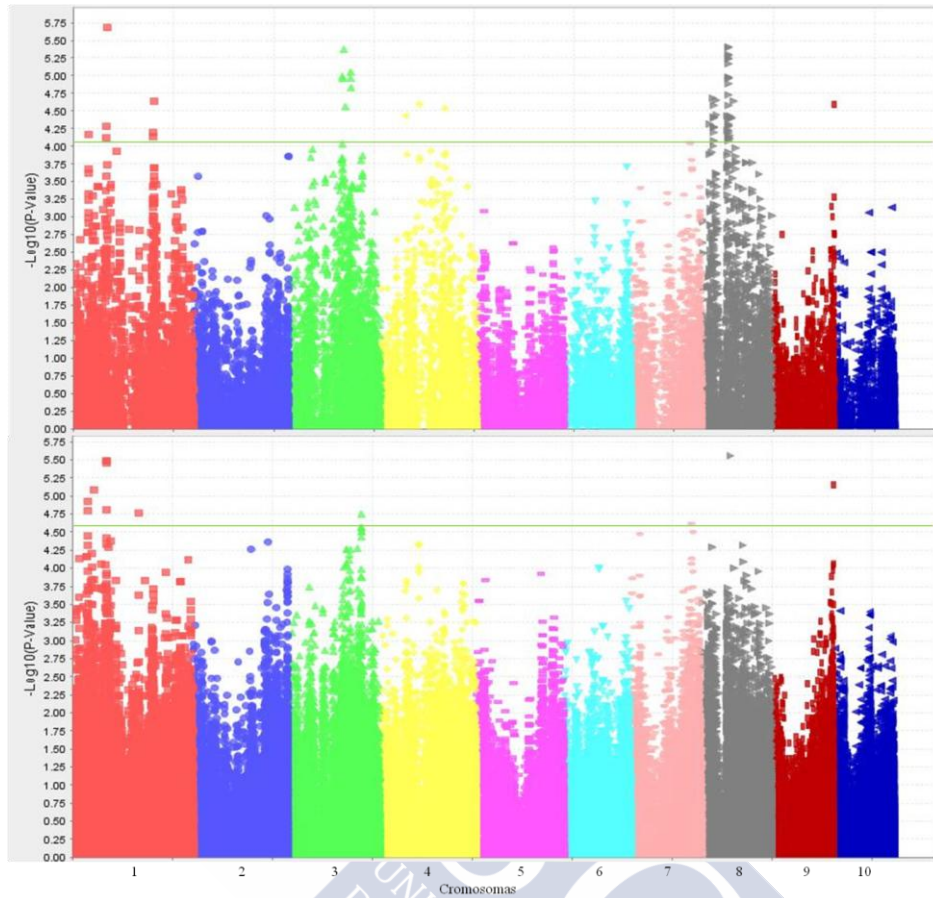


Figura 4.3.6 Resultados del GWAS para el carácter altura de planta en la población MAGIC de maíz de este estudio. Cada punto representa los valores de significación (p) cuando se usa la base de datos de 29.292 SNPs (arriba) y la de 224.363 SNPs (abajo). Los puntos sobre la línea verde indican a los SNPs significativamente asociados al carácter de altura de planta.

4.3.7 Haplotipos del QTL por cada SNP significativo para altura de planta

Los SNPs significativos detectados se sometieron también a un análisis de desequilibrio de ligamiento en Haploview, por lo tanto, de los 75 SNPs significativos para el carácter de altura de planta se encontraron solo 48 QTL en esas regiones. Los mayores efectos aditivos por cada cromosoma para altura de planta se encontraron en los cromosomas 1, 3, 4 y 8 con 76,6, 39,8, 87,3 y 92,0 cm, respectivamente (Tabla 4.3.7)



Tabla 4.3.7 Base de datos utilizados, marcadores flanqueantes, efecto aditivo de los parentales, longitud del QTL, haplotipo que incrementa, haplotipo de disminuye y Σ del efecto aditivo teórico por cada SNP o grupo de SNPs significativamente asociados a la altura de planta de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP significativo ^c	Base de datos ^a	Marcadores flanqueantes ^b	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL	Haplotipo que incrementa ^f	Haplotipo que disminuye ^g	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S1_38008787 S1_38130432 S1_38130561	29.292/ 224.363	S1_37946326- S1_38131791	-68,0	-73,4--68	-65,6--60	-49,5--33,1	-75,1-- 30,6	-64,3--48,3	-65,7- 19,9	75,5-76,6	185 Kpb	CCGCTAATGT TGGCCTATTA TTGC	TTTGCGGCCTC CTCTTAGCCT CGCG	76,6
S1_52632335	224.363	S1_52626995- S1_52640776	-7,5--2,5	-3,5	-3,8-2	-10,2-15,5	-9,1--1,1	-17,5-23,4	-6,4--4,8	13,7-22,1	13 Kpb	CTGGGGGACG CCCTT	GGCCAAAGTA TTTAG	23,4
S1_81431429	29.292	S1_81212941- S1_81549746	-2,6-3,3	-43--33,1	-60,6-- 42,9	-24,2-14,4	-3-3,3	-26,5-37,5	-49,3--42	3,3	336 Kpb	TCTTTCTTATA CCCAAATTCTA GTGTTT	GTCGCGCGTC TTGTCGCCTG GCCAGCC	62,2
S1_82703052	29.292	S1_82680258- S1_82797610	27,2-34,1	-20,1	-37,7	-20,1-15,1	-18,3-4,6	5,7	-10,9- 20,3	-12--2,9	117 Kpb	TGAGACAGGA TGCTTT	GCGAGTGTTT CAGCGG	50,9
S1_84413650 S1_84414237	29.292/ 224.363	S1_84347525- S1_84415381	67,5	33,7-37,6	-69,4-10	37,8-47,7	33,7-41,6	12,9-40,7	40,7	32,2-40,1	67 Kpb	GGAATCCGTT TGCCCTC	AAGGCATCCG GATACCA	71,5
S1_85051701 S1_85051713	224.363	S1_85018817- S1_85051713	28,3	-19,3--0,7	-28,3-8,4	-0,7	-28,3-8,4	-8,4-28,3	ND	-28,3-8,4	32 Kpb	CATCAT	AGCTCC	28,3
S1_164954300	224.363	S1_164951534- S1_164955536	13,2-33	-5,1-33	-33-10,3	5,1-33	-27-17	-5,1-33	33,0	33,0	4 Kpb	GATTTAT	TGCCCGC	33,0
S1_198478892	29.292	S1_198416798- S1_198478892	-59,7- 53,3	-59,7--6,2	-71,7--49	-71,7-34,7	-21,8	-21,8-13,8	-71,7- 41,3	41,3-71,7	62 Kpb	CTAGCCCTA AGCTGCTCGT AC	TCGTATATGT CTTATACTTG GA	71,7
S1_198739522	29.292	S1_198733742- S1_198739623	-32,4-- 28,8	-28,8	-32,4--26	-28,8-3,3	-32,4	-19,9-12,2	-26--22,2	26-32,4	5 Kpb	GAGAGCAACC C	AGAGCGCCGA T	32,4
S1_201847366	29.292	S1_201740384- S1_201872777	14,7-35,1	-44,7-- 22,1	-53,1-4,9	-53,1-0,8	12,1	-46--34,9	-14,8--6,7	57	132 Kpb	GCGTCAGCAA GGGGCGGGCC TAAGTACAG	CTCAGCAATT TTATTATATT CGGAAGTCA	58,8
S3_135308624 S3_135309026	29.292	S3_135307679- S3_135440203	-26,8	-3,0	-26,8	-26,8--14	-26,8	26,8	7,9-26,8	9,9	132 Kpb	TGCAGTGTG	CTTGAGACC	26,8
S3_135695835	29.292	S3_135695490- S3_135757370	-36,4	-36,4-- 22,5	-36,4	-36,4	-36,4	20,6	-6,6-26,1	20,6	61 Kpb	CCAGTTCAGT CCCC	GGGTCGTGTC TTTA	36,4
S3_138740291	29.292	S3_138740089- S3_138765619	-6,3	3,6	-11,2--6,3	-5,9-3,6	-1,3	-1,3-3,6	11,2	-6,3-3,6	25 Kpb	ACAA	TTGG	11,2

Resultados

SNP significativo ^c	Base de datos ^a	Marcadores flanqueantes ^b	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL	Haplotipo que incrementa ^f	Haplotipo que disminuye ^g	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S3_143181265	29.292	S3_142956971-S3_143356181	-10,5--9,6	2-34,3	-33,1-30,7	29,3	-38,9--37	6,9-18,9	32,1	6,9-12,3	399 Kpb	CTGTTTGC GG GCACTCCC	AAACCCCTCA ATGTGATA	39,8
S3_155961960	29.292	S3_155960563-S3_156052726	-21,2	-21,2	-21,2	-9,1-7,8	-6,3	-22,5--21,2	23,9	1,1-5,5	92 Kpb	TGTGGGGAGC TGAT	CTCCACGAA GACC	23,9
S3_156363028	29.292	S3_156363028-S3_156435012	-14,1	-8,9--6,9	-8,9	1,2-8,3	-11,2	1,2-6,9	-0,7-6,9	8,3	71 Kpb	CCGAG	TGAGC	14,1
S3_156964693	29.292	S3_156963609-S3_156968484	2,2	-2,4-21,1	-2,4-10	14,6	-15,6	2,2-14,6	21,1	21,1	4 Kpb	AAGAGATGG	GGAGCGGAC	21,1
S3_184059175	224.363	S3_184059175-S3_184065331	-36,9	23,3	ND	-17,7	-4,8-30,2	-10,9-21,2	-29,4-1,9	-36,9--10,9	6 Kpb	CTCTCGTGA	TCTGTTGAG	36,9
S4_62353257	29.292	S4_62353202-S4_62788968	-87,3--85,4	14-40,5	-87,3	-6-72,8	-87,3--74,7	16,3	16,3	14,4-16,3	435 Kpb	CATAGTTAGC GGGCCGCAAC CGTCACGTT CAAGCG GGG	AGCTACCGAT AAATTCTTGT TAGTTTCAAA TGGATA CTA	87,3
S4_96326739	29.292	S4_96312234-S4_96326775	-31,5--15,7	3,5-30,1	24,7	8,1-31,8	-24,1--18,2	-5,8-8,4	-32,7--25,2	-21,5	14 Kpb	ATAAACGGCG GCT	CCCGGCCGA TAA	34,4
S4_159994299	29.292	S4_159755419-S4_159995560	-17,8	29-31,5	-28,1-5	3,3-22,3	-7,6-14,2	0,3-12,2	9,7-19,2	-0,4-19,2	240 Kpb	TAGGCTCCAG TTTCAGGCC ACA	CGCAGAAGCA AGCGTTTTG GTC	33,4
S7_146118757	29.292	S7_145971011-S7_146119797	-1,5-6,5	0,9	7,7-17,4	-8,1	5,9-14,5	13,6	-6,1--1,1	-24,9--1,4	148 Kpb	AGATGCGTGT CGCGTTGT	GAGCATTGAC TATCCCC	24,9
S7_149915464	224.363	S7_149914478-S7_149916543	16,9	16,9	16,9	-18--3,6	-8,7-19,1	-12,5-1,5	ND	-18-10,9	2 Kpb	CCCACAGC	ATTAGATCT	21,2
S8_18350213	29.292	S8_18350034-S8_18350693	10,3-19,5	-5,4-4	5,4	-6,3	-11,4-5,7	7,2-19,1	1,4-5,7	5,1	659 pb	GGCTTGCCTT CGC	ACAGCATTGC TTG	19,8
S8_27127641	29.292	S8_27127641-S8_27215550	17,3-22,7	28,7	28,7	-28,7	17,3	1,9	-21,8-28,7	28,7	87 Kpb	AGATGGTG	CAGAAACC	28,7
S8_28291128	29.292	S8_28287239-S8_28477886	6,9-21	15,3	15,3	-36,9	11,5	11,5-15,1	-27,2--29,1	11,5-15,3	190 Kpb	TCCATCCAGA CCAG	CATCGGAGAG TTGA	36,9
S8_28525959	29.292	S8_28477900-S8_28526126	-1,2-5,5	-26,5	7,6	-32,9	-32,9	-3,8-7,6	-26,5--20,5	7,6	48 Kpb	TGAAGTTAC TC	CACCAGCCCA CG	32,9
S8_29016818	29.292	S8_28720585-S8_29089093	-9,7-1,1	-0,7-13,7	4,3	-8,1	-10,9	-1,4-4,3	5,4-19,4	4,3	368 Kpb	GGAATAACTC CTATGACATC ATA	TAGGAGCGCA TCGAGTTGG CCG	19,4
S8_29715673 S8_29715718 S8_29715719	29.292	S8_29615025-S8_29715719	11,3-12,5	12,5	12,5	-11,3	-11,3	11,3-12,5	12,5	12,5	101 Kpb	ATCGC	CCTCT	12,5

SNP significativo ^c	Base de datos ^a	Marcadores flanqueantes ^b	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL	Haplotipo que incrementa ^f	Haplotipo que disminuye ^g	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S8_29730975 S8_29731110	29.292	S8_29730975- S8_29993233	6-33,5	-37,8	32,2-38	-22,3	-22,4	14,9-39,6	-38--37,8	32,2	262 Kpb	CTATTTGGAC GGCAATGT	GCGCCGCCGA AATTTCTA	39,6
S8_34580216	29.292	S8_34580215- S8_34580791	9,4	3,2-5	9,7	-11,2--9,4	9,4	2,5-11,2	5,0	9,7	576 pb	AACCA	GTTAG	11,2
S8_35462167	29.292	S8_35231586- S8_35643925	-0,5-5,1	-2,3-6,5	11,3-13,8	-18,1--2,2	2,6	-10,3-11,1	-1,6	13,8	412 Kpb	GTCTTACGTT AGCGCG	ACACCCTAGC TCTATA	18,1
S8_63269011 S8_63269014	29.292	S8_63266517- S8_63558249	1-24,8	-28,1- 23,8	-53,8	-87,1	81,2	49,7-84,6	7,9	39,7	291 Kpb	ACGCCCGCCG GGCAGACGGT CGAGAGTAAA GACATTTTGC CGC	GTCTTGAGGA CCTGCCGACC ATGCTCCGGG ATTGGCCGAA TAT	92,0
S8_64650372	29.292	S8_64576620- S8_64708127	3,2-13,2	-10,9--6,6	11,2	-20,8	8,4-18,5	-3,8-10,7	18,4	18,1	131 Kpb	CAAGGGTCTT AGAAAA	AGGACAGTCA TAGGGC	25,4
S8_65178433 S8_65235694 S8_65235699 S8_65235702 S8_65235708	29.292	S8_64746117- S8_65235708	22,5-57,1	40,3	40,3	-59,4	40,6	-25,9-2,1	47,3	33,4	489 Kpb	CTAAAGTGCG TATTCGGC GTGTGCGACC GGATCCTG	AGGGGAAAA CATCTACTC AAAAGAGAT AAGCATCA	62,2
S8_65565478 S8_65565516 S8_65565566 S8_65699016 S8_65750661 S8_65750670 S8_65750859 S8_65753556 S8_65753664 S8_65753745 S8_65784434	29.292	S8_65565478- S8_65974200	24,7-35,6	36,5	53,9	-74,9--70	53,9	48,7-57,6	53,9	42,8	408 Kpb	CGTTGACTCC AATTGGTACC CCTGAAGCGA ATAT	GACCTGTCAT GGCCCTCGTA GTGTTTATCC CAGA	75,0
S8_65981915	29.292	S8_65977068- S8_65981915	-7,3-4,6	14,6	14,6	-18,8	14,6	14,6	14,6	9,2	4 Kpb	TTCGCC	ACTCTGT	18,8
S8_65982580	29.292	S8_65982446- S8_66097813	24,3-30,5	19,1-22,7	-17,2- 33,3	-38,5	28,9	17,9-28,9	28,9	28,9	115 Kpb	TGGTGAGATT TA	GATCAGCGGA GG	38,5
S8_66142546	29.292	S8_65982891- S8_66143414	22,9	14,4-18	-25,5-25	-40,1	20,6	9,6-20,6	23,5	23,5	160 Kpb	GTGAGATTTA CAGGT	TCAGCGGAGG TTCTA	42,3
S8_66176488	29.292	S8_66144289- S8_66176488	9,1	-2,4,5	4,5	-9,1	2,6	-2,9,1	9,1	9,1	32 Kpb	AGT	GTC	9,1

SNP significativo ^c	Base de datos ^a	Marcadores flanqueantes ^b	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL	Haplotipo que incrementa ^f	Haplotipo que disminuye ^g	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S8_66556197 S8_66556208	29.292	S8_66176717- S8_66662358	22,8-25,5	14-16,4	9,1-14,5	-19,6	-6,9-19,6	-10,4-21,7	21,5	16-21,5	485 Kpb	CCAAGGGCGA CATATTCT	GTGGAACATG GGATCCTC	27,3
S8_68298442	29.292	S8_68269337- S8_68309669	-31,6	48,5	56,5-62	-69,6--62,9	-34,6	-36,5-57,7	-32,7	-38,7-62	40 Kpb	AATGTTCAAT CTTTAGAGAT TGCAGTCAT	GGCCGCAGGA AAAGGTGCGC CCGGACTGG	69,6
S8_68692692	29.292	S8_68687432- S8_68693682	-22,9	23,4	29,0	-34,4	-22,9	-28,3-31,6	-31,6	-28,3- 11,9	6 Kpb	AAAATATTGC TACTT	CCGGCGGGCA GTGCG	34,4
S8_69119155	29.292	S8_69054762- S8_69415009	-30,0	-35,4	-40,6-- 35,4	-40,6	-30,0	-20,2-22,6	20,1	-10,5- 25,2	360 Kpb	GTATTTACGT AATGATA	ACGCCGGTAG GGCCGCC	40,6
S8_71975885	224.363	S8_71974428- S8_71976197	4,3	4,3	5,9-18,9	-35,4--22,2	-35,3- 35,4	-29,3-35,4	34,4	16-33,2	1 Kpb	TGTTTTGCGAA CGGCT	CACCCTACG GCATA	35,4
S8_73852929 S8_73852948	29.292	S8_73852561- S8_73896818	-9-51,6	-38,8	29,5	-38,8	-47,9- 11,2	27,5-45,2	-23,7- 38,1	29,5	44 Kpb	CGGTGCAATT ATTATTGGTA CGGGTTGG	GACAAAGGCC CGCGCACCG GCCTCCCA	51,6
S8_79127682	29.292	S8_78852104- S8_79149894	7,1-17,8	3,2-29,4	20,4	-69,0	-69,4- 18,3	-31,2-58,4	4,2-13,1	20,4	297 Kpb	ACTTCTCTG GTGATGTGGC TGCAAACCTGA CGGTTATGC	GTATCCGTCA ACCGGTAA AGGAACCCGG ACGAACCGCC G	85,7
S9_154098509	29.292/22 4.363	S9_154096952- S9_154099017	-6,4--2,8	-9,6--6,4	-9,8	13,5	13,5	2,1-13,5	13,5	-9,8	2 Kpb	TCACG	CGGTA	13,5

^a Significa la base de datos con la que se calculó cada SNP significativo, es decir con la 29.292 SNPs o con la base de datos de 224.363 SNPs.

^b Marcadores flanqueantes del bloque de ligamiento.

^c SNPs significativos detectados en la tabla 4.3.6.

^d Cuando había datos perdidos en el efecto aditivo de los parentales se calculó el rango, solo en los SNPs significativos de la base de datos de 224.363 SNPs.

^e Tamaño del QTL en Kpb o pb.

^f Haplotipo que incrementa el efecto aditivo si lleva estos alelos.

^g Haplotipo que disminuye el efecto aditivo si lleva estos alelos.

^h Suma de los efectos aditivos de todos los SNPs significativos en el bloque de ligamiento.

4.3.8 SNPs significativos para floración femenina

Se identificaron 47 SNPs significativos asociados al carácter de floración femenina bajo infestación con *S. nonagrioides*. De ellos, 33 fueron localizados con la base de datos de 29.292 SNPs en los cromosomas 2, 3, 5, 6, 7, 8, 9 y 10. Dos SNPs se encontraron en el cromosoma 2, uno en el cromosoma 3, cuatro en el cromosoma 5, uno en el cromosoma 6, doce en el cromosoma 7, once en el cromosoma 8, uno en el cromosoma 9 y uno en el cromosoma 10. Los 14 SNPs restantes se localizaron con la base de datos de 224.363 SNPs en los cromosomas 1, 3, 5, 8, 9 y 10. Un SNP en el cromosoma 1, tres en el cromosoma 3, dos en el cromosoma 5, cinco en el cromosoma 8, uno en el cromosoma 9 y dos en el cromosoma 10. La proporción de la varianza fenotípica (R^2) explicada por cada SNP significativamente asociado a este carácter vario de 2,7 a 5,9. Los efectos aditivos, oscilan entre 0,73 y 1,92 días para los SNPs significativamente asociados con el carácter de días a floración femenina (Tabla y Figura 4.3.8).



Tabla 4.3.8 Base de datos utilizados, variantes alélicas, efecto aditivo, valores para las pruebas de significación (Valor-*p*) y proporción de la varianza total explicada por cada SNP significativamente asociado a la floración femenina de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	A509 ^c	EP125 ^c	EP17 ^c	EP43 ^c	EP53 ^c	EP86 ^c	F473 ^c	PB130 ^c	Alelos ^c	(No) ^d	Efecto aditivo ^e	Valor- <i>p</i> ^f	R ^{2g}
S2_79284243	29.292	G	G	G	G	G	G	A	G	A/G	65/525	1,14	6,81E-05	0,027
S2_79872003	29.292	G	G	G	G	G	G	A	G	A/G	64/526	1,16	7,16E-05	0,027
S3_5669160	29.292	C	C	G	C	C	C	C	C	G/C	97/497	1,00	1,47E-05	0,032
S5_39898206	29.292	A	A	A	A	G	A	A	A	A/G	451/29	1,58	8,77E-05	0,033
S5_143975719	29.292	T	C	T	C	C	T	C	C	C/T	448/104	0,92	4,84E-05	0,030
S5_151886703	29.292	G	G	G	G	G	G	G	G	G/T	376/80	1,00	7,43E-05	0,035
S5_213028225	29.292	C	C	T	T	T	T	C	T	C/T	393/125	0,90	1,86E-05	0,037
S6_106836229	29.292	C	C	G	G	G	G	G	G	C/G	787/367	0,82	8,96E-06	0,036
S7_25505913	29.292	G	G	G	G	G	G	A	G	A/G	41/341	1,42	3,14E-05	0,046
S7_154700916	29.292	C	C	C	T	T	C	C	C	T/C	171/403	0,75	8,30E-05	0,027
S7_155584900	29.292	T	C	C	C	C	T	C	C	C/T	486/72	1,06	3,51E-05	0,031
S7_155584919	29.292	C	T	T	T	T	C	T	T	T/C	486/72	1,06	3,51E-05	0,031
S7_155743387	29.292	T	T	T	C	T	T	T	T	C/T	129/400	0,87	2,93E-05	0,034
S7_158959879	29.292	C	C	C	A	A	C	A	C	A/C	187/256	0,80	5,41E-05	0,035
S7_158959908	29.292	C	C	C	A	A	C	A	C	A/C	187/256	0,80	5,41E-05	0,035
S7_158959910	29.292	A	A	A	C	C	A	C	A	C/A	187/256	0,80	5,41E-05	0,035
S7_158959912	29.292	T	T	T	A	A	T	A	T	A/T	187/256	0,80	5,41E-05	0,035
S7_158959913	29.292	C	C	C	A	A	C	A	C	A/C	187/256	0,80	5,41E-05	0,035
S7_158959916	29.292	C	C	C	T	T	C	T	C	T/C	187/256	0,80	5,41E-05	0,035
S7_164078854	29.292	C	C	C	G	G	C	C	C	G/C	132/439	0,84	4,23E-05	0,030
S8_121797765	29.292	T	T	C	C	C	T	C	C	T/C	250/333	0,76	1,75E-05	0,032
S8_124358657	29.292	C	C	C	C	C	T	C	T	T/C	171/403	0,81	2,16E-05	0,032
S8_125197739	29.292	C	T	C	C	C	T	C	C	T/C	166/402	0,90	3,71E-06	0,038
S8_125197822	29.292	G	A	G	G	G	A	G	G	A/G	169/409	0,86	8,24E-06	0,035

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	A509 ^c	EP125 ^c	EP17 ^c	EP43 ^c	EP53 ^c	EP86 ^c	F473 ^c	PB130 ^c	Alelos ^c	(No) ^d	Efecto aditivo ^e	Valor- <i>p</i> ^f	R ^{2g}
S8_125473699	29.292	C	C	C	C	C	C	C	C	T/C	27/482	1,77	9,59E-06	0,037
S8_132878255	29.292	C	C	T	C	C	T	C	T	T/C	167/324	0,94	1,82E-06	0,046
S8_135352477	29.292	C	C	C	C	C	C	C	C	T/C	38/512	1,68	2,39E-06	0,041
S8_142370328	29.292	C	C	C	C	C	C	C	C	T/C	67/524	1,16	6,86E-05	0,027
S8_142371602	29.292	G	G	G	G	G	G	G	G	A/G	54/515	1,27	3,91E-05	0,030
S8_142371636	29.292	G	G	G	G	G	G	G	G	A/G	55/525	1,31	2,00E-05	0,031
S8_142476923	29.292	C	C	A	C	C	C	A	A	A/C	219/331	0,77	3,52E-05	0,031
S9_14646808	29.292	G	G	T	T	G	T	T	G	G/T	226/321	0,73	4,46E-05	0,031
S10_3192554	29.292	G	G	G	C	C	G	C	C	G/C	256/285	0,77	1,50E-05	0,035
S1_44346106	224.363	G	A	A	G	A	N	N	G	G/A	249/223	0,85	2,36E-05	0,036
S3_5447465	224.363	N	G	G	G	G	G	G	G	C/G	98/431	1,02	1,66E-05	0,034
S3_5669160	224.363	C	C	G	C	C	C	C	C	G/C	97/497	1,02	1,32E-05	0,032
S3_5879931	224.363	C	T	T	T	N	N	N	N	T/C	125/216	1,04	1,05E-05	0,059
S5_31543892	224.363	C	C	N	C	T	N	C	C	C/T	474/28	1,71	2,15E-05	0,036
S5_213028225	224.363	C	C	T	T	T	T	C	T	C/T	393/125	0,95	1,10E-05	0,039
S8_124357599	224.363	C	T	N	C	C	T	C	C	T/C	148/428	0,96	6,18E-06	0,036
S8_125473699	224.363	C	C	C	C	C	C	C	C	T/C	27/482	1,92	3,14E-06	0,042
S8_132878255	224.363	C	C	T	C	C	T	C	T	T/C	167/324	0,93	1,22E-05	0,039
S8_135352477	224.363	C	C	C	C	C	C	C	C	T/C	38/512	1,71	4,11E-06	0,039
S8_135716709	224.363	C	C	N	C	C	C	C	N	T/C	85/434	1,18	5,88E-06	0,039
S9_12601606	224.363	T	C	T	C	C	C	C	N	T/C	129/279	1,00	7,66E-06	0,046
S10_88570718	224.363	C	N	N	C	N	C	N	C	G/C	57/410	1,36	1,55E-05	0,037
S10_105904131	224.363	C	C	C	C	C	C	N	C	T/C	40/466	1,48	2,40E-05	0,036

^a El número antes del guion bajo () indica el número del cromosoma y el número después del guion bajo () indica la posición física del SNP en pb dentro del cromosoma.

