



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

Luis Fernando Samayoa López

TESIS DOCTORAL

**LOCALIZACIÓN DE QTL E IDENTIFICACIÓN DE GENES
DE RESISTENCIA Y/O TOLERANCIA A LA PLAGA DE LOS
TALADROS DEL MAÍZ**

SANTIAGO DE COMPOSTELA / LUGO



**LOCALIZACIÓN DE QTL E IDENTIFICACIÓN DE GENES
DE RESISTENCIA Y/O TOLERANCIA A LA PLAGA DE LOS
TALADROS DEL MAÍZ**

Memoria para optar al grado de Doctor, que presenta

Luis Fernando Samayoa López

Pontevedra, 20 de Agosto de 2014

ANA BUTRÓN, Científico titular y ROSA ANA MALVAR, Profesora de investigación del Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) en calidad de directoras y ANTONIO RIGUEIRO, Profesor titular del Departamento de Producción Vegetal - USC, en calidad de tutor.

CERTIFICAN:

Que la presente memoria titulada “Localización de QTL e identificación de genes de resistencia y/o tolerancia a la plaga de los taladros del maíz” para optar al grado de Doctor presentada por el Ingeniero Agrónomo Luis Fernando Samayoa López 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 Agosto del 2014.

Ana Butrón

Rosa Ana Malvar

Antonio Rigueiro

A large, light blue watermark of the USC logo is positioned diagonally across the center of the page. The logo consists of the letters 'USC' in a large, stylized font, with the full name 'UNIVERSIDAD DE SANTIAGO DE COMPOSTELA' written in a smaller font below it.

A mi Madre, a Liliana y nuestro pequeño Fernando

Agradecimientos

Hace ya cuatro años que llegue al grupo de maíces de la Misión Biológica de Galicia motivado por el deseo de investigar y aprender sobre el mundo de la mejora genética del maíz, ahora ha llegado el momento de agradecer a todas esas personas que de una u otra forma me brindaron su ayuda para llegar al final de este camino, la culminación de mi tesis doctoral.

Quiero empezar agradeciendo a mis directoras, Dra. Ana Butrón y Dra. Rosa Ana Malvar, por brindarme la oportunidad de realizar este trabajo, por su paciencia y esmero brindado durante toda mi formación. Y no solo por la valiosa formación científica que me dieron sino además por su amistad y apoyo tanto dentro como fuera del ámbito profesional.

Al resto de científicos del grupo de maíces, Dr. Amando Ordás, Dr. Pedro Revilla, Dr. Bernardo Ordás, Dr. Rogelio Santiago y Dr. Víctor Rodríguez por su buena disposición en compartir conocimientos, consejos y sugerencias y por toda la ayuda durante el tiempo que duro mi investigación.

A todo el personal técnico del grupo de maíces, Ana Alonso, Ana Carballeda, Bea Lago y Silvana Poceiro por su ayuda en la fase experimental y de laboratorio de mi investigación y por la amistad brindada durante todo este tiempo, y por supuesto a la excompañera Raquel Díaz cuyo aporte fue considerable en la fase de genotipado.

Y fuera del grupo agradezco la amistad de Lus Pato y de la Dra. M^a de la Fuente así también el atento servicio de Miriam en la biblioteca.

A todo el personal de campo que ha contribuido en la fase experimental de mi investigación, sin duda su labor fue de suma importancia en la fase de medición de las galerías de todos los ensayos de campo.

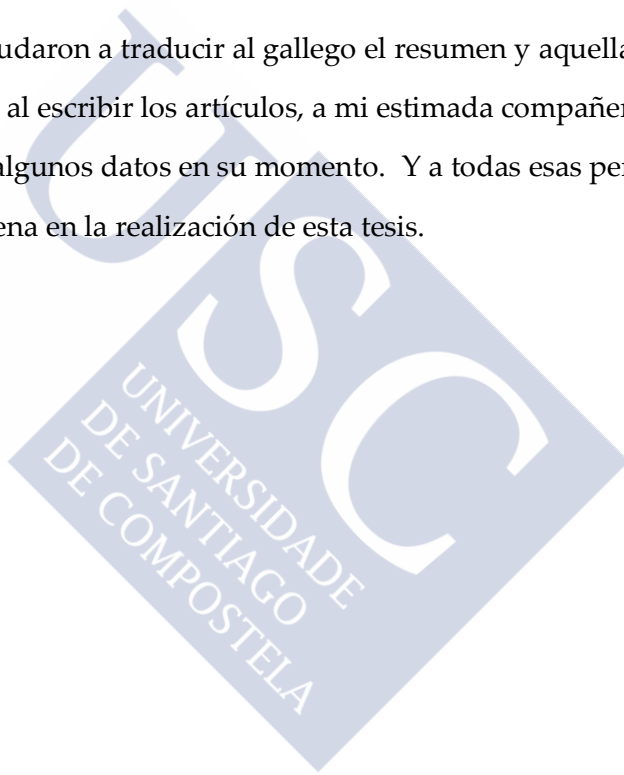
Al Dr. James Holland de la Universidad del Estado de Carolina del Norte (NCSU, USA) por haberme dado la oportunidad de realizar una estancia académica en su laboratorio, por su asesoramiento en el análisis del mapeo de asociación y sobre todo por su amistad. Así también quiero agradecer al Dr. Bode Olukolu de la NCSU por su colaboración en los análisis del mapeo de asociación y a su buena disposición en la

resolución de dudas. Y al resto de chicos que eran parte del Holland's Lab, entre ellos al Dr. Charlie Zila, por su amistad y colaboración en la estancia.

Agradezco de manera muy especial al Consejo Superior de Investigaciones Científicas (CSIC) por haberme concedido la beca para realizar esta tesis dentro del programa Jae-Predoc. Y a los proyectos “Mejora Genética de la Resistencia del Maíz a los Taladros”, AGL2009-09611 y AGL2012-33415 por financiar esta investigación.

A toda mi familia que me ha apoyado moralmente todo este tiempo desde el otro lado del Atlántico, y a mi buen amigo Rudy Molina por estar pendiente de mí desde las bananeras de Guatemala.

A las personas que me ayudaron a traducir al gallego el resumen y aquellas que me aclararon dudas de inglés al escribir los artículos, a mi estimada compañera de piso Bea por ayudarme a corregir algunos datos en su momento. Y a todas esas personas que pusieron su granito de arena en la realización de esta tesis.



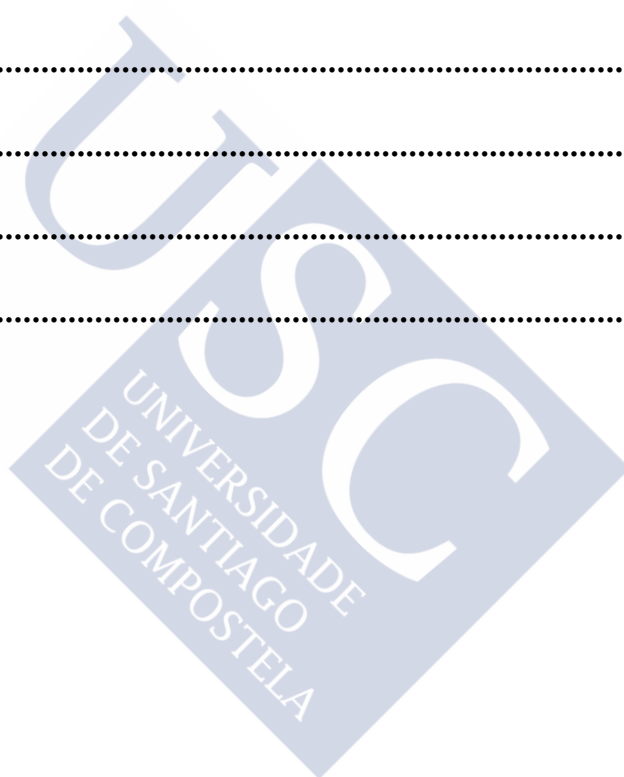
CONTENIDO

1. Introducción.....	3
1.1 La plaga de los taladros del maíz.....	3
1.2 Defensa del maíz frente al ataque de los taladros.....	4
1.3 Métodos de control.....	5
1.3.1 Control químico y cultural.....	6
1.3.2 Control biológico.....	6
1.3.3 Control mediante mejora genética.....	7
1.3.3.1 Variedades resistentes: introducción de genes de resistencia mediante transformación genética.....	7
1.3.3.2 Variedades resistentes: uso de la variación genética natural para resistencia a insectos mediante selección.....	9
1.4 Asociaciones entre genotipo y fenotipo: búsqueda de QTL y genes relacionados con la resistencia y la tolerancia.....	11
1.4.1 Poblaciones de mapeo.....	11
1.4.1.1 Mapeo de QTL en poblaciones estructuradas: poblaciones biparentales, poblaciones multiparentales y NAM.....	11
1.4.1.2 Mapeo de QTL en poblaciones no estructuradas: paneles de asociación.....	14
1.4.2 Identificación de QTL.....	14
1.4.2.1 Mapeo convencional de QTL.....	15
1.4.2.2 Mapeo de asociación.....	17
1.4.2.3 Situación de los estudios de QTL de resistencia a los taladros del maíz.....	20
1.4.3 Validación de QTL.....	21
1.4.4 Herramientas estadísticas para el análisis de QTL.....	22
1.5 Justificación del trabajo: estudios de identificación de QTL en <i>S. nonagrioides</i>	23
2. Objetivos	29
2.1 Objetivo general	29
2.2 Objetivos específicos	29

3. Materiales y métodos.....	33
3.1 Mapeo convencional de QTL.....	33
3.1.1 Material vegetal.....	33
3.1.2 Datos genotípicos	34
3.1.3 Datos fenotípicos	37
3.1.4 Análisis estadístico de los datos fenotípicos	39
3.1.5 Análisis de QTL.....	40
3.1.6 Validación	41
3.2 Mapeo de Asociación.....	42
3.2.1 Material vegetal.....	42
3.2.2 Datos genotípicos	42
3.2.3 Datos fenotípicos.....	43
3.2.4 Análisis estadístico de los datos fenotípicos	44
3.2.5 Análisis de asociación.....	44
3.2.6 Umbral de significancia	45
3.2.7 Desequilibrio de ligamiento y selección de genes candidatos	46
4. Resultados	49
4.1 Mapeo convencional de QTL.....	49
4.1.1 Medias, heredabilidades y correlaciones.....	49
4.1.2 Mapa genético.....	53
4.1.3 QTL identificados.....	53
4.1.3.1 QTL detectados para caracteres de resistencia a <i>S. nonagrioides</i>	56
4.1.3.2 QTL detectados para caracteres agronómicos.....	63
4.1.4 Interacción QTL × ambiente.....	76
4.1.5 Validación	77
4.2 Mapeo de asociación.....	80
4.2.1 Medias, Análisis de varianzas y heredabilidades	80

4.2.2	Análisis de correlación.....	81
4.2.3	Análisis de asociación	83
4.2.4	Selección de genes candidatos.....	89
4.2.4.1	Genes candidatos para longitud de galerías	89
4.2.4.2	Genes candidatos para daño de tallo relativo	90
4.2.4.3	Genes candidatos para resistencia de grano	92
5.	Discusión.....	99
5.1	Mapeo convencional de QTL.....	99
5.1.1	QTL para caracteres de resistencia a <i>S. nonagrioides</i> y para caracteres agronómicos.....	99
5.1.2	Interacción QTL × E.....	102
5.1.3	Relación entre caracteres de resistencia a <i>S. nonagrioides</i> y caracteres agronómicos (no incluyendo el rendimiento).	103
5.1.4	Rendimiento y su relación con la resistencia.....	105
5.1.5	Relación entre caracteres agronómicos (no incluyendo el rendimiento).....	105
5.1.6	Validación	106
5.2	Mapeo de asociación	107
5.2.1	Medias, heredabilidades y correlaciones.....	107
5.2.2	Análisis de asociación	109
5.2.3	Genes candidatos.....	110
5.2.3.1	Genes asociados con longitud de galerías hechas por <i>S.</i> <i>nonagrioides</i>	110
5.2.3.2	Genes asociados con daño relativo de tallo ocasionado por <i>S.</i> <i>nonagrioides</i>	111
5.2.3.3	Genes asociados con resistencia de grano al ataque de <i>S.</i> <i>nonagrioides</i>	112
6.	Conclusiones.....	119

7. Bibliografía	123
ANEXO I	153
ANEXO II.....	155
ANEXO III	163
ANEXO IV	165
ANEXO V	167
ANEXO VI	168
ANEXO VII.....	174
ANEXO VIII	175
ANEXO IX.....	177
PUBLICACIONES	179



RESUMEN

El taladro Mediterráneo (*Sesamia nonagrioides* Lefebvre) es una de las plagas de insectos más importante para el cultivo del maíz en la región Mediterránea, incluyendo el noroeste de España. Los métodos utilizados por los agricultores para mantener la plaga bajo control van desde la aplicación de insecticidas químicos hasta el uso de maíz transgénico (maíz *Bt*). La investigación en mejora genética vegetal constituye la mejor estrategia para obtener plantas resistentes a insectos para aquellos países donde los cultivos modificados genéticamente no están permitidos e incluso para fortalecer aún más la resistencia de los materiales transgénicos. Los avances de la biología molecular, la bioinformática y la genética estadística ofrecen la posibilidad de explorar con mayor detalle y precisión la variación genética natural de un carácter tan poligénico como lo es la resistencia a insectos en plantas.

El objetivo de esta investigación fue identificar loci de caracteres cuantitativos o QTL y genes que controlan la resistencia y/o tolerancia del maíz al ataque de *S. nonagrioides*, para lo cual se emplearon dos enfoques distintos y dos poblaciones de mapeo distintas. Por un lado se realizó un estudio para buscar QTL de resistencia y rendimiento bajo infestación con *S. nonagrioides*, así como otros caracteres agronómicos en una población de líneas recombinantes (RIL) derivadas del cruce de EP42 (maíz tipo Liso Europeo) × A637 (derivada de una población de maíz "Reid"), un fondo genético no explorado anteriormente para resistencia a los taladros. En este primer estudio se utilizó un mapa genético construido a partir de marcadores micro satélites (SSR). Por otro lado se realizó un estudio de asociación (GWAS) para buscar genes de resistencia a este insecto utilizando un panel de asociación de líneas de maíz que representan la diversidad disponible en los programas de mejora del sector público en todo el mundo. En este segundo estudio se utilizaron más de 240000 marcadores SNP distribuidos en todo el genoma.

En el primer estudio se identificaron seis QTL para caracteres de resistencia y doce QTL para caracteres agronómicos: un QTL para longitud de galerías y otro para encamado de tallo, cuatro QTL para caracteres de resistencia en mazorca, un QTL para rendimiento bajo infestación, dos QTL para humedad de grano, dos QTL para días a

floración masculina y dos para días a floración femenina, tres QTL para altura de planta y dos QTL para altura de mazorca. No se encontraron correlaciones genéticas significativas entre rendimiento y los otros caracteres evaluados. La prueba de validación cruzada (VC) demostró que la estimación del sesgo para los QTL de resistencia fue mayor que el de los QTL para caracteres agronómicos. Los resultados de este estudio destacan la importancia que tiene una región (*hot spot*) del cromosoma 9 (bin 9.03) que podría albergar genes que controlan la resistencia a los taladros y la altura de planta y de mazorca. Además sugieren la presencia de QTL con efectos menores sobre la resistencia en mazorca. El QTL de rendimiento parece jugar un papel importante en la tolerancia a *S. nongrioides* en este fondo genético. Los altos valores de sesgo en la estimación de los efectos de la mayoría de los QTL observados en la VC puede deberse principalmente al tamaño pequeño de la población utilizada y el sesgo fue mayor en los QTL para los caracteres de resistencia debido a la complejidad genética de estos caracteres. En base a este estudio se considera más apropiado seleccionar por rendimiento bajo infestación en lugar de hacerlo por caracteres de resistencia porque la resistencia podría tener asociaciones desfavorables con los caracteres agronómicos.

Del segundo estudio se obtuvieron veinticinco SNP significativamente asociados a caracteres de resistencia: diez asociados a longitud de galerías, cuatro asociados a daño de tallo relativo y once asociados a resistencia de grano. La variante alélica de cada SNP significativo explico entre 6 y 9% de la varianza fenotípica observada. Se propuso como genes candidatos a aquellos genes que contienen o están cerca de cada SNP significativamente asociado al carácter, en base a la evidencia previamente publicada sobre la implicación funcional en los mecanismos de defensa de la planta de cada gen candidato. El desequilibrio de ligamiento en este estudio decayó ($r^2 < 0,10$) rápidamente en distancias cortas, sugiriendo una resolución alta del GWAS. La mayoría de los genes candidatos encontrados en este estudio forman parte de rutas de señalización, otros actúan como reguladores de expresión bajo condiciones de estrés biótico y unos pocos genes son enzimas con efecto antibiótico contra insectos tales como el gen *cystatin1* y las proteínas defensinas. Estos hallazgos contribuyen al entendimiento de la compleja relación existente entre los insectos y las plantas hospedantes.

RESUMO

O barreno Mediterráneo (*Sesamia nonagrioides* Lefebvre) é unha das pragas de insectos máis importante para o cultivo de millo na rexión mediterránea, incluíndo o noroeste de España. Os métodos utilizados polos agricultores para manter a praga baixo control van dende a aplicación de insecticidas químicos ata o uso de millo transxénico (millo Bt). A investigación en mellora xenética vexetal constitúe a mellor estratexia para obter plantas resistentes a insectos para aqueles países onde os cultivos modificados xeneticamente non están permitidos e incluso para fortalecer aínda máis a resistencia dos materiais transxénicos. Os avances da bioloxía molecular, a bioinformática e a xenética estatística ofrecen a posibilidade de explotar con maior detalle e precisión a variación xenética natural dun carácter polixénico como é a resistencia das plantas aos insectos.

O obxectivo desta investigación foi identificar loci de caracteres cuantitativos ou QTL e xenes que controlan a resistencia e/ou tolerancia do millo ao ataque de *S. nonagrioides*, para o cal empleáronse dous enfoques distintos e dúas poboacións de mapeo distintas. Por un lado realizouse un estudo para buscar QTL de resistencia e rendemento baixo a infestación con *S. nonagrioides*, así como outros caracteres agronómicos nunha poboación de liñas recombinantes (RIL) derivadas do cruce da EP42 (millo tipo Liso Europeo) x A637 (derivada dunha poboación "Reid"), un fondo xenético non explorado con anterioridade para a resistencia aos barrenos. Neste primeiro estudo utilizouse un mapa xenético construído a partir de marcadores micro satélites (SSR). Por outro lado realizouse un estudo de asociación (GWAS) para buscar xenes de resistencia a este insecto utilizando un panel de liñas de millo que representa a diversidade dispoñible nos programas de mellora do sector público en todo o mundo. Neste segundo estudo utilizáronse máis de 240000 marcadores SNP distribuídos en todo o xenoma.

No primeiro estudo identificáronse seis QTL para caracteres de resistencia e doce QTL para caracteres agronómicos: un QTL para a lonxitude de galerías e outro para encamado de tallo, catro QTL para caracteres de resistencia na mazaroca, un QTL para rendemento baixo infestación, dous QTL para humidade do gran, dous QTL para días

a floración masculina e dous para días a floración feminina, tres QTL para altura da planta e dous QTL para altura da mazaroca. Non se atoparon correlacións xenéticas significativas entre o rendemento e outros caracteres avaliados. A proba de validación cruzada (VC) demostrou que a estimación do sesgo para os QTL de resistencia foi maior que o dos QTL para caracteres agronómicos. Os resultados de este estudo destacan a importancia que ten unha rexión (hot spot) do cromosoma 9 (bin 9.03) que podería albergar xenes que controlan a resistencia aos barrenos e a altura da planta e da mazaroca. Ademais suxírense a presenza de QTL con efectos menores sobre a resistencia da mazaroca. O QTL de rendemento parece xogar un papel importante na tolerancia a *S. nonagrioides* neste fondo xenético. Os altos valores de sesgo na estimación dos efectos da maioría dos QTL observados na VC pode deberse principalmente ao tamaño da poboación utilizada e o sesgo foi maior nos QTL para os caracteres de resistencia debido a complexidade xenética destes caracteres. En base a este estudo considérase máis apropiado seleccionar polo rendemento baixo infestación en lugar de facelo polos caracteres de resistencia porque a resistencia podería ter asociacións desfavorables cos caracteres agronómicos.

Do segundo estudo obtivéronse vinte cinco SNP significativamente asociados a caracteres de resistencia: dez asociados a lonxitude das galerías, catro asociados ao dano de tallo relativo e once asociados á resistencia do gran. A variante alélica de cada SNP significativa explica entre 6 e 9% da varianza fenotípica observada. Propuxéronse como xenes candidatos a aqueles xenes que conteñen ou están cerca do SNP significativamente asociado ao carácter, en base á evidencia previamente publicada sobre a implicación funcional nos mecanismos de defensa da planta de cada xene candidato. O desequilibrio do ligamento neste estudo decaeu ($r^2 < 0,10$) rapidamente en distancias cortas, suxerindo unha resolución alta do GWAS. A maioría dos xenes candidatos atopados neste estudo forman parte de rutas de sinlización, outros actúan como reguladores da expresión baixo condicións de estrés biótico e uns poucos xenes son encimas con efecto antibiótico contra insectos tales como o xen *cystatin1* e as proteínas defensinas. Estes achados contribúen ao entendemento da complexa relación entre o insecto e as plantas hóspedes.

ABSTRACT

The Mediterranean corn borer (*Sesamia nonagrioides* Lefebvre) is the most important maize insect pest in the Mediterranean region, including the Northwest of Spain. The methods used by farmers to keep the pest under control ranging from the application of chemical insecticides to the use of transgenic corn (*Bt* corn). Research in plant breeding is the best strategy to get resistant plants in those countries where genetically modified organisms are not allowed and even to further strengthen the resistance of the transgenic crops. The advancement of molecular biology, bioinformatics and statistical genetics offer the possibility to explore in greater detail and accuracy the natural genetic variation of complex traits such as insect resistance in plants.

The main objective of this research was to identify quantitative trait loci (QTL) and genes that control the resistance and/or tolerance of maize against *S. nonagrioides* attack, for which two different approaches and two different mapping populations were used. On the one hand, a study was conducted to find QTL for resistance and yield under infestation with *S. nonagrioides* as well as agronomic traits in a population of recombinant inbred lines (RIL) derived from the cross EP42 (maize type European Flint) × A637 (released from the maize population Reid), a previously unexplored genetic background for resistance to corn borers. In this first study a genetic map constructed from microsatellite markers SSR was used. On the other hand a genome wide association study (GWAS) was performed to find genes for resistance to this insect using a maize diversity panel that represents the diversity available in public breeding sector around the world. In this second study a set of more than 240000 SNP distributed throughout the genome was used.

In the first study six QTL for resistance traits and twelve QTL for agronomic traits were located: one QTL for tunnel length, one QTL for stalk lodging, and four QTL for ear resistance, one QTL for yield under infestation, two QTL for grain moisture, two QTL for days to anthesis, two QTL for days to silking, three QTL for plant height, and two QTL for ear height. No significant genetic correlations between yield and other traits were observed. The cross validation (CV) approach showed that the estimation biases for QTL for resistance traits were higher than those for agronomic traits. This work

stresses the importance of the region 9.03 for controlling corn borer resistance and suggests the presence of QTL with small effect on ear resistance traits. At the same genomic region, there are also genes that control plant and ear height. The QTL for yield seem to play an important role in *S. nonagrioides* tolerance in this genetic background. Large biases observed for QTL effects by CV could mainly be due to the small sample size used and were higher for resistance traits due to their larger genetic complexity. Based on these findings it is considered that it is more appropriate to select for grain yield under infestation instead of selecting for resistance traits because resistance to *S. nonagrioides* could have unfavorable associations with agronomic traits.

From the second study twenty five SNP were significantly associated with three resistance traits: 10 were significantly associated with tunnel length, 4 with steam damage, and 10 with kernel resistance. Allelic variation at each significant SNP explained from 6 to 9% of the phenotypic variance. A set of genes containing or physically close to these SNP are proposed as candidate genes for corn borer resistance, supported by their involvement in plant defense-related mechanisms in previously published evidence. The linkage disequilibrium decayed ($r^2 < 0.10$) rapidly within short distance, suggesting high resolution of GWAS associations. Most of the candidate genes found in this study are part of signaling pathways, others act as regulator of expression under biotic stress condition, and a few genes are encoding enzymes with antibiotic effect against insects such as the *cystatin1* gene and the defensin proteins. These findings contribute to the understanding the complex relationship between plant-insect interactions.



INTRODUCCIÓN



1. Introducción

1.1 La plaga de los taladros del maíz

A medida que la población mundial se expande es necesario mejorar los sistemas de producción agrícola para satisfacer las demandas globales tanto de alimentos como de energía. El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos más importantes a nivel mundial, tanto por su importancia como fuente de alimentación humana y animal como por sus diversos usos industriales (FAOSTAT, 2014). 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 las principales insectos plaga que más daño ocasionan al cultivo de maíz, de hecho aproximadamente el 7% de la producción mundial de maíz se pierde debido al ataque de los taladros, lo que representa pérdidas de 40 millones de toneladas por año (FAOSTAT, 2011).

La plaga de los taladros es ocasionada por diversas especies de Lepidópteros, las especies más importantes se agrupan dentro de dos familias: Crambidae y Noctuidae. Dentro de la primera destacan las especies *Ostrinia nubilalis* Hubner presente en Norteamérica, Europa y el norte de África, *Ostrinia furnacalis* Guenée en Asia, *Diatraea saccharalis* Fabricius presente desde Estados Unidos hasta Argentina, *Chilo partellus* Swinhoe en el sur de Estados Unidos, Centro América y el Caribe, *Diatraea lineolata* Walker en Centro América, el Caribe y América del Sur, y *Diatraea grandiosella* Dyar en el norte y centro de América. Dentro de las principales especies de la familia Noctuidae destacan: *Sesamia nonagrioides* Lefebvre en la región Mediterránea, *Busseola fusca* Fuller en el África sub-Sahariana y *Sesamia calamistis* Hampson en el oeste de África.

En España las dos principales especies de barrenadores que causan daños al cultivo del maíz son el taladro Europeo del maíz (*O. nubilalis*) y el taladro Mediterráneo del maíz (*S. nonagrioides*), siendo esta última más abundante y más voraz que la anterior (Malvar *et al.*, 2004b; Eizaguirre y Fantinou, 2012), lo que la convierte en la plaga de insectos más importante para el cultivo del maíz en toda la cuenca Mediterránea, en general, y en España, en particular. *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;

Sannino *et al.*, 2004; Eizaguirre y Fantinou, 2012). El daño al cultivo ocurre durante el estado larvario del insecto. En la región noroeste de España, específicamente en la comunidad de Galicia, *S. nonagrioides* tiene 2 generaciones por año e incluso hasta tres generaciones dependiendo de la temperaturas alcanzadas durante el verano (Velasco *et al.*, 2007). 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). Las larvas también pueden invadir la mazorca del maíz favoreciendo la posterior colonización por hongos productores de micotoxinas. En general las pérdidas de rendimiento que ocasiona *S. nonagrioides* suelen variar desde el 5% hasta el 30% (Arias y Alvez, 1973; Larue, 1984), o incluso podría ser mayor.