^b Se utilizaron dos bases de datos para buscar SNPs significativos, una de 29.292 y otra de 224.363 SNPs.

^c Los alelos de los padres se obtuvieron de las bases de datos originales de genotipado.

^dNo = número de líneas homocigotas para una variante determinada. El efecto aditivo siempre es positivo porque el alelo antes de la diagonal (/) aumenta el carácter; y el alelo después de la diagonal (/) disminuye el carácter.

^e El efecto aditivo se calculó como la mitad de la diferencia entre la media de los homocigotos para el alelo que aumenta el carácter y la media del homocigoto que disminuye el carácter.

^f p = valores de significación de los SNPs significativos.

^g R^2 , proporción de la varianza fenotípica explicada por el SNP.



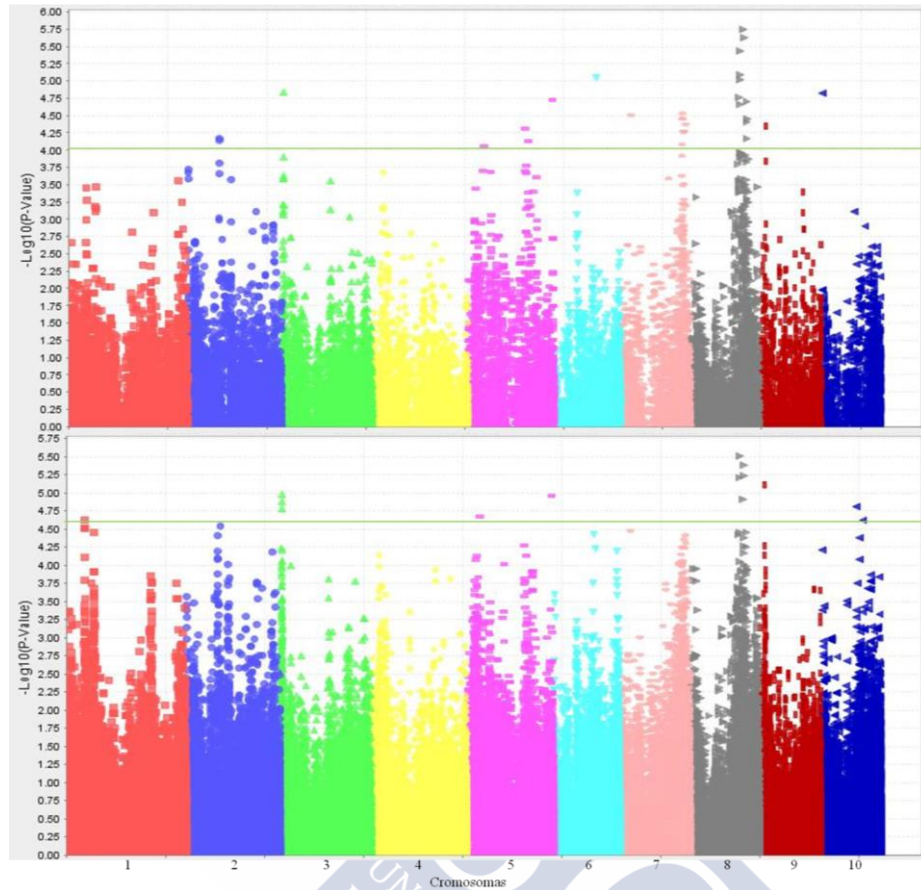


Figura 4.3.8 Resultados del GWAS para el carácter floración femenina bajo infestación con *S. nonagrioides* en la población MAGIC de maíz de este estudio. Cada punto representa los valor-*P* de los 29.292 SNPs (arriba) y 224.363 SNPs (abajo) probados en el análisis. Los puntos sobre la línea verde indican a los SNPs significativamente asociados al carácter de floración femenina.

4.3.9 Haplotipos del QTL por cada SNP significativo para floración femenina

Los SNPs significativos detectados se sometieron también a un análisis de desequilibrio de ligamiento en Haploview, por lo tanto, los 47 SNPs significativos para el carácter de floración femenina se agruparon en 34 QTL. Los mayores efectos aditivos por cada cromosoma para este carácter se encontraron en los cromosomas 2, 5, 7 y 8 con 17,2, 22,7, 11,3 y 14,5 días para el carácter días a floración (Tabla 4.3.9).



Tabla 4.3.9 Base de datos utilizados, marcadores flanqueantes, efecto aditivo de los parentales, longitud del QTL, haplotipo que incrementa, haplotipo de disminuye y Σ del efecto aditivo teórico por cada SNP o grupo de SNPs significativamente asociados a la floración femenina de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	Marcadores flanqueantes ^c	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Haplotipo que incrementa ^f	Haplotipo que disminuye ^g	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S1_44346106	224.363	S1_44345120-S1_44373450	7,8	-2,5	-5,1	8,0	-7,8	-7,5--1,8	-8-2,5	4,2-8	28 Kpb	TATCCCTGC GTGG	CCCTTGCTT CCAT	8,2
S2_79284243	29.292	S2_78929348-S2_79416621	-3,1--2,1	-6,1	3,6	-7,2-5,9	-1,1	-4,6	7,6-9,6	-7,6-3,6	487 Kpb	CTAGAACG GTTCCCAAC GAAAAC	TCGCGTGC ACCTTGGG AAGGGGG	12,0
S2_79872003	29.292	S2_79477741-S2_79872003	-9,5--8,5	-8,5	-7,2--5,1	-12,8--1,6	-9,5--7,4	-8,5	17,2	-12,4-8,5	394 Kpb	CCAGAGCC GTGGAATG TGATA	GTTCCAAG ACAAGGA GACGG	17,2
S3_5447465	224.363	S3_5440571-S3_5537708	-3,6-0,1	-2,5--1,9	-2,5-0,1	-2,5--1,9	-2,5--1,9	-2,5--1,9	-3--2,3	-3,6--2,3	97 Kpb	GGGCCC	AAAGGT	3,6
S3_5669160	29.292/ 224.363	S3_5669160-S3_5669217	-0,1	-0,1	2,0	-0,1	-0,1	-2,0	-2,0	-2,0	57 pb	GGGCCC	AAAGGT	2,0
S3_5879931	224.363	S3_5879931-S3_5881172	0,5	2,5	-0,5-2,5	1,8-2,5	0,5-2,5	-1,8-2,5	-2,5--0,5	ND	1 Kpb	TTCC	CCTG	2,5
S5_31543892	224.363	S5_31543892-S5_31676863	5,9	-0,5-0,8	-3,7-5,9	0,8-3,6	-5,9--0,4	-5,2-4,9	5,9	2,3	132 Kpb	CAAGAAAT GT ATT	TCTCGTGCA CCCC	5,9
S5_39898206	29.292	S5_39894712-S5_40356702	19,9	8,8-18,8	-9,9-22,3	5,7-20,1	-22,8--13,6	21,6	3,5-21,4	16,6	461 Kpb	CAAATCCC GATCCTTGG CCTGGTGC GATGCTCA CTTGGCAC	GGGCAGTG TCAGAAC CAGAAACG TCGCCTCGG TCCAATGT	22,7
S5_143975719	29.292	S5_143975522-S5_144142545	-3,7--2	0,1-3,4	-3,8-0,3	2,4	2,3-4,7	-5,8-2,1	2,3-5,6	1,0	167 Kpb	AGTGTCCG CA TGGTG	GTCTGGCCT TGATCA	5,8
S5_151886703	29.292	S5_151886703-S5_151989388	0,8	-2,2--0,5	0,7-0,8	5,8	0,7	-0,9-0,8	-2,6-4,2	4,1	102 Kpb	GCCCGTCT G	TTTACGAA A	5,8
S5_213028225	29.292/ 224.363	S5_212882092-S5_213028273	1,6-2,9	1-2,9	-4--0,3	-3,3--2,9	-3,9--1,1	-3,9--2,1	-1,6-1,7	-4--1,5	146 Kpb	TGCTGTGCT T CTC	GTACACAT GCGCA	4,0
S6_106836229	29.292	S6_106836229	0,8	0,8	-0,8	-0,8	-0,8	-0,8	-0,8	-0,8	0,0 Kpb	C	G	0,8

Resultados

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	Marcadores flanqueantes ^c	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Haplotipo que incrementa ^f	Haplotipo que disminuye ^g	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S7_25505913	29.292	S7_25158423-S7_25505914	-2,3	-0,3-0,1	-2,9	-3,2-0,4	-0,6-0,4	-0,3-0,4	2,9	-0,9-0,4	347 Kpb	ACCACGAC	TGTGTAGT	3,2
S7_154700916	29.292	S7_154699325-S7_154700916	-0,5-2,1	0,2	-2,7-2,1	3,7-4,5	0,7-3,4	-1,6-1,2	-1,6	-2,6--0,8	1 Kpb	TCTAATCAT TT	AGCGCGAT AGC	4,5
S7_155584900 S7_155584919	29.292	S7_155564078-S7_155587538	-7,1-0,5	0,3	0,4-7,3	7,2	-1,9-0,1	-7,0	-1,6-0,6	0,8	23 Kpb	CGGTGAAG GCTCCGATT C	ACAAACCC CTCTGACCG T	7,5
S7_155743387	29.292	S7_155743302-S7_155743991	1,5	-1,4	-2,8--0,4	2,9-3,3	-0,3-1,6	-2,8	-2-1,6	1,5-1,5	689 pb	AGCGGACC AC	TTTACGTGG G	3,7
S7_158959879 S7_158959879 S7_158959908 S7_158959910 S7_158959912 S7_158959913 S7_158959914	29.292	S7_158959869-S7_159130564	-7,9	-7,9	-9,1--5,9	6-8,5	7,2	-9,7--7	4,2-6,9	-11,3--3	170 Kpb	CAACAATT AGTGACGG CTGCGT	TCCATCCCG TCACTAATC ATCG	11,3
S7_164078854	29.292	S7_164078770-S7_164196639	-2,5--1,6	-1,6	-2,5-4,7	6,2	0,3-6,2	-1,6-2,8	-1,6	-5,1--0,6	117 Kpb	GTGCTGCG GGACGAGG GAAT	CCCTCCTTC CGACGAAA CGG	6,2
S8_121797765	29.292	S8_121797170-S8_121799723	1,9	-0,1-1,9	-1,9-0,2	-1,9--1,4	-1,9	1,9	-0,1	-0,2--0,1	2 Kpb	AAATT	GGGCG	1,9
S8_124357599	224.363	S8_124357232-S8_124357639	-1,8	1,7	ND	-1,2	-1,8	1,6-1,7	-1,9--1,2	-0,1	407 Kpb	CCCTC	TAGCG	1,9
S8_124358657	29.292	S8_124357802-S8_124358657	-1,3	-1,3--0,2	-1,3--0,2	-1,3	-1,3	0,2-1,3	-1,3--0,2	1,3	855 pb	TT	AC	1,3
S8_125197739 S8_125197822	29.292	S8_125197105-S8_125198013	-3,3	4,7-5,4	-3,3	-4,8--4,1	-2,2	4,5-5,4	-5,4--4,1	-1,9	908 pb	CGAGTCAT A	GTGCCTGA G	5,4
S8_125473699	29.292/ 224.363	S8_125470443-S8_125743619	-1,4--0,9	-2--0,9	-4,1--1,8	-3--1,7	-2,1	-2,1--0,5	-3,3--1,7	-1,4--0,9	273 Kpb	ATGTACCTC	GCAATATG G	4,1
S8_132878255	29.292/ 224.363	S8_132878255-S8_132992521	0,9	-3,2	3,3	-3,2--2,2	-3,2--1,9	1,9-3,7	-1,3	3,7	114 Kpb	TCAGGAT	CTTACCC	3,7
S8_135352477	29.292/ 224.363	S8_135208533-S8_135417846	-3,7--2,9	-7,9	-10,1-3,3	-6,4--3,7	-10,7--1,7	-1,9-4,8	-0,8-3,3	5,6-6,5	209 Kpb	GACAACGT GTTGATGTA CTTGATGG	TGGGGTCC ACCAGCAG GACCTGGA AA	12,9
S8_135716709	224.363	S8_135716700-S8_135764064	-12-9	-11,7	-14,5- 14,2	-13,4-4,6	-13,4-4,6	7,4-8,9	8,9-11,9	11,7-14,1	47 Kpb	AGTGCGAT AAATGAGT GAGCCT	GTCCTTTGG TGGTTAGTG ATAA	14,5

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	Marcadores flanqueantes ^c	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Haplotipo que incrementa ^f	Haplotipo que disminuye ^g	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S8_142370328	29.292	S8_142369668-S8_142370528	-3,7	-1,4-1,3	0,2	1,3	1,3	-1,4	-3,7-1,3	0,6	860 pb	AATTG	TTCCCT	3,7
S8_142371602 S8_142371636	29.292	S8_142371435-S8_142371636	-2,4	-2,7	-2,7	-2,7	-2,7	-2,7--2,4	-2,7--2,4	-2,7	201 pb	AAA	GGG	2,7
S8_142476923	29.292	S8_142427665-S8_142476929	-3,7-0,8	-2,5-2,6	-1,6-3,3	-3--2,8	-3--2,8	-2,8-2	-1,6-3,5	-1,1	49 Kpb	ATCACAGC GT CAAG	TATGGCAG CGTCCA	4,2
S9_12601606	224.363	S9_12601217-S9_12601606	1,5	-1,5	0,5-1,5	-1,5	-1,5	-1,5--0,5	-1,5	ND	389 pb	AT	CC	1,5
S9_14646808	29.292	S9_14646808-S9_14821417	4,8	0,3-4,8	-2,4-0,9	-5--3,4	-0,8-2,1	-5--2,1	-5--1,1	4,8	174 Kpb	GATATTAA	TTCCCTG	5,0
S10_3192554	29.292	S10_3191113-S10_3192778	2,6	1,5	-3,3--0,1	-2--1,5	-4,8--4,3	-2,6-1,4	-4,8--4,3	-4,8--4,3	1 Kpb	GGCCATTC AGA	AAGGTCGC AGCG	5,0
S10_88570718	224.363	S10_88570718-S10_88571133	-7-1,3	-7,1--2,5	-7,1-5,9	4,4	ND	0,4	-5,8-7,1	0,5-1,3	415 pb	GTGCAAGA CTG CGATAA	CATTGGCG GGATATAG T	7,1
S10_105904131	224.363	S10_105904006-S10_105904131	-2,9	-2,9	-2,9	-2,4	-2,4	-2,4	ND	-2,9--2,4	125 pb	TAT	GGC	2,9

^a SNPs significativos detectados en la tabla 4.3.8.

^b Significa la base de datos con la que se calculó cada SNP significativo, es decir con la 29.292 SNPs o con la base de datos de 224.363 SNPs.

^c Marcadores flanqueantes del bloque de ligamiento.

^d Cuando había datos perdidos en el efecto aditivo de los parentales se calculó el rango, solo en los SNPs significativos de la base de datos de 224.363 SNPs.

^e Tamaño del QTL en Kpb o pb.

^f Haplotipo que incrementa el efecto aditivo si lleva estos alelos.

^g Haplotipo que disminuye el efecto aditivo si lleva estos alelos.

^h Suma de los efectos aditivos de todos los SNPs significativos en el bloque de ligamiento.

4.3.10 SNPs significativos para longitud de galerías

Se identificaron 5 SNPs significativos asociados al carácter de longitud de galerías bajo infestación con *S. nonagrioides*. Tan solo el primero se localizó con la base de datos de 29.292 SNPs en el cromosoma 5 ($p= 5,92 \times 10^{-05}$). Los 4 restantes se localizaron con la base de datos de 224.363 SNPs uno en el cromosoma 3 ($p= 4,73 \times 10^{-06}$), dos en el cromosoma 4 ($p= 1,20 \times 10^{-05}$ y $p= 2,82 \times 10^{-06}$), y uno más en el cromosoma 5 ($p= 2,39 \times 10^{-05}$). La proporción de la varianza fenotípica (R^2) explicada por cada SNP significativamente asociado a este carácter vario de 2,8 a 6,0. Los efectos aditivos, oscilan entre 1,76 y 2,38 cm para los SNPs significativamente asociados con el carácter de longitud de galerías (Tabla y Figura 4.3.10).



Tabla 4.3.10 Base de datos utilizados, variantes alélicas, efecto aditivo, valores para las pruebas de significación (Valor-*p*) y proporción de la varianza total explicada por cada SNP significativamente asociado a la longitud de galerías en el tallo de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	A509 ^c	EP125 ^c	EP17 ^c	EP43 ^c	EP53 ^c	EP86 ^c	F473 ^c	PB130 ^c	Alelos ^c	(No) ^d	Efecto aditivo ^e	Valor- <i>p</i> ^f	R ² ^g
S5_57432767	29.292	G	A	A	A	A	G	A	A	A/G	461/104	1,76	5,92E-05	0,028
S3_191332395	224.363	N	G	N	N	G	C	N	G	C/G	138/269	2,01	4,73E-06	0,052
S4_155128691	224.363	T	T	T	N	T	N	T	T	G/T	63/345	2,38	1,20E-05	0,047
S4_156193095	224.363	C	C	C	N	N	C	T	C	T/C	78/308	2,32	2,82E-06	0,060
S5_24771445	224.363	A	N	G	G	G	A	G	G	G/A	345/117	1,82	2,39E-05	0,040

^a El número antes del guion bajo () indica el número del cromosoma y el número después del guion bajo () indica la posición física del SNP en pb dentro del cromosoma.

^b Se utilizaron dos bases de datos para buscar SNPs significativos, una de 29.292 y otra de 224.363 SNPs.

^c Los alelos de los padres se obtuvieron de las bases de datos originales de genotipado.

^d No = número de líneas homocigotas para una variante determinada. El efecto aditivo siempre es positivo porque el alelo antes de la diagonal (/) aumenta el carácter; y el alelo después de la diagonal (/) disminuye el carácter.

^e El efecto aditivo se calculó como la mitad de la diferencia entre la media de los homocigotos para el alelo que aumenta el carácter y la media del homocigoto que disminuye el carácter.

^f *p* = valores de significación de los SNPs significativos.

^g R², proporción de la varianza fenotípica explicada por el SNP.

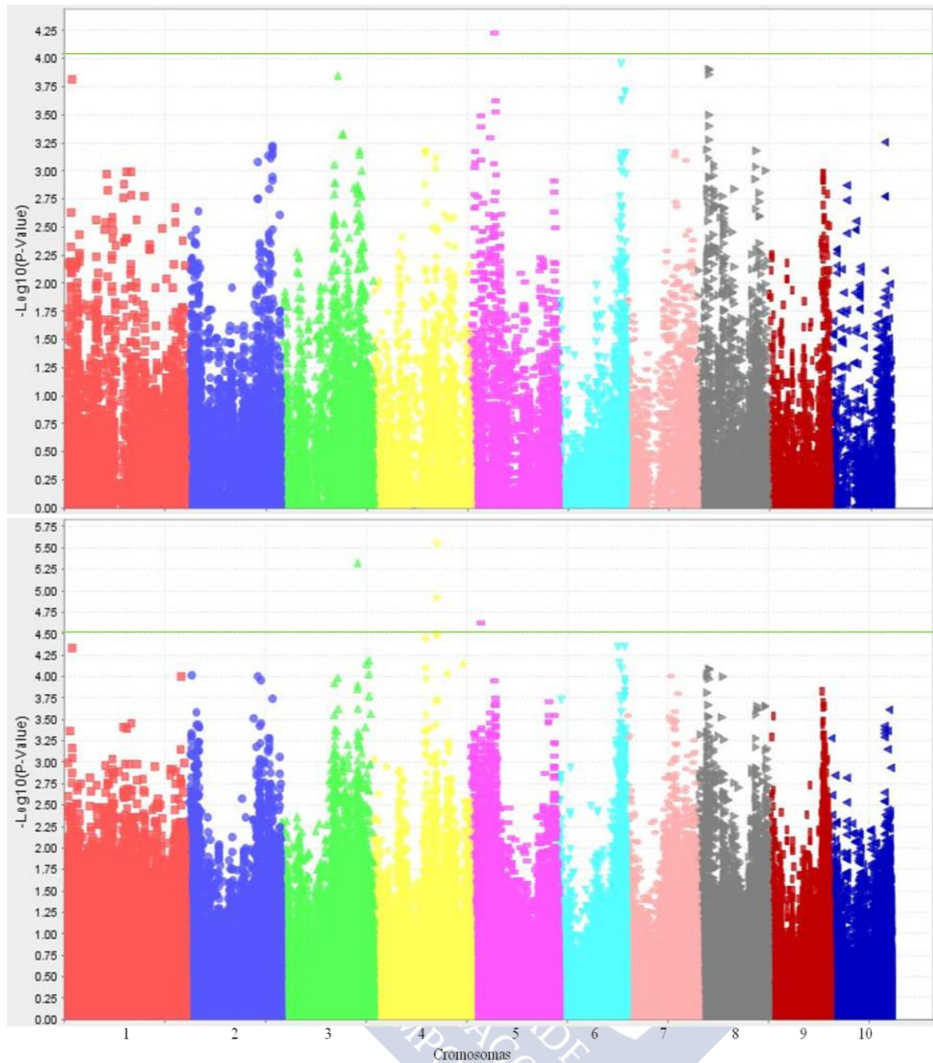


Figura 4.3.10 Resultados del GWAS para el carácter longitud de galerías bajo infestación con *S. nonagrioides* en la población MAGIC de maíz de este estudio. Cada punto representa los valor-*P* de los 29.292 SNPs (arriba) y 224.363 SNPs (abajo) probados en el análisis. Los puntos sobre la línea verde indican a los SNPs significativamente asociados al carácter de longitud de galerías.

4.3.11 Haplotipos del QTL por cada SNP significativo para longitud de galerías

Los SNPs significativos detectados se sometieron también a un análisis de desequilibrio de ligamiento en Haploview, y los 5 SNPs significativos se localizaron en bloques de ligamiento distintos por lo que probablemente están asociados a 5 QTL. El mayor efecto aditivo se encontró en el cromosoma 5 con 30,32 cm para longitud de galerías (Tabla y Figura 4.3.11).



Tabla 4.3.11 Base de datos utilizados, marcadores flanqueantes, efecto aditivo de los parentales, longitud del QTL, haplotipo que incrementa, haplotipo de disminuye, Σ del efecto aditivo real del haplotipo que disminuye la longitud de galerías y Σ del efecto aditivo teórico por cada SNP o grupo de SNPs significativamente asociados a la longitud de galerías en el tallo de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	Marcadores flanqueantes ^c	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Haplotipo que incrementa ^f	Haplotipo que disminuye ^g	Σ efecto aditivo real ^e	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S3_191332395	224.363	S3_191332395-S3_191454736	5,2-11,7	-10,7--7,7	ND	5,2-11,7	-12,9	2,4-15,1	0,5-15,1	-14,7--8,9	122 Kpb	CGGGC GGGCT TCAA	GAATTAT AGCAATC	-14,02	15,13
S4_155128691	224.363	S4_155017225-S4_155134488	-17,8--11,9	-14,5--13,3	-13,3--9	-10,6-16,2	-16,3--14,5	-12,8--6,8	-13,3	-17,8--16,1	117 Kpb	AGCGA AACAG CTTA	GCATG TGTCT ACGT	-17,84	17,84
S4_156193095	224.363	S4_156193088-S4_156193145	-6,9	-5,3	-6,9--5,3	0,6-6,9	-5,3-6,9	-6,9-0,6	-6-6,9	-5,3--1,5	57 pb	ATGG	TCAT	-6,95	6,95
S5_24771445	224.363	S5_24618080-S5_24861720	-30,1	0,9-29,4	2,7-6,8	1,6-2,5	-19,6-23,4	-2,3--1,3	5,0	-3-0	243 Kpb	GAGCG GCGCCT CCCTTG TTTGTC TTT	AGCATCA ATAGTTG AAACCCA CTCGA	-30,18	30,32
S5_57432767	29.292	S5_57430043-S5_57503262	-9,4--9,1	5,5-9,6	6,5-7,9	8,8	-2,2-10,7	-4,1	9,9	10,3-10,5	73 Kpb	GCGAA GATAA TTATCA	TTTGTAG CTGCCCC TT	-10,99	12,63

^a SNPs significativos detectados en la tabla 4.3.10.

^b Significa la base de datos con la que se calculó cada SNP significativo, es decir con la 29.292 SNPs o con la base de datos de 224.363 SNPs.

^c Marcadores flanqueantes del bloque de ligamiento.

^d Cuando había datos perdidos en el efecto aditivo de los parentales se calculó el rango, solo en los SNPs significativos de la base de datos de 224.363 SNPs.

^e Tamaño del QTL en Kpb o pb.

^f Haplotipo que incrementa el efecto aditivo si lleva estos alelos.

^g Haplotipo que disminuye el efecto aditivo si lleva estos alelos.

^h Suma de los efectos aditivos de todos los SNPs significativos en el bloque de ligamiento.

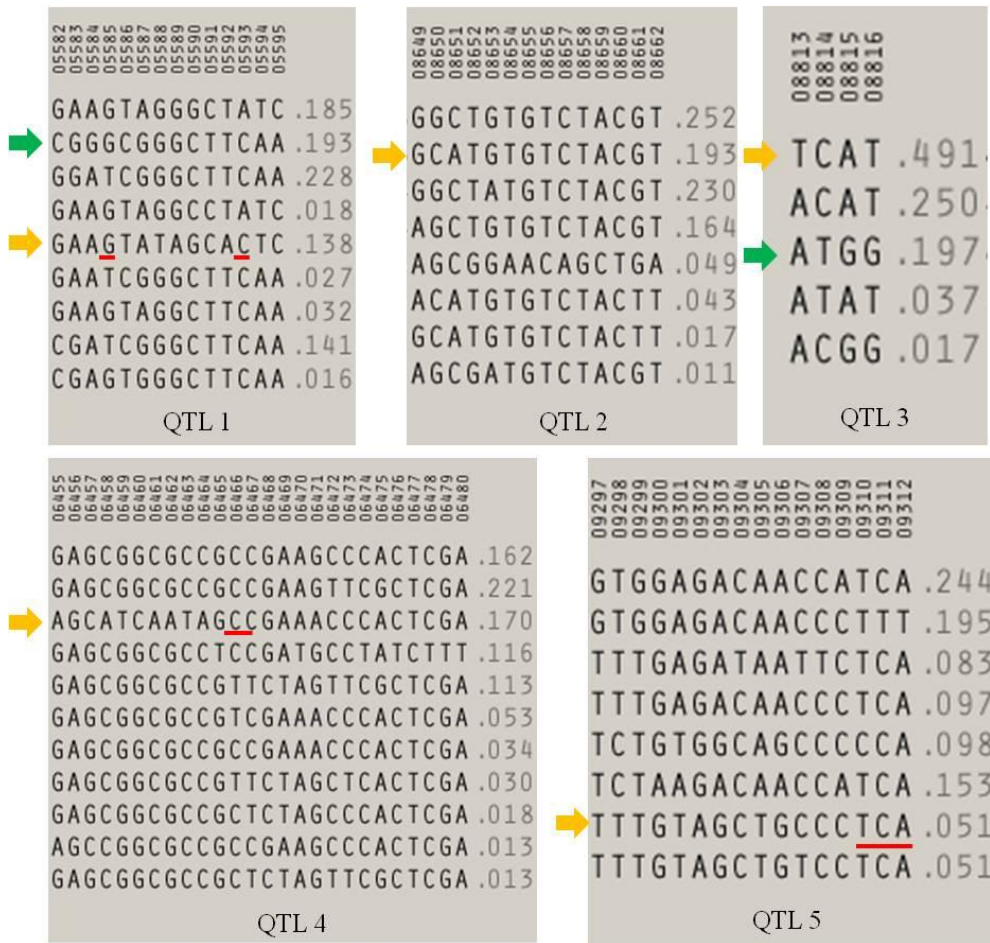


Figura 4.3.11 Haplotipos de los QTL para longitud de galerías. Los haplotipos que disminuyen significativamente la longitud de galerías están marcados con flechas amarillas y los haplotipos que incrementan la longitud de galerías en flechas verdes. Los alelos que no coinciden con el haplotipo total que disminuye la longitud de galerías están subrayados con línea roja (haplotipos 1, 4 y 5).

4.3.12 Genes candidatos para longitud de galerías

En los 5 QTL se encontraron 10 genes candidatos (GRMZM2G136710, GRMZM2G057140, GRMZM5G886288, GRMZM2G134072, GRMZM2G032648, GRMZM2G034276, GRMZM2G338853, GRMZM2G073351, GRMZM2G317900 y GRMZM2G170805) los cuales están adyacentes a los SNPs asociados al carácter de longitud de galerías (Tabla 4.3.12).

Tabla 4.3.12 Cromosoma, base de datos utilizados, marcadores flanqueantes, longitud del QTL y genes candidatos por cada SNP o grupo de SNPs significativamente asociados a la longitud de galerías en el tallo de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP Significativo ^a	Cromosoma ^b	Base de datos ^c	Marcadores flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S3_191332395	3	224.363	S3_191332395- S3_191454736	122 Kpb	a) GRMZM2G136710 (191.329.776-191.332.134) ⁺ b) GRMZM2G057140 (191.413.501-191.491.654) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G136710 b) Enzyme: Acid phosphatase (Catalysis of the reaction: an orthophosphoric monoester + H2O = an alcohol + phosphate, with an acid pH optimum). Phosphate utilization in cell wall regeneration (www.maizegdb.org).
S4_155128691	4	224.363	S4_155017225- S4_155134488	117 Kpb	a) GRMZM5G886288 (155.048.784-155.053.667) ⁺	a) ---
S4_156193095	4	224.363	S4_156193088- S4_156193145	57 pb	a) GRMZM2G134072 (156.186.406-156.189.707) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G134072
S5_24771445	5	224.363	S5_24618080- S5_24861720	243 Kpb	a) GRMZM2G032648 (24.609.355-24.611.223) ⁺ b) GRMZM2G034276 (24.714.700-24.723.606) ⁺ c) GRMZM2G338853 (24.724.270-24.727.270) ⁺ d) GRMZM2G073351 (24.861.190-24.863.632) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G032648. b) Polypeptide: GRMZM2G034276. c) Polypeptide: GRMZM2G338853. d) Enzyme: 2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase. (A metabolic process that results in the removal or addition of one or more electrons to or from a substance, with or without the concomitant removal or addition of a proton or protons) (www.maizegdb.org). Chlorophyll biosynthesis and protochlorophyllide reductasa (Kretschmer <i>et al.</i> , 2016).
S5_57432767	5	29.292	S5_57430043- S5_57503262	73 Kpb	a) GRMZM2G317900 (57.427.815-57.434.823) ⁺ b) GRMZM2G170805 (57.505.789-57.508.642) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G317900 (www.maizegdb.org); (Plavskin y Timmermans, 2012). GRMZM2G317900 encode auxin response factors belonging to the auxin/indole-3-acetic acid family (Xin <i>et al.</i> , 2013). This gene is related to leaf or floral organ development (Finet <i>et al.</i> , 2010; Tabata <i>et al.</i> , 2010). b) Polypeptide: AIG2-like protein. Putative uncharacterized protein.

^a SNPs significativos detectados.

^b Cromosoma en el que se detectó cada SNP significativo.

^c Base de datos con la que se detectó cada SNP significativo.

^d Marcadores flanqueantes del bloque de ligamiento.

^e Tamaño del QTL en Kpb o pb.

^f Gen o genes candidatos localizados en la página www.maizegdb.org dentro o cerca de la posición del bloque de ligamiento. Cada a) en la columna ^f se corresponde con a) en la columna ^g, cada b) en la columna ^f con b) en la columna ^g etc.

^g Proteína codificada por el gen candidato y su función.

⁺ Posición del gen en el mapa de la página www.maizegdb.org.

4.3.13 SNPs significativos para rendimiento

Se identificaron 28 SNPs significativos asociados al carácter de rendimiento bajo infestación con *S. nonagrioides*. Tan solo 8 se localizaron con la base de datos de 29.292 SNPs, tres en el cromosoma 1 ($p= 3,06 \times 10^{-05}$, $p= 6,03 \times 10^{-05}$ y $p= 2,35 \times 10^{-05}$), cuatro en el cromosoma 2 ($p= 7,20 \times 10^{-05}$, $p= 7,20 \times 10^{-05}$, $p= 9,52 \times 10^{-05}$ y $p= 2,19 \times 10^{-05}$) y uno en el cromosoma 7 ($9,29 \times 10^{-05}$). Los 20 restantes se localizaron con la base de datos de 224.363 SNPs; once en el cromosoma 1 (con valores de p de $4,09 \times 10^{-06}$ a $1,45 \times 10^{-05}$), dos en el cromosoma 5 ($p= 1,83 \times 10^{-05}$, $p= 1,83 \times 10^{-05}$), uno en el cromosoma 8 ($p= 8,12 \times 10^{-06}$) y seis en el cromosoma 9 (con valores de p de $6,12 \times 10^{-06}$ a $2,12 \times 10^{-05}$) La proporción de la varianza fenotípica (R^2) explicada por cada SNP significativamente asociado a este carácter vario de 2,9 a 5,8. Los efectos aditivos, oscilan entre 2,4 y 5,4 g planta⁻¹ para los SNPs significativamente asociados con el carácter de rendimiento (Tabla y Figura 4.3.13).



Tabla 4.3.13 Base de datos utilizados, variantes alélicas, efecto aditivo, valores para las pruebas de significación (Valor-*p*) y proporción de la varianza total explicada por cada SNP significativamente asociado al rendimiento de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	A509 ^c	EP125 ^c	EP17 ^c	EP43 ^c	EP53 ^c	EP86 ^c	F473 ^c	PB130 ^c	Alelos ^c	(No) ^d	Efecto aditivo ^e	Valor- <i>p</i> ^f	R ² g
S1_200801543	29.292	G	G	G	G	G	G	G	G	T/G	134/433	2,70	3,06E-05	0,031
S1_201847366	29.292	G	G	G	G	G	G	G	A	A/G	141/373	2,61	6,03E-05	0,032
S1_202160398	29.292	A	A	A	A	A	A	A	G	G/A	143/433	2,70	2,35E-05	0,031
S2_144722563	29.292	G	G	G	C	C	G	G	G	C/G	142/392	2,57	7,20E-05	0,029
S2_144722574	29.292	T	T	T	C	C	T	T	T	C/T	142/392	2,57	7,20E-05	0,029
S2_167509666	29.292	T	T	C	C	C	T	T	T	C/T	159/370	2,44	9,52E-05	0,029
S2_173776029	29.292	A	A	A	A	C	A	A	A	C/A	115/384	2,98	2,19E-05	0,037
S7_17180231	29.292	C	C	C	G	C	C	C	C	G/C	64/428	3,33	9,29E-05	0,032
S1_199075640	224.363	T	T	N	N	T	N	N	N	A/T	69/317	4,01	1,45E-05	0,050
S1_199075673	224.363	T	T	N	N	T	N	N	N	C/T	69/320	4,04	1,20E-05	0,050
S1_199075674	224.363	T	T	N	N	T	N	N	N	A/T	69/320	4,04	1,20E-05	0,050
S1_199075675	224.363	A	A	N	N	A	N	N	N	T/A	69/318	4,05	1,16E-05	0,051
S1_199075677	224.363	G	G	N	N	G	N	N	N	T/G	69/318	4,04	1,20E-05	0,050
S1_199075679	224.363	T	T	N	N	T	N	N	N	A/T	69/318	4,05	1,16E-05	0,051
S1_199075681	224.363	G	G	N	N	G	N	N	N	C/G	69/320	4,04	1,20E-05	0,050
S1_199075682	224.363	A	A	N	N	A	N	N	N	T/A	69/318	4,05	1,16E-05	0,051
S1_199075684	224.363	C	C	N	N	C	N	N	N	A/C	69/319	4,04	1,20E-05	0,050
S1_200479419	224.363	A	A	N	A	A	N	A	N	G/A	124/402	3,32	4,09E-06	0,040
S1_202647745	224.363	A	A	N	A	A	A	A	N	G/A	114/413	3,21	1,63E-05	0,036
S5_128333604	224.363	G	G	G	C	N	C	G	G	G/C	324/88	3,65	1,83E-05	0,047
S5_128333610	224.363	A	A	A	G	N	G	A	A	A/G	324/88	3,65	1,83E-05	0,047
S8_171634738	224.363	A	A	N	N	A	A	N	A	G/A	47/374	4,56	8,12E-06	0,048
S9_5656122	224.363	N	G	G	G	G	G	G	G	A/G	42/273	4,63	2,12E-05	0,058
S9_5656138	224.363	N	G	G	G	G	G	G	G	C/G	42/273	4,63	2,12E-05	0,058

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	A509 ^c	EP125 ^c	EP17 ^c	EP43 ^c	EP53 ^c	EP86 ^c	F473 ^c	PB130 ^c	Alelos ^c	(No) ^d	Efecto aditivo ^e	Valor- p ^f	R^2 ^g
S9_9966270	224.363	T	A	N	T	A	T	A	T	A/T	115/289	3,28	5,64E-06	0,051
S9_9966272	224.363	C	T	N	C	T	C	T	C	T/C	115/291	3,26	6,12E-06	0,050
S9_9966291	224.363	C	T	N	C	T	C	T	C	T/C	116/291	3,30	4,60E-06	0,052
S9_11746822	224.363	G	C	N	G	G	G	N	N	C/G	33/335	5,40	1,03E-05	0,053

^a El número antes del guion bajo () indica el número del cromosoma y el número después del guion bajo () indica la posición física del SNP en pb dentro del cromosoma.

^b Se utilizaron dos bases de datos para buscar SNPs significativos, una de 29.292 y otra de 224.363 SNPs.

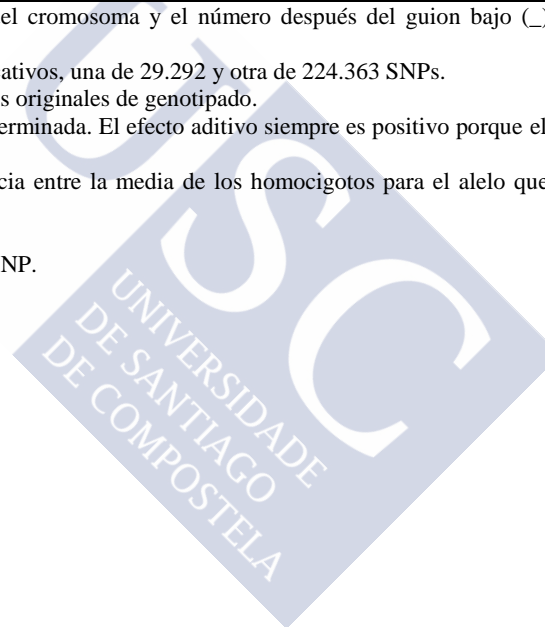
^c Los alelos de los padres se obtuvieron de las bases de datos originales de genotipado.

^d No = número de líneas homocigotas para una variante determinada. El efecto aditivo siempre es positivo porque el alelo antes de la diagonal (/) aumenta el carácter; y el alelo después de la diagonal (/) disminuye el carácter.

^e El efecto aditivo se calculó como la mitad de la diferencia entre la media de los homocigotos para el alelo que aumenta el carácter y la media del homocigoto que disminuye el carácter.

^f p = valores de significación de los SNPs significativos.

^g R^2 , proporción de la varianza fenotípica explicada por el SNP.



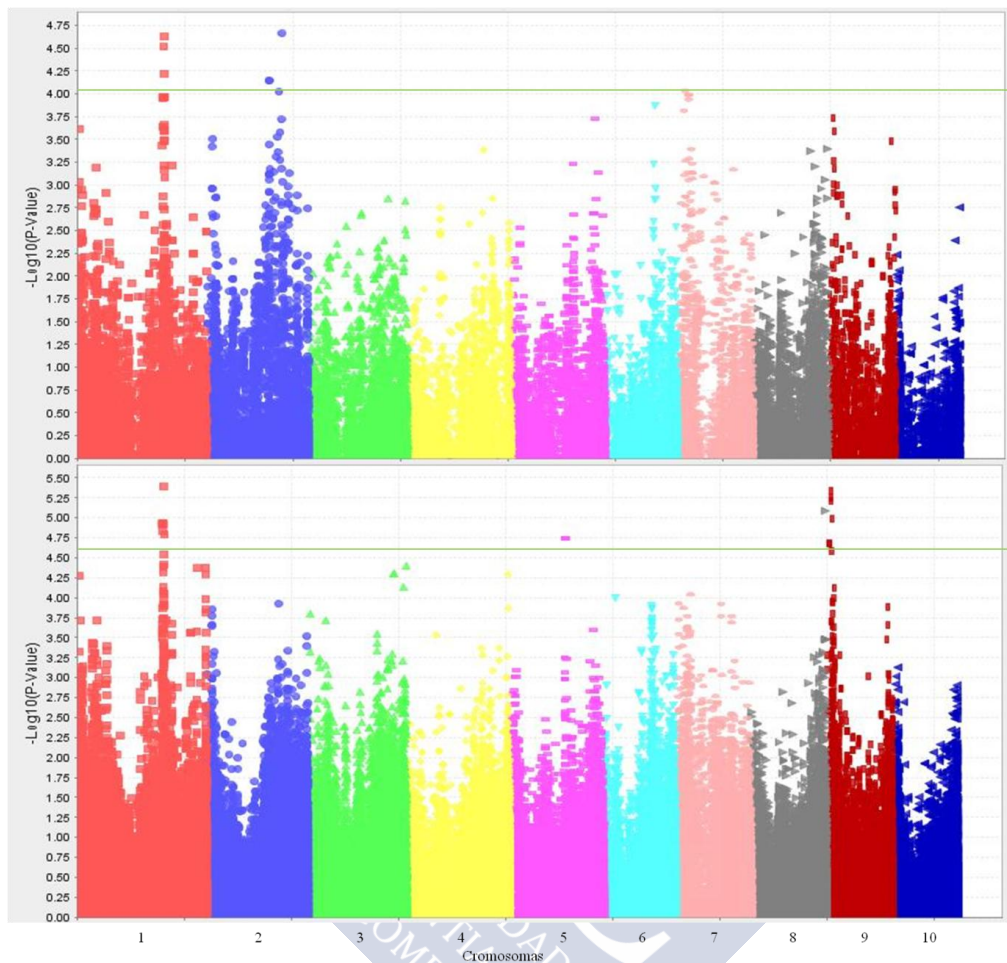


Figura 4.3.13 Resultados del GWAS para el carácter rendimiento bajo infestación con *S. nonagrioides* en la población MAGIC de maíz de este estudio. Cada punto representa los valor-*P* de los 29.292 SNPs (arriba) y 224.363 SNPs (abajo) probados en el análisis. Los puntos sobre la línea verde indican a los SNPs significativamente asociados al carácter de rendimiento.

4.3.14 Haplotipos por cada SNP significativo para rendimiento

Los SNPs significativos detectados se sometieron también a un análisis de desequilibrio de ligamiento en Haploview, por lo tanto, de los 28 SNPs significativos para rendimiento se encontraron 15 QTL en esas regiones. Los mayores efectos aditivos se encontraron en el cromosoma 1 con 62,2 g, y cromosoma 9 con 79,65 g por planta para rendimiento (Tabla y Figura 4.3.14).

Tabla 4.3.14 Base de datos utilizados, marcadores flanqueantes, efecto aditivo de los parentales, longitud del QTL, haplotipo que incrementa, haplotipo de disminuye, Σ del efecto aditivo real del haplotipo que incrementa el rendimiento y Σ del efecto aditivo teórico por cada SNP o grupo de SNPs significativamente asociados al rendimiento de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	Marcadores flanqueantes ^c	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Haplotipo que incrementa ^f	Σ efecto aditivo real ^f	Haplotipo que disminuye ^e	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S1_199075640 S1_199075673 S1_199075674 S1_199075675 S1_199075677 S1_199075679 S1_199075681 S1_199075682 S1_199075684	224.363	S1_199074721 - S1_199104824	-14,8--6,2	-19,8	ND	ND	-12,1	ND	ND	-39,4- 60,5	30 Kpb	ACATTA CTAAC AACAA CAGGG A	62,2	TTTAGT GACCA TCTGCT TAATG	62,2
S1_200479419	224.363	S1_200413533 - S1_200482504	-8,2	-4,7	-3,6-17,2	-6,0	0,4	-12,2-17,2	-9,5	-11,6- 17,2	68 Kpb	TGGCC AATAG TG	17,0	CCATA GTCGA CT	17,2
S1_200801543	29.292	S1_200725160 - S1_200801588	-11,0	-11,0	-15,7-8,2	-11,0	-12,0	-12-3,9	-11,0	-2,8-4,9	76 Kpb	CCCGA CCTGTA A	15,7	TTTAGT TCCGG G	15,7
S1_201847366	29.292	S1_201729280 - S1_201872777	24,5-37,7	-47,9-- 30,3	-51,8-10	-44,7-7,2	26,5	-47,6--37,2	-17,6--9,4	54,3	143 Kpb	TGCTGG CGTCA GCAAG GGGCG GGCCT GAATA CAG	54,3	GCGAA CTCAGC AATTTT ATTATA TTCAGG AGTCA	54,3
S1_202160398	29.292	S1_202160254 - S1_202160398	-5,2--0,5	-3,1	-5,2	-7,4	-7,4	-7,4	-7,4	9,1	144 pb	AGGGC	9,1	TATAG	9,1
S1_202647745	224.363	S1_202647173 - S1_202752781	-9,7	-8,1	-3,8-12,6	-5,9	-16,1-6,3	-13-10,1	-15,1-8	3-16,8	105 Kpb	GGTAG GCTAG G	16,8	CAGGA AACGC A	16,8

SNP significativo ^a	Base de datos ^b	Marcadores flanqueantes ^c	A509 ^d	EP125 ^d	EP17 ^d	EP43 ^d	EP53 ^d	EP86 ^d	F473 ^d	PB130 ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Haplotipo que incrementa ^f	Σ efecto aditivo real ^f	Haplotipo que disminuye ^e	Σ del efecto aditivo teórico ^h
S1_144722563, S1_144722574	29.292	S2_144720120 - S2_144802116	-15,1	-37,2	-15,1	32,3	25,0	-26,4	-15,1	-19,5	81 Kpb	GCGTC ACCAA CGAGC CCGATT GAGTG GTTGGC A	34,91	CTTCGC TAGGA TGTGGT TGCCCG CGATCC AATG	37,50
S2_167509666	29.292	S2_167417879 - S2_167847759	-28,4--14,5	-28,4	-9,8--6,2	-14,9--9,8	29,5	-28,4-8,9	-28,4--19,4	-28,4-21,3	429 Kpb	CAAAC GCGAC CCTTGA	30,60	TCCGTA TAGITG CGTG	30,68
S2_173776029	29.292	S2_173775864 - S2_173793260	-26,8--25,5	-26,8	-23,5--4,2	-28,0	28,0	-15,9-22,8	-26,8-22,8	-23,5-18,9	17 Kpb	TACCAT CTCACA CGA	27,97	GGAGT CAGAT GCGCG	27,97
S7_17180231	29.292	S7_17180176- S7_17180231	-5,2	-5,2	-5,2	5,9-6,1	-5,2	-5,2	-1,6	-1,6--0,7	55 pb	CAAAG	6,07	TGCTC	6,07
S5_128333604, S5_128333610	224.363	S5_128333162 - S5_128333610	21,2	21,2	21,2	-21,2	-21,2-17,4	-21,2	21,2	21,2	448 pb	AGACC GTTGA	21,16	GAGGG TCCCG	21,16
S8_171634738	224.363	S8_171634732 - S8_171634791	-20,8	-20,8	ND	11,7-21,4	-21,4	-21,4	ND	-21,4	59 pb	ACCGG GTCCG	21,36	GGATT ACGA	21,36
S9_5656122, S9_5656138	224.363	S9_5656122- S9_5656984	-15,2-3,3	-9,5	-12,7--3,5	-12,7--9,4	-12,3--4,8	-14,1--12,3	-12,7--11	-13,5	862 pb	ACCTAT GTA	16,61	GGTGG GACC	16,61
S9_9966270, S9_9966272, S9_9966291	224.363	S9_9966270- S9_9967813	-14,6	14,6	-14,6-9,7	-14,6	14,6	-14,6	14,6	-14,6	1 Kpb	ATTAG	14,60	TCCGA	14,60
S9_11746822	224.363	S9_11733238- S9_11775273	-71,6-35	78,6	-64,9--21,1	-46,3--44,2	-38,3--30,8	-70,1	-66-68,5	-74,6-79,7	42 Kpb	GTACC AGCCC GGGTT AATGT AGATCT GGGCG GCGGG	79,65	ACCTTG TGTACC CCGGG CACCTC CGATA AGAAT CAA	79,65

^a SNPs significativos detectados en la tabla 4.3.13.

^b Significa la base de datos con la que se calculó cada SNP significativo, es decir con la 29.292 SNPs o con la base de datos de 224.363 SNPs.

^c Marcadores flanqueantes del bloque de ligamiento.

^d Cuando había datos perdidos en el efecto aditivo de los parentales se calculó el rango, solo en los SNPs significativos de la base de datos de 224.363 SNPs.

^e Tamaño del QTL en Kpb o pb.

^f Haplotipo que incrementa el efecto aditivo si lleva estos alelos.

^g Haplotipo que disminuye el efecto aditivo si lleva estos alelos.

^h Suma de los efectos aditivos de todos los SNPs significativos en el bloque de ligamiento.



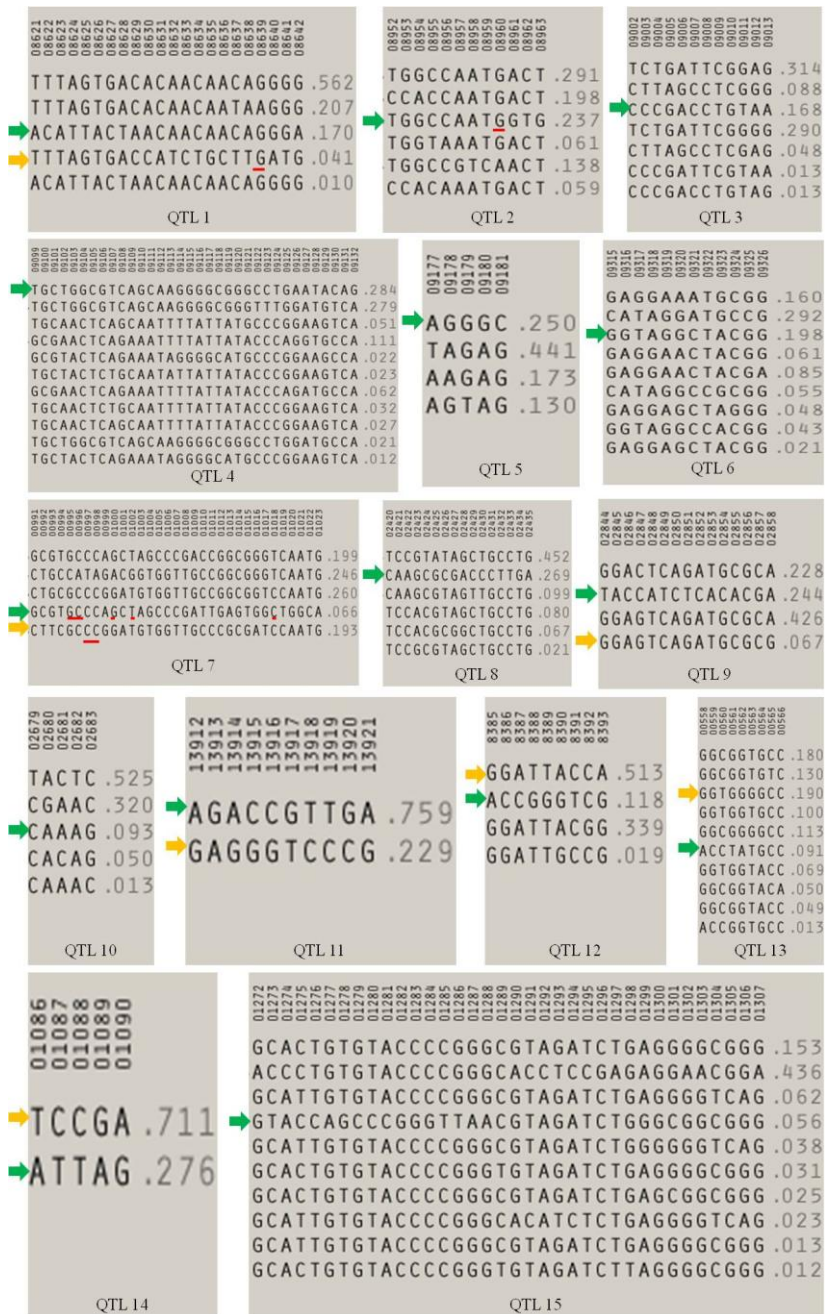


Figura 4.3.14 Haplotipos de los QTL para rendimiento. Los haplotipos que disminuyen significativamente el rendimiento están marcados con flechas amarillas y los haplotipos que incrementan en flechas verdes. Los alelos que no coinciden con el

haplotipo total que disminuye o aumenta el rendimiento están subrayados con línea roja (1, 2 y 7).