Figura 1.1 Larva de *S. nonagrioides* y daño ocasionado en las plantas de maíz

1.2 Defensa del maíz frente al ataque de los taladros

Durante miles de años las plantas han co-evolucionado con los insectos depredadores desarrollando diversos mecanismos de defensa contra sus atacantes, estos mecanismos varían considerablemente no sólo entre genotipos de la misma especie sino, además,

entre distintos órganos vegetales, estados fenológicos o condiciones ambientales (Poelman *et al.*, 2008). En las plantas existen tres categorías principales de resistencia contra insectos que son antixenosis, antibiosis y tolerancia (Painter, 1951). La antixenosis es el mecanismo mediante el cual las plantas disuaden a los insectos, bien sea 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. La antibiosis es el mecanismo por el cual la planta huésped influye en el desarrollo del insecto una vez la colonización ha sido iniciada, 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 (Chen, 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.

En maíz se han detectado las tres categorías de resistencia (antixenosis, antibiosis y tolerancia) contra *S. nonagrioides* (Butrón *et al.*, 1998b); pero los trabajos para estudiar una categoría concreta son escasos porque implican el monitoreo del comportamiento alimenticio u oviposicional de los insectos, en el caso de la antixenosis; del desarrollo larvario, en el caso de la antibiosis, o de las pérdidas de rendimiento, en el caso de la tolerancia (Barry y Darrah, 1988; Butron *et al.*, 1999; Ordás *et al.*, 2002). En la mayor parte de los estudios realizados se ha evaluado la resistencia en sentido amplio, ya que se ha estimado la resistencia como la menor longitud de las galerías en la médula del tallo del maíz hechas por las larvas del taladro sin tener en cuenta la biología del insecto y/o las pérdidas de rendimiento.

1.3 Métodos de control

Los métodos de control para las distintas especies de taladro son diversos e incluyen el control químico mediante la aplicación de insecticidas contra las larvas y el insecto

adulto, control cultural (ej. rotación de cultivos), control biológico (ej. usando insectos parasitoides de las plagas o el uso de sustancias hormonales para obstaculizar el apareamiento) y el control mediante resistencia genética en el cual se incluyen los cultivos transgénicos.

1.3.1 Control químico y cultural

El control químico de la plaga de los taladros implica el uso de insecticidas químicos (organofosforados y piretroides). Esta práctica además de ser poco segura para la salud humana y animal, contribuye a la contaminación de los recursos naturales y es costosa para el agricultor. Por otra parte las aspersiones de insecticidas químicos para el control de los taladros resultan poco eficaces si no se efectúa en el momento adecuado dado que las larvas que ocasionan el daño se encuentran protegidas dentro de la caña o la mazorca del maíz donde pasan la mayor parte del tiempo alimentándose (Velasco *et al.*, 1999). Además las aplicaciones constantes de insecticidas de contacto pueden llegar a inducir resistencia en los insectos plaga haciendo más difícil su control. Los métodos de control culturales como la rotación de cultivos, la eliminación de rastrojos y malas hierbas son métodos orientados a prevenir una infestación severa pero no son métodos que permitan mantener la plaga bajo control.

1.3.2 Control biológico

El control biológico consiste en el uso de parasitoides, depredadores y entomopatógenos presentes de manera natural en la vegetación. Las dos principales especies de moscas parasitoides encontradas para el taladro mediterráneo son *Lydella thompsoni*, Herting y *Pseudoperichaeta nigrolineata*, Walker (Diptera: Tachinidae) (Agusti *et al.*, 2005). Por estudios previos realizados en Pontevedra se sabe que el porcentaje de parasitismo es muy reducido (Monetti *et al.*, 2003), lo que puede ser debido en parte a que el adulto de *S. nonagrioides* deposita los huevos entre la vaina y el tallo, así que la vaina los puede proteger del ataque de los parasitoides. Otra práctica usual dentro del control biológico de insectos es el uso de patógenos tales como hongos y bacterias. En un estudio realizado por Faria y Wraight (2007) se dio a conocer un listado de más de

170 bioinsecticidas formulados a partir de al menos 12 especies diferentes de hongos entomopatógenos en todo el mundo que han sido utilizados para ayudar en el control de más de 48 familias de insectos de 10 órdenes distintos. A pesar de la gran cantidad de estudios sobre hongos entomopatógenos, es necesario profundizar más en la naturaleza de las interacciones patógeno-insecto para que estos hongos sean utilizados exitosamente en el manejo de plagas (Vega *et al.*, 2009). 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).

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, 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).

1.3.3 Control mediante mejora genética

1.3.3.1 Variedades resistentes: introducción de genes de resistencia mediante transformación genética.

El uso de cultivos transgénicos es probablemente la estrategia de control de plagas más eficaz que se conoce actualmente desde su incorporación comercialmente en 1996. Los cultivos genéticamente modificados (GM) más conocidos son el algodón y el maíz *Bt*, creados mediante la inserción de un gen *cry* de la bacteria gram-positiva *Bacillus thuringiensis*. Los genes *cry* codifican proteínas que cristalizan (Cry, también conocidas como δ -endotoxinas), las cuales, una vez ingeridas por el insecto, se solubilizan mediante la acción de las enzimas proteasas del intestino medio de ciertos insectos de los órdenes Lepidoptera, Coleoptera y Diptera provocando la muerte casi inmediata de

los mismos (Schnepf *et al.*, 1998). Existe una amplia variedad de proteínas Cry, las cuales se han clasificado por su especificidad y por su composición de aminoácidos (Asokan *et al.*, 2014).

Según el informe No. 44 sobre el estatus global de los cultivos biotecnológicos o GM (ISAA-Brief 44-2012) el área total sembrada de cultivos *Bt* ha aumentado de 1.1 millones de hectáreas sembradas en 1996 hasta aproximadamente 70 millones de hectáreas sembradas en todo el mundo en 2012 (James, 2012). En la Unión Europea (UE) únicamente está autorizado el cultivo de maíz *Bt* en cinco países miembros (España, Portugal, República Checa, Eslovaquia y Rumania), en los cuales se sembró una extensión de 148.013 hectáreas en el 2013 de las cuales más del 92% se sembró en España (136.962 ha) (James, 2013).

A pesar del éxito de los cultivos *Bt* en el control de plagas de insectos, se han encontrado casos de reducción de la eficacia en el control de algunas plagas importantes, sobre todo en los últimos años (ver el resumen de Tabashnik *et al.*, 2013), incluyendo un caso reciente de altos niveles de resistencia dominante en el taladro del maíz *Buseola fusca* (Campagne *et al.*, 2013). En la UE el principal limitante para la producción de cultivos *Bt* viene dado por la dificultad administrativa para obtener la licencia para su siembra (Meissle *et al.*, 2011), además de que en el cultivo ecológico no está permitido el uso de ningún organismo que haya sido genéticamente modificado (Speiser y Tamm, 2011).

Dadas las limitaciones a las que aún se enfrentan actualmente los cultivos genéticamente modificados y la creciente amenaza de aparición de resistencia a las proteínas Cry en las poblaciones de insectos, es necesario explorar la variación genética para la resistencia de los propios cultivos con la finalidad de identificar genes de resistencia que contribuyan a contrarrestar el daño que ocasionan los insectos. Un ejemplo de esto son los genes que codifican inhibidores de proteasas presentes en algunas plantas (Mithöfer y Boland, 2012).

1.3.3.2 *Variedades resistentes: uso de la variación genética natural para resistencia a insectos mediante selección*

Antes de iniciar cualquier programa de mejora de la resistencia primero será necesario identificar las fuentes de resistencia. La variación genética existente en las especies de plantas cultivadas y sus parientes silvestres apenas ha sido explorada en la agricultura (Broekgaarden *et al.*, 2011). En el caso concreto de la resistencia del maíz a *S. nonagrioides*, se han identificado fuentes de resistencia en sentido amplio en la propia especie (Malvar *et al.*, 1993; Butrón *et al.*, 1999b; Malvar *et al.*, 2004a; Butrón *et al.*, 2005a; 2006). También se han llevado a cabo estudios acerca de la herencia de la resistencia (Butrón *et al.*, 1999a; 1999b; Cartea *et al.*, 1999; 2001; Butrón *et al.*, 2009) y se han localizado regiones genómicas que podrían estar detrás de dicha resistencia (Ordás *et al.*, 2009; 2010).

Se sabe que los efectos aditivos son los más importantes en la herencia de los caracteres relacionados con la resistencia en caña: longitud de galerías y daño relativo de tallo; mientras los efectos aditivos y dominantes son determinantes en la genética de los caracteres de resistencia en mazorca (Butrón *et al.*, 1998a; 1999a; Cartea *et al.*, 1999; 2001; Butrón *et al.*, 2009). Por esta razón en la Misión Biológica de Galicia (MBG, CSIC) se inició un programa de selección intrapoblacional en el sintético EPS12 en el que se seleccionaron las familias S₁ con menores galerías en caña, siempre y cuando presentaran un rendimiento superior al de la media de las familias, utilizando una intensidad de selección del 10% (Sandoya *et al.*, 2008). La selección después de 5 ciclos fue efectiva para reducir las galerías; pero el rendimiento también disminuyó significativamente debido a la correlación genética entre ambos caracteres (Butrón *et al.*, 2012). Esta relación negativa entre resistencia y rendimiento nos llevó a fijarnos en otra categoría de resistencia, la tolerancia, que usualmente se define como la reducción de las pérdidas de rendimiento. Sin embargo, no evaluamos la tolerancia en base a las pérdidas sino en base al rendimiento en condiciones de infestación porque en un estudio previo se había observado una baja correlación entre la pérdida de rendimiento y el rendimiento *per se* de una variedad debido a que el alto potencial de rendimiento de algunos cultivos compensa sus grandes pérdidas de rendimiento (Butrón *et al.*, 1999a).

Se inició un programa de selección recurrente interpoblacional para rendimiento en condiciones de alta infestación ya que se sabía que la varianza dominante era un componente importante en la herencia del rendimiento en condiciones de alta infestación (Butrón *et al.*, 1999b). Se utilizó como material base dos sintéticos EPS20 y EPS21. Ambos sintéticos están formados por ocho líneas con resistencia parcial a los taladros y el cruzamiento entre ambos muestra buena heterosis (Butrón *et al.*, 1999b; 2009). Se utilizaron dos métodos de selección: el de hermanos completos y el de hermanos completos y familias S₂ aplicando en ambos casos una intensidad de selección del 10%. La evaluación de los dos primeros ciclos muestra que ambos programas de selección han conseguido mejorar el rendimientos en condiciones de alta intensidad de la plaga pero la selección de hermanos completos y familias S₂ ha sido más eficaz (Ordás *et al.*, 2012).

Los programas de selección de líneas puras para resistencia a *S. nonagrioides* es otro ejemplo del aprovechamiento de la variación natural para resistencia a insectos que sin duda ha sido de gran importancia para desarrollo de híbridos y variedades que combinen resistencia y buen comportamiento agronómico. Diversos programas de selección de líneas puras resistentes a la primera y segunda generación de barrenadores del maíz han dado resultados satisfactorios mediante selección por pedigrí y retrocruzamientos utilizando diferentes criterios de selección (Russell *et al.*, 1974; Abel *et al.*, 2000; 2001; Willmot *et al.*, 2005; Butrón *et al.*, 2006). En cuanto a los criterios de selección la longitud de galerías es el criterio más eficiente para la obtención de líneas puras de maíz resistente al ataque de *S. nonagrioides* (Butrón *et al.*, 2014).

Sin embargo, el problema fundamental de la mejora es seleccionar los mejores genotipos basándose en el fenotipo. El desarrollo de nuevos métodos de genotipado, análisis estadístico y métodos bioinformáticos permite asociar regiones genómicas con los caracteres de resistencia y tolerancia que permitirán desarrollar nuevos programas de selección más eficaces.

1.4 Asociaciones entre genotipo y fenotipo: búsqueda de QTL y genes relacionados con la resistencia y la tolerancia.

1.4.1 Poblaciones de mapeo

1.4.1.1 Mapeo de QTL en poblaciones estructuradas: poblaciones biparentales, poblaciones multiparentales y NAM.

Desde la aparición e implementación de los marcadores moleculares basados en el ADN se empezaron a desarrollar los primeros mapas genéticos para estudiar tanto caracteres monogénicos como caracteres cuantitativos (Edwards *et al.*, 1987; Lander y Botstein, 1989). Un paso importante en el mapeo de loci de caracteres cuantitativos o QTL (por sus siglas en inglés *Quantitative Trait Loci*) es la construcción de un mapa de ligamiento el cual indica la posición y la distancia genética relativa entre marcadores a lo largo de los cromosomas. El principal uso del mapa de ligamiento es identificar localizaciones cromosómicas que contienen QTL asociados al carácter en estudio y se basan en el principio de que los genes o marcadores segregan debido a la recombinación de los cromosomas (entrecruzamiento) durante la meiosis, por lo tanto los marcadores que se encuentran cercanos el uno al otro (estrechamente ligados) tendrán más probabilidades de ser transmitidos juntos a la progenie que los que se encuentran separados por una mayor distancia (Collard *et al.*, 2005).

El mapa genético se construye con el genotipado de una población de mapeo que debe reunir ciertas características; sobre esta población también se hará un fenotipado para el carácter de interés. Por lo tanto, una población de mapeo consiste en una población segregante para el carácter en estudio. Las poblaciones biparentales de mapeo 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 una generación F_1 por una de las líneas parentales.

Las poblaciones más costosas y más difíciles de construir son aquellas en las que es necesario varios ciclos de autofecundación (6 – 8 ciclos) a partir de una población F_2 , el resultado es un conjunto de líneas puras recombinantes (RIL, por sus siglas en inglés *Recombinant Inbred Lines*) con una combinación única de segmentos cromosómicos de

ambos padres. Para ciertos caracteres monogénicos o casi se pueden hacer ciclos recurrentes de retrocruzamiento y seleccionar en cada ciclo las plantas con el fenotipo de interés, de manera que se llega a obtener una colección de líneas casi isogénicas (NIL, *Near-Isogenic Lines*) cuyos cromosomas sólo difieren entre sí por los segmentos que contienen los QTL responsables del carácter en estudio.

Aún más complejas en su construcción son las generaciones avanzadas de cruces de líneas multiparentales (o MAGIC, *Multiparent Advances Generation Intercross*), en este método se crea un conjunto de RIL a partir de múltiples líneas fundadoras, 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).

Otro tipo de población de mapeo incluye el uso poblaciones anidadas para mapeo de asociación (o NAM, *Nested Association Mapping*) 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 que ha sido ampliamente usada para mapear genes y diseccionar caracteres complejos (McMullen *et al.*, 2009).

Las poblaciones de haploides dobles son aquellas que se obtienen mediante la regeneración de plantas a partir de granos de polen y su posterior duplicación cromosómica, el resultado serán plantas totalmente homocigotas (Collard *et al.*, 2005). En el caso del maíz también se pueden crear haploides dobles utilizando genotipos inductores de haploidía (en la Tabla 1.1 se resumen las principales características de las poblaciones estructuradas).

Tabla 1.1 Ventajas y desventajas de las principales poblaciones estructuradas de mapeo de QTL

Característica	F ₂	BC	RIL	Multiparentales y NAM	HD
Tiempo de construcción (generaciones)	2-3	2-3	≥ 6	≥ 6	2-3
Costo	Bajo	Bajo	Alto	Alto	Alto
Desarrollo	Simple	Simple	Complicado, requiere mucho trabajo	Complicado, requiere mucho trabajo	Complicado, equipo y personal especializado y/o requiere el uso de un buen inductor.
Restringida a ciertas especies	No	No	No	No	Solo especies que permiten el cultivo de tejidos o si existen inductores.
Inmortalidad	No	No	Si	Si	Si
Homocigosis verdadera	-	No	No	No	Si
Permite estimar efectos de dominancia	Si	Si	No	No	No
Resolución de mapeo	Baja	Baja	Alta, debido a una mayor cantidad de eventos de recombinación	Aún más alta que las RIL debido a que se explora un mayor rango de variabilidad.	Baja

1.4.1.2 Mapeo de QTL en poblaciones no estructuradas: paneles de asociación

Al hablar de poblaciones no estructuradas se hace referencia a las poblaciones en las que la relación familiar es desconocida. Los estudios de asociación en humanos son realizados principalmente sobre este tipo de poblaciones (Donnelly, 2008) puesto que ofrece mejores ventajas sobre las poblaciones en las que se conoce una relación de parentesco (Risch y Merikangas, 1996; Long *et al.*, 1997). 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-Kalandaivelu *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 (Rincent *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 (en la Tabla 1.2 se comparan estas poblaciones con las poblaciones estructuradas).

1.4.2 Identificación de QTL

Diversos métodos estadísticos han sido propuestos para el análisis de QTL. A continuación se mencionan algunos de los métodos más utilizados en el análisis de caracteres complejos en plantas.

1.4.2.1 Mapeo convencional de QTL

El mapeo mediante pruebas del marcador individual es uno de los métodos más simples en el análisis de QTL, consiste en analizar la segregación de un fenotipo con respecto a los marcadores genotipados, indicando qué marcadores están asociados con el carácter de interés y sugiriendo de este modo la existencia de un posible QTL (Doerge, 2002). En este enfoque se pueden utilizar tres técnicas estadísticas: prueba-t, análisis de varianza (ANOVA) y regresión linear simple. La hipótesis nula que se somete a prueba es que el valor de la media del carácter es independiente del genotipo para un marcador dado, siendo todas ellas equivalentes (Doerge, 2002). Pero estas técnicas tienen tres debilidades principales: la primera es que no son nada certeras al estimar la localización del QTL o la frecuencia de recombinación entre éste y el marcador debido a que los efectos del QTL y la localización se confunden o es imposible estimarlos ambos efectos independientemente; la segunda es que se deben descartar individuos para los que no se tiene información para el marcador; y la tercera es que, cuando los marcadores están muy espaciados, el QTL podría estar muy alejado de los marcadores y por lo tanto el poder de detección es bajo (Broman, 2001).

El mapeo de QTL por intervalos simples (SIM, por sus siglas en inglés *Simple Interval Mapping*) es el método más popular para análisis de QTL, este método supera las tres desventajas del método anterior. El método fue desarrollado por Lander y Botstein (1989) y utiliza un mapa genético con marcadores cartografiados a lo largo de los cromosomas definiendo intervalos sobre los cuales se efectúa la localización de los QTL. Mediante técnicas estadísticas de máxima verosimilitud se estima si un QTL está presente o no en una localización dentro de un intervalo dado. Además con este método se pueden estimar los efectos aditivos y efectos de dominancia de un QTL en cualquier localización testada entre un par de marcadores mapeados. La hipótesis que se pretende probar con el método por intervalos es si un QTL está presente en cualquier posición dentro de un intervalo dado por dos marcadores contiguos (Lander y Botstein, 1989). El resultado de cada prueba estadística es expresado en puntuación LOD (logaritmo de los odds), la cual indica el nivel de evidencia de la presencia de un QTL en esa posición. Cuando el pico de la puntuación LOD máximo excede el umbral establecido se rechaza la hipótesis nula de que ningún QTL se encuentra dentro de una

posición para el intervalo testado (Broman, 2001). Una de las mayores desventajas del mapeo por intervalos es que solo considera un QTL a la vez en el modelo del análisis por lo tanto puede haber un sesgo en la estimación de la localización del QTL cuando múltiples QTL están presentes en el mismo grupo de ligamiento (Lander y Botstein, 1989; Haley y Knott, 1992; Zeng, 1994).

El problema de QTL múltiples fue resuelto de manera independiente por Jansen (1993) y Zeng (1994) que diseñaron el mapeo de intervalos compuesto (CIM, por sus siglas en inglés *Composite Interval Mapping*). El mapeo por intervalos compuesto se hace utilizando un conjunto de marcadores ligados a otros posibles QTL como covariables (cofactores), de modo que se incrementa la resolución del mapeo al eliminar la variabilidad asociada a otros QTL. Por otra parte Kao (1999) sugirió otro enfoque llamado mapeo múltiple de intervalos (MIM, *Multiple Interval Mapping*) que es básicamente una extensión del enfoque CIM. El enfoque MIM utiliza la regresión paso a paso (o "*stepwise regression*") para añadir o eliminar QTL del modelo (primero como CIM), luego estima simultáneamente la probabilidad de los QTL y finalmente busca efectos epistáticos entre los QTL.

Moreno-González (1992a; 1992b) también propuso otro método de mapeo múltiple de QTL basado en la regresión múltiple con el que se estiman efectos aditivos, de dominancia y epistasia para posibles QTL asociados a varios segmentos de los cromosomas. Otros métodos que proponen algunas modificaciones al mapeo de intervalos han sido propuestos por otros autores (Knapp, 1991; Haley y Knott, 1992; Martinez y Curnow, 1992; Jiang y Zeng, 1995; Wang *et al.*, 1999; Sen y Churchill, 2001)

Una metodología alternativa a los métodos tradicionales anteriormente descritos y que ha adquirido particular importancia son los métodos Bayesianos, los cuales se basan principalmente en el método de Markov Chain Monte Carlo (MCMC) (Hastings, 1970). MCMC es un muestreo probabilístico que genera una distribución de los parámetros del QTL *a posteriori*, dados los datos observados del mapeo de QTL. Algunos autores han demostrado su eficacia al mapear QTL para múltiples caracteres en diferentes cultivos (Xu *et al.*, 2009; Arriagada *et al.*, 2012; Balestre *et al.*, 2012; Bink *et al.*, 2014).

1.4.2.2 Mapeo de asociación

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), ofrece la posibilidad de identificar los genes o directamente las variantes que determinan la variación del carácter en estudio (Oraguzie et al. 2007). Hasta hace pocos años este tipo de mapeo en especies autólogas como el maíz en las que el desequilibrio de ligamiento (DL) es muy bajo se hacía tan sólo para genes concretos porque el mapeo de asociación de todo el genoma (GWAS, por sus siglas en inglés *Genome-wide Association Study*) 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, 2009) y el fenotipado de alto rendimiento (HTP, *High-Throughput Phenotyping*) es posible explorar esa variación genética que está detrás de la resistencia a insectos observada en las poblaciones intraespecíficas de plantas (Broekgaarden et al., 2011).

Tabla 1.2 Comparación entre mapeo de QTL convencional y el mapeo de asociación adaptada de Oraguzie y Wilcox (2007).

Atributo	Mapeo QTL convencional	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, NILs, HD, etc.	Población no estructurada, 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

La resolución y eficacia del mapeo de asociación depende grandemente de la extensión y naturaleza del desequilibrio de ligamiento que a su vez depende de otros factores (Oraguzie y Wilcox, 2007) los cuales se resumen en la Figura 1.2.

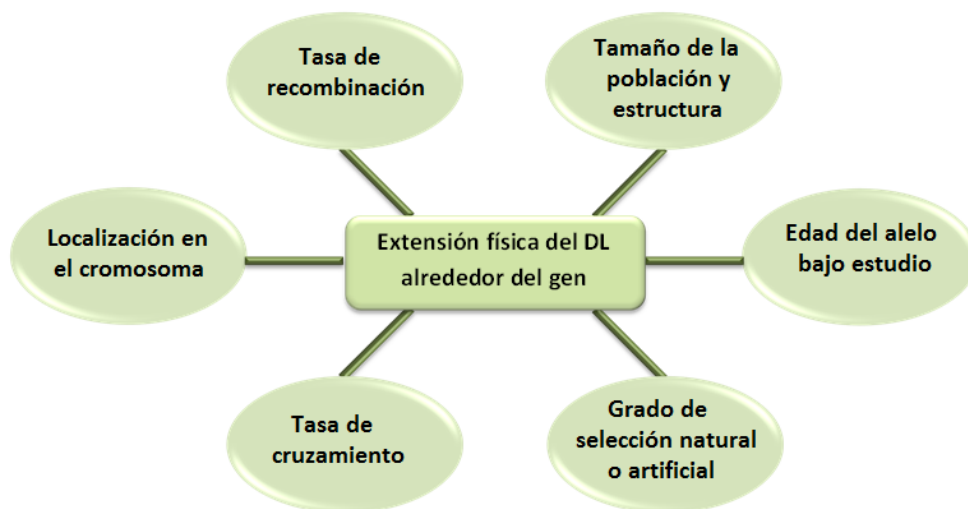


Figura 1.2 Factores de los que depende el DL en el mapeo de asociación

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).

Los enfoques actualmente utilizados en plantas para hacer mapeo de asociación incluyen el uso de poblaciones multiparentales tales como MAGIC, NAM y el uso de paneles de asociación de líneas de diversos orígenes que capturan la mayor variabilidad posible de la especie en estudio, son otro tipo de población que ha dado buenos resultados en mapeo de asociación.

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-t o modelos lineales generales (GLM), que incluyen el ANOVA, hasta modelos más complejos como el uso de modelos lineales mixtos (MLM).

En los estudios de asociación es bastante usual que se creen falsas asociaciones debido a la estructura poblacional (Pritchard *et al.*, 2000). 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 espurias. 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 (Devlin y Roeder, 1999; 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) propuso 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. Los resultados de los estudios de asociación suelen ser satisfactorios siempre que se corrija por estructura poblacional usando una matriz Q y/o 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; Raman *et al.*, 2010).

Uno de los puntos claves en todo análisis de asociación es el nivel de significancia que se debe elegir para declarar que un marcador está significativamente asociado con el carácter en estudio. Dada la gran cantidad de pruebas o test que se realizan (cientos de miles) el umbral debe ser alto. Una opción sería ajustar el nivel de significancia en base

al número de marcadores testados mediante la corrección de Bonferroni (α/n). El inconveniente con esta corrección es que no toma en cuenta el hecho de que algunos marcadores testados en el mismo cromosoma podrían no ser independientes, los marcadores podrían estar en DL uno con otro; por lo tanto, resulta demasiado estricta. Otra opción es usar el método de permutaciones propuesto por Churchill y Doerge para ajustar el umbral de significancia en múltiples pruebas en experimentos de mapeo de QTL. Con esta técnica estadística se genera un gran número de datos simulados a partir de los datos reales mediante el barajeo aleatorio de los datos genotípicos a través de los individuos en la población de mapeo. Se realizan las pruebas estadísticas de asociación (GLM o MLM) sobre los datos simulados. Para cada uno de los análisis simulados se elige y se guarda el mayor valor. Este método es excelente para ajustar el umbral de significancia en poblaciones de apareamiento aleatorio.

Otro método para intentar evitar falsas asociaciones consiste en establecer un umbral para la tasa de falsos descubrimientos (FDR, *False Discovery Rate*). La FDR es la proporción esperada de QTL o asociaciones detectadas que son en realidad falsos positivos (Benjamini y Hochberg, 1995; Weller *et al.*, 1998). Existen numerosos ejemplos en los que se controla la FDR en estudios de asociación (Storey, 2002; Storey y Tibshirani, 2003; Fernando *et al.*, 2004).

Otra alternativa recientemente usada para establecer el umbral de significancia en estudios de asociación es un método basado en la técnica de bootstrap, se usa un procedimiento de submuestreo para asignar el valor de la probabilidad de inclusión en el modelo (llamado RMIP, derivado del inglés *Resample Model Inclusion Probability*) de cada marcador testado mediante una estimación Monte Carlo (Valdar *et al.*, 2009). Al igual que con la técnica de permutaciones es necesario hacer simulaciones para calcular la probabilidad de inclusión de un marcador.