DISCUSIÓN





5. DISCUSIÓN

5.1 VALIDACIÓN DE QTL EN UNA POBLACIÓN HIF

El objetivo del presente estudio fue la validación de QTL para longitud de galerías, rendimiento de grano y floración bajo alta infestación que en un trabajo previo realizado por Ordás *et al.* (2010) ya se habían localizado en la región 8.03-8.05 en una población RIL obtenida a partir del cruce EP42 x EP39.

Usando una población de HIF generada a partir de una de las RIL de la población de mapeo inicial, en el presente trabajo se ha confirmado la existencia de un QTL para rendimiento de grano en el bin 8.04, probablemente en la región comprendida entre los 113 y 117 Mpb. En la población RIL original un QTL para rendimiento había sido posicionado entre los marcadores microsatélites *umc1858* [situado entre 111.185.873 y 115.053.540 Mpb en la versión 2 de la secuencia de B73 (B73 RefGen-v2)] y *bnlg1812* [situado entre 135.858.398 y 136.042.717 Mpb en la versión 2 de la secuencia de B73 (B73 RefGen-v2)] que estarían situados en las siguientes posiciones en la versión 2 de la secuencia de B73 (B73 RefGen-v2): entre 135.858.398 y 136.042.717 Mpb. Aunque puede haber más QTL para rendimiento en la región 8.04-8.05 porque hay varias regiones que eran polimórficas entre EP42 y EP39 que han sido fijadas en la población HIF, el intervalo de confianza para el QTL validado en este estudio se ha reducido enormemente, lo que facilitará el mapeo fino del gen o genes que se corresponden con el QTL. El valor aditivo estimado en el análisis de las líneas HIF fue similar, aunque ligeramente superior, al valor estimado en el análisis de la población RIL original (0,3 vs 0,2 Mg ha⁻¹). Además el sesgo de la estima del valor aditivo para este QTL fue moderado (23%) y el QTL se detectó en casi el 87% de las pruebas de validación, lo cual también indica que el QTL es confiable.

En la VC del QTL para rendimiento de grano en la población RIL original, la frecuencia de detección había sido sensiblemente inferior (40%) indicando que la homogenización del fondo genético en las líneas HIF fue efectiva para incrementar la precisión de la detección del QTL (0,87%). La fijación de la mayor parte de los QTL fuera de la región objetivo del análisis en las líneas HIF también condujo a un aumento en la proporción de la varianza fenotípica explicada por el QTL (de 10,7% a

34,9%). Así, la isogenización fue efectiva al aislar el efecto del QTL a pesar de su efecto aditivo moderado y de una heredabilidad para rendimiento de grano también moderada. Huo *et al.* (2016) encontraron que la homogenización del fondo genético producía un similar incremento en la proporción de la varianza fenotípica explicada por un QTL para número de granos, un carácter con heredabilidad alta.

Sin embargo no se consiguió validar satisfactoriamente el QTL para floración femenina, lo cual podría deberse a la fijación en esta región de la región que alberga el QTL durante el desarrollo de las HIF. En la misma región genómica un QTL para floración ha sido consistentemente encontrado en diferentes ambientes y fondos genéticos (Vlăduțu *et al.*, 1999; Buckler *et al.*, 2009; Coles *et al.*, 2010; Salvi *et al.*, 2011; Dell'Acqua *et al.*, 2015) y se han clonado algunos genes con efecto sobre floración que están en la región bajo estudio: a 124 Mpb ZCN8 (Bouchet *et al.*, 2013) y a 134 Mpb Zm-Rap2.7 (Salvi *et al.*, 2007). Precisamente, la región alrededor de los 124 Mpb se fijó en las líneas HIF, lo que podría explicar la falta de éxito al intentar validar el QTL para floración.

El QTL para longitud de galerías no se confirmó en el análisis de las líneas HIF. Otros autores Mideros *et al.* (2014) y Brauner *et al.* (2017) encontraron falta de consistencia en la validación de QTL para resistencia a enfermedades con líneas isogénicas y propusieron diferentes razones para una baja tasa de validación tales como interacción QTL \times ambiente, alto error experimental, sobreestimación de los efectos y falta de poder estadístico. Estas razones no parecen plausibles para el caso de este estudio específico porque un QTL para rendimiento de grano se validó en el mismo experimento aunque el QTL no tuvo un gran efecto en la población RIL original. En el presente estudio, la falla para confirmar el QTL podría deberse a la fijación de los genes de resistencia a los taladros en las líneas HIF. Sin embargo, la región donde el QTL se localizó en la población RIL EP39 \times EP42 (76 Mpb – 136 Mpb) no se fijó en las líneas HIF. Alternativamente, el QTL podría no ser detectado debido a la eliminación de un gran efecto para floración en las líneas HIF. Ya Krakowsky *et al.* (2004) encontró que un QTL de longitud de galerías co-localizaba con un QTL de floración de efecto grande y no se detectó después de ajustar la floración. Por otro lado, un nuevo QTL para longitud de galerías se detectó en las

líneas HIF que no se detectó previamente porque la región no se genotipó en la población RIL EP42 × EP3. Sin embargo, el valor de LOD de este QTL fue pequeño, aunque el QTL se confirmó en la mitad de la VC.

Un QTL para altura de planta se detectó en las líneas HIF que no se detectó en la población RIL original. Este QTL no parece un falso positivo ya que los efectos aditivos estimados usando el conjunto de datos completos, el conjunto de estimación y el conjunto de validación fueron muy similares (en torno a 5 cm). Además, el QTL se detectó en el 95% de la VC y explicó casi el 30% de la varianza fenotípica. La falta de detección para detectar el QTL en la población RIL EP39 × EP42 podría ser debido a la presencia de dos QTL ligados en repulsión. Uno de ellos podría haberse fijado no intencionadamente durante el desarrollo de las líneas HIF, permitiendo la detección del otro.

En la región 8.03-8.05 del cromosoma 8, el QTL para rendimiento de grano, y floración femenina están en el bloque 5 de ligamiento, el QTL para altura de planta en el bloque 3 y el nuevo QTL para longitud de galerías en el bloque 2. Así, el QTL para longitud de galerías y el QTL de rendimiento de grano están en diferentes bloques siendo posible la recombinación entre bloques. Por lo tanto, estos QTL podrían ser usados para mejorar ambas características sin efectos indirectos no deseados.

5.2 MAPEO DE QTL EN UNA POBLACIÓN RIL A637 × A509

5.2.1 Análisis estadístico de los datos fenotípicos

En este estudio, un valor intermedio de heredabilidad $h^2=0,52$ se obtuvo para longitud de galerías, similar a la $h^2=0,49$ obtenida con otras poblaciones RIL infestadas con *S. nonagrioides* (Samayoa *et al.*, 2015a). La heredabilidad para resistencia en grano obtenida en este estudio (0,36), estuvo también en el rango de valores obtenidos por otros investigadores (Samayoa *et al.*, 2015a; Ordás *et al.*, 2009; Santiago *et al.*, 2016; Samayoa *et al.*, 2014). Estudios previos han mostrado que la heredabilidad de la resistencia en tallo a *S. nonagrioides* varía grandemente dependiendo de los ambientes y de las poblaciones RIL, con rangos de $h^2=0,12$ (Santiago *et al.*, 2016) a $h^2=0,77$ (Ordás *et al.*, 2009). Además, las heredabilidades para características agronómicas (que oscilaron entre 0,69 y 0,88) fueron similares a

aquellas las obtenidas por otros autores usando diversas poblaciones RIL bajo infestación con taladros del maíz (Bohn *et al.*, 1996; Bohn *et al.*, 2000; Samayoa *et al.*, 2015a; Ordás *et al.*, 2009; Samayoa *et al.*, 2014; Papst *et al.*, 2001).

Los coeficientes de correlación genética entre longitud de galerías y características agronómicas en este estudio indican que los genotipos susceptibles tendrían mayor rendimiento, plantas más altas y una maduración más tardía que los genotipos resistentes a *S. nonagrioides* como ha sido sugerido previamente por Butrón *et al* (1999). Esto coincide con los resultados de otros estudios (Samayoa *et al.*, 2014 y Malvar *et al.*, 1993). Sin embargo, cabe señalar que algunos autores como Samayoa *et al.*, (2015a) y Ordás *et al.* (2010) no encontraron una correlación genética apreciable entre longitud de galerías y rendimiento. Ordás *et al.* (2013) encontraron una relación negativa entre el daño de los taladros del maíz y el número de días desde la floración hasta la infestación porque plantas más maduras resisten mejor el ataque de las larvas. En este estudio, la infestación artificial se llevó a cabo el mismo día en todas las líneas. Así, las larvas de *S. nonagrioides* se alimentaron de tejido inmaduro durante más tiempo en líneas tardías que en las precoces lo que justificaría el mayor daño que presentaron las líneas más tardías.

5.2.2 Análisis de QTL de características individuales

QTL de resistencia a MCB aparecieron en regiones donde no habían sido previamente encontrados usando otros materiales genéticos, como es habitual cuando se buscan QTL de resistencia en poblaciones biparentales: Esto refuerza la hipótesis del carácter poligénico de esta característica. Sin embargo, el QTL para longitud de galerías causadas por MCB que se localizó en 8.04-8.05 ya había sido reportado en previos estudios con RIL derivadas de una cruce entre líneas españolas (Ordás *et al.*, 2010). Para el QTL en los bins 8.05 y 10.02-10.03, los alelos para reducir la longitud de galerías vienen de la línea A509. Esta línea se clasificó como resistente por Butrón *et al.* (1998b). Sin embargo, la línea susceptible A637 mostró alelos favorables de resistencia para el QTL en el bin 5.01. Estos resultados indican que los genotipos resistentes podrían ser mejorados introduciendo variantes alélicas complementarias que podrían venir de otros genotipos resistentes pero también de algunos susceptibles.

Los efectos aditivos para los tres QTL detectados para longitud de galerías ($\alpha=0,79-1,12$) fueron más bajos a los efectos aditivos reportados hasta ahora ($\alpha=3,73-4,46$) (Ordás *et al.*, 2009), ($\alpha=2,40-2,83$) (Ordás *et al.*, 2010) y a los encontrados en las RIL derivadas de la cruce B73 \times CML103, los cuales fueron más altos ($\alpha=3,0-4,1$) (Samayoa *et al.*, 2015a). Las diferencias en longitud de galerías entre B73 y CML103 fueron mucho más grandes que entre cualquier otro par de líneas parentales, lo cual podría explicar esos efectos aditivos altos detectados en las RIL de estos padres (Samayoa *et al.*, 2015a). El QTL más confiable para longitud de galerías se encontró en los bins 10.02-10.03, donde el análisis VC/G reveló que éste se detectó en el 73% de la VC/G. Este QTL en el cromosoma 10 también se encontró que estaba relacionado con el daño del tallo.

Para resistencia en grano, se encontró un único QTL en el cromosoma 9 en el bin 9.07 y explicó más del 20% de la varianza genética. En el mismo cromosoma, en los bins 9.02-9.04, Santiago *et al.* (2016) había reportado un QTL para resistencia en grano que explicó el 20% de la varianza genética. Otros estudios de QTL habían reportado QTL para resistencia en grano a *S. nonagrioides* en los cromosomas 2, 3, 4, 5, 6, 7, y 8 (Santiago *et al.*, 2016; Samayoa *et al.*, 2015a; Samayoa *et al.*, 2014; Ordás *et al.*, 2009). El efecto aditivo para resistencia en grano fue 0,07, menor a los reportados por otros autores, donde osciló de 0,15 a 0,40 (Samayoa *et al.*, 2015a; Ordás *et al.*, 2009). Y esto es un poco inesperado porque a diferencia de los otros cruzamientos, se esperaba que A509 \times A637 diera lugar a una población RIL que segregara ampliamente para este carácter porque A509 mostró cierta resistencia al daño en grano y A637 sin embargo era susceptible (Butrón *et al.*, 1998b).

Un único QTL para rendimiento se localizó en el bin 8.04. Esta región del cromosoma 8 podría contener genes clave para el rendimiento debido a que QTL con efecto aditivo sobre el rendimiento y/o con efecto de dominancia aumentada sobre heterosis para rendimiento se han localizado en diferentes poblaciones, por lo tanto esta región podría ser considerada como un “hot spot” para rendimiento y heterosis (Ordás *et al.*, 2010; Schön *et al.*, 2010; Samayoa *et al.*, 2017).

Un QTL para floración femenina en los bins 8.04-8.05 se encontró y demostró ser muy importante porque se detectó en el 84% de la VC/G; esto

corresponde con los resultados obtenidos por otros autores que encontraron importantes QTL para floración en el bin 8.05 en diferentes fondos genéticos (Ordás *et al.*, 2009; Ordás *et al.*, 2010; Samayoa *et al.*, 2014), y podría corresponder con el locus “*vegetative to generative transition1*” (*Vgt1*) en el cromosoma 8 que ha sido posicionado a 132 Mpb, un gen mayor para tiempo de floración, el cual ha sido clonado en maíz (Salvi *et al.*, 2002; Salvi *et al.*, 2007).

En este estudio se identificaron tres QTL para altura de planta en los bins 2.04, 4.02, y 8.04-8.05. Veldboom y Lee, (1996) habían encontrado un QTL para altura de planta en la misma región del cromosoma 2; Cai *et al.* (2012a) un QTL en el bin 4.01; Samayoa *et al.* (2014) en el bin 8.05; y Wei *et al.* (2009) un QTL en el bin 8.03. Un posible gen candidato para el QTL en el cromosoma 2 podría ser el gen *bm6* porque Chen *et al.* (2012) confirmó la posición del gen *bm6* que es una nueva mutación *bm* (Ali *et al.*, 2010) con efecto sobre altura de planta y digestibilidad de la pared celular en el bin 2.02.

5.2.3 Análisis de QTL de índices

Los índices han sido ampliamente usados para mejorar dos o más características simultáneamente. Sandoya *et al.* (2008) usaron un índice para mejorar resistencia mientras mantenía el rendimiento en la población EPS12. El método fue efectivo en los primeros tres ciclos de selección pero el rendimiento disminuyó en subsecuentes ciclos (Butrón *et al.*, 2012). Una desfavorable correlación genética entre longitud de galerías y rendimiento se confirmó y los resultados desaconsejan la selección fenotípica para reducir la longitud de galerías por *S. nonagrioides* sin pérdidas de rendimiento. Una alternativa a la selección fenotípica podría ser el uso de la selección asistida por marcadores para el QTL que afecta la resistencia a *S. nonagrioides* y rendimiento. Por lo tanto, se han buscado QTL para diferentes índices combinando resistencia en tallo y mazorca y rendimiento.

Los QTL para índices deberían ser explorados para mejorar algunas características simultáneamente. El ajuste final del índice R+rg-lg reveló la presencia de dos QTL en el bin 1.10, y 10.02-10.03. El QTL encontrado para el índice permite identificar el alelo favorable para mejorar ambas características simultáneamente,

resistencia y rendimiento. Los QTL para características individuales, que son parte de los índices, habían sido previamente encontrados en el bin 1.10 pero solo para una característica en diferentes poblaciones RIL. Así, Samayoa *et al.* (2015a) encontraron un QTL relacionado con rendimiento de grano en el bin 1.10, Quero *et al.* (2004) encontró un QTL relacionado a resistencia en grano. En esta población no se encontraron QTL significativos en el bin 1.10 ni para resistencia a *S. nonagrioides* ni para rendimiento. Por otro lado Cai *et al.* (2012b) encontraron un QTL para rendimiento de grano en el bin 10.03-10.04 que podría estar relacionado con el QTL para R+rg-lg en la región 10.02-10.03. En nuestro trabajo, también encontramos un QTL significativo para longitud de galerías en esta región. Ambos QTL para índices probablemente podrían ser usados en MAS para mejorar rendimiento y resistencia en tallo y mazorca.

El análisis final para el índice R-lg reveló dos QTL en los cromosomas 5 y 10. El alelo favorable en el bin 5.04 y en el bin 10.03 viene de A509 y serán útiles para incrementar el rendimiento y reducir la longitud de galerías en un programa de MAS, estos QTL no afectan a la resistencia en grano. Samayoa *et al.* (2014) encontraron un QTL para rendimiento bajo infestación con *S. nonagrioides* en el bin 5.03 en una población RIL derivada de EP42 × A637, con A637 llevando el alelo favorable. El bin 5.04 podría albergar variantes genéticas controlando rendimiento y resistencia en tallo ya que varios autores previamente han encontrado QTL para estas características en la misma región (bins 5.03-5.04) en diferentes poblaciones biparentales (Cai *et al.*, 2012a; Cai *et al.*, 2012b). Por lo tanto, esto podría ser interesante para realizar estudios adicionales en esta región para dilucidar las relaciones entre rendimiento y resistencia a *S. nonagrioides* en tallo.

Un QTL para el índice R+rg se encontró en el cromosoma 8 (85 cM), pero está cerca del QTL para longitud de galerías (bin 8.05). El alelo favorable incrementó rendimiento y resistencia en grano, pero incrementó también longitud de galerías.

5.2.4 Análisis de QTL conjunto

El análisis de QTL conjunto de varios caracteres corroboró los resultados del análisis de correlación porque se encontró una región en la que co-localizaron QTL

para rendimiento, longitud de galerías, floración y altura de planta. Los alelos de A637 serían responsables de retrasar la maduración e incrementar el rendimiento, la altura de planta y la longitud de galerías con respecto a los alelos de A509. Por lo tanto, otras características además del rendimiento tales como altura de planta, deberían ser examinadas para clarificar la relación negativa entre rendimiento y resistencia.

5.3 MAPEO DE ASOCIACIÓN EN UNA POBLACIÓN MAGIC

5.3.1 Análisis estadístico de datos fenotípicos

En la formación de poblaciones MAGIC es muy importante la selección de los parentales, los cuales deben contener las características de interés que se están persiguiendo mapear o mejorar (Ladejobi *et al.*, 2016). Los parentales de la MAGIC difirieron significativamente para longitud de galerías, resistencia en grano, días a floración femenina, rendimiento y altura de planta por lo que parece que esta población sea idónea para buscar QTL para todos estos caracteres.

La heredabilidad para los caracteres de resistencia se consideró baja, entre 0,24 y 0,30, mientras que para los caracteres agronómicos fue moderada-alta oscilando entre 0,53 y 0,84. La heredabilidad para longitud de galerías estimada en este estudio se encuentra dentro del rango de aquellas obtenidas en estudios previos con poblaciones biparentales bajo infestación ya sea con *S. nonagrioides* u *O. nubilalis* (Schön *et al.*, 1993; Bohn *et al.*, 2000); Ordás *et al.*, 2009); así mismo las heredabilidades reportadas para las características agronómicas de floración femenina, rendimiento y altura de planta son similares a las reportadas por otros autores (Bohn *et al.*, 1996; Bohn *et al.*, 2000; Ordás *et al.*, 2009; Samayoa *et al.*, 2015a; Samayoa *et al.*, 2014; Papst *et al.*, 2001).

5.3.2 Análisis de correlación

Se detectó una correlación genética moderada, positiva y significativa en las líneas MAGIC entre longitud de galerías y altura de planta ($r_g = 0,67$). Respaldando esta correlación se encontraron dos SNPs en los cromosomas 3 (S3_191332395) y 4 (S4_156193095) relacionados con longitud de galerías que están relativamente cerca

de SNPs significativos para altura de planta (S3_184059175 y S4_159994299). Esta relación entre altura de planta y longitud de galerías no siempre se observa en poblaciones segregantes biparentales como en diversos estudios previos llevados a cabo tanto bajo infestación con *S. nonagrioides* como con *O. nubilalis* (Schön *et al.*, 1993; Cardinal *et al.*, 2001; Krakowsky *et al.*, 2004; Ordás *et al.*, 2010). Y otras veces sí (Ordás *et al.*, 2010; Samayoa *et al.*, 2015a; Samayoa *et al.*, 2015b).

También se encontró una correlación genética positiva entre longitud de galerías y rendimiento ($r_g = 0,53$), lo que significa en forma general, que al incrementar el rendimiento se incrementa la longitud de galerías y la altura de planta, acorde con resultados previos (Jiménez-Galindo *et al.*, 2017). Sin embargo no se encontró ningún SNP significativo en común entre longitud de galerías y rendimiento. En otros estudios ocurre lo mismo la longitud de galerías esta correlacionada positivamente con la altura de planta como en los estudios de Samayoa *et al.* (2015a), Samayoa *et al.* (2015b) y Jiménez-Galindo *et al.* (2017) y por lo tanto está claro que cada vez más la relación entre rendimiento y galerías podría deberse a la relación con la altura de planta. Reforzando esta relación en este estudio de la MAGIC se encontró un SNP significativo en común para rendimiento y altura de planta en el cromosoma 1, posición S1_201847366 con efecto aditivo teórico para el haplotipo donde se localizó el SNP de 58.8 cm en altura de planta y 54,3 g planta⁻¹.

Así mismo esto significa que la longitud de galerías está ligada a plantas más altas y tardías lo cual está acorde con Jiménez-Galindo *et al.* (2017) que explica que plantas tardías y altas podrían tener tallos verdes para la alimentación de las larvas de ECB, las cuales están por más tiempo comiendo dentro del tallo y por lo tanto causando galerías más largas. El hecho de encontrar una asociación entre precocidad y resistencia podría no deberse a la presencia de genes ligados (aunque no se excluye) para ambos caracteres sino al hecho de que las plantas tempranas alcanzan antes el estado de madurez en el que la resistencia se incrementa por efecto de cambios fisiológicos tales como la lignificación de los tejidos (Ordás *et al.*, 2013).

5.3.3 Análisis de asociación

Dell'Acqua *et al.* (2015) y colaboradores presentaron el análisis de la primera

población MAGIC en maíz; y en ella analizaron caracteres como altura de planta y rendimiento, pero ninguno relacionado con resistencia a estreses. La población MAGIC ofrece algunas propiedades únicas para facilitar el análisis genético de características complejas como el rendimiento y la resistencia a estreses.

Tanto las poblaciones MAGIC (Holland, 2015) como los paneles de asociación (Samayoa *et al.*, 2015b), genotipados con un elevado número de marcadores, ofrecen ventajas considerables comparados con poblaciones biparentales, ya que la resolución es incomparable debido al menor desequilibrio de ligamiento que presentan las líneas y permiten reducir el intervalo de confianza del QTL de manera que sea posible, en muchos casos, obtener una lista reducida de genes candidatos (no más de una decena frente a los cientos o miles de genes que pueden albergar los QTL de poblaciones bi-parentales) con los que hacer validaciones.

En el estudio de esta MAGIC se encontraron 6 genes candidatos para resistencia en grano, 68 para altura de planta, 51 para floración femenina, 10 para longitud de galerías y 26 para rendimiento. En un panel de asociación de aproximadamente 270 líneas de origen diverso se encontraron 7 genes candidatos para longitud de galerías, 4 genes para proporción del tallo dañado y 10 genes para resistencia en grano (Samayoa *et al.*, 2015b). Se encontraron menos número de genes candidatos, para resistencia, en dicho panel de asociación descrito por Samayoa *et al.* (2015b) que en la MAGIC del presente estudio, probablemente porque los parentales de la MAGIC se seleccionaron porque presentaban diversos mecanismos de resistencia a MCB. Por ejemplo Dell'Acqua *et al.* (2015) encontró 32 para altura de planta, 29 para floración (caída de polen) y 8 genes candidatos para rendimiento.

En el análisis de asociación se observó una mínima variación entre los caracteres en el ajuste del MLM comprimido porque los niveles de compresión fueron similares para todos los caracteres ($c = 1,08$ a $1,32$ y $c = 1,0$ a $1,22$ para la base de datos de 29.292 y 224.363 SNPs respectivamente), excepto para resistencia en grano, el cual tuvo el valor más alto del nivel de compresión ($c = 16,7$ y $c = 17,7$ para la base de datos de 29.292 y 224.363 SNPs respectivamente). Por lo tanto la variabilidad genética aleatoria para resistencia en grano podría reducirse menos que para otros caracteres cuando se introduce la matriz de parentesco entre grupos porque, al ser

mayor el número de individuos por grupo, quedaría más variabilidad aleatoria dentro del grupo. Sin embargo, ha sido demostrado que este método controla bien la tasa de falsos positivos cuando los niveles de compresión son de 1,5 a 10 (Zhang *et al.*, 2010) por lo tanto especialmente en este carácter podrían darse falsas asociaciones en el presente estudio.