1.4.2.3 Situación de los estudios de QTL de resistencia a los taladros del maíz.

A pesar de los esfuerzos de los mejoradores por incrementar la resistencia del maíz al ataque de estos insectos en las últimas tres décadas en todo el mundo aún no se cuenta con materiales comerciales con altos niveles de resistencia natural a los taladros. Como

se ha hecho mención en el apartado 1.3.3.2, los aportes de la mejora clásica en la resistencia a *S. nonagrioides* y otras especies de taladros han sido evidentes sin lugar a dudas, pero los niveles de resistencia natural en materiales elite permanecen insuficientes para mantener bajo control a la plaga. 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 menores y mayores para la resistencia a longitud de galerías y al daño de hoja causado por *O. nubilalis* (Schön *et al.*, 1993; Cardinal *et al.*, 2001; Krakowsky *et al.*, 2004; Papst *et al.*, 2004; 2007; Orsini *et al.*, 2012). Cabe destacar que se han reportado pocos estudios de identificación de QTL de resistencia a otras especies de taladros tales como *S. nonagrioides* (Ordás *et al.*, 2009; 2010) o algunas especies de taladros tropicales tales como *D. saccharalis* o *D. granciosella* (Bohn *et al.*, 1996; 1997; Groh *et al.*, 1998; Khairallah *et al.*, 1998), comparados con los reportados para *O. nubilalis*. Se han identificado QTL de resistencia a longitud de galerías ocasionado por los taladros en todos los cromosomas del maíz, pero las regiones más comunes donde se ha detectado el mayor número de QTL están en los cromosomas 1, 2, 3 y 9 (ver resumen de Meihls *et al.*, 2012).

1.4.3 Validación de QTL

El principal objetivo que se persigue en todo estudio de QTL en plantas es poder disponer de marcadores fiables que puedan ser utilizados en programas de mejora basados en la selección asistida por marcadores (SAM). 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 y por lo tanto a una evaluación sesgada en la perspectiva de la SAM (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; Bohn *et al.*, 2001; Melchinger *et al.*, 2004; Schön *et al.*, 2004).

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*) en el cual se prueban las estimaciones derivadas del ES para su validación 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.

1.4.4 Herramientas estadísticas para el análisis de QTL

Actualmente existen varios paquetes estadísticos desarrollados específicamente para el análisis de QTL ya sea utilizando métodos convencionales basados en el análisis de ligamiento o utilizando mapeo de asociación. A continuación en la Tabla 1.3 se resumen algunos programas informáticos utilizados ampliamente para el análisis de QTL.

Tabla 1.3 Software comúnmente utilizado en el análisis de QTL y GWAS en mejora genética vegetal.

Software	Última versión	Plataforma	Métodos utilizados	Referencia
MapMaker QTL	v1.1 (1987)	Linux (Unix), DOS, Windows, Mac	SIM, CIM	(Paterson <i>et al.</i> , 1988)
PlabMQTL	0.9 (2012)	DOS, Windows	SIM, CIM, VC, bootstrap, MQTL	(Utz, 2012)
QTL/cartographer	v2.5 (2012)	Linux (Unix), DOS, Windows, Mac	IM, CIM, BIM	(Basten <i>et al.</i> , 2004)
BioMercator	V4 (2012)	Linux (Unix), Windows, Mac	CIM, MQTL	(Arcade <i>et al.</i> , 2004)
R/qtl	1.31-9 (2014)	Linux (Unix), Windows, Mac	SIM, CIM, imputación,	(Broman <i>et al.</i> , 2003)
R/qtlbim	2.0.7 (2014)	Linux (Unix), Windows, Mac	MCMC	(Yandell <i>et al.</i> , 2007)
Tassel	5 (2014)	Linux (Unix), Windows, Mac	GLM, MLM, CMLM, LD, K-matrix	(Bradbury <i>et al.</i> , 2007)
GABIT	2014	Linux (Unix), Windows, Mac	MLM, CMLM, gBLUP, GS,	(Lipka <i>et al.</i> , 2012)

1.5 Justificación del trabajo: estudios de identificación de QTL en *S. nonagrioides*.

Dado que la heredabilidad es baja para longitud de galerías y existe una correlación negativa entre rendimiento y resistencia, parecía conveniente encontrar marcadores que pudieran ser empleados en programas de selección asistida por marcadores y para ello se llevaron a cabo estudios de QTL para resistencia a *S. nonagrioides* y para rendimiento en condiciones de infestación. Butrón *et al.* (2005b) estudiaron los efectos de la selección para resistencia a *S. nonagrioides* sobre 70 marcadores microsatélites (SSR, por sus siglas en inglés *Simple Sequence Repeat*) en una población sintética de maíz EPS12. Como resultado se identificaron loci cuya frecuencia cambió significativamente debido a la selección sobre la población. Dos de estos loci o marcadores SSR (*umc1329* y *phi076*) sugirieron la presencia de un QTL mayor de resistencia y/o rendimiento bajo

condiciones de infestación con esta especie de taladro localizado en el cromosoma 4, aunque en una validación posterior no pudo ser corroborada la presencia de este QTL (Butrón *et al.*, 2012). Otro 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 $\times$ Lancaster. El estudio fue realizado en una población de 243 RIL derivadas del cruce de las líneas B73 $\times$ 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 europeas tipo liso en una población de 178 RIL derivadas del cruce EP42 $\times$ EP39 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); un QTL para daño de tallo relativo en el cromosoma 8 (bin 8.05) 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).

En una primera fase de esta tesis se ha desarrollado un nuevo estudio de QTL en el cual se explora otro patrón heterótico, Liso Europeo $\times$ Reid. Hasta ahora en este grupo heterótico no se habían publicado estudios de identificación de QTL para resistencia a *S. nonagrioides*, ni para el rendimiento bajo condiciones de infestación artificial con este insecto. El material de partida fueron las líneas EP42 y A637, las cuales se eligieron basándonos principalmente en el estudio realizado por Butrón *et al.* (1998b) en el que se estudiaron los mecanismos de defensa de 10 líneas puras y de los 90 cruces del dialelo con recíprocos entre estas líneas. A partir de este cruce (EP42 $\times$ A637) se desarrollaron líneas recombinantes que he utilizado para realizar un estudio de QTL para caracteres agronómicos y de resistencia a *S. nonagrioides*.

En la segunda fase de la tesis se desarrolló un estudio de asociación explorando todo el genoma con una cantidad considerablemente superior de marcadores. Hasta ahora pocos investigadores han dedicado esfuerzos a explorar la resistencia natural de insectos utilizando GWAS: Chan *et al.* (2010) estudió la variación genética de los glucosinolatos en *Arabidopsis* identificando dos QTL mayores que controlan la síntesis de estos compuestos que son clave en la interacción insecto-planta y otros autores han

utilizado GWAS para mapear variantes genéticas asociadas a la resistencia a cinco plagas mayores en trigo (Joukhadar *et al.*, 2013). Debido a la complejidad de los mecanismos de resistencia a insectos y a su evolución en plantas, este carácter resulta muy difícil de estudiar dentro de un contexto genómico (Anderson y Mitchell-Olds, 2011), esta es una de las razones por las que se realizan pocos estudios en este tema. Sin embargo el mapeo de asociación proporciona un enfoque integral para explorar toda la gama de mecanismos de defensa de la plantas cultivadas (Kloth *et al.*, 2012).

El enfoque GWAS en el estudio de la resistencia a los taladros es complementario a todos los estudios convencionales de QTL para resistencia a los taladros reportados hasta el momento en la literatura, puesto que ahora es necesario identificar los genes causantes que están detrás de estos QTL de resistencia en esas regiones genómicas ya mencionadas. Una vez identificadas y validadas estas variantes podrán ser seleccionadas por los mejoradores para transferirlas a las líneas elites utilizadas en los principales programas de mejora del maíz. El siguiente paso que nos permitirá concretar este objetivo podría ser la selección genómica.







OBJETIVOS



2. Objetivos

2.1 Objetivo general

Detectar e identificar QTL y genes de resistencia y tolerancia al ataque del taladro Mediterráneo del maíz (*Sesamia nonagrioides* Lefèbvre).

2.2 Objetivos específicos

- a) Mapear y caracterizar QTL para rendimiento, resistencia y caracteres agronómicos bajo condiciones de infestación artificial con *S. nonagrioides* en la población biparental de líneas recombinantes proveniente del cruce EP42 × A637.
- b) Estimar el sesgo del efecto aditivo (α) y del porcentaje de la varianza genética explicada (p) de cada uno de los QTL mapeados mediante pruebas de validación.
- c) Identificar SNP significativamente asociados a la resistencia a *S. nonagrioides* en un panel de líneas que representan la diversidad mundial del maíz.
- d) Localizar genes candidatos que contienen o están adyacentes a los SNP significativamente asociados a la resistencia del ataque de *S. nonagrioides*.
- e) Estudiar la relación genética entre resistencia y caracteres relacionados con el valor agronómico (rendimiento, altura de planta, etc.)





MATERIALES Y MÉTODOS



3. Materiales y métodos

La metodología empleada en esta investigación se divide en dos apartados principales. El primer apartado se refiere al mapeo convencional de QTL y el segundo al mapeo de asociación o GWAS. En cada apartado se describe el material vegetal, los caracteres evaluados y los métodos estadísticos utilizados en cada estudio.

3.1 Mapeo convencional de QTL

3.1.1 Material vegetal

El material original de partida fueron la línea europea de grano liso EP42, que proviene de una población local gallega denominada Tomiño y la línea americana de grano dentado A637, que proviene del cruzamiento CO106 x A321. Ambas líneas fueron elegidas como parentales debido a que A637 muestra un alto rendimiento bajo condiciones de infestación artificial por el taladro y es tolerante al daño de tallo y mazorca (pérdidas de rendimiento del 11,7%) hecho por las larvas de *S. nonagrioides* mientras que la línea EP42 es sensible (pérdidas de rendimiento del 29,33%) (Butrón *et al.*, 1998b). Por otra parte la línea A637 mostró una aptitud combinatoria general (ACG) favorable para rendimiento con infestación y sin infestación con *S. nonagrioides*, mientras que la ACG de EP42 no difirió significativamente de cero (Butron *et al.*, 1999). A partir de la generación F₂ derivada del cruce entre ambas líneas puras se avanzaron seis generaciones de autofecundación (F₆) mediante el método de un solo descendiente por mazorca con el fin de desarrollar un conjunto de líneas recombinantes (RIL) que representaran la variabilidad presente en la F₂. El programa de obtención de las líneas recombinantes inició en 1999 y finalizó 2006 con 146 RIL, en el año 2009 (previo a las evaluaciones) se multiplico la semilla. (El proceso de obtención de las RIL se esquematiza en la Figura 3.1).

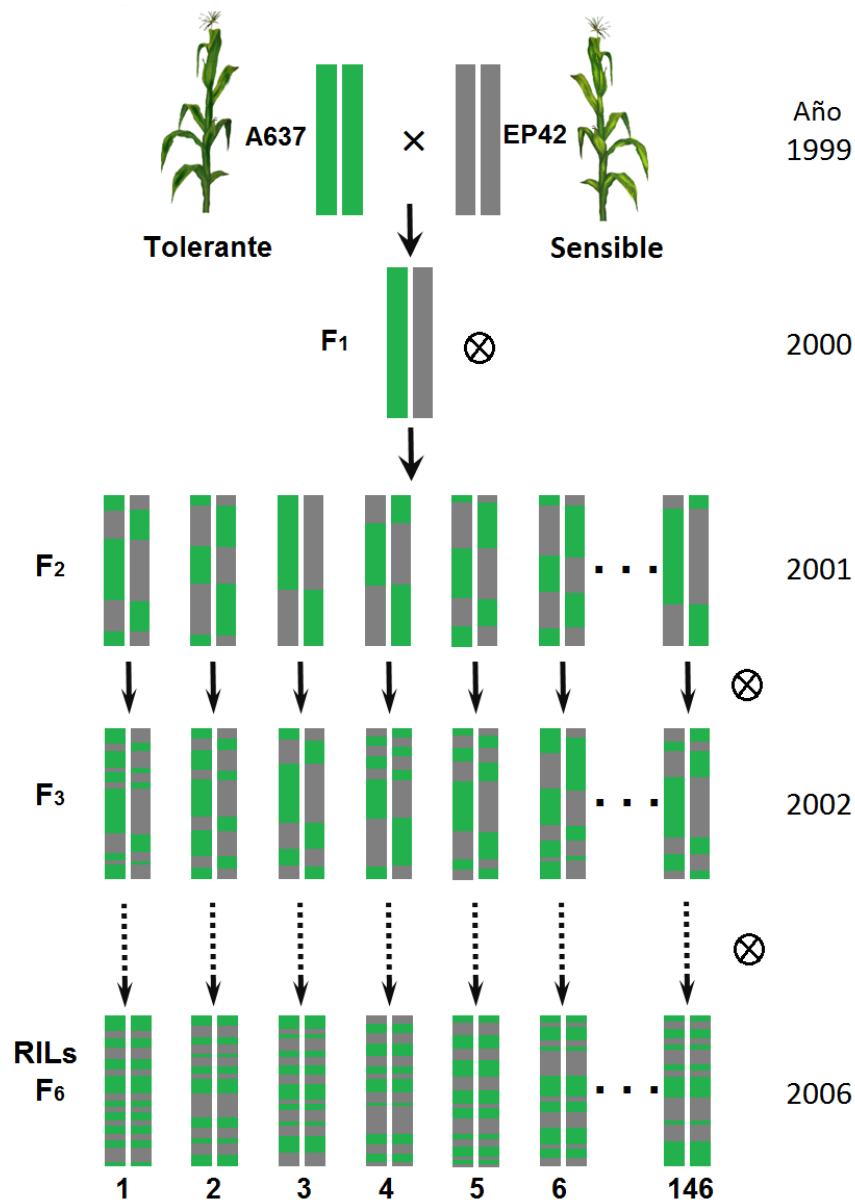


Figura 3.1 Esquema de la obtención de 146 RIL a partir del cruce de las líneas A637 × EP42.