5.3.4 Desequilibrio de ligamiento de la población MAGIC

En comparación con las RIL biparentales, las poblaciones MAGIC eliminan la subestructura de la población, produciendo líneas homocigóticas estables. Los múltiples inter-cruzamientos en las generaciones tienen el efecto útil añadido de la introducción de más recombinaciones a lo largo de los cromosomas dentro de la población, lo que significa que los bloques de cromosomas heredados por cada línea son reducidos en tamaño comparados con los de los genomas de los padres, permitiendo así que los genetistas desacoplen mejor los efectos de genes ligados (Holland, 2015). Así en el estudio de esta MAGIC se encontraron bloques de ligamiento más pequeños, menores a 1.000.000 pb (1000 Kpb) comparados a los encontrados en la MAGIC hecha por Dell'Acqua *et al.* (2015) que encontraron bloques de ligamiento de más de 1.000.000 pb (1000 Kpb). Por ejemplo para altura de planta en esta MAGIC se encontraron 4 SNPs S8_71975885, S8_73852929, S8_73852948, S8_79127682 y el primero está dentro del bloque de ligamiento S8_71974428-S8_71976197, el segundo y el tercero dentro del bloque de ligamiento S8_73852561-s8_73896818 y el cuarto está localizado dentro del bloque de ligamiento S8_78852104-S8_79149894 con longitudes de 1.769 pb (1 Kpb), 44.257 pb (44 Kpb) y 297.790 pb (197 Kpb) respectivamente. Y estos SNPs y haplotipos concuerdan con los detectados por Dell'Acqua *et al.* (2015) en las posiciones S8_71816698-S8_159332310, S8_73370838-S8_148182549, S8_77927153-S8_100721032 con longitudes de 87515612 pb (87.515 Kpb), 74811711 pb (74.811 Kpb) y 22.793.879 pb (22.793 Kpb) respectivamente. Esto puede ser posible debido a la forma de construcción de la presente MAGIC en la cual se le hicieron seis recombinaciones, a diferencia de la de Dell'Acqua *et al.* (2015) y colaboradores en donde no se hicieron las recombinaciones.

5.3.5 SNPs significativos para resistencia en grano

Para resistencia en grano se encontraron 2 SNPs en el cromosoma 3 S3_220658669 y S3_220658703 que están relativamente cerca del detectado por Samayoa *et al.* (2015b) para resistencia en grano localizado en S3_222733400.

5.3.6 Genes candidatos por cada SNP significativo para resistencia en grano

El SNP asociado significativamente a la resistencia en grano en el cromosoma 9 (S9_147511039) está localizado dentro del gen candidato GRMZM2G178190. Este gen codifica para el polipeptido GRMZM2G178190 (“Polypeptide: GRMZM2G178190”) que codifica para una proteína macrofágica asociada a la resistencia natural (“Natural-resistance-associated-macrophage-protein NRAMP”) también conocido como transportador de metal divalente y se ha reportado que desempeñan papeles importantes en la absorción y traslocación de hierro ferroso (Nozoye *et al.*, 2013) con lo cual al estar relacionado con la activación de los macrófagos puede estar relacionado con la resistencia en el grano del maíz. En los mamíferos, la proteína NRAMP-1 regula la activación de los macrófagos y la actividad antimicrobiana (Blackwell y Searle, 1999; Blackwell *et al.*, 2000). Tras el daño o la infección del tejido, los monocitos se reclutan rápidamente al tejido, donde se diferencian en macrófagos de tejido y llevan a cabo las funciones protectoras fundamentales de ingerir y matar a los organismos invasores (Johnston Jr, 1988). Esta asociación encontrada con la resistencia en grano podría indicar que esta proteína podría tener una actividad similar en plantas como se describe en los mamíferos. Este gen necesita una validación y profundizar en la función que podría tener en plantas. Así mismo el SNP localizado en el cromosoma 10 (S10_136106669) se localiza dentro del gen candidato GRMZM2G040359. Este gen codifica para la enzima triacilglicerol lipasa (“Triacylglycerol lipase”). La degradación de Triacylglycerol es crítico para muchas plantas para las cuales los lípidos en lugar de los carbohidratos son las principales reservas de almacenamiento en semillas. El desglose de los lípidos de almacenamiento de semillas proporciona esqueletos de carbono y energía que pueden impulsar el crecimiento post-germinativo de las plantas antes de que el

sistema radicular de la planta y la capacidad fotosintética estén plenamente establecidos (www.maizegdb.org).

5.3.7 SNPs significativos para altura de planta

Para altura de planta se encontraron 4 SNPs S8_71975885, S8_73852929, S8_73852948, S8_79127682 que concuerdan con los detectados por Dell'Acqua *et al.* (2015) en las posiciones S8_71816698-S8_159332310, S8_73370838-S8_148182549, S8_77927153-S8_100721032. Dell'Acqua *et al.* (2015) reportaron resultados de QTL para rendimiento, altura de planta y altura de mazorca usando una población MAGIC con ocho líneas puras como parentales (A632, B73, B96, F7, H99, HP301, Mo17, W153R).

5.3.8 SNPs significativos para floración femenina

Para la característica de floración femenina se encontró un SNP significativo en el cromosoma 1 en S1_44346106 que está cerca de un SNP encontrado por Dell'Acqua *et al.* (2015) entre S1_45777368-S1_71152615. También se encontraron dos SNPs significativos en el cromosoma 8 en la posición S8_121797765 y el segundo en S8_124358657 cercanos a un SNP detectado por Dell'Acqua *et al.* (2015) en S8_122680653-S8_124187533.

5.3.9 SNPs significativos para longitud de galerías

En este estudio de la población MAGIC no se encontraron SNPs cercanos a los detectados en el panel americano de asociación para longitud de galerías analizado por Samayoa *et al.* (2015b) posiblemente debido al fondo genético ya que el panel es un grupo de 302 líneas de diversas partes del mundo y la MAGIC se formó con solo 8 padres fundamentalmente pertenecientes al grupo de germoplasma liso europeo pero todos seleccionados con variabilidad en rendimiento (Butrón *et al.*, 2009a) y todos con diferentes mecanismos de resistencia a MCB. La proporción de la varianza fenotípica explicada ($R^2 = 3-6\%$) por cada SNP significativamente asociado a longitud de galerías fue comparable con la proporción de la varianza fenotípica explicada por los QTL para longitud de galerías hechas por *O. nubilalis* y *S.*

nonagrioides ($R^2 = 3,5-15,7\%$) en poblaciones derivadas de cruces biparentales (Schön *et al.*, 1993; Bohn *et al.*, 2000; Cardinal *et al.*, 2001; Ordás *et al.*, 2009).

5.3.10 Genes candidatos por cada SNP significativo para longitud de galerías

El SNP asociado significativamente a la longitud de galerías en el cromosoma 3 (S3_191332395), dentro de los marcadores flanquantes (S3_191332395-S3_191454736) y este QTL está en parte localizado dentro del gen candidato GRMZM2G057140 (191.413.501-191.491.654). Este gen codifica una enzima: fosfatasa ácida (“Acid phosphatase (Catalysis of the reaction: an orthophosphoric monoester + H₂O = an alcohol + phosphate, with an acid pH optimum”), utilizada en la regeneración de la pared celular de las plantas (www.maizegdb.org). El papel de la pared celular como defensa frente al ataque de los taladros ya ha sido descrito, en concreto para la PB130 y la EP125, ambas parentales de la MAGIC (Barros-Rios *et al.*, 2015; Santiago *et al.*, 2016). El SNP asociado significativamente a la longitud de galerías en el cromosoma 5 (S5_24771445) localizado dentro del bloque de ligamiento (S5_24618080-S5_24861720) y éste está localizado en parte dentro del gen candidato GRMZM2G073351 (24.861.190-24.863.632). El gen codifica para la enzima: 2,3-dihidro-2,3-dihidroxibenzoato deshidrogenasa (“2,3-dihydro-2,3-dihydroxybenzoate dehydrogenase”), un proceso metabólico que resulta en la eliminación o adición de uno o más electrones hacia o desde una sustancia, con o sin la eliminación o adición concomitante de un protón o protones (www.maizegdb.org). También se le ha relacionado con la biosíntesis de clorofila y protochlorophyllide reductasa (Kretschmer *et al.*, 2016). El SNP localizado en el cromosoma 5 (S5_57432767) se localiza dentro del gen candidato GRMZM2G317900 (57.427.815-57.434.823). Este gen codifica para el polipeptido (“Polypeptide: GRMZM2G317900”) (www.maizegdb.org; Plavskin y Timmermans, 2012). El gen candidato GRMZM2G317900 codifica factores de respuesta de auxinas pertenecientes a la familia de auxina / ácido indol-3-acético (Xin *et al.*, 2013). Este gen está relacionado también con el desarrollo de órganos florales y de follaje (Finet *et al.*, 2010; Tabata *et al.*, 2010). Los genes candidatos GRMZM5G886288, GRMZM2G134072, GRMZM2G032648, GRMZM2G034276, GRMZM2G338853 y

GRMZM2G170805 codifican para polipeptidos (proteínas no caracterizadas).

5.3.11 SNPs significativos para rendimiento

Para rendimiento Dell'Acqua *et al.* (2015) encontraron SNPs significativos en los cromosomas 4, 6 y 10 y en el presente estudio se encontraron en los cromosomas 1, 2, 5, 7, 8 y 9 sin concordar en ninguno de ellos debido posiblemente a que los fondos genéticos utilizados son muy diferentes y, dado que el rendimiento es un carácter enormemente poligénico, los genes que más influyen en la variabilidad para el carácter en una y otra población pueden ser totalmente distintos.

5.3.12 Diseño de un programa de mejora genética

Con los 5 QTL detectados para longitud de galerías se pueden realizar dos cosas muy importantes 1) localización de genes candidatos para cada SNP y QTL donde se encuentra el SNP y su posterior validación y 2) desarrollar un programa de mejora genética utilizando la selección asistida por marcadores para buscar líneas que tengan los 5 haplotipos, que disminuyen la longitud de galerías primero directamente en la base de datos de genotipado y después con el uso de la selección asistida por marcadores o para disminuir la longitud de galerías sin descuidar los QTL de mayor efecto aditivo en rendimiento, mejorando así favorablemente ambos caracteres.



CONCLUSIONES





6. CONCLUSIONES

6.1 VALIDACIÓN DE QTL EN UNA POBLACIÓN HIF

1. Las familias HIF se pueden considerar como un método efectivo para confirmar QTL como por ejemplo para rendimiento de grano bajo alta infestación detectado en la región 8.04.
2. Ciertos QTL no se pueden validar porque se producen fijaciones durante la formación de las familias en las zonas donde se había mapeado previamente como por ejemplo el QTL para floración.
3. El análisis de las HIF permitió la detección de nuevos QTL como por ejemplo para altura de planta, que no se había detectado previamente probablemente debido a la segregación de múltiples genes ligados en repulsión en la población biparental original.
4. Nuevos QTL se pueden encontrar también si en la región analizada hay zonas que no se había genotipado previamente como el QTL para longitud de galerías encontrado en la región 8.03-8.04.

6.2 MAPEO DE QTL EN UNA POBLACIÓN RIL A637 × A509

1. La región en el cromosoma 10 (bin 10.02-10.03) y en el cromosoma 5 (bin 5.04) son nuevas regiones que podrían ser la clave para dilucidar la asociación entre rendimiento, otras características agronómicas y resistencia a MCB. Por lo tanto, se recomienda el mapeo fino en esas regiones para buscar genes de rendimiento y resistencia a los taladros del maíz.
2. La selección de genotipos con el alelo favorable para el QTL en el cromosoma 5 (bin 5.01) disminuiría la longitud de galerías sin afectar al rendimiento, la floración ni la altura de planta. Del mismo modo, el QTL en el bin 9.07 podría ser usado para mejorar la resistencia en mazorca al ataque de MCB pero esto podría conllevar un retraso en la floración.
3. Los QTL de índices como el detectado en la región 5.04 podrían ser usados en programas de MAS para mejorar resistencia en tallo y rendimiento y las regiones 1.10 y 10.02-10.03 podrían mejorar también resistencia en mazorca.

6.3 MAPEO DE ASOCIACIÓN EN UNA POBLACIÓN MAGIC

1. Esta población MAGIC es altamente idónea para llevar a cabo con ella análisis de GWAS y búsqueda de genes, dada la variabilidad detectada entre los parentales y en las propias líneas MAGIC para los caracteres agronómicos y de resistencia al ataque de MCB, así como el bajo desequilibrio de ligamiento observado.
2. Al seleccionar para incrementar el rendimiento se espera que se incrementen también la longitud de galerías y la altura de planta debido a la correlación genética entre estos caracteres. Destaca el papel de la altura de planta en la relación resistencia-rendimiento.
3. El mapeo de asociación de la población MAGIC descubre regiones genómicas con mayor precisión involucradas en la resistencia a MCB que no se detectaron anteriormente lo que confirma la ventaja de las generaciones de recombinación en las poblaciones MAGIC.
4. El gen GRMZM2G178190 relacionado con la resistencia natural podría intervenir en la resistencia de la mazorca y el gen GRMZM2G057140 que está relacionado con la regeneración de la pared celular y podría estar relacionado con la resistencia en caña al ataque de los taladros.
5. Se puede diseñar un programa de mejora genética con los 5 QTL detectados para longitud de galerías utilizando la selección asistida por marcadores para disminuir la longitud de galerías sin descuidar los QTL para rendimiento, mejorando así favorablemente ambos caracteres.

BIBLIOGRAFÍA





7. BIBLIOGRAFÍA

- Agusti N., Bourguet D., Spataro T., Delos M., Eychenne N., Folcher L. y Arditi R. (2005) Detection, identification and geographical distribution of European corn borer larval parasitoids using molecular markers. *Molecular Ecology* 14:3267-3274.
- Ali F., Scott P., Bakht J., Chen Y. y Lübberstedt T. (2010) Identification of novel brown midrib genes in maize by tests of allelism. *Plant breeding* 129:724-726.
- Avantaggiato G., Quaranta F., Desiderio E. y Visconti A. (2003) Fumonisin contamination of maize hybrids visibly damaged by *Sesamia*. *Journal of the Science of Food and Agriculture* 83:13-18. DOI: 10.1002/jsfa.1272.
- Bandillo N., Raghavan C., Muyo P.A., Sevilla M.A.L., Lobina I.T., Dilla-Ermita C.J., Tung C.-W., McCouch S., Thomson M. y Mauleon R. (2013) Multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations in rice: progress and potential for genetics research and breeding. *Rice* 6:11.
- Barrett J.C. (2009) Haploview: Visualization and analysis of SNP genotype data. *Cold Spring Harbor Protocols* 2009:pdb. ip71.
- Barrett J.C., Fry B., Maller J. y Daly M.J. (2005) Haploview: analysis and visualization of LD and haplotype maps. *Bioinformatics* 21:263-265.
- Barros-Rios J., Santiago R., Jung H.J.G. y Malvar R.A. (2015) Covalent Cross-Linking of Cell-Wall Polysaccharides through Esterified Diferulates as a Maize Resistance Mechanism against Corn Borers. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 63:2206-2214. DOI: 10.1021/jf505341d.
- Basten C., Weir B. y Zeng Z. (2001) QTLCartographer (Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC), Version.
- Bates S.L., Zhao J.-Z., Roush R.T. y Shelton A.M. (2005) Insect resistance management in GM crops: past, present and future. *Nature biotechnology* 23:57-62.
- Bayram A., Ozcan H. y Kornosor S. (2005) Effect of cold storage on the performance of *Telenomus busseolae* Gahan (Hymenoptera : Scelionidae), an egg

- parasitoid of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre) (Lepidoptera : Noctuidae). *Biological Control* 35:68-77. DOI: 10.1016/j.biocontrol.2005.06.007.
- Beavis W.D. (1998) QTL analyses: power, precision, and accuracy. *Molecular dissection of complex traits* 1998:145-162.
- Bernacchi D., Beck-Bunn T., Emmatty D., Eshed Y., Inai S., Lopez J., Petiard V., Sayama H., Uhlig J. y Zamir D. (1998) Advanced backcross QTL analysis of tomato. II. Evaluation of near-isogenic lines carrying single-donor introgressions for desirable wild QTL-alleles derived from *Lycopersicon hirsutum* and *L. pimpinellifolium*. *Theoretical and Applied Genetics* 97:170-180.
- Bian Y., Yang Q., Balint-Kurti P.J., Wisser R.J. y Holland J.B. (2014) Limits on the reproducibility of marker associations with southern leaf blight resistance in the maize nested association mapping population. *BMC genomics* 15:1068.
- Blackwell J.M. y Searle S. (1999) Genetic regulation of macrophage activation: understanding the function of Nramp1 (= Ity/Lsh/Bcg). *Immunology letters* 65:73-80.
- Blackwell J.M., Searle S., Goswami T. y Miller E.N. (2000) Understanding the multiple functions of Nramp1. *Microbes and infection* 2:317-321.
- Bohn M., Khairallah M., González-de-León D., Hoisington D., Utz H., Deutsch J., Jewell D., Mihm J. y Melchinger A. (1996) QTL mapping in tropical maize: I. Genomic regions affecting leaf feeding resistance to sugarcane borer and other traits. *Crop Science* 36:1352-1361.
- Bohn M., Schulz B., Krepis R., Klein D. y Melchinger A. (2000) QTL mapping for resistance against the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* H.) in early maturing European dent germplasm. *TAG Theoretical and Applied Genetics* 101:907-917.
- Bouchet S., Servin B., Bertin P., Madur D., Combes V., Dumas F., Brunel D., Laborde J., Charcosset A. y Nicolas S. (2013) Adaptation of maize to temperate climates: mid-density genome-wide association genetics and diversity patterns reveal key genomic regions, with a major contribution of the Vgt2 (ZCN8) locus. *PLoS One* 8:e71377.

- Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y. y Buckler E.S. (2007) TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23:2633-2635.
- Brauner P.C., Melchinger A.E., Schrag T.A., Utz H.F., Schipprack W., Kessel B., Ouzunova M. y Miedaner T. (2017) Low validation rate of quantitative trait loci for Gibberella ear rot resistance in European maize. *Theoretical and Applied Genetics* 130:175-186.
- Broekgaarden C., Snoeren T.A., Dicke M. y Vosman B. (2011) Exploiting natural variation to identify insect-resistance genes. *Plant biotechnology journal* 9:819-825.
- Buckler E.S., Holland J.B., Bradbury P.J., Acharya C.B., Brown P.J., Browne C., Ersoz E., Flint-Garcia S., Garcia A. y Glaubitz J.C. (2009) The genetic architecture of maize flowering time. *Science* 325:714-718.
- Butrón A., Malvar R., Cartea M., Ordás A. y Velasco P. (1999) Resistance of maize inbreds to pink stem borer. *Crop science* 39:102-107.
- Butrón A., Malvar R.A., Velasco P., Cartea M.E. y Ordás A. (1998a) Combining abilities and reciprocal effects for maize ear resistance to pink stem borer. *Maydica* 43:117-122.
- Butrón A., Malvar R.A., Velasco P., Revilla P. y Ordás A. (1998b) Defense mechanisms of maize against pink stem borer. *Crop Science* 38:1159-1163.
- Butrón A., Malvar R.A., Velasco P., Vales M.I. y Ordás A. (1999) Combining abilities for maize stem antibiosis, yield loss, and yield under infestation and non infestation with pink stem borer. *Crop Science* 39:691-696.
- Butrón A., Revilla P., Romay M.C., Ordás A. y Malvar R.A. (2009a) Causes of agronomic differences between synthetics developed by the random and convergent cross methods. *Field Crops Research* 110:229-234. DOI: 10.1016/j.fcr.2008.09.003.
- Butrón A., Romay M.C., Pena-Asin J., Alvarez A. y Malvar R.A. (2012) Genetic Relationship Between Maize Resistance to Corn Borer Attack and Yield. *Crop Science* 52:1176-1180. DOI: 10.2135/cropsci2011.11.0584.
- Butrón A., Sandoya G., Revilla P. y Malvar R.A. (2009b) Genetics of resistance to

- the pink stem borer (*Sesamia nonagrioides*) in maize (*Zea mays*). *Annals of Applied Biology* 154:205-217. DOI: 10.1111/j.1744-7348.2008.00284.x.
- Butrón A., Santiago R., Mansilla P., Pintos-Varela C., Ordás A. y Ana Malvar R. (2006) Maize (*Zea mays* L.) genetic factors for preventing fumonisin contamination. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 54:6113-6117. DOI: 10.1021/jf0611163.
- Butrón A., Tarrío R., Revilla P., Malvar R.A. y Ordás A. (2003) Molecular evaluation of two methods for developing maize synthetic varieties. *Molecular Breeding* 12:329-333. DOI: 10.1023/B:MOLB.0000006718.11324.4f.
- Butrón A., Velasco P., Ordás A. y Malvar R.A. (2004) Yield evaluation of maize cultivars across environments with different levels of pink stem borer infestation. *Crop Science* 44:741-747.
- Cai H., Chu Q., Gu R., Yuan L., Liu J., Zhang X., Chen F., Mi G. y Zhang F. (2012a) Identification of QTLs for plant height, ear height and grain yield in maize (*Zea mays* L.) in response to nitrogen and phosphorus supply. *Plant breeding* 131:502-510.
- Cai H., Chu Q., Yuan L., Liu J., Chen X., Chen F., Mi G. y Zhang F. (2012b) Identification of quantitative trait loci for leaf area and chlorophyll content in maize (*Zea mays*) under low nitrogen and low phosphorus supply. *Molecular breeding* 30:251-266.
- Campagne P., Kruger M., Pasquet R., Ru B. y Berg J. (2013) Dominant inheritance of field-evolved resistance to Bt corn in *Busseola fusca*. *PLoS One* 8. DOI: 10.1371/journal.pone.0069675.
- Camus-Kulandaivelu L., Veyrieras J.-B., Madur D., Combes V., Fourmann M., Barraud S., Dubreuil P., Gouesnard B., Manicacci D. y Charcosset A. (2006) Maize adaptation to temperate climate: relationship between population structure and polymorphism in the Dwarf8 gene. *Genetics* 172:2449-2463.
- Cardinal A.J., Lee M., Sharopova N., Woodman-Clikeman W.L. y Long M.J. (2001) Genetic mapping and analysis of quantitative trait loci for resistance to stalk tunneling by the European corn borer in maize. *Crop Science* 41:835-845.
- Cartea M.E., Malvar R.A., Butrón A., Vales M.I. y Ordás A. (1999) Inheritance of

- antibiosis to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera : Noctuidae) in maize. *Journal of Economic Entomology* 92:994-998.
- Cartea M.E., Malvar R.A., Revilla P., Ordás A. y Alvarez A. (1994) Seasonal occurrence and response of maize inbred lines to pink stem borer in the northwest of Spain. *Maydica* 39:191-196.
- Cartea M.E., Malvar R.A., Vales M.I., Butrón A. y Ordás A. (2001) Inheritance of resistance to ear damage caused by *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera : Noctuidae) in maize. *Journal of Economic Entomology* 94:277-283.
- Coles N.D., McMullen M.D., Balint-Kurti P.J., Pratt R.C. y Holland J.B. (2010) Genetic control of photoperiod sensitivity in maize revealed by joint multiple population analysis. *Genetics* 184:799-812.
- Collard B., Jahufer M., Brouwer J. y Pang E. (2005) An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: the basic concepts. *Euphytica* 142:169-196.
- COTRISA. (2017) Comercializadora de trigo S. A. Disponible en: <https://www.cotrisa.cl/#>
- Cubero J.I.I.C. (2013) Introducción a la mejora genética vegetal Mundi-prensa. Tercera edición. 569 p.
- Chen Y., Liu H., Ali F., Scott M.P., Ji Q., Frei U.K. y Luebberstedt T. (2012) Genetic and physical fine mapping of the novel brown midrib gene *bm6* in maize (*Zea mays* L.) to a 180 kb region on chromosome 2. *Theoretical and Applied Genetics* 125:1223-1235. DOI: 10.1007/s00122-012-1908-5.
- Chung C.-L., Jamann T., Longfellow J. y Nelson R. (2010) Characterization and fine-mapping of a resistance locus for northern leaf blight in maize bin 8.06. *Theoretical and Applied Genetics* 121:205-227. DOI: 10.1007/s00122-010-1303-z.
- Churchill G.A. y Doerge R.W. (1994) Empirical threshold values for quantitative trait mapping. *Genetics* 138:963-971.
- Dell'Acqua M., Gatti D.M., Pea G., Cattonaro F., Coppens F., Magris G., Hlaing A.L., Aung H.H., Nelissen H. y Baute J. (2015) Genetic properties of the MAGIC maize population: a new platform for high definition QTL mapping

- in *Zea mays*. Genome biology 16:1-23.
- Donnelly P. (2008) Progress and challenges in genome-wide association studies in humans. Nature 456:728-731.
- Doohan D.J., Felix J., Jasinski J., Welty C. y Kleinhenz M.D. (2002) Insect management and herbicide tolerance in near-isogenic sister lines of transgenic and non-transgenic sweet corn. Crop Protection 21:375-381. DOI: 10.1016/s0261-2194(01)00106-5.
- Eizaguirre M. y Albajes R. (1992) Diapause induction in the stem corn-borer, *Sesamia-nonagrioides* (Lepidoptera, Noctuidae). Entomologia Generalis 17:277-283.
- Eizaguirre M. y Fantinou A.A. (2012) Abundance of *Sesamia nonagrioides* (Lef.)(Lepidoptera: Noctuidae) on the edges of the Mediterranean Basin. Psyche: A Journal of Entomology 2012.
- Eizaguirre M., Lopez C., Asin L. y Albajes R. (1994) Thermoperiodism, photoperiodism and sensitive stage in the diapause induction of *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera, Noctuidae). Journal of Insect Physiology 40:113-119. DOI: 10.1016/0022-1910(94)90082-5.
- Eizaguirre M., Schafellner C., Lopez C. y Sehna F. (2005) Relationship between an increase of juvenile hormone titer in early instars and the induction of diapause in fully grown larvae of *Sesamia nonagrioides*. Journal of Insect Physiology 51:1127-1134. DOI: 10.1016/j.jinsphys.2005.05.010.
- FAOSTAT. (2017). Statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>. Accessed February 2017.
- Fasoula V.A., Harris D.K., Bailey M.A., Phillips D.V. y Boerma H.R. (2003) Identification, mapping, and confirmation of a soybean gene for bud blight resistance. Crop science 43:1754-1759.
- Finet C., Fourquin C., Vinauger M., Berne-Dedieu A., Chambrier P., Paindavoine S. y Scutt C.P. (2010) Parallel structural evolution of auxin response factors in the angiosperms. The Plant Journal 63:952-959.
- Flint-Garcia S.A., Thuillet A.C., Yu J., Pressoir G., Romero S.M., Mitchell S.E.,

- Doebley J., Kresovich S., Goodman M.M. y Buckler E.S. (2005) Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *The Plant Journal* 44:1054-1064.
- Foiada F., Westermeier P., Kessel B., Ouzunova M., Wimmer V., Mayerhofer W., Presterl T., Dilger M., Kreps R. y Eder J. (2015) Improving resistance to the European corn borer: a comprehensive study in elite maize using QTL mapping and genome-wide prediction. *Theoretical and Applied Genetics* 128:875-891.
- Gabriel S.B., Schaffner S.F., Nguyen H., Moore J.M., Roy J., Blumenstiel B., Higgins J., DeFelice M., Lochner A., Faggart M., Liu-Cordero S.N., Rotimi C., Adeyemo A., Cooper R., Ward R., Lander E.S., Daly M.J. y Altshuler D. (2002) The structure of haplotype blocks in the human genome. *Science* 296:2225-2229. DOI: 10.1126/science.1069424.
- Gardiner J.M., Coe E.H., Meliahancock S., Hoisington D.A. y Chao S. (1993) Development of a core RFLP map in maize using an immortalized-F2 population. *Genetics* 134:917-930.
- Glover K., Wang D., Arelli P., Carlson S., Cianzio S. y Diers B. (2004) Near isogenic lines confirm a soybean cyst nematode resistance gene from PI 88788 on linkage group J. *Crop Science* 44:936-941.
- Gonzalez-Cabrera J., Farinos G.P., Caccia S., Diaz-Mendoza M., Castanera P., Leonardi M.G., Giordana B. y Ferre J. (2006) Toxicity and mode of action of *Bacillus thuringiensis* cry proteins in the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). *Applied and Environmental Microbiology* 72:2594-2600. DOI: 10.1128/aem.72.4.2594-2600.2006.
- Gonzalez-Cabrera J., Garcia M., Hernandez-Crespo P., Farinos G.P., Ortego F. y Castanera P. (2013) Resistance to Bt maize in *Mythimna unipuncta* (Lepidoptera: Noctuidae) is mediated by alteration in Cry1Ab protein activation. *Insect Biochemistry and Molecular Biology* 43:635-643. DOI: 10.1016/j.ibmb.2013.04.001.
- Gonzalez-Nunez M., Ortego F. y Castanera P. (2000) Susceptibility of Spanish populations of the corn borers *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera :

- noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae) to a *Bacillus thuringiensis* endotoxin. *Journal of Economic Entomology* 93:459-463.
- Harper L.C., Schaeffer M.L., Thistle J., Gardiner J.M., Andorf C.M., Campbell D.A., Cannon E.K., Braun B.L., Birkett S.M. y Lawrence C.J. (2011) The MaizeGDB Genome Browser tutorial: one example of database outreach to biologists via video. *Database* 2011:bar016.
- Hawkins J.S., Delgado V., Feng L., Carlise M., Dooner H.K. y Bennetzen J.L. (2014) Variation in allelic expression associated with a recombination hotspot in *Zea mays*. *The Plant Journal* 79:375-384.
- Holland J.B. (2006) Estimating genotypic correlations and their standard errors using multivariate restricted maximum likelihood estimation with SAS Proc MIXED. *Crop Sci* 46. DOI: 10.2135/cropsci2005.0191.
- Holland J.B. (2007) Genetic architecture of complex traits in plants. *Current opinion in plant biology* 10:156-161.
- Holland J.B. (2015) MAGIC maize: a new resource for plant genetics. *Genome biology*, 16(1), 163.
- Holland J.B., Nyquist W.E. y Cervantes-Martinez C.T. (2002) Estimating and interpreting heritability for plant breeding: An update. *Plant Breeding Reviews*, Vol 22 22:9-112.
- Huang B.E., George A.W., Forrest K.L., Kilian A., Hayden M.J., Morell M.K. y Cavanagh C.R. (2012) A multiparent advanced generation inter-cross population for genetic analysis in wheat. *Plant biotechnology journal* 10:826-839.
- Huang C., Chen Q., Xu G., Xu D., Tian J. y Tian F. (2016) Identification and fine mapping of quantitative trait loci for the number of vascular bundle in maize stem. *Journal of integrative plant biology* 58:81-90.
- Huo D., Ning Q., Shen X., Liu L. y Zhang Z. (2016) QTL Mapping of Kernel Number-Related Traits and Validation of One Major QTL for Ear Length in Maize. *PloS one* 11:e0155506.
- Islam M.S., Thyssen G.N., Jenkins J.N., Zeng L., Delhom C.D., McCarty J.C., Deng D.D., Hinchliffe D.J., Jones D.C. y Fang D.D. (2016) A MAGIC population-

- based genome-wide association study reveals functional association of GhRBB1_A07 gene with superior fiber quality in cotton. *BMC genomics* 17:903.
- James, Clive. 2014. Global Status of Commercialized Biotech/GM Crops: 2014. *ISAAA Brief No.49*. ISAAA: Ithaca, NY.
- Jansen R.C. y Stam P. (1994) High resolution of quantitative traits into multiple loci via interval mapping. *Genetics* 136:1447-1455.
- Jiménez-Galindo J.C., Ordás B., Butrón A., Samayoa L.F. y Malvar R.A. (2017) QTL Mapping for Yield and Resistance against Mediterranean Corn Borer in Maize. *Frontiers in Plant Science* 8. DOI: 10.3389/fpls.2017.00698.
- Johnston Jr R.B. (1988) Monocytes and macrophages. *New England Journal of Medicine* 318:747-752.
- Khan Z.R. y Saxena R.C. (1997) Use of surrogate stem for eliciting ovipositional response of *Busseola fusca* (Lepidoptera: Noctuidae). *J Econ Entomol* 90. DOI: 10.1093/jee/90.5.1426.
- Klenke J.R., Russell W.A. y Guthrie W.D. (1986) Recurrent selection for resistance to european corn-borer in a corn synthetic and correlated effects on agronomic traits. *Crop Science* 26:864-868.
- Korte A. y Farlow A. (2013) The advantages and limitations of trait analysis with GWAS: a review. *Plant methods* 9:29.
- Kover P.X., Valdar W., Trakalo J., Scarcelli N., Ehrenreich I.M., Purugganan M.D., Durrant C. y Mott R. (2009) A multiparent advanced generation inter-cross to fine-map quantitative traits in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet* 5:e1000551.
- Krakowsky M., Lee M., Woodman-Clikeman W., Long M. y Sharopova N. (2004) QTL Mapping of Resistance to Stalk Tunneling by the European Corn Borer in RILs of Maize Population B73× De8. *Crop science* 44:274-282.
- Kreps R., Gumber R., Schulz B., Klein D. y Melchinger A. (1998) Genetic variation in testcrosses of European maize inbreds for resistance to the European corn borer and relations to line per se performance. *Plant breeding* 117:319-327.
- Kretschmer M., Croll D. y Kronstad J.W. (2016) Chloroplast-associated metabolic functions influence the susceptibility of maize to *Ustilago maydis*. *Molecular*

Plant Pathology.

- Lacey L.A., Frutos R., Kaya H. y Vail P. (2001) Insect pathogens as biological control agents: do they have a future? *Biological control* 21:230-248.
- Ladejobi O., Elderfield J., Gardner K.A., Gaynor R.C., Hickey J., Hibberd J.M., Mackay I.J. y Bentley A.R. (2016) Maximizing the potential of multi-parental crop populations. *Applied & Translational Genomics* 11:9-17.
- Lander E. y Kruglyak L. (1995) Genetic dissection of complex traits: guidelines for interpreting and reporting linkage results. *Nature Genetics* 11:241-247.
- Lander E.S. y Botstein D. (1989) Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.
- Lander E.S., Green P., Abrahamson J., Barlow A., Daly M.J., Lincoln S.E. y Newberg L.A. (2009) MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations (vol 1 pg 174, 1987). *Genomics* 93:398-398. DOI: 10.1016/j.ygeno.2008.12.003.
- Langridge P., Lagudah E., Holton T., Appels R., Sharp P. y Chalmers K. (2001) Trends in genetic and genome analyses in wheat: a review. *Crop and Pasture Science* 52:1043-1077.
- Li D., Wang X., Zhang X., Chen Q., Xu G., Xu D., Wang C., Liang Y., Wu L. y Huang C. (2016) The genetic architecture of leaf number and its genetic relationship to flowering time in maize. *New Phytologist* 210:256-268.
- Li H., Hearne S., Bänziger M., Li Z. y Wang J. (2010) Statistical properties of QTL linkage mapping in biparental genetic populations. *Heredity* 105:257-267.
- Li M.J., Wang P., Liu X., Lim E.L., Wang Z., Yeager M., Wong M.P., Sham P.C., Chanock S.J. y Wang J. (2011) GWASdb: a database for human genetic variants identified by genome-wide association studies. *Nucleic acids research*, 40(D1), D1047-D1054.
- Li Z., Jakkula L., Hussey R., Tamulonis J. y Boerma H. (2001) SSR mapping and confirmation of the QTL from PI96354 conditioning soybean resistance to southern root-knot nematode. *Theoretical and Applied Genetics* 103:1167-1173.

- Lincoln S.E., Daly M.J. y Lander E.S. (1993) Mapping genes controlling quantitative traits using MAPMAKER/QTL version 1.1: a tutorial and reference manual. Whitehead Institute for Biomedical Research Technical Report.
- Liu B.H. (1997) Statistical genomics: linkage, mapping, and QTL analysis CRC press.
- Liu K., Goodman M., Muse S., Smith J.S., Buckler E. y Doebley J. (2003) Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics* 165:2117-2128.
- Lopez C., Sans A., Asin L. y Eizaguirre M. (2001) Phenological model for *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera : Noctuidae). *Environmental Entomology* 30:23-30. DOI: 10.1603/0046-225x-30.1.23.
- Mackay I. y Powell W. (2007) Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends in plant science* 12:57-63.
- Mackay I.J., Bansept-Basler P., Barber T., Bentley A.R., Cockram J., Gosman N., Greenland A.J., Horsnell R., Howells R. y O'Sullivan D.M. (2014) An eight-parent multiparent advanced generation inter-cross population for winter-sown wheat: creation, properties, and validation. *G3: Genes| Genomes| Genetics* 4:1603-1610.
- Malvar R.A., Butrón Gómez A.M., Cartea González M.E. y Ordás Pérez A. (1995) Tolerance of maize inbred lines to pink stem borer. XIV EUCARPIA Congress. *Adaptation in Plant Breeding* .
- Malvar R., Butrón A., Alvarez A., Ordás B., Soengas P., Revilla P. y Ordás A. (2004) Evaluation of the European Union maize landrace core collection for resistance to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *Journal of economic entomology* 97:628-634.
- Malvar R.A., Cartea M.E., Revilla P., Ordás A., Alvarez A. y Mansilla J.P. (1993) Sources of resistance to pink stem borer and european corn-borer in maize. *Maydica* 38:313-319.
- Manly K.F., Cudmore Jr R.H. y Meer J.M. (2001) Map Manager QTX, cross-platform software for genetic mapping. *Mammalian Genome* 12:930-932.

- MAPAMA. (2017) Ministerio de Agricultura y Pesca, Alimentación y Medio Ambiente. Disponible en: <http://www.mapama.gob.es/es/>
- Mazomenos B.E., Bardas D. y Pantazimazomenou A. (1989) *Sesamia-nonagrioides* sex-pheromone - field attractiveness use of pheromone traps for monitoring and control. *Acta Phytopathologica Et Entomologica Hungarica* 24:153-156.
- McGaughey W.H. y Whalon M.E. (1992) Managing insect resistance to *Bacillus-thuringiensis* toxins. *Science* 258:1451-1455. DOI: 10.1126/science.258.5087.1451.
- McMullen M.D., Kresovich S., Villeda H.S., Bradbury P., Li H., Sun Q., Flint-Garcia S., Thornsberry J., Acharya C., Bottoms C., Brown P., Browne C., Eller M., Guill K., Harjes C., Kroon D., Lepak N., Mitchell S.E., Peterson B., Pressoir G., Romero S., Rosas M.O., Salvo S., Yates H., Hanson M., Jones E., Smith S., Glaubitz J.C., Goodman M., Ware D., Holland J.B. y Buckler E.S. (2009) Genetic Properties of the Maize Nested Association Mapping Population. *Science* 325:737-740. DOI: 10.1126/science.1174320.
- Meissle M., Mouron P., Musa T., Bigler F., Pons X., Vasileiadis V., Otto S., Antichi D., Kiss J. y Pálincás Z. (2010) Pests, pesticide use and alternative options in European maize production: current status and future prospects. *Journal of Applied Entomology* 134:357-375.
- Meissle M., Romeis J. y Bigler F. (2011) Bt maize and integrated pest management - a European perspective. *Pest Management Science* 67:1049-1058. DOI: 10.1002/ps.2221.
- Melchinger A., Utz H. y Schon C. (2004) QTL analyses of complex traits with cross validation, bootstrapping and other biometric methods. *Euphytica* 137:1-11.
- Melchinger A.E., Utz H.F. y Schön C.C. (1998) Quantitative trait locus (QTL) mapping using different testers and independent population samples in maize reveals low power of QTL detection and large bias in estimates of QTL effects. *Genetics* 149:383-403.
- Meng L., Zhao X., Ponce K., Ye G. y Leung H. (2016) QTL mapping for agronomic traits using multi-parent advanced generation inter-cross (MAGIC) populations derived from diverse elite indica rice lines. *Field Crops Research*

189:19-42.

- Metzker M.L. (2010) Sequencing technologies—the next generation. *Nature reviews genetics* 11:31-46.
- Mideros S.X., Warburton M.L., Jamann T.M., Windham G.L., Williams W.P. y Nelson R.J. (2014) Quantitative Trait Loci Influencing Mycotoxin Contamination of Maize: Analysis by Linkage Mapping, Characterization of Near-Isogenic Lines, and Meta-Analysis. *Crop Science* 54:127-142. DOI: 10.2135/cropsci2013.04.0249.
- Mimura M., Zallot R., Niehaus T.D., Hasnain G., Gidda S.K., Nguyen T.N., Anderson E.M., Mullen R.T., Brown G. y Yakunin A.F. (2016) Arabidopsis TH2 Encodes the Orphan Enzyme Thiamin Monophosphate Phosphatase. *The Plant Cell* 28:2683-2696.
- Min H., Chen C., Wei S., Shang X., Sun M., Xia R., Liu X., Hao D., Chen H. y Xie Q. (2016) Identification of Drought Tolerant Mechanisms in Maize Seedlings Based on Transcriptome Analysis of Recombination Inbred Lines. *Front. Plant Sci.* 7: 1080. doi: 10.3389/fpls.
- Monetti L., Ordás Pérez A., Malvar Pintos R.A. y Cordero-Rivera A. (2003) Parasitoids incidence and diversity on maize stem borers *Sesamia nonagrioides* Lefebvre and *Ostrinia nubilalis* Hubner in NW Spain. *Maydica*, 48(2), 133-140.
- Myles S., Peiffer J., Brown P.J., Ersoz E.S., Zhang Z., Costich D.E. y Buckler E.S. (2009) Association mapping: critical considerations shift from genotyping to experimental design. *The Plant Cell* 21:2194-2202.
- Nelson J.C. (1997) QGENE: software for marker-based genomic analysis and breeding. *Molecular breeding* 3:239-245.
- Nielsen D.M. y Zaykin D. (2001) Association mapping: where we've been, where we're going. *Expert review of molecular diagnostics* 1:334-342.
- Nozoye T., Nakanishi H. y Nishizawa N.K. (2013) Characterizing the crucial components of iron homeostasis in the maize mutants *ys1* and *ys3*. *PLoS One* 8:e62567.
- Olmos S.E., Delucchi C., Ravera M., Negri M.E., Mandolino C. y Eyhéabide G.H.

- (2013) Genetic relatedness and population structure within the public Argentinean collection of maize inbred lines. *Maydica* 59:16-31.
- Oloyede-Kamiyo Q.O., Ajala S.O. y Akoroda M.O. (2014) Estimates of genetic variances and relationship among traits associated with stem borer resistance in maize (*Zea mays* L.). *Field Crops Research* 166:137-143. DOI: 10.1016/j.fcr.2014.05.014.
- Oraguzie N.C. y Wilcox P.L. (2007) An overview of association mapping, *Association mapping in plants*, Springer. pp. 1-9.
- Ordás B., Alvarez A., Revilla P., Butrón A. y Malvar R.A. (2013) Relationship Between Time to Flowering and Stalk and Ear Damage by Second Generation Corn Borers. *Journal of Economic Entomology* 106:1234-1239. DOI: 10.1603/ec12013.
- Ordás B., Butrón A., Alvarez A., Revilla P. y Malvar R. (2012) Comparison of two methods of reciprocal recurrent selection in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics* 124:1183-1191.
- Ordás B., Butrón A., Soengas P., Ordás A. y Malvar R. (2002) Antibiosis of the pith maize to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *Journal of economic entomology* 95:1044-1048.
- Ordás B., Malvar R.A., Santiago R. y Butrón A. (2010) QTL mapping for Mediterranean corn borer resistance in European flint germplasm using recombinant inbred lines. *BMC genomics*, 11(1), 174.. DOI: 10.1186/1471-2164-11-174.
- Ordás B., Malvar R.A., Santiago R., Sandoya G., Romay M.C. y Butrón A. (2009) Mapping of QTL for resistance to the Mediterranean corn borer attack using the intermated B73 x Mo17 (IBM) population of maize. *Theoretical and Applied Genetics* 119:1451-1459. DOI: 10.1007/s00122-009-1147-6.
- Ortega A. (1987) *Insectos nocivos del maíz: una guía para su identificación en el campo CIMMYT*. México D. F. 106 P. ISBN 968-6127-10-0.
- Painter R.H. (1951) Insect Resistance in Crop Plants. *Soil Science* 72:481.
- Papst C., Melchinger A., Eder J., Schulz B., Klein D. y Bohn M. (2001) QTL mapping for resistance to European corn borer (*Ostrinia nubilalis* Hb.) in

- early maturing European dent maize (*Zea mays* L.) germplasm and comparison of genomic regions for resistance across two populations of F3 families. *Maydica* 46:195-205.
- Pascual L., Desplat N., Huang B.E., Desgroux A., Bruguier L., Bouchet J.P., Le Q.H., Chauchard B., Verschave P. y Causse M. (2015) Potential of a tomato MAGIC population to decipher the genetic control of quantitative traits and detect causal variants in the resequencing era. *Plant biotechnology journal* 13:565-577.
- Pea G., Paulstephenraj P., Canè M.A., Sardaro M.L.S., Landi P., Morgante M., Porceddu E., Pè M.E. y Frascaroli E. (2009) Recombinant near-isogenic lines: a resource for the mendelization of heterotic QTL in maize. *Molecular Genetics and Genomics* 281:447-457.
- Plavskin Y. y Timmermans M. (2012) Small RNA-regulated networks and the evolution of novel structures in plants, Cold Spring Harbor symposia on quantitative biology, Cold Spring Harbor Laboratory Press. pp. 221-233.
- Poerschmann J., Rauschen S., Langer U., Augustin J. y Gorecki T. (2008) Molecular Level Lignin Patterns of Genetically Modified Bt-Maize MON88017 and Three Conventional Varieties Using Tetramethylammonium Hydroxide (TMAH)-induced Thermochemolysis. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 56:11906-11913. DOI: 10.1021/jf8023694.
- Pritchard J.K., Stephens M. y Donnelly P. (2000) Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Pumphrey M.O., Bernardo R. y Anderson J.A. (2007) Validating the QTL for Fusarium head blight resistance in near-isogenic wheat lines developed from breeding populations. *Crop Science* 47:200-206.
- Qi W., Tian Z., Lu L., Chen X., Chen X., Zhang W. y Song R. (2017) Editing of Mitochondrial Transcripts nad3 and cox2 by Dek10 Is Essential for Mitochondrial Function and Maize Plant Development. *Genetics* 116.
- Quero C., Bau J., Guerrero A. y Renou M. (2004) Responses of the olfactory receptor neurons of the corn stalk borer *Sesamia nonagrioides* to components of the pheromone blend and their inhibition by a trifluoromethyl ketone analogue of

- the main component. *Pest management science* 60:719-726.
- Raihan M.S., Liu J., Huang J., Guo H., Pan Q. y Yan J. (2016) Multi-environment QTL analysis of grain morphology traits and fine mapping of a kernel-width QTL in Zheng58× SK maize population. *Theoretical and Applied Genetics* 129:1465-1477.
- Reyna N. y Sneller C. (2001) Evaluation of marker-assisted introgression of yield QTL alleles into adapted soybean. *Crop Science* 41:1317-1321.
- Rincent R., Laloë D., Nicolas S., Altmann T., Brunel D., Revilla P., Rodriguez V.M., Moreno-Gonzalez J., Melchinger A. y Bauer E. (2012) Maximizing the reliability of genomic selection by optimizing the calibration set of reference individuals: comparison of methods in two diverse groups of maize inbreds (*Zea mays* L.). *Genetics* 192:715-728.
- Ritland K. (1996) Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genetical Research* 67:175-185.
- Salvi S., Corneti S., Bellotti M., Carraro N., Sanguineti M.C., Castelletti S. y Tuberosa R. (2011) Genetic dissection of maize phenology using an intraspecific introgression library. *BMC plant biology* 11:4.
- Salvi S., Sponza G., Morgante M., Tomes D., Niu X., Fengler K.A., Meeley R., Ananiev E.V., Svtashev S., Bruggemann E., Li B., Hainey C.F., Radovic S., Zaina G., Rafalski J.A., Tingey S.V., Miao G.-H., Phillips R.L. y Tuberosa R. (2007) Conserved noncoding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus in maize. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 104:11376-11381. DOI: 10.1073/pnas.0704145104.
- Salvi S., Tuberosa R., Chiapparino E., Maccaferri M., Veillet S., van Beuningen L., Isaac P., Edwards K. y Phillips R.L. (2002) Toward positional cloning of Vgt1, a QTL controlling the transition from the vegetative to the reproductive phase in maize. *Plant Molecular Biology* 48:601-613. DOI: 10.1023/a:1014838024509.
- Samayoa L.F., Butrón A. y Malvar R.A. (2014) QTL mapping for maize resistance and yield under infestation with *Sesamia nonagrioides*. *Molecular breeding*

34:1331-1344.

- Samayoa L.F., Malvar R.A. y Butrón A. (2017) QTL for Maize Midparent Heterosis in the Heterotic Pattern American Dent x European Flint under corn borer pressure. *Frontiers in Plant Science* 8:573.
- Samayoa L.F., Malvar R.A., McMullen M.D. y Butrón A. (2015a) Identification of QTL for resistance to Mediterranean corn borer in a maize tropical line to improve temperate germplasm. *BMC Plant Biology* 15:1-9. DOI: 10.1186/s12870-015-0652-9.
- Samayoa L.F., Malvar R.A., Olukolu B.A., Holland J.B. y Butrón A. (2015b) Genome-wide association study reveals a set of genes associated with resistance to the Mediterranean corn borer (*Sesamia nonagrioides* L.) in a maize diversity panel. *BMC Plant Biology* 15. DOI: 10.1186/s12870-014-0403-3.
- Samayoa-López L.F. (2015) Localización de QTL e identificación de genes de resistencia y/o tolerancia a la plaga de los taladros del maíz. Tesis doctoral, Universidad de Santiago de Compostela en Lugo, España.
- Sandoya G., Butrón A., Alvarez A., Ordás A. y Malvar R.A. (2008) Direct response of a maize synthetic to recurrent selection for resistance to stem borers. *Crop Science* 48:113-118. DOI: 10.2135/cropsci2007.02.0084.
- Sandoya G., Malvar R.A., Revilla P. y Butrón A. (2009) Effects of selection for maize resistance to *Sesamia nonagrioides* on the additive and dominant components of genetic variance. *Plant Breeding* 128:244-248. DOI: 10.1111/j.1439-0523.2008.01579.x.
- Santiago R., Malvar R.A., Barros-Rios J., Samayoa L.F. y Butrón A. (2016) Hydroxycinnamate Synthesis and Association with Mediterranean Corn Borer Resistance. *Journal of agricultural and food chemistry* 64:539-551.
- SAS Institute (2016) Version 9.4. SAS Institute, Cary, NC
- Schön C.C., Dhillon B.S., Utz H.F. y Melchinger A.E. (2010) High congruency of QTL positions for heterosis of grain yield in three crosses of maize. *Theoretical and applied genetics* 120:321-332.
- Schön C.C., Lee M., Melchinger A.E., Guthrie W.D. y Woodman W.L. (1993)

- Mapping and characterization of quantitative trait loci affecting resistance against second-generation European corn borer in maize with the aid of RFLPs. *Heredity-London* 70:648-648.
- Schulz B., Kreps R., Klein D., Gumber R. y Melchinger A. (1997) Genetic variation among European maize inbreds for resistance to the European corn borer and relation to agronomic traits. *Plant breeding* 116:415-422.
- Schulze T.G. y McMahon F.J. (2002) Genetic association mapping at the crossroads: which test and why? Overview and practical guidelines. *American journal of medical genetics* 114:1-11.
- Sekhar J.C., Karjagi C.G., Kumar B., Rakshit S., Soujanya L., Kumar P., Singh K.P., Dhandapani A., Dass S. y Kumar R.S. (2015) Genetics of resistance to *Sesamia inferens* infestation and its correlation with yield in maize. *Plant Breeding* 134:394-399. DOI: 10.1111/pbr.12281.
- Sen T.Z., Harper L.C., Schaeffer M.L., Andorf C.M., Seigfried T.E., Campbell D.A. y Lawrence C.J. (2010) Choosing a genome browser for a Model Organism Database: surveying the Maize community. *Database-the Journal of Biological Databases and Curation*. DOI: 10.1093/database/baq007.
- Shah P.A. y Pell J.K. (2003) Entomopathogenic fungi as biological control agents. *Applied Microbiology and Biotechnology* 61:413-423. DOI: 10.1007/s00253-003-1240-8.
- Sharp P., Johnston S., Brown G., McIntosh R., Pallotta M., Carter M., Bariana H., Khatkar S., Lagudah E. y Singh R. (2001) Validation of molecular markers for wheat breeding. *Crop and Pasture Science* 52:1357-1366.
- Solé J., Sans A., Riba M., Rosa E., Bosch M., Barrot M., Palencia J., Castellà J. y Guerrero A. (2008) Reduction of damage by the Mediterranean corn borer, *Sesamia nonagrioides*, and the European corn borer, *Ostrinia nubilalis*, in maize fields by a trifluoromethyl ketone pheromone analog. *Entomologia experimentalis et applicata* 126:28-39.
- Soto-Cerda B.J. y Cloutier S. (2012) Association Mapping in Plant Genomes, Genetic Diversity in Plants, Prof. Mahmut Caliskan (Ed.), ISBN: 978-953-51-0185-7. www.intechopen.com