3.1.2 Datos genotípicos

El primer paso en el genotipado fue la obtención de tejido vegetal para la extracción del ADN. Para ello se pusieron a germinar semillas de las líneas recombinantes y de ambas líneas parentales a 26 °C en placas Petri. De las semillas germinadas se cogió aproximadamente 1 cm de coleoptilo, a partir del cual se realizó la extracción. De cada una de las 146 líneas recombinantes y sus parentales se extrajo ADN siguiendo el método de Liu y Whittier (1994) con algunas modificaciones (en el Anexo I se presenta

el protocolo de extracción utilizado). Con los parentales (A637 y EP42) de las RIL se llevó a cabo un cribado con aproximadamente unos 500 “Simple Sequence Repeat” (SSR) de ADN de los cuales se escogieron 130 SSRs que eran polimórficos. Las amplificaciones se llevaron a cabo siguiendo a Butrón *et al.* (2003) mediante la reacción en cadena de la polimerasa o PCR (por sus siglas en inglés *Polymerase Chain Reaction*). Los productos empleados para preparación de la mix se resumen en la Tabla 3.1.

Tabla 3.1 Productos empleados en la reacción de PCR para la amplificación de los SSRs.

Producto	Volumen (μl) [†]
Tampón	2,5
Cl ₂ Mg	1,0
Rojo de cresol (20% p/v sacarosa)	2,5
Desoxinucleótidos trifosfato	0,5
Taq ADN Polimerasa	0,1
Cebador o Primer A	0,5
Cebador o Primer B	0,5
ADN	1,0

[†] Este volumen corresponde a una reacción

El listado de los cebadores utilizados y la información sobre los marcadores está disponible en el Anexo II. En la amplificación se utilizaron dos modelos de termocicladores: Marshall Scientific-MJ Research PTC-100® Thermal Cycler y BIO-RAD-MyCycler™ Thermal Cycler. Las instrucciones programadas en los termocicladores para obtener los productos de la PCR se resumen en la Tabla 3.2.

Tabla 3.2 Programa de los termocicladores para obtener los productos de la PCR.

Proceso	Tiempo y temperatura	Nº de ciclos
Desnaturalización	5 minutos a 95 °C	1
Amplificación	30 segundos a 95 °C	36
	30 segundos a 56 °C	
	30 segundos a 72 °C	
Elongación	10 minutos a 72 °C	1
Conservación	Indefinidamente a 4 °C	1

Los fragmentos SSR no desnaturalizados se separaron mediante electroforesis en geles de acrilamida al 6% p/v y tampón TBE 1x (cuya composición se resume en la Tabla 3.3), persulfato de amonio (APS) 0.07% p/v y TEMED 0.08% p/v. La electroforesis se llevó a cabo en un equipo CBS Scientific Company C-DAS6-400-50, durante aproximadamente 3 horas a 250 V (Wang *et al.*, 2003).

Tabla 3.3 Composición del tampón TBE

Producto	Concentración (1X)
Trizma base ($C_4H_{11}NO_3$)	10,8 g/l
Ácido bórico	5,5 g/l
EDTA ($C_{10}H_{14}N_2Na_2O_8$; pH = 8.0)	2 mM

Para la visualización del producto de la PCR en los geles de acrilamida se utilizó un transiluminador de rayos UV.

Se creó un mapa de ligamiento usando los datos de los marcadores SSR y el programa estadístico MAPMAKER (Lander *et al.*, 1987). Se usó un umbral LOD de dos para declarar a dos marcadores significativamente ligados y una distancia máxima entre marcadores consecutivos de 50 cM.

3.1.3 Datos fenotípicos

Se evaluó un conjunto de 144 RIL (se descartaron 2 líneas por falta de semilla) en Pontevedra (42°24'N, 8°38'O y 20 m sobre el nivel del mar) en 2010 y 2011. Por otra parte se evaluaron las líneas parentales y el híbrido resultante en Pontevedra en 2011 y 2012. Las RIL junto con las líneas parentales (A637 y EP42) como controles se evaluaron en un diseño de látice 12 × 12 con dos repeticiones. En ensayos independientes se evaluaron los parentales y el híbrido en un diseño de bloques al azar con cinco repeticiones. Cada ensayo fue sembrado manualmente en el campo y cada parcela experimental consistió de un surco sembrado con 26 semillas distribuidas en 13 golpes (2 semillas/golpe), la separación entre golpes fue de 0,18 m y entre surcos de 0,8 m. Se realizó un aclareo para reducir el número de plantas por parcela a 13, obteniéndose una densidad de siembra de aproximadamente 70.000 plantas por hectárea.

Las evaluaciones se realizaron bajo infestación artificial con huevos de *S. nonagrioides*. Los huevos fueron obtenidos en la Misión Biológica de Galicia mediante la cría del insecto bajo condiciones controladas de laboratorio siguiendo el método de Eizaguirre y Albajes (1992). En los Anexos III, IV y V se resume el proceso de cría en laboratorio de *S. nonagrioides*. Las infestaciones se realizaron en un periodo próximo a la floración de modo que todas las plantas se encontraran en el mismo estado fenológico. Se infestaron cinco plantas de cada parcela experimental depositando una ristra de aproximadamente 40 huevos entre el tallo y la vaina de una hoja basal situada aproximadamente a una distancia de 30 cm del suelo.

Las variables evaluadas se clasifican en caracteres de resistencia y caracteres agronómicos. Los caracteres de resistencia fueron registrados mediante la inspección de la caña y la mazorca de cada planta infestada y otros como el encamado mediante conteo de plantas. Los caracteres de resistencia fueron los siguientes:

Longitud de galerías (LG): es la medida de la longitud media en centímetros de las galerías o túneles producidos por las larvas de *S. nonagrioides* en la caña de las plantas infestadas. Las galerías se miden cortando las cañas a lo largo.

Daño de tallo relativo (DTR): es el porcentaje de tallo dañado por las larvas de *S. nonagrioides* y se estima dividiendo la LG por la altura total de la planta y multiplicando por cien.

Encamado de tallo (ET): es el porcentaje de plantas en la parcela experimental con tallo quebrado debajo de la mazorca principal.

Resistencia del grano (RG), resistencia del zuro (RZ) y resistencia de pedúnculo (RP): estas variables son determinadas de acuerdo a una escala visual de resistencia subjetiva de 1 a 9 en donde el valor de 1 indica totalmente dañado y 9 indica totalmente sano. El dato es la media de las cinco mazorcas de las plantas infestadas.

Además se evaluaron los siguientes caracteres agronómicos:

Días a floración masculina (DFM): son los días transcurridos desde la siembra hasta que aproximadamente el 50% de las plantas de una parcela está emitiendo polen.

Días a floración femenina (DFF): son los días transcurridos desde la siembra hasta que el 50% de las plantas presentan sedas receptivas al polen.

Altura de planta (AP): esta variable se registró después de la floración en cinco plantas representativas de la parcela y se refiere a la longitud media de la planta en centímetros desde la base del suelo hasta el extremo superior del pendón o inflorescencia masculina.

Altura de mazorca (AM): esta variable se registró después de la floración en cinco plantas representativas de la parcela y se refiere a la longitud media en centímetros desde la base del suelo hasta el nudo de inserción de la mazorca principal.

Rendimiento (R): Se registró como el peso del grano en Megagramos por hectárea al 14% de humedad. Se determinó con la ecuación:

$$Rendimiento = \frac{P \times S \times GS \times G}{8,6}$$

Donde P = peso total de las mazorcas de las plantas de una parcela expresado en kilogramos, S = superficie de la parcela experimental en metros cuadrados, GS = proporción de grano seco calculado como la diferencia entre 100 y el porcentaje de humedad de grano en el momento de la cosecha y G = la proporción de grano respecto

del total de la masa de las mazorcas recolectadas, calculado a partir de una muestra al azar de cinco mazorcas con la siguiente ecuación:

$$G = \frac{\text{peso de grano}}{\text{peso total}} \times 100$$

Humedad de grano (HG): 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 cm³ y se expresó en porcentaje.

3.1.4 Análisis estadístico de los datos fenotípicos

Los datos de las evaluaciones fenotípicas del experimento de 140 RIL (se eliminaron 4 líneas porque habían menos de 3 plantas evaluadas) se analizaron utilizando el procedimiento de modelos mixtos del paquete estadístico SAS (PROC MIXED) (SAS Institute Inc, 2011), considerando las repeticiones, los bloques dentro de repeticiones y las RIL como factores aleatorios con el fin de obtener el mejor predictor lineal no sesgado (BLUP, por el acrónimo en inglés *Best Linear Unbiased Predictor*) del valor fenotípico de cada línea recombinante.

Además, con el propósito de evitar la constricción (*shrinkage*) de la varianza genética que ocasiona el uso de los BLUP se realizó un segundo análisis en el que se consideraron las RIL como efectos fijos para obtener el mejor estimador lineal no sesgado (BLUE, del acrónimo en inglés *Best Liner Unbiased Estimator*). Los análisis de QTL se realizaron tanto con los BLUP como con los BLUE.

Se estimaron las heredabilidades (h^2) para cada carácter sobre la base de la media de la familia siguiendo a Holland *et al.* (2003). Además se estimaron las correlaciones genéticas (r_g) y las correlaciones fenotípicas (r_p) entre todos los caracteres evaluados siguiendo el procedimiento de SAS descrito por Holland (2006).

Los datos obtenidos en las evaluaciones de los experimentos de los padres y los híbridos fueron analizados separadamente usando el programa PROC GLM del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc, 2011) considerando años, repeticiones dentro de años y la interacción genotipo $\times$ año como efectos aleatorios. Las medias se compararon utilizando la mínima diferencia significativa de Fisher (MDS).

3.1.5 Análisis de QTL

Se realizó un análisis de QTL para cada uno de los 14 caracteres registrados en los experimentos de las 144 familias de RIL utilizando el paquete informático PlabMQTL (Utz, 2012). Se utilizó el método estadístico de mapeo por intervalos compuesto (CIM) para detectar los QTL y estimar sus efectos aditivos. Previamente, utilizando el mismo software, se realizaron análisis de QTL con 1000 reorganizaciones aleatorias o permutaciones de los datos con el objeto de determinar el umbral LOD para declarar como significativo un posible QTL considerando que el error de todo el experimento fuera inferior al 0.25. El umbral LOD fue 2,5. Todos estos análisis se hicieron usando cofactores, para ello se usó el comando cov SELECT.

Se estimó la varianza fenotípica explicada por el modelo por medio del coeficiente de determinación ajustada (R_{adj}^2), el cual tiene en cuenta la proporción de la varianza fenotípica explicada por todos los QTL detectados en el ajuste final del programa. La proporción de la varianza fenotípica explicada por un posible QTL individual (QTL i) fue calculada como:

$$R_i^2 = \frac{partR_i^2 \times R_{adj}^2}{\sum_{i=1}^n partR_i^2}$$

Donde n = número total de QTL en el ajuste final y $part R_i^2$ = coeficiente parcial de determinación, estimado para el i mo QTL detectado (Zhu *et al.*, 2004). La proporción de la varianza genética $\hat{p}$ explicada por todos los QTL detectados en el ajuste final fue estimada a partir de la ecuación:

$$\hat{p} = R_{adj}^2 / \hat{h}^2$$

Mientras que la proporción de la varianza genética explicada por cada QTL i se estimó a partir de la ecuación:

$$\hat{p}_i = R_i^2 / \hat{h}^2.$$

3.1.6 Validación

Se utilizó el enfoque de la validación cruzada (VC) propuesto por Utz *et al.* (2000) para evaluar los resultados del análisis de QTL. En cada carácter se realizó validación cruzada, tanto para el análisis realizado con BLUP como con BLUE. Este método de remuestreo fue llevado a cabo con el programa PlabMQTL. El conjunto de datos completo (DS) utilizado para la prueba estuvo formado por las medias de los BLUP o BLUE de las 140 RIL. En cada validación cruzada, un total de 117 RIL fueron usadas en el grupo de estimación (ES) para hacer la calibración y un total de 29 líneas se usaron en el grupo de validación (TS) para comprobar o validar los resultados de los análisis obtenidos con el DS. En total se realizaron 1000 VC para determinar la frecuencia con la que se detectó cada QTL significativo y la construcción de la estima de los efectos de los QTL detectados.

La proporción de la varianza genética explicada por el QTL en el grupo de validación TS se calculó a partir de la siguiente ecuación:

$$\hat{p}_{TS,ES} = \frac{R_{adj}^2(Y_{TS}, Q_{TS,ES})}{\hat{h}^2}$$

Donde R_{adj}^2 es el cuadrado del coeficiente de correlación ajustado entre las medias fenotípicas observadas en el TS (Y_{TS}) y los valores genotípicos predichos ($Q_{TS,ES}$) sobre la base de los resultados derivados del grupo de estimación ES, y $\hat{h}^2$ es la estima de la heredabilidad del carácter bajo estudio.

La magnitud del sesgo de la estimación de la proporción de la varianza genética ($\hat{p}_i$) explicada por cada QTL i debido al genotipo fue calculada como la diferencia entre el promedio estimado de p obtenido en ES y el correspondiente promedio de p obtenido en TS, tal como indica la siguiente ecuación:

$$\text{Sesgo estimación de } p = (\bar{p}_{i,ES} - \bar{p}_{i,TS,ES})$$

Y la fracción de ese sesgo se calculó como $1 - (\bar{p}_{i,TS,ES} / \bar{p}_{i,ES})$. De la misma forma se obtuvo el sesgo de la estimación de los efectos aditivos $\hat{\alpha}_i$ de cada QTL i detectado. También se obtuvieron las medias de p_i y α_i en ES ($\bar{p}_{i,ES}$ y $\bar{\alpha}_{i,ES}$) y en el correspondiente

TS ($\tilde{p}_{iTS.ES}$ y $\tilde{\alpha}_{iTS.ES}$), así como los cuantiles 10 y 90% de p_i y α_i tanto para el ES como para el TS.