- Stange M., Utz H.F., Schrag T.A., Melchinger A.E. y Würschum T. (2013) High-density genotyping: an overkill for QTL mapping? Lessons learned from a case study in maize and simulations. *Theoretical and applied genetics* 126:2563-2574.
- Szalma S., Hostert B., LeDeaux J., Stuber C. y Holland J. (2007) QTL mapping with near-isogenic lines in maize. *Theoretical and Applied Genetics* 114:1211-1228.
- Tabata R., Ikezaki M., Fujibe T., Aida M., Tian C.-e., Ueno Y., Yamamoto K.T., Machida Y., Nakamura K. y Ishiguro S. (2010) Arabidopsis auxin response factor6 and 8 regulate jasmonic acid biosynthesis and floral organ development via repression of class 1 KNOX genes. *Plant and Cell Physiology* 51:164-175.
- Tanksley S.D. (1993) Mapping polygenes. *Annual review of genetics* 27:205-233.
- Tao Y., Liu Q., Wang H., Zhang Y., Huang X., Wang B., Lai J., Ye J., Liu B. y Xu M. (2013) Identification and fine-mapping of a QTL, qMrdd1, that confers recessive resistance to maize rough dwarf disease. *BMC plant biology* 13:145.
- Tarasco E. (2001) Damaging insects in asparagus. *Informatore Agrario* 57:36-38.
- Tuinstra M.R., Ejeta G. y Goldsbrough P.B. (1997) Heterogeneous inbred family (HIF) analysis: a method for developing near-isogenic lines that differ at quantitative trait loci. *Theoretical and Applied Genetics* 95:1005-1011. DOI: 10.1007/s001220050654.
- Urbany C., Benke A., Marsian J., Huettel B., Reinhardt R. y Stich B. (2013) Ups and downs of a transcriptional landscape shape iron deficiency associated chlorosis of the maize inbreds B73 and Mo17. *BMC plant biology* 13:213.
- Utz H. (2012) PlabMQTL-Software for meta-QTL analysis with composite interval mapping. Version 0.5 s. Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics, University of Hohenheim. PlabMQTL Manual.
- Utz H. y Melchinger A. (1994) Comparison of different approaches to interval mapping of quantitative trait loci, *Biometrics in plant breeding: applications of molecular markers*. Proceedings of the ninth meeting of the EUCARPIA

- section biometrics in plant breeding. pp. 6-8.
- Utz H. y Melchinger A. (1996) PLABQTL: a program for composite interval mapping of QTL. *J Quant Trait Loci* 2:1-5.
- Utz H.F., Melchinger A.E. y Schön C.C. (2000) Bias and sampling error of the estimated proportion of genotypic variance explained by quantitative trait loci determined from experimental data in maize using cross validation and validation with independent samples. *Genetics* 154:1839-1849.
- Uygun N. y Kayapinar A. (1993) A new pest on banana: Corn stalk borer, *Sesamia nonagrioides* Lefebvre (Lep., Noctuidae) in South Anatolia. *Türkiye Entomoloji Dergisi* 17:33-40.
- van Berloo R., Aalbers H., Werkman A. y Niks R.E. (2001) Resistance QTL confirmed through development of QTL-NILs for barley leaf rust resistance. *Molecular Breeding* 8:187-195.
- Vasileiadis V.P., Sattin M., Otto S., Veres A., Palinkas Z., Ban R., Pons X., Kudsk P., van der Weide R., Czembor E., Moonen A.C. y Kiss J. (2011) Crop protection in European maize-based cropping systems: Current practices and recommendations for innovative Integrated Pest Management. *Agricultural Systems* 104:533-540. DOI: 10.1016/j.agsy.2011.04.002.
- Velasco P., Malvar R.A., Butrón A., Revilla P. y Ordás A. (1999) Ear feeding resistance of sweet corn inbreds to pink stem borer. *Journal of the American Society for Horticultural Science* 124:268-272.
- Velasco P., Revilla P., Monetti L., Butrón A., Ordás A. y Malvar R.A. (2007) Corn borers (Lepidoptera : Noctuidae; Crambidae) in Northwestern Spain: Population dynamics and distribution. *Maydica* 52:195-203.
- Velasco P., Soengas P., Revilla P., Ordás A. y Malvar R.A. (2004) Mean generation analysis of the damage caused by *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera : Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera : Crambidae) in sweet corn ears. *Journal of Economic Entomology* 97:120-126.
- Veldboom L.R. y Lee M. (1996) Genetic mapping of quantitative trait loci in maize in stress and nonstress environments: I. Grain yield and yield components. *Crop Science* 36:1310-1319.

- Vlăduțu C., McLaughlin J. y Phillips R.L. (1999) Fine mapping and characterization of linked quantitative trait loci involved in the transition of the maize apical meristem from vegetative to generative structures. *Genetics* 153:993-1007.
- Wang N., Akey J.M., Zhang K., Chakraborty R. y Jin L. (2002) Distribution of recombination crossovers and the origin of haplotype blocks: the interplay of population history, recombination, and mutation. *The American Journal of Human Genetics* 71:1227-1234.
- Wei M., Fu J., Li X., Wang Y. y Li Y. (2009) Influence of dent corn genetic backgrounds on QTL detection for plant-height traits and their relationships in high-oil maize. *Journal of applied genetics* 50:225-234.
- Wissuwa M. y Ae N. (2001) Further characterization of two QTLs that increase phosphorus uptake of rice (*Oryza sativa* L.) under phosphorus deficiency. *Plant and Soil* 237:275-286.
- Xin M., Yang R., Li G., Chen H., Laurie J., Ma C., Wang D., Yao Y., Larkins B.A. y Sun Q. (2013) Dynamic expression of imprinted genes associates with maternally controlled nutrient allocation during maize endosperm development. *The Plant Cell* 25:3212-3227.
- Young N. (1996) QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annual review of phytopathology* 34:479-501.
- Yu J., Pressoir G., Briggs W.H., Bi I.V., Yamasaki M., Doebley J.F., McMullen M.D., Gaut B.S., Nielsen D.M. y Holland J.B. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature genetics* 38:203-208.
- Yu K., Park S. y Poysa V. (2000) Marker-assisted selection of common beans for resistance to common bacterial blight: efficacy and economics. *Plant breeding* 119:411-415.
- Zehnder G., Gurr G.M., Kühne S., Wade M.R., Wratten S.D. y Wyss E. (2007) Arthropod pest management in organic crops. *Annu. Rev. Entomol.* 52:57-80.
- Zhang Z., Ersoz E., Lai C.-Q., Todhunter R.J., Tiwari H.K., Gore M.A., Bradbury P.J., Yu J., Arnett D.K. y Ordovas J.M. (2010) Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nature genetics* 42:355-360.

Zhao K., Aranzana M.J., Kim S., Lister C., Shindo C., Tang C., Toomajian C., Zheng H., Dean C. y Marjoram P. (2007) An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. *PLoS Genet* 3(1):e4.

Zhou M.-L., Zhang Q., Sun Z.-M., Chen L.-H., Liu B.-X., Zhang K.-X., Zhu X.-M., Shao J.-R., Tang Y.-X. y Wu Y.-M. (2014) Trehalose metabolism-related genes in maize. *Journal of Plant Growth Regulation* 33:256-271.



8. ANEXOS

A-I Genes candidatos para altura de planta

Tabla A-I Cromosoma, base de datos utilizados, marcadores flanqueantes, longitud del QTL y genes candidatos por cada SNP o grupo de SNPs significativamente asociados a la altura de planta de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP Significativo ^a	Cromosoma ^b	Base de datos ^c	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S1_38008787 S1_38130432 S1_38130561	1	29.292 /224.363	S1_37946326- S1_38131791	185 Kpb	a) GRMZM2G151576 (37.997.649-38.007.506) ⁺ b) GRMZM2G151564 (38.008.894-38.011.416) ⁺ c) GRMZM2G151521 (38.054.478-38.060.946) ⁺ d) GRMZM2G161452 (38.120.906-38.123.866) ⁺ e) GRMZM2G161337 (38.125.296-38.130.385) ⁺	a) Polypeptide: CONSTANS interacting protein 4. (protein binding). b) Polypeptide: Calcium ion binding protein. c) Polypeptide: ASC1-like protein Putative uncharacterized protein. d) Enzyme: GRMZM2G161452. e) Enzyme: Anthranilate synthase component I-1 Putative uncharacterized protein//Anthranilate synthase.
S1_52632335	1	224.363	S1_52626995- S1_52640776	13 Kpb	a) GRMZM2G174680 (52.626.105-52.627.099) ⁺ b) GRMZM2G174696 (52.635.954-52.643.260) ⁺	a) Polypeptide: Lipid binding protein. b) Polypeptide: Mitochondrial import receptor subunit TOM40Putative uncharacterized protein.
S1_81431429	1	29.292	S1_81212941- S1_81549746	336 Kpb	a) GRMZM2G137561 (81.425.687-81.425.953) ⁺	a) Polypeptide: Complex 1 protein containing protein.
S1_82703052	1	29.292	S1_82680258- S1_82797610	117 Kpb	a) GRMZM2G506660 (82.701.465-82.702.230) ⁺	a) Polypeptide: ATP binding proteinPutative uncharacterized protein.
S1_84413650 S1_84414237	1	29.292 /224.363	S1_84347525- S1_84415381	67 Kpb	a) GRMZM2G083173 (84.413.857-84.417.615) ⁺	a) Transporter: Hexose transporter.
S1_85051701 S1_85051713	1	224.363	S1_85018817- S1_85051713	32 Kpb	a) GRMZM2G026147 (85.018.328-85.019.680) ⁺ b) GRMZM2G026767 (85.054.319-85.059.958) ⁺ c) GRMZM2G327907 (85.028.946-85.029.887) ⁺	a) Polypeptide: Expansin-like 3 Putative uncharacterized protein. b) Enzyme: GRMZM2G026767. c) Polypeptide: GRMZM2G327907.
S1_164954300	1	224.363	S1_164951534- S1_164955536	4 Kpb	a) GRMZM2G034690 (164.951.457-164.954.153) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G034690.

SNP Significativo ^a	Cromosoma ^b	Base de datos ^c	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S1_198478892	1	29.292	S1_198416798-S1_198478892	62 Kpb	a) GRMZM2G123094 (198.472.139-198.474.902) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G123094. (Clone 348108 mRNA sequence).
S1_198739522	1	29.292	S1_198733742-S1_198739623	5 Kpb	a) GRMZM2G055968 (198.733.634-198.735.104) ⁺ b) GRMZM2G076723 (198.738.739-198.743.220) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G055968. b) Enzyme: Nitrate reductase (NADH). (A metabolic process that results in the removal or addition of one or more electrons to or from a substance, with or without the concomitant removal or addition of a proton or protons). (The nitrogen metabolic process that encompasses the uptake of nitrate from the environment and reduction to ammonia, and results in the incorporation of nitrogen derived from nitrate into cellular substances).
S1_201847366	1	29.292	S1_201740384-S1_201872777	132 Kpb	a) GRMZM2G148867 (201.739.161-201.740.315) ⁺ b) GRMZM2G056686 (201.868.285-201.872.683) ⁺	a) Enzyme: GRMZM2G148867. b) Polypeptide: F420 hydrogenase/dehydrogenase, beta subunit family.
S3_135308624 S3_135309026	3	29.292	S3_135307679-S3_135440203	132 Kpb	a) GRMZM2G004988 (135.285.449-135.302.562) ⁺ b) GRMZM2G084794 (135.411.598-135.433.742) ⁺	a) Polypeptide: SSXT protein. b) Polypeptide: GRMZM2G084794.
S3_135695835	3	29.292	S3_135695490-S3_135757370	61 Kpb	a) GRMZM2G083130 (135.756.776-135.758.251) ⁺	a) Enzyme: Cytokinin-O-glucosyltransferase 2//Cis-zeatin O-beta-D-glucosyltransferase.
S3_138740291	3	29.292	S3_138740089-S3_138765619	25 Kpb	a) GRMZM2G324157 (138.739.388-138.740.374) ⁺	a) Enzyme: GRMZM2G324157.
S3_143181265	3	29.292	S3_142956971-S3_143356181	399 Kpb	a) GRMZM2G034868 (142.946.111-142.950.410) ⁺ b) GRMZM2G069408 (143.052.550-143.057.493) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G034868. b) Polypeptide: GRMZM2G069408.
S3_155961960	3	29.292	S3_155960563-S3_156052726	92 Kpb	a) GRMZM2G161380 (155.958.192-155.960.016) ⁺ b) GRMZM2G161295 (155.960.634-155.963.163) ⁺	a) Enzyme: GRMZM2G161380. b) Polypeptide: unknown protein.
S3_156363028	3	29.292	S3_156363028-S3_156435012	71 Kpb	a) GRMZM2G173534 (156.362.526-156.364.851) ⁺ b) GRMZM2G300862 (156.395.357-156.398.833) ⁺ c) GRMZM2G121123 (156.429.334-156.433.755) ⁺	a) Enzyme: Inducer of CBF expression 2. b) Enzyme: Aspartate kinase. c) Enzyme: Protein-synthesizing GTPase. (Any process that modulates the frequency, rate or extent of translational initiation).
S3_156964693	3	29.292	S3_156963609-S3_156968484	4 Kpb	a) GRMZM2G142315 (156.963.450-156.968.250) ⁺	a) Polypeptide: Phosphatidylinositol transfer protein CSR1. (The directed movement of substances (such as macromolecules, small molecules, ions) into, out of or within a cell, or between cells, or within a multicellular organism by means of some agent such as a transporter or pore).
S3_184059175	3	224.363	S3_184059175-S3_184065331	6 Kpb	a) GRMZM2G118363 (184.059.251-184.065.416) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G118363.
S4_62353257	4	29.292	S4_62353202-S4_62788968	435 Kpb	a) GRMZM2G702462 (62.533.559-62.533.855) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G702462.

SNP Significativo ^a	Cromosoma ^b	Base de datos ^c	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S4_96326739	4	29.292	S4_96312234-S4_96326775	14 Kpb	a) GRMZM2G420819 (62.403.248-62.403.445) ⁺	a) ---
S4_159994299	4	29.292	S4_159755419-S4_159995560	240 Kpb	a) GRMZM2G057031 (159.873.073-159.882.185) ⁺ b) GRMZM2G076631 (159.908.939-159.910.567) ⁺ c) GRMZM2G176340 (159.978.428-159.981.164) ⁺	a) Enzyme: GRMZM2G057031. b) Enzyme: hydrolase, alpha/beta fold family protein. (Catalysis of a biochemical reaction at physiological temperatures. In biologically catalyzed reactions, the reactants are known as substrates, and the catalysts are naturally occurring macromolecular substances known as enzymes. Enzymes possess specific binding sites for substrates, and are usually composed wholly or largely of protein, but RNA that has catalytic activity (ribozyme) is often also regarded as enzymatic). c) Polypeptide: GRMZM2G176340.
S7_146118757	7	29.292	S7_145971011-S7_146119797	148 Kpb	a) GRMZM2G146240 (145.968.402-145.977.809) ⁺ b) GRMZM2G077406 (146.116.926-146.119.421) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G146240. b) Polypeptide: GRMZM2G077406.
S7_149915464	7	224.363	S7_149914478-S7_149916543	2 Kpb	a) GRMZM2G135029 (149.913.565-149.915.197) ⁺ b) GRMZM2G134797 (149.952.414-149.954.818) ⁺	a) Enzyme: CTF2A; monooxygenase. b) ---
S8_18350213	8	29.292	S8_18350034-S8_18350693	659 pb	a) GRMZM2G144464 (18.349.518-18.350.888) ⁺	a) Enzyme: Pepsin A.
S8_27127641	8	29.292	S8_27127641-S8_27215550	87 Kpb	a) GRMZM2G010596 (27.213.913-27.216.067) ⁺	a) Enzyme: 3-methyl-2-oxobutanoate hydroxymethyltransferase. (Catalysis of the reaction: 5,10-methylenetetrahydrofolate + 3-methyl-2-oxobutanoate = tetrahydrofolate + 2-dehydropantoate).
S8_28291128	8	29.292	S8_28287239-S8_28477886	190 Kpb	a) GRMZM2G062826 (28.287.022-28.290.543) ⁺	a) Polypeptide: Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit 6-interacting protein. Putative uncharacterized protein.
S8_28525959	8	29.292	S8_28477900-S8_28526126	48 Kpb	a) GRMZM2G018228 (28.524.342-28.524.906) ⁺	a) Enzyme: 40S ribosomal protein S15aPutative uncharacterized protein.
S8_29016818	8	29.292	S8_28720585-S8_29089093	368 Kpb	a) GRMZM2G107205 (28.759.513-28.766.322) ⁺ b) GRMZM2G393347 (29.016.326-29.019.052) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G107205. b) Polypeptide: GRMZM2G393347.
S8_29715673 S8_29715718 S8_29715719	8	29.292	S8_29615025-S8_29715719	101 Kpb	a) GRMZM2G372870 (29.714.274-29.717.106) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G372870.
S8_29730975 S8_29731110	8	29.292	S8_29730975-S8_29993233	262 Kpb	a) GRMZM2G070520 (29.729.917-29.733.056) ⁺	a) Enzyme: GRMZM2G070520.
S8_34580216	8	29.292	S8_34580215-S8_34580791	576 pb	a) GRMZM2G148904 (34.579.987-34.580.889) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G148904.
S8_35462167	8	29.292	S8_35231586-S8_35643925	412 Kpb	a) GRMZM2G038212 (35.453.492-35.454.303) ⁺	a) ---
S8_63269011 S8_63269014	8	29.292	S8_63266517-S8_63558249	291 Kpb	a) GRMZM2G389510 (63.324.774-63.328.937) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G389510.

SNP Significativo ^a	Cromosoma ^b	Base de datos ^c	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S8_64650372	8	29.292	S8_64576620- S8_64708127	131 Kpb	a) GRMZM2G355610 (64.169.897-64.175.469) ⁺ b) GRMZM2G054689 (64.661.684-64.664.277) ⁺	a) --- b) Polypeptide: GRMZM2G054689.
S8_65178433 S8_65235694 S8_65235699 S8_65235702 S8_65235708	8	29.292	S8_64746117- S8_65235708	489 Kpb	a) GRMZM2G570842 (64.971.090-64.971.206) ⁺	a) ---
S8_65565478 S8_65565516 S8_65565566 S8_65699016 S8_65750661 S8_65750670 S8_65750859 S8_65753556 S8_65753664 S8_65753745 S8_65784434	8	29.292	S8_65565478- S8_65974200	408 Kpb	a) GRMZM2G098999 (65.781.972-65.784.890) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G098999.
S8_65981915	8	29.292	S8_65977068- S8_65981915	4 Kpb	a) GRMZM2G022101 (65.981.814-65.983.211) ⁺	a) Enzyme: Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase//Cis-zeatin O-beta-D-glucosyltransferase//Sinapate 1-glucosyltransferase. (The chemical reactions and pathways, including anabolism and catabolism, by which living organisms transform chemical substances. Metabolic processes typically transform small molecules, but also include macromolecular processes such as DNA repair and replication, and protein synthesis and degradation).
S8_65982580	8	29.292	S8_65982446- S8_66097813	115 Kpb	a) GRMZM2G022101 (65.981.814-65.983.211) ⁺	a) Enzyme: Indole-3-acetate beta-glucosyltransferase//Cis-zeatin O-beta-D-glucosyltransferase//Sinapate 1-glucosyltransferase. (The chemical reactions and pathways, including anabolism and catabolism, by which living organisms transform chemical substances. Metabolic processes typically transform small molecules, but also include macromolecular processes such as DNA repair and replication, and protein synthesis and degradation).
S8_66142546	8	29.292	S8_65982891- S8_66143414	160 Kpb	a) GRMZM2G492915 (66.099.756-66.102.785) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G492915.
S8_66176488	8	29.292	S8_66144289- S8_66176488	32 Kpb	a) GRMZM2G101042 (66.142.026-66.142.607) ⁺	a) Enzyme: Protein-synthesizing GTPase. (The cellular metabolic process in which a protein is formed, using the sequence of a mature mRNA molecule to specify the sequence of amino acids in a polypeptide chain. Translation is mediated by the ribosome, and begins with the formation of a ternary complex between aminoacylated initiator methionine tRNA, GTP, and initiation factor 2, which subsequently associates with the small subunit of the ribosome and an mRNA. Translation ends with the release of a polypeptide chain from the ribosome).
S8_66556197 S8_66556208	8	29.292	S8_66176717- S8_66662358	485 Kpb	a) GRMZM2G108851 (66.344.845-66.373.626) ⁺	a) ---

SNP Significativo ^a	Cromosoma ^b	Base de datos ^c	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S8_68298442	8	29.292	S8_68269337-S8_68309669	40 Kpb	a) GRMZM2G168654 (68.308.474-68.330.902) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G168654.
S8_68692692	8	29.292	S8_68687432-S8_68693682	6 Kpb	a) GRMZM2G359664 (68.691.072-68.693.397) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G359664.
S8_69119155	8	29.292	S8_69054762-S8_69415009	360 Kpb	a) GRMZM2G125294 (69.119.616-69.130.892) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G125294.
S8_71975885	8	224.363	S8_71974428-S8_71976197	1 Kpb	a) GRMZM2G157153 (71.974.028-71.974.906) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G157153.
S8_73852929 S8_73852948	8	29.292	S8_73852561-S8_73896818	44 Kpb	a) GRMZM2G466731 (73.875.938-73.878.129) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G466731.
S8_79127682	8	29.292	S8_78852104-S8_79149894	297 Kpb	a) GRMZM2G456000 (79.007.087-79.011.437) ⁺	a) Polypeptide: HYP1. (Double layer of lipid molecules that encloses all cells, and, in eukaryotes, many organelles; may be a single or double lipid bilayer; also includes associated proteins).
S9_154098509	9	29.292 /224.363	S9_154097300-S9_154099017	2 Kpb	a) GRMZM2G171365 (153.813.354-153.832.189) ⁺	a) Polypeptide: M5 protein MADS box protein 1Putative uncharacterized protein/MADS1.

^a SNPs significativos detectados.

^b Cromosoma en el que se detectó cada SNP significativo.

^c Base de datos con la que se detectó cada SNP significativo.

^d Marcadores flanqueantes del bloque de ligamiento.

^e Tamaño del QTL en Kpb o pb.

^f Gen o genes candidatos localizados en la página www.maizegdb.org dentro o cerca de la posición del bloque de ligamiento. Cada a) en la columna ^f se corresponde con a) en la columna ^g, cada b) en la columna ^f con b) en la columna ^g etc.

^g Proteína codificada por el gen candidato y su función.

⁺ Posición del gen en el mapa de la página www.maizegdb.org.



A-II Genes candidatos para floración femenina

Tabla A-II Cromosoma, base de datos utilizados, marcadores flanqueantes, longitud del QTL y genes candidatos por cada SNP o grupo de SNPs significativamente asociados a floración femenina de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP Significativo ^c	Cromosoma ^a	Base de datos ^b	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S1_44346106	1	224.363	S1_44345042-S1_44346106	28 Kpb	a) GRMZM2G107731 (44.345.728-44.348.990) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G107731.
S2_79284243	2	29.292	S2_78929348-S2_79416621	487 Kpb	a) GRMZM2G102699 (79.248.690-79.249.426) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G102699.
S2_79872003	2	29.292	S2_79477741-S2_79872003	394 Kpb	a) GRMZM2G065839 (79.844.611-79.872.277) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G065839.
S3_5447465	3	224.363	S3_5440571-S3_5537708	97 Kpb	a) GRMZM2G435338 (5.429.162-5.436.736) ⁺ b) GRMZM2G133314 (5.437.542-5.447.653) ⁺	a) Polypeptide: 60S ribosomal protein L11-1Putative uncharacterized protein. b) Polypeptide: GRMZM2G133314.
S3_5669160	3	29.292/224.363	S3_5669160-S3_5669217	57 pb	a) GRMZM2G050890 (5.668.678-5.669.259) ⁺	a) Polypeptide: Prenylated rab acceptor family proteinPutative uncharacterized protein.
S3_5879931	3	224.363	S3_5879931-S3_5881172	1 Kpb	a) GRMZM2G143723 (5.884.697-5.886.483) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G143723.
S5_31543892	5	224.363	S5_31543892-S5_31676863	132 Kpb	a) GRMZM2G456853 (31.581.326-31.583.716) ⁺ b) GRMZM2G146374 (31.648.431-31.651.233) ⁺	a) Enzyme: GRMZM2G456853. b) Polypeptide: Ubiquitin carrier protein (EC 6.3.2.-).
S5_39898206	5	29.292	S5_39894712-S5_40356702	461 Kpb	a) GRMZM2G014180 (40.079.719-40.104.042) ⁺ b) GRMZM2G012209 (39.870.888-39.881.837) ⁺ c) GRMZM2G016878 (40.226.976-40.228.037) ⁺	a) Polypeptide: Transcription initiation factor IIF, alpha subunit. b) Polypeptide: GRMZM2G012209. c) Polypeptide: GRMZM2G016878.
S5_143975719	5	29.292	S5_143975522-S5_144142545	167 Kpb	a) GRMZM2G158313 (143.972.768-143.974.065) ⁺ b) GRMZM2G111529 (144.098.625-144.117.036) ⁺	a) Polypeptide: BZIP transcription factor family proteinPutative uncharacterized protein. b) Enzyme: 1,3-beta-glucan synthase. (The chemical reactions and pathways resulting in the formation of beta-1,3 glucans, compounds composed of glucose residues linked by 1,3-beta-D-glucosidic bonds).
S5_151886703	5	29.292	S5_151886703-S5_151989388	102 Kpb	a) GRMZM2G176206 (151.883.998-151.887.211) ⁺	a) Enzyme: GRMZM2G176206.
S5_213028225	5	29.292/224.363	S5_212882092-S5_213028273	146 Kpb	a) GRMZM2G468932 (212.882.757-212.883.323) ⁺ b) GRMZM2G005791 (212.999.104-213.004.185) ⁺	a) Polypeptide: 60S ribosome subunit biogenesis protein NIP7Putative uncharacterized protein. (The aggregation, arrangement and bonding together of the mature ribosome and of its subunits). b) Polypeptide: GRMZM2G005791.

SNP Significativo ^c	Cromosoma ^a	Base de datos ^b	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S6_106836229	6	29.292	S6_106836229	0.0 Kpb	a) GRMZM2G127251 (106.835.282-106.836.598) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G127251.
S7_25505913	7	29.292	S7_25158423-S7_25505914	347 Kpb	a) GRMZM2G086757 (25.156.008-25.157.144) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G086757.
S7_154700916	7	29.292	S7_154699325-S7_154700916	1 Kpb	a) GRMZM2G387381 (154.699.482-154.700.375) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G387381.
S7_155584900, S7_155584919	7	29.292	S7_155564085-S7_155587508	23 Kpb	a) GRMZM2G108285 (155.559.763-155.562.592) ⁺ b) GRMZM2G041381 (155.584.987-155.585.872) ⁺ c) GRMZM2G042047 (155.587.581-155.588.220) ⁺	a) Enzyme: Isopentenyl pyrophosphate isomerase/Isopentenyl-diphosphate delta-isomerase II. (Catalysis of the reaction: isopentenyl diphosphate = dimethylallyl diphosphate). flower development. b) Polypeptide: Histone H2A. c) Polypeptide: Histone H2A.
S7_155743387	7	29.292	S7_155743302-S7_155743991	689 pb	a) GRMZM2G444075 (155.741.919-155.745.194) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G444075.
S7_158959879, S7_158959879, S7_158959908, S7_158959910, S7_158959912, S7_158959913, S7_158959914	7	29.292	S7_158959869-S7_159130564	170 Kpb	a) GRMZM2G081782 (158.951.458-158.953.863) ⁺ b) GRMZM2G380656 (158.960.452-158.960.928) ⁺ c) GRMZM2G081668 (158.974.229-158.977.661) ⁺ d) GRMZM2G081155 (159.002.065-159.027.333) ⁺ e) GRMZM2G107562 (159.130.801-159.136.752) ⁺	a) Polypeptide: AN1-type zinc finger protein 2BPutative uncharacterized protein. b) Polypeptide: GRMZM2G380656. (Clone 1526594 mRNA sequence). c) Polypeptide: GRMZM2G081668. d) Polypeptide: GRMZM2G081155. e) Polypeptide: Copper ion binding proteinPutative uncharacterized protein. (Interacting selectively and non-covalently with copper (Cu) ions).
S7_164078854	7	29.292	S7_164078770-S7_164196639	117 Kpb	a) GRMZM2G136918 (164.072.342-164.075.777) ⁺ b) GRMZM2G136884 (164.078.675-164.080.213) ⁺ c) GRMZM2G136872 (164.080.762-164.085.807) ⁺ d) GRMZM2G167520 (164.197.976-164.199.972) ⁺	a) Enzyme: 6-phosphogluconolactonase. (Catalysis of the reaction: 6-O-phosphono-D-glucono-1, 5-lactone + H(2)O = 6-phospho-D-gluconate + H(+)). b) Enzyme: Pepsin A. c) Polypeptide: GRMZM2G136872. d) Polypeptide: Brittle stalk-2-like protein 6Putative uncharacterized protein.
S8_121797765	8	29.292	S8_121797170-S8_121799723	2 Kpb	a) GRMZM2G366873 (121.797.274-121.799.409) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G366873.
S8_124357599	8	224.363	S8_124357232-S8_124357639	407 Kpb	a) GRMZM2G135381 (124.357.367-124.358.834) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G135381.
S8_124358657	8	29.292	S8_124357802-S8_124358657	855 pb	a) GRMZM2G135381 (124.357.367-124.358.834) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G135381. (Clone 291148 mRNA sequence).
S8_125197739, S8_125197822	8	29.292	S8_125197105-S8_125198013	908 pb	a) AC205471.4_FG008 (125.196.525-125.197.922) ⁺	a) Polypeptide: AC205471.4_FGP008. protein binding.
S8_125473699	8	29.292/224.363	S8_125470443-S8_125743619	273 Kpb	a) GRMZM2G048200 (125.470.063-125.473.867) ⁺ b) GRMZM2G034551 (125.741.469-125.743.923) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G048200. b) Transporter: ZIP zinc/iron transport family protein. (Catalysis of the transfer of zinc (Zn) ions from one side of a membrane to the other).

SNP Significativo ^c	Cromosoma ^a	Base de datos ^b	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S8_132878255	8	29.292/224.363	S8_132878255-S8_132992521	114 Kpb	a) GRMZM2G056014 (132.408.451-132.413.070) ⁺ b) GRMZM2G381168 (132.993.511-133.000.479) ⁺	a) --- b) Polypeptide: GRMZM2G381168
S8_135352477	8	29.292/224.363	S8_135208533-S8_135417846	209 Kpb	a) GRMZM2G339151 (135.208.571-135.212.407) ⁺	a) Enzyme: Full-length cDNA clone ZM_BFb0217E05.
S8_135716709	8	224.363	S8_135716700-S8_135764064	47 Kpb	a) GRMZM2G101664 (135.715.734-135.716.682) ⁺	a) Polypeptide: Zinc finger protein. (Interacting selectively and non-covalently with zinc (Zn) ions).
S8_142370328	8	29.292	S8_142369668-S8_142370328	660 pb	a) GRMZM2G400533 (142.364.614-142.371.333) ⁺	a) Enzyme: Nucleoside-triphosphatase. (Catalysis of the reaction: a nucleoside triphosphate + H2O = nucleoside diphosphate + phosphate).
S8_142371602, S8_142371636	8	29.292	S8_142371435-S8_142371636	201 pb	a) GRMZM2G034573 (142.842.119-142.843.054) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G034573.
S8_142476923	8	29.292	S8_142427665-S8_142476929	49 Kpb	a) GRMZM2G375707 (142.476.468-142.477.874) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G375707.
S9_12601606	9	224.363	S9_12601217-S9_12601606	389 pb	a) GRMZM2G428370 (12.598.224-12.601.309) ⁺	a) Enzyme: GRMZM2G428370.
S9_14646808	9	29.292	S9_14646808-S9_14821417	174 Kpb	a) GRMZM2G325561 (14.645.426-14.647.309) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G325561.
S10_3192554	10	29.292	S10_3191113-S10_3192778	1 Kpb	a) GRMZM2G058595 (3.190.661-3.192.879) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G058595.
S10_88570718	10	224.363	S10_88570718-S10_88571133	415 pb	a) GRMZM2G350693 (88.570.529-88.570.774) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G350693.
S10_105904131	10	224.363	S10_105904006-S10_105904131	125 pb	a) GRMZM5G801531 (105.877.101-105.877.760) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM5G801531.

^a Cromosoma en el que se detectó cada SNP significativo.

^b Base de datos con la que se detectó cada SNP significativo.

^c SNPs significativos detectados.

^d Marcadores flanqueantes del bloque de ligamiento.

^e Tamaño del QTL en Kpb o pb.

^f Gen o genes candidatos localizados en la página www.maizegdb.org dentro o cerca de la posición del bloque de ligamiento. Cada a) en la columna ^f se corresponde con a) en la columna ^g, cada b) en la columna ^f con b) en la columna ^g etc.

^g Proteína codificada por el gen candidato y su función.

⁺ Posición del gen en el mapa de la página www.maizegdb.org.



A-III Genes candidatos para rendimiento

Con los 15 QTL se encontraron 26 genes candidatos los cuales están adyacentes a los SNPs asociados al carácter de rendimiento. El SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 1 (S1_200479419), dentro de los marcadores flanquantes (S1_200413533-S1_200482504) y este haplotipo esta en parte localizado dentro del gen candidato GRMZM2G157018 (200.480.789-200.483.470). Este gen es transportador: cadena ATP sintasa D, mitocondrial (“Transporter: ATP synthase D chain, mitocondrial”), que ayuda al transporte de protones a través de una membrana para generar un gradiente electroquímico (fuerza motriz protónica) que potencia la síntesis de ATP (www.maizegdb.org). También está relacionado con los ID: GO:0005740 envolvente mitocondrial: ATPasa, complejo F0, subunidad D Citocromo c oxidasa cobre. GO:0015078 actividad del transportador transmembrana de iones de hidrógeno: Ubiquinol-citocromo C reductasa. Y el GO:0015992 Transporte de protones: ATPasa, complejo F0, subunidad D (Qi *et al.*, 2017). El SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 1 (S1_200801543) localizado dentro del bloque de ligamiento (S1_200725160-S1_200801588) el haplotipo está localizado en parte dentro del gen candidato GRMZM2G133413 (200,724,064-200,726,400). El gen codifica para el polipeptido GRMZM2G133413 (“Polypeptide: GRMZM2G133413”). Y es un gen inhibidor de la kinasa dependiente de la ciclina (“*cyclin dependent kinase inhibitor: CDKI*”) (Min *et al.*, 2016). El SNP localizado en el cromosoma 1 (S1_201847366) se localiza dentro del gen candidato GRMZM2G165011 (201.845.735-201.847.693). Este gen codifica para la enzima: Histona-lisina N-metiltransferasa (“Enzyme: Histone-lysine N-methyltransferase”), que está involucrada en la catálisis de la reacción: S-adenosil-L-metionina + histona L-lisina = S-adenosil-L-homocisteína + histona N6-metil-L-lisina. La metilación de la peptidil-lisina en las histonas forma N6-metil-L-lisina, N6, N6-dimetil-L-lisina y derivados N6, N6, N6-trimetil-L-lisina (www.maizegdb.org). El del gen candidato GRMZM2G056686 (201,868,285-201,872,683) está localizado dentro del SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 1 (S1_201847366) localizado dentro del bloque de ligamiento (S1_201729280-S1_201872777). El gen GRMZM2G056686 codifica para el polipeptido F420 Hidrogenasa/deshidrogenasa,

familia de la subunidad beta (“Polypeptide: F420 hydrogenase/dehydrogenase, beta subunit family”) (www.maizegdb.org). El del gen candidato GRMZM2G148867 (201,739,161-201,740,315) está localizado dentro del SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 1 (S1_201847366) localizado dentro del bloque de ligamiento (S1_201729280-S1_201872777). El gen GRMZM2G148867 codifica para el polipeptido GRMZM2G148896 (“Polypeptide: GRMZM2G148896”) Para sintetizar el cofactor tiamina difosfato (ThDP), las plantas deben primero hidrolizar tiamina monofosfato (ThMP) a tiamina, pero las enzimas dedicadas para este paso de hidrólisis eran desconocidas y ampliamente dudosas de existir. GRMZM2G148896 es fosfatasas ThMP-selectivas cuya actividad reside en el dominio HAD y que el dominio TenA At5g32470 tiene la actividad esperada de salvamento de tiamina. Los experimentos in vitro e in vivo mostraron que los sitios de inicio de traducción alternativos dirigen la proteína At5g32470 al citosol y potencialmente también a las mitocondrias. Por lo tanto los hallazgos de Mimura *et al.* (2016) establecen que las plantas tienen una fosfatasa ThMP dedicada e indican que una depleción de THDP modesta (50%) puede producir síntomas de deficiencia severa. El SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 1 (S1_202647745) localizado dentro del bloque de ligamiento (S1_202647173-S1_202752781) el haplotipo está localizado 1714 pb corriente abajo del gen candidato GRMZM2G389233 (202.754.495-202.763.888). El gen codifica para la enzima glicil aminopeptidasa (M1) (“Enzyme: glycyl aminopeptidase (M1)”), que se relaciona con la catálisis de la hidrólisis de los enlaces peptídicos por un mecanismo en el que el agua actúa como un nucleófilo, uno o dos iones metálicos mantienen la molécula de agua en su lugar y las cadenas laterales de aminoácidos cargadas son ligandos para los iones metálicos (www.maizegdb.org). Los SNPs asociados significativamente al rendimiento en el cromosoma 2 (S2_144722563, S2_144722574) localizados dentro del bloque de ligamiento (S2_144720120-S2_144802116) el haplotipo está localizado en parte dentro del gen candidato GRMZM2G046201 (144.720.028-144.722.446). El gen codifica para la enzima longitud completa cDNA clon ZM_BFb0287L14, fosforilación de proteínas (“Enzyme: Full-length cDNA clone ZM_BFb0287L14, protein phosphorylation”)

relacionada con el proceso de introducción de un grupo fosfato en una proteína (www.maizegdb.org). Los SNPs asociados significativamente al rendimiento en el cromosoma 2 (S2_144722563, S2_144722574) localizados dentro del bloque de ligamiento (S2_144720120-S2_144802116) el haplotipo está localizado en parte dentro del gen candidato GRMZM2G133624 (144.729.215-144.732.032). El gen codifica para la enzima peptidil-prolil isomerasa (“Enzyme: Peptidyl-prolyl isomerase”), relacionada con el proceso de ayudar en el ensamblaje covalente y no covalente de polipéptidos de cadena sencilla o complejos de subunidades múltiples en la estructura terciaria correcta (www.maizegdb.org). Los SNPs asociados significativamente al rendimiento en el cromosoma 2 (S2_144722563, S2_144722574) localizados dentro del bloque de ligamiento (S2_144720120-S2_144802116) el haplotipo está localizado en parte dentro del gen candidato GRMZM2G092581 (144.800.931-144.802.805). El gen codifica para el polipeptido GRMZM2G092581 (“Polypeptide: GRMZM2G092581”), relacionado con el movimiento dirigido de iones metálicos, cualquier ión metálico con carga eléctrica, dentro, fuera o dentro de una célula, o entre células, por medio de algún agente tal como un transportador o poro (www.maizegdb.org). El gen candidato GRMZM2G064898 (167.417.884-167.420.116) está localizado dentro del SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 2 (S2_167509666) localizado dentro del bloque de ligamiento (S2_167417879-S2_167847759). El gen GRMZM2G056686 codifica para el polipeptido de la familia ORMDL (“Polypeptide: ORMDL family protein. Putative uncharacterized protein”), relacionada con la penetración de al menos una bicapa de fosfolípidos de una membrana. También puede referirse al estado de ser enterrado en la bicapa sin exposición fuera de la bicapa. O bien cuando se usa para describir una proteína, indica que toda o parte de la secuencia peptídica está incrustada en la membrana (www.maizegdb.org). El gen candidato GRMZM2G033694 (173.776.530-173.792.763) está localizado dentro del bloque de ligamiento (S2_173775864-S2_173793260) del SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 2 (S2_173776029). El gen GRMZM2G033694 codifica para la enzima: histona-lisina N-metiltransferasa, H3 lisina-36 y H4 lisina-20 específica. Proteína putativa no caracterizada (“Enzyme: Histone-lysine N-

methyltransferase, H3 lysine-36 and H4 lysine-20 specific. Putative uncharacterized protein”) relacionada con la Catálisis de la reacción: S-adenosil-L-metionina + histona L-lisina = S-adenosil-L-homocisteína + histona N6-metil-L-lisina. La metilación de peptidil-lisina en forma de histonas N6-metil-L-lisina, N6, N6-dimetil-L-lisina y derivados N6, N6, N6-trimetil-L-lisina (www.maizegdb.org). El SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 7 (S7_17180231) está localizado 240 pb corriente abajo del gen candidato GRMZM2G088469 (17.180.471-17.181.783). El gen codifica para el polipeptido: GRMZM2G088469 (“Polypeptide: GRMZM2G088469”) (www.maizegdb.org). Putative uncharacterized protein (Urbany *et al.*, 2013). Los SNPs asociados significativamente al rendimiento en el cromosoma 9 (S9_5656122 y S9_5656138) están localizados dentro del gen candidato GRMZM2G080354 (5.654.786-5.657.172). El gen codifica para el polipeptido: GRMZM2G080354 (“Polypeptide: GRMZM2G080354”) que está relacionado con el proceso de biosíntesis de trehalosa (Zhou *et al.*, 2014). Los SNPs asociados significativamente al rendimiento en el cromosoma 9 (S9_9966270, S9_9966272 y S9_9966291) están localizados dentro del gen candidato GRMZM2G122793 (9.965.176-9.969.449). El gen codifica para la enzima: cadena catalítica de ferredoxina-tiorredoxina reductasa, precursor cloroplástico (FTR-C) (EC 1.18.-) (“Enzyme: Ferredoxin-thioredoxin reductase catalytic chain, chloroplastic Precursor (FTR-C) (EC 1.18.-.-)”), que está involucrada en la subunidad de ferredoxina-tiorredoxina reductasa B (FTR-B) // ferredoxina-tiorredoxina reductasa-beta (FTR-B). Un proceso metabólico que da como resultado la eliminación o adición de uno o más electrones hacia o desde una sustancia, con o sin la eliminación concomitante o la adición de un protón o protones (www.maizegdb.org). El gen candidato GRMZM2G478553 (11.736.254-11.737.774) está localizado dentro del bloque de ligamiento (S9_11733238-S9_11775273) del SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 9 (S9_11746822). El gen GRMZM2G478553 también llamado (“Zinc finger nuclease (Znf)”) (Hawkins *et al.*, 2014). El gen candidato GRMZM2G177218 (11.738.785-11.739.961) está localizado dentro del bloque de ligamiento (S9_11733238-S9_11775273) del SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 9 (S9_11746822). El gen

GRMZM2G177218 codifica para la enzima Hypro1 (“Enzyme: *Hypro1*. Putative uncharacterized protein (*hypro1*)”) (Hawkins *et al.*, 2014). El gen candidato GRMZM2G177098 (11.745.997-11.754.981) está localizado dentro del bloque de ligamiento (S9_11733238-S9_11775273) del SNP asociado significativamente al rendimiento en el cromosoma 9 (S9_11746822). El gen GRMZM2G177098 codifica para “*stc1* sesquiterpene cyclase1” (Olmos *et al.*, 2013). Los genes candidatos GRMZM2G134735, GRMZM2G457309, GRMZM2G157010, GRMZM2G148867, GRMZM2G148867, GRMZM2G422373, GRMZM2G092268, GRMZM2G539076 y GRMZM5G823534 codifican para polipeptidos o enzimas no caracterizadas (Tabla A-III).



Tabla A-III Cromosoma, base de datos utilizados, marcadores flanqueantes, longitud del QTL y genes candidatos por cada SNP o grupo de SNPs significativamente asociados a rendimiento de maíz bajo infestación con *S. nonagrioides*.

SNP Significativo ^a	Cromosoma ^b	Base de datos ^c	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S1_199075640 S1_199075673 S1_199075674 S1_199075675 S1_199075677 S1_199075679 S1_199075681 S1_199075682 S1_199075684	1	224.363	S1_199074721- S1_199104824	30 Kpb	a) GRMZM2G134735 (199.070.446-199.071.201) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G134735.
S1_200479419	1	224.363	S1_200413533- S1_200482504	68 Kpb	a) GRMZM2G457309 (200.469.024-200.469.524) ⁺ b) GRMZM2G157010 (200.470.922-200.479.703) ⁺ c) GRMZM2G157018 (200.480.789-200.483.470) ⁺	a) Polypeptide: Mucin-2. Putative uncharacterized protein. b) Polypeptide: GRMZM2G157010. c) Transporter: ATP synthase D chain, mitochondrial. (The transport of protons across a membrane to generate an electrochemical gradient (proton-motive force) that powers ATP synthesis) (www.maizegdb.org). GO:0005740 Mitochondrial envelope: ATPase, F0 complex, subunit D Cytochrome c oxidase copper. GO:0015078 Hydrogen ion transmembrane transporter activity: Ubiquinol-cytochrome C reductase. GO:0015992 proton transport: ATPase, F0 complex, subunit D (Qi <i>et al.</i> , 2017).
S1_200801543	1	29.292	S1_200725160- S1_200801588	76 Kpb	a) GRMZM2G133413 (200.724.064-200.726.400) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G133413. Only a <i>cyclin</i> gene (<i>cyclin dependent kinase inhibitor: CDKI</i>): GRMZM2G133413 showed an increased expression level in RIL70 (Min <i>et al.</i> , 2016).
S1_201847366	1	29.292	S1_201729280- S1_201872777	143 Kpb	a) GRMZM2G148867 (201.739.161-201.740.315) ⁺ b) GRMZM2G165011 (201.845.735-201.847.693) ⁺ c) GRMZM2G056686 (201.868.285-201.872.683) ⁺ d) GRMZM2G148896 (201.736.464-201.738.666) ⁺ e) GRMZM2G148867 (201.739.161-201.740.315) ⁺	a) Enzyme: GRMZM2G148867. b) Enzyme: Histone-lysine N-methyltransferase. (Catalysis of the reaction: S-adenosyl-L-methionine + histone L-lysine = S-adenosyl-L-homocysteine + histone N6-methyl-L-lysine. The methylation of peptidyl-lysine in histones forms N6-methyl-L-lysine, N6, N6-dimethyl-L-lysine and N6,N6-trimethyl-L-lysine derivatives) (www.maizegdb.org). c) Polypeptide: F420 hydrogenase/dehydrogenase, beta subunit family (www.maizegdb.org). d) Polypeptide: GRMZM2G148896 To synthesize the cofactor thiamin diphosphate (ThDP), plants must first hydrolyze thiamin monophosphate (ThMP) to thiamin, but dedicated enzymes for this hydrolysis step were unknown and widely doubted to exist. GRMZM2G148896 is ThMP-selective phosphatases whose activity resides in the HAD domain and that the At5g32470 TenA domain has the expected thiamin salvage activity. In vitro and in vivo experiments showed that alternative translation start sites direct the At5g32470 protein to the cytosol and potentially also to mitochondria. Our findings establish that plants have a dedicated ThMP phosphatase and indicate that modest (50%) ThDP depletion can produce severe deficiency symptoms. (Mimura <i>et al.</i> , 2016). e) Enzyme: GRMZM2G148867.
S1_202160398	1	29.292	S1_202160254- S1_202160398	144 pb	a) GRMZM2G422373 (202.158.408-202.160.444) ⁺	a) Enzyme: GRMZM2G422373.

SNP Significativo ^a	Cromosoma ^b	Base de datos ^c	Marcadores Flanqueantes ^d	Kpb o pb del QTL ^e	Identificador del gen y posición en el mapa ^f	Proteína codificada ^g (en www.maizegdb.org)
S1_202647745	1	224.363	S1_202647173-S1_202752781	105 Kpb	a) GRMZM2G092268 (202.647.101-202.647.910) ⁺ b) GRMZM2G389233 (202.754.495-202.763.888) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G092268. b) Enzyme: glycyl aminopeptidase (M1). (Catalysis of the hydrolysis of peptide bonds by a mechanism in which water acts as a nucleophile, one or two metal ions hold the water molecule in place, and charged amino acid side chains are ligands for the metal ions).
S2_144722563, S2_144722574	2	29.292	S2_144720120-S2_144802116	81 Kpb	a) GRMZM2G046201 (144.720.028-144.722.446) ⁺ b) GRMZM2G133624 (144.729.215-144.732.032) ⁺ c) GRMZM2G092581 (144.800.931-144.802.805) ⁺	a) Enzyme: Full-length cDNA clone ZM_BFb0287L14, protein phosphorylation. (The process of introducing a phosphate group on to a protein). b) Enzyme: Peptidyl-prolyl isomerase. (The process of assisting in the covalent and noncovalent assembly of single chain polypeptides or multisubunit complexes into the correct tertiary structure). c) Polypeptide: GRMZM2G092581. (The directed movement of metal ions, any metal ion with an electric charge, into, out of or within a cell, or between cells, by means of some agent such as a transporter or pore).
S2_167509666	2	29.292	S2_167417879-S2_167847759	429 Kpb	a) GRMZM2G064898 (167.417.884-167.420.116) ⁺	a) Polypeptide: ORMDL family protein. Putative uncharacterized protein. (Penetrating at least one phospholipid bilayer of a membrane. May also refer to the state of being buried in the bilayer with no exposure outside the bilayer. When used to describe a protein, indicates that all or part of the peptide sequence is embedded in the membrane).
S2_173776029	2	29.292	S2_173775864-S2_173793260	17 Kpb	a) GRMZM2G033694 (173.776.530-173.792.763) ⁺	a) Enzyme: Histone-lysine N-methyltransferase, H3 lysine-36 and H4 lysine-20specific Putative uncharacterized protein. (Catalysis of the reaction: S-adenosyl-L-methionine + histone L-lysine = S-adenosyl-L-homocysteine + histone N6-methyl-L-lysine. The methylation of peptidyl-lysine in histones forms N6-methyl-L-lysine, N6,N6-dimethyl-L-lysine and N6,N6,N6-trimethyl-L-lysine derivatives).
S7_17180231	7	29.292	S7_17180176-S7_17180231	55 pb	a) GRMZM2G088469 (17.180.471-17.181.783) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G088469. Putative uncharacterized protein (Urbany <i>et al.</i> , 2013)
S5_128333604, S5_128333610	5	224.363	S5_128333162-S5_128333610	448 pb	a) GRMZM2G539076 (128.325.706-128.325.818) ⁺	a) ---
S8_171634738	8	224.363	S8_171634732-S8_171634791	59 pb	a) GRMZM5G823534 (171.669.398-171.670.275) ⁺	a) ---
S9_5656122, S9_5656138	9	224.363	S9_5656122-S9_5656984	862 pb	a) GRMZM2G080354 (5.654.786-5.657.172) ⁺	a) Polypeptide: GRMZM2G080354. Trehalose biosynthetic process (Zhou <i>et al.</i> , 2014)
S9_9966270, S9_9966272, S9_9966291	9	224.363	S9_9966270-S9_9967813	1 Kpb	a) GRMZM2G122793 (9.965.176-9.969.449) ⁺	a) Enzyme: Ferredoxin-thioredoxin reductase catalytic chain, chloroplastic Precursor (FTR-C) (EC 1.18.-.-) (Ferredoxin-thioredoxin reductase subunit B)(FTR-B)//ferredoxin-thioredoxin reductase-beta (FTR-B). (A metabolic process that results in the removal or addition of one or more electrons to or from a substance, with or without the concomitant removal or addition of a proton or protons).
S9_11746822	9	224.363	S9_11733238-S9_11775273	42 Kpb	a) GRMZM2G478553 (11.736.254-11.737.774) ⁺ b) GRMZM2G177218 (11.738.785-11.739.961) ⁺ c) GRMZM2G177098 (11.745.997-11.754.981) ⁺	a) Zinc finger nuclease (Znf) (Hawkins <i>et al.</i> , 2014). b) Enzyme: <i>Hypro1</i> . Putative uncharacterized protein (<i>hypro1</i>) (Hawkins <i>et al.</i> , 2014). c) <i>stc1</i> sesquiterpene cyclase I (Olmos <i>et al.</i> , 2013).

^a SNPs significativos detectados.

^b Cromosoma en el que se detectó cada SNP significativo.

^c Base de datos con la que se detectó cada SNP significativo.

^d Marcadores flanqueantes del bloque de ligamiento.

^e Tamaño del QTL en Kpb o pb.

^f Gen o genes candidatos localizados en la página www.maizegdb.org dentro o cerca de la posición del bloque de ligamiento. Cada a) en la columna ^f se corresponde con a) en la columna ^g, cada b) en la columna ^f con b) en la columna ^g etc.

^g Proteína codificada por el gen candidato y su función.

⁺ Posición del gen en el mapa de la página www.maizegdb.org.