Con la ayuda de una aplicación Grep (*Globally search for Regular Expression and Print*) (GNU, 2009) se extrajeron de cada calibración y validación los valores de la proporción de la varianza genética y fenotípica explicada por cada QTL i detectado, así como los efectos aditivos de cada set.

Utilizando el comando “env 2” en el archivo de ordenes o *script* del programa PlabMQTL se estimó la varianza de la interacción QTL $\times$ ambiente incluyendo todos los QTL detectados usando los BLUP o BLUE medios. El cuadrado medio (CM) de los genotipos obtenidos del ANOVA se subdividió en la variación debida a los QTL detectados y la variación residual. De manera similar, el cuadrado medio de la interacción genotipo $\times$ ambiente fue subdividido en la variación debida a la interacción de los QTL (QTL $\times$ E) y su correspondiente residuo. La varianza genética explicada por todos los QTL del modelo fue calculada en base a las esperanzas de los cuadrados medios que fueron semejantes a las utilizadas por Bliss (1967) y Knapp (1994).

3.2 Mapeo de Asociación

3.2.1 Material vegetal

Como se describió anteriormente, en el mapeo de asociación se utilizan poblaciones no estructuradas para buscar polimorfismos asociados al carácter en estudio. En esta investigación se utilizó un subconjunto del panel de líneas puras que representan la variabilidad mundial del maíz (a partir de aquí me referiré a estas líneas como “panel de asociación”) (Flint-Garcia *et al.*, 2005).

3.2.2 Datos genotípicos

Se utilizó un único conjunto de marcadores SNP derivados del chip de micro esferas (*beanchip*) de Illumina 50k (Ganal *et al.*, 2011) y del conjunto de SNP desarrollados por el grupo de Ed. Buckler y utilizados recientemente para genotipar el banco nacional de germoplasma de maíz de los EE.UU (Romay *et al.*, 2013). Las bases de datos con el

genotipado fueron proporcionadas por el Dr. James Holland y su grupo del departamento de “Crop Science” de la Universidad del Estado de Carolina del Norte, EE.UU. Las dos bases de datos se combinaron y se filtraron los SNP para eliminar aquellos con más del 20% de datos perdidos y/o con una frecuencia para el alelo menor inferior al 5%. Además los genotipos heterocigotos fueron considerados como datos perdidos en el análisis. Después del filtrado se dispuso de un total de 246.477 SNP distribuidos a través de todo el genoma del maíz que fueron utilizados en el análisis de asociación.

Para evitar falsas asociaciones en los análisis posteriores se corrigió por estructura poblacional utilizando una matriz de parentesco genético (K) previamente publicada por Olukolu *et al.* (2013). Esta matriz fue estimada utilizando un subconjunto de 5.000 SNP sin ningún dato perdido y distribuidos de forma aproximadamente uniforme en todo el genoma (al menos 60 kbp entre cada dos marcadores).

3.2.3 Datos fenotípicos

Un total de 270 líneas del panel de asociación fueron evaluadas en Pontevedra (42°24'N, 8°38'O y 20 m sobre el nivel del mar) durante dos años consecutivos (2010, 2011). En el tercer año (2012) se sembraron únicamente 255 líneas de este panel debido a que no había disponibilidad de semilla para las líneas restantes.

Los ensayos fueron sembrados manualmente en el campo y cada parcela experimental consistió de un surco sembrado con 58 semillas distribuidas en 29 golpes (2 semillas/golpe). El espacio entre parcelas experimentales fue de 0,8 m y el espacio entre plantas dentro de cada parcela experimental fue de 0,18 m. Después del aclareo se dejaron 29 plantas por parcela experimental lo que equivale a una densidad de siembra de aproximadamente 70.000 plantas por hectárea.

Las evaluaciones fenotípicas se realizaron bajo infestación artificial con huevos de *S. nonagrioides* siguiendo el mismo procedimiento descrito en el apartado anterior. Las variables evaluadas se clasifican en caracteres de resistencia y caracteres agronómicos. En el Anexo VI se presentan las medias generales de los tres años de evaluación tanto para los caracteres de resistencia como agronómicos.

En este experimento se registraron tres caracteres de resistencia y tres caracteres agronómicos. Los caracteres de resistencia fueron longitud de galerías (LG), daño de tallo relativo (DTR) y resistencia del grano (RG). Los caracteres agronómicos fueron días a floración masculina (DFM), días a floración femenina (DFF) y altura de planta (AP).

3.2.4 Análisis estadístico de los datos fenotípicos

Se realizó un análisis combinado de todos los ensayos con el procedimiento de modelos mixtos (PROC MIXED) del paquete estadístico SAS (SAS Institute Inc, 2011), considerando las líneas como efectos fijos y replicaciones y bloques dentro de replicaciones como efectos aleatorios. Dado que se observó una clara asociación entre los valores predichos para longitud de galerías y daño relativo de tallo y los valores del residuo, se realizó una transformación logarítmica de LG y DTR antes de obtener los BLUE. La transformación logarítmica eliminó la relación entre la varianza de los residuos y los valores predichos. Una vez obtenidos los BLUE se convirtieron nuevamente a cm y porcentajes y con estos valores se realizó el GWAS.

Se calcularon las heredabilidades para cada carácter en cada año sobre la base de la media familiar siguiendo el procedimiento de Holland *et al.* (2003). El modelo para calcular las heredabilidades es similar al utilizado para calcular los BLUE con la excepción de que las líneas fueron tratadas como efectos aleatorios. Las varianzas genéticas y fenotípicas se calcularon usando REML con el procedimiento de modelos mixtos en SAS como lo describe Holland (2006).

3.2.5 Análisis de asociación

El análisis de asociación basado en el modelo lineal mixto (MLM) fue realizado en el programa informático Tassel 4.1.26 (Bradbury *et al.*, 2007). El MLM utilizado por Tassel fue:

$$y = X\beta + Zu + e$$

Donde y es el vector de los fenotipos (BLUE), β es un vector de efectos fijos, incluyendo el marcador SNP testado, u es un vector de efectos aditivos aleatorios (líneas), $\mathbf{X}$ 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 fueron modeladas 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).

Las estimas de la máxima verosimilitud restringida de los componentes de la varianza fueron obtenidas 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.

3.2.6 Umbral de significancia

Para seleccionar asociaciones robustas entre los SNP y los caracteres se utilizó un procedimiento de sub muestreo (o *subagging*) para determinar un umbral de significancia en el GWAS (Valdar *et al.*, 2009). Se calcula la probabilidad de inclusión en el modelo de cada marcador testado (RMIP). La proporción esperada de veces que el locus m es incluido en el modelo está dada por la ecuación:

$$RMIP = \frac{1}{R} \sum_{r=1}^R \Gamma_{rm}$$

Donde $\Gamma_m = [\gamma_1 \ \gamma_2 \ \cdots \ \gamma_R]$, γ corresponde a cada submuestreo, siendo $\gamma = 1$ cuando la significación de la asociación del SNP con el carácter tiene una $P < 1 \times 10^{-4}$; $R = 100$, es el número de submuestras Γ_{rm} generados. Cada uno de los 100 submuestras generados con el paquete estadístico R (R Core Team, 2013) comprende una muestra aleatoria del 80% de las líneas del panel y solamente los SNP detectados en ≥ 30 de los submuestras (ej. umbral $RMIP \geq 0,30$) fueron considerados como significativamente asociados al carácter.

3.2.7 Desequilibrio de ligamiento y selección de genes candidatos

Se examinó el desequilibrio de ligamiento r^2 de cada SNP significativamente asociado con caracteres de resistencia a *S. nonagrioides* en una región de 60 SNP ubicados corriente arriba y corriente abajo del SNP significativo (cubriendo una región que varió de 0,15 a 1 Mbp). Para cada carácter también se examinó el desequilibrio de ligamiento existente entre los SNP significativo.

Se utilizó el navegador del genoma del sitio web MaizeGDB (Harper *et al.*, 2011) disponible en <http://www.maizegdb.org/> para identificar y caracterizar los genes que contienen o que están adyacentes a este SNP significativamente asociado al carácter en estudio. Se examinó una región de ± 150 kbp circundantes a cada SNP significativo para identificar genes de interés. En algunos SNP se preseleccionaron más de dos genes que podrían estar involucrados en los mecanismos de defensa de la planta (basándonos en evidencias que han sido previamente publicadas), de éstos se eligió al 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.



RESULTADOS



4. Resultados

4.1 Mapeo convencional de QTL

4.1.1 Medias, heredabilidades y correlaciones

Los resultados de la prueba de la mínima diferencia significativa (MDS) indican que no hubo diferencias significativa entre las medias de las líneas A637 y EP42 tanto para los caracteres de resistencia como para los caracteres agronómicos (Tabla 4.1 y Tabla 4.2). Se observó un alto grado de heterosis para los caracteres agronómicos así como también para los caracteres de resistencia dado que el híbrido F_1 fue significativamente distinto de la media de los padres (*mid-parent*) excepto para longitud de galerías y humedad de grano (Tabla 4.1 y Tabla 4.2). Además, las varianzas genéticas de las RIL fueron altamente significativas ($P < 0,01$) para todos los caracteres agronómicos y para dos caracteres de resistencia, LG y ET (Tabla 4.1 y Tabla 4.2). Las heredabilidades obtenidas para los caracteres agronómicos fueron altas ($h^2 \geq 0,6$) mientras que para los caracteres de resistencia oscilaron entre valores no significativamente diferentes de cero y valores de heredabilidad moderada (Tabla 4.1 y Tabla 4.2).

Se observó que la correlación genética de LG, con HG, AP y AM oscilo entre valores moderados a altos, mientras que la correlación genética entre LG y DFM fue baja (Tabla 4.3). Por otra parte no se observó correlación genética entre los caracteres de resistencia en mazorca y ningún carácter agronómico. Los valores del coeficiente de correlación fenotípica entre los caracteres RG, RP y RZ oscilaron entre moderados a altos, mientras que los valores del coeficiente de correlación genética para esos mismos caracteres no se estimaron dado que sus varianzas genéticas no difirieron de cero (Tabla 4.3).

50 Tabla 4.1 Medias de cada línea parental (A637 y EP42), del híbrido (A637 × EP42) y del padre medio ($\bar{P}$), media $\pm$ error estándar de la población de RIL ($RIL \pm ES$), heredabilidades (h^2) y varianzas genéticas (σ_G) de las RIL para los caracteres de resistencia.

	Caracteres de resistencia					
	Longitud de galerías	Daño de tallo relativo	Resistencia del grano	Resistencia del pedúnculo	Resistencia del zuro	Encamado de tallo
	(cm)	(%)	(1-9) [†]	(1-9) [†]	(1-9) [†]	(%)
A637	43,27 ^{a*}	26,70 ^a	7,46 ^b	4,91 ^b	6,91 ^b	48,20 ^a
EP42	49,47 ^a	28,60 ^a	7,44 ^b	5,04 ^b	7,71 ^{ab}	35,37 ^a
F ₁	44,68 ^a	19,58 ^b	8,73 ^a	8,58 ^a	8,80 ^a	10,55 ^b
MDS ($\alpha = 0,05$)	12,85	7,0	0,80	1,72	1,50	23,55
$\bar{P}$ [§]	46,37	27,65	7,45	4,98	7,31	41,79
MDS para heterosis [¶] ($\alpha = 0,05$)	11,13	6,10	0,70	1,49	1,30	20,39
RIL $\pm$ ES	36,96 $\pm$ 0,61	24,84 $\pm$ 0,38	7,38 $\pm$ 0,06	6,19 $\pm$ 0,09	7,18 $\pm$ 0,07	27,62 $\pm$ 1,04
σ_G	24,36 ^{**}	4 $\times$ 10 ^{-4NS}	0,10 ^{NS}	0,20 ^{NS}	0,15 ^{NS}	132,0 ^{**}
h^2	0,34	0,20 ^{NS}	0,20 ^{NS}	0,19 ^{NS}	0,19 ^{NS}	0,48

Las varianzas genéticas (σ_G) y las heredabilidades (h^2) de cada carácter fueron estimadas siguiendo a Holland (2006) y Holland *et al.* (2003), respectivamente.

[†] La resistencia de grano, de pedúnculo y de zuro fueron evaluadas en base a una escala subjetiva de 1-9 en la cual 1 = completamente dañado y 9 = sin daño ocasionado por las larvas.

^{*} Los valores de las medias con letra diferente fueron significativamente diferentes de acuerdo con la MDS ($\alpha = 0,05$)

[§] $\bar{P}$ = la media de los dos parentales A637 y EP42 (*mid-parent*)

[¶] La heterosis fue significativa a una probabilidad de 0,05 cuando el padre medio difirió significativamente del híbrido usando esta mínima diferencia significativa (MDS).

^{**} Significativa a un nivel de probabilidad del 0,01

^{NS} No significativo

Tabla 4.2 Medias de cada línea parental (A637 y EP42) del híbrido (A637 × EP42) y del padre medio ($\bar{P}$), media $\pm$ error estándar de la población de RIL (RIL $\pm$ ES), heredabilidades (h^2) y varianzas genéticas (σ_G) de las RIL para los caracteres agronómicos.

	Caracteres agronómicos					
	Rendimiento (Mg ha ⁻¹)	Humedad de grano [†] (%)	Días a floración masculina (días)	Días a floración femenina [†] (días)	Altura de planta [†] (cm)	Altura de mazorca [†] (cm)
A637	2,86 ^{b*}	20,59 ^a	71,60 ^a	74,20 ^a	165,90 ^a	65,30 ^a
EP42	2,69 ^b	18,03 ^a	71,00 ^a	76,20 ^a	172,50 ^a	69,20 ^a
F ₁	13,39 ^a	18,72 ^a	65,50 ^b	66,20 ^a	227,90 ^a	104,40 ^a
MDS ($\alpha = 0,05$)	1,07	5,61	1,24	14,21	69,98	55,63
$\bar{P}$ [§]	2,77	19,31	71,30	75,20	169,20	67,25
MDS para heterosis [¶] ($\alpha = 0,05$)	0,93	4,86	1,07	12,31	60,60	48,18
RIL $\pm$ ES	2,43 $\pm$ 0,06	19,76 $\pm$ 0,14	67,47 $\pm$ 0,18	70,70 $\pm$ 0,19	153,65 $\pm$ 0,94	61,66 $\pm$ 0,64
σ_G	0,52 ^{**}	13,43 ^{**}	13,51 ^{**}	13,05 ^{**}	294,1 ^{**}	119,9 ^{**}
h^2	0,61	0,58	0,91	0,84	0,83	0,76

Las varianzas genéticas (σ_G) y las heredabilidades (h^2) de cada carácter fueron estimadas siguiendo a Holland (2006) y Holland *et al.* (2003), respectivamente.

[†] No hubo diferencia significativa entre la F₁ y sus padres porque la interacción G $\times$ E fue altamente significativa.

^{*} Los valores de las medias con letra diferente fueron significativamente diferentes de acuerdo con la MDS ($\alpha = 0,05$)

[§] $\bar{P}$ = la media de los dos parentales A637 y EP42 (*mid-parent*)

[¶] La heterosis fue significativa a una probabilidad de 0,05 cuando el padre medio difirió significativamente del híbrido usando esta mínima diferencia significativa (MDS).

^{**} Significativa a un nivel de probabilidad de 0,01

^{NS} No significativo

Table 4.3 Coeficientes de correlación genética y fenotípica entre los caracteres evaluados en la población de RIL derivadas del cruce A637 × EP42

	Caracteres de resistencia [†]					Caracteres agronómicos [†]					
	LG	RG [‡]	RP [‡]	RZ [‡]	ET	R	HG	DFM	DFF	AP	AM
LG					0,22	0,32	0,69 ⁺	0,40 ⁺	0,31	0,66 ⁺	0,84 ⁺
RG	-0,27 ⁺				0,22						
RP	-0,37 ⁺	0,65 ⁺			0,37						
RZ	-0,32 ⁺	0,85 ⁺	0,67 ⁺		0,37						
ET	0,06	-0,05	-0,04 ⁺	-0,04		0,21	-0,36 ⁺	-0,09	-0,18	0,02	0,21
R	0	0,23 ⁺	0,15 ⁺	0,19 ⁺	0,10 ⁺		-0,04	0,14	-0,12	0,22	0,39 ⁺
HG	0,07	0,02	0,11 ⁺	0,01	-0,07	-0,14 ⁺		0,80 ⁺	0,92 ⁺	0,41 ⁺	0,60 ⁺
DFM	0,10 ⁺	0,11 ⁺	0,21 ⁺	0,13 ⁺	-0,05	-0,08	0,46 ⁺		0,90 ⁺	0,26 ⁺	0,62 ⁺
DFF	0,06	0,01	0,12 ⁺	0,01	-0,17 ⁺	-0,30 ⁺	0,51 ⁺	0,80 ⁺		0,28 ⁺	0,47 ⁺
AP	0,30 ⁺	0,21 ⁺	0,17 ⁺	0,16 ⁺	0,04	0,40 ⁺	0,10	0,07	0		0,77 ⁺
AM	0,39 ⁺	0,15 ⁺	0,17 ⁺	0,12 ⁺	0,05	0,36 ⁺	0,15 ⁺	0,35 ⁺	0,22 ⁺	0,76 ⁺	

Los coeficientes de correlación fenotípica (r_p) se muestran debajo de la diagonal mientras los coeficientes de correlación genética (r_g) se muestran sobre la diagonal.

[†] LG, longitud de galerías; RG, resistencia de grano; RP, resistencia de pedúnculo; RZ, resistencia de zuro; ET, encamado de rallo; R, rendimiento; HG, humedad de grano; DFM, días a floración masculina; DFF, días a floración femenina; AP, altura de planta y AM, altura de mazorca.

[‡] No se estimaron los coeficientes de correlación genética y fenotípica para los caracteres cuya estima de la varianza genética no difirió de cero.

⁺ Coeficientes de correlación genética y fenotípica que superan dos veces su error estándar.

4.1.2 Mapa genético

Ciento treinta marcadores SSR fueron genotipados en las 146 RIL, de los cuales 121 loci fueron mapeados en una única posición dentro de los 10 cromosomas del maíz. El programa PlabMQTL combinó 7 de esos marcadores porque la distancia con el marcador más próximo fue inferior de 1.01 cM. Finalmente el mapa genético utilizado para el análisis de QTL cubrió una longitud de 1.730,8 cM con un total de 114 marcadores distribuidos en todo el genoma. No se observó distorsión de segregación para ningún marcador en relación a la proporción de segregación esperada. Se observó que el 93,6 % del genoma estaba cubierto por marcadores con una distancia promedio de 20 cM entre marcadores consecutivos.

4.1.3 QTL identificados

Se localizó un total de 18 QTL para los diferentes caracteres evaluados (de resistencia y agronómicos) en los cromosomas 1, 3, 5, 8, 9 y 10 (Figura 4.1 y Tabla 4.4). Los QTL detectados utilizando BLUP y los parámetros de esos QTL (intervalos de confianza, R^2 , p y α) fueron similares a los obtenidos usando BLUE, excepto los QTL para resistencia en mazorca y un QTL para altura de planta que sólo se detectaron utilizando BLUE; y un QTL detectado para rendimiento, el cual únicamente se detectó cuando se utilizaron los BLUP en el análisis de QTL.

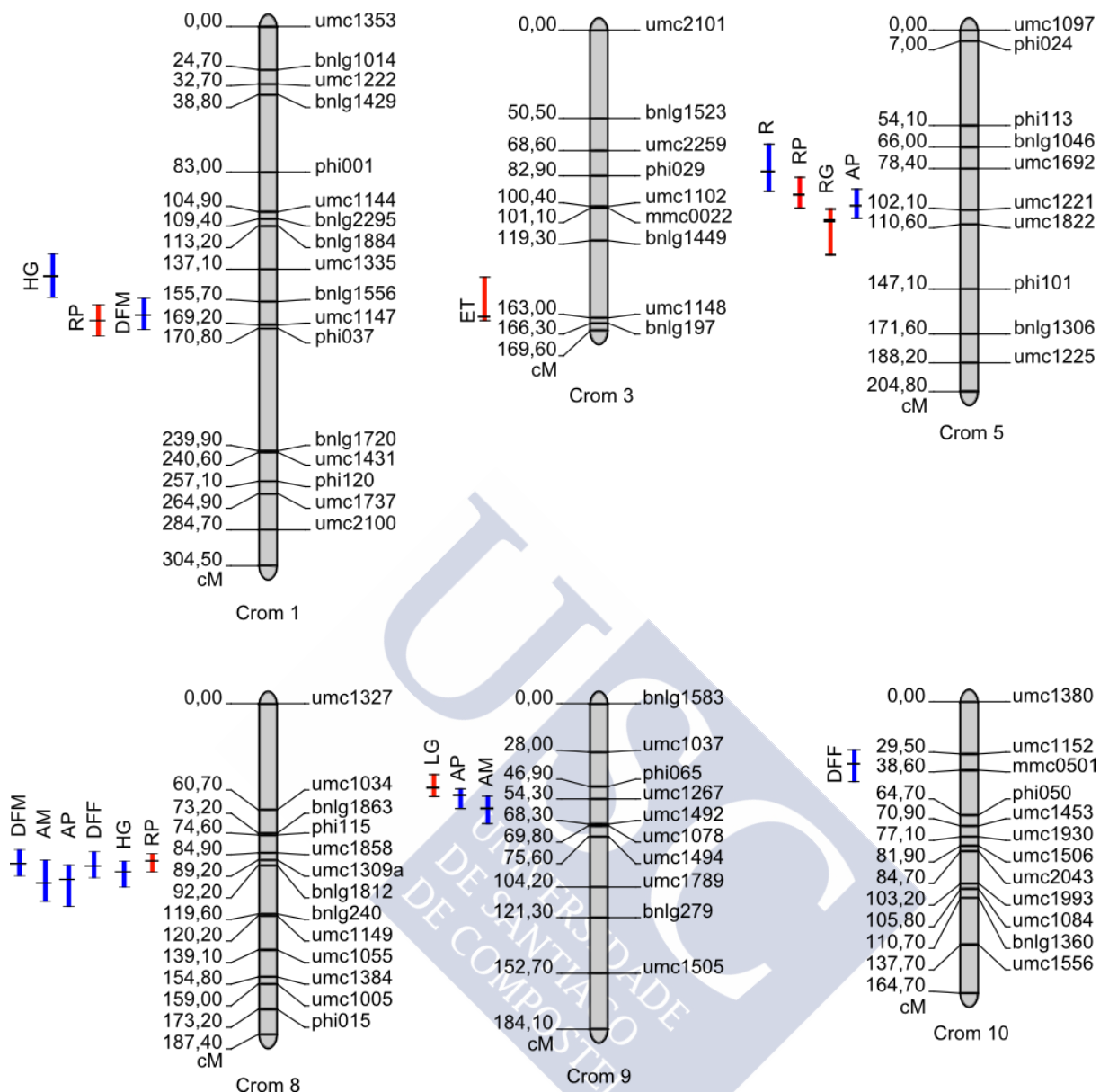


Figura 4.1 Mapa de ligamiento de los seis cromosoma del maíz donde se identificaron QTL para los caracteres evaluados en una población de 144 RIL derivadas del cruce A637 × EP42. Las barras de color rojo representan a los QTL localizados para los caracteres de resistencia, las líneas de los extremos y del centro de cada barra indican los intervalos de confianza y la posición del QTL, respectivamente. Las barras de color azul representan a los QTL localizados para los caracteres agronómicos. LG, longitud de galerías; RG, resistencia de grano; RP, resistencia de pedúnculo; ET, encamado de rallo; R, rendimiento; HG, humedad de grano; DFM, días a floración masculina; DFF, días a floración femenina; AP, altura de planta y AM, altura de mazorca.

Tabla 4.4 Resumen de la localización de los QTL mapeados en la población de RIL derivadas del cruce A637 × EP42 bajo infestación con *S. nonagrioides*.

Carácter	Nombre QTL	Bin	Posición	Intervalo de confianza (cM)	LOD	Marcadores flanqueantes	Frecuencia de detección en la VC (%)
Longitud de galerías	LG	9.03 [†]	48	40-54	3,40	<i>phi065-umc1267</i>	49,3
Resistencia de grano	RG	5.04/05 [§]	106	102-124	4,46	<i>umc1221-umc1822</i>	49,5
Resistencia de pedúnculo	RP1	1.07 [§]	168	160-172	4,73	<i>bnlg1556-umc1147</i>	22,3
	RP5	5.03 [§]	92	84-102	6,42	<i>umc1692-umc1221</i>	91,4
	RP8	8.04 [§]	88	84-94	4,98	<i>umc1858-umc1309a</i>	48,9
Encamado de tallo	ET	3.07 [†]	162	146-166	2,50	<i>bnlg1449-umc1148</i>	45,4
Rendimiento	R	5.03 [‡]	80	64-92	3,95	<i>umc1692-umc1221</i>	72,7
Humedad de grano	HG1	1.07 [†]	138	126-148	2,80	<i>umc1335-bnlg1556</i>	74,2
	HG8	8.05 [‡]	90	86-94	4,83	<i>umc1309a-bnlg1812</i>	89,1
Días a floración masculina	DFM1	1.07 [†]	168	162-172	3,67	<i>bnlg1556-umc1147</i>	45,4
	DFM8	8.05 [†]	90	86-92	10,81	<i>umc1309a-bnlg1812</i>	96,0
Días a floración femenina	DFF8	8.05 [†]	90	86-92	10,51	<i>umc1309a-bnlg1812</i>	92,9
	DFF10	10.02 [‡]	36	30-54	4,26	<i>umc1152-mmcc0501</i>	55,3
Altura de planta	AP5	5.04 [†]	102	90-108	3,02	<i>umc1692-umc1221</i>	23,8
	AP8	8.05 [§]	96	88-110	3,29	<i>bnlg1812-bnlg240</i>	23,0
	AP9	9.03 [†]	54	50-62	7,6	<i>phi065-umc1267</i>	89,0
Altura de mazorca	AM8	8.05 [†]	98	88-106	9,02	<i>bnlg1812-bnlg240</i>	54,1
	AM9	9.03 [‡]	64	54-70	3,08	<i>umc1267-umc1492</i>	62,1

[†] Detectados usando tanto BLUP como BLUE en el análisis.

[‡] Detectados únicamente cuando se usaron BLUP

[§] Detectados únicamente cuando se usaron BLUE

4.1.3.1 QTL detectados para caracteres de resistencia a *S. nonagrioides*

Para el carácter LG únicamente se identificó un QTL en el cromosoma 9 el cual registró el pico más alto del LOD en la posición 48 cM dentro del bin 9.03 de este cromosoma (parte inferior de la Figura 4.2 y Tabla 4.4). La proporción de la varianza genética y fenotípica explicada por este QTL fue de 19,76% y 6,80%, respectivamente. El alelo que aumenta la longitud de galerías es el que proviene de la EP42 (lo indica el signo negativo del efecto) por lo tanto el alelo favorable para la resistencia fue aportado por la línea A637 y el efecto aditivo del QTL fue de 0,75 cm (Tabla 4.5).

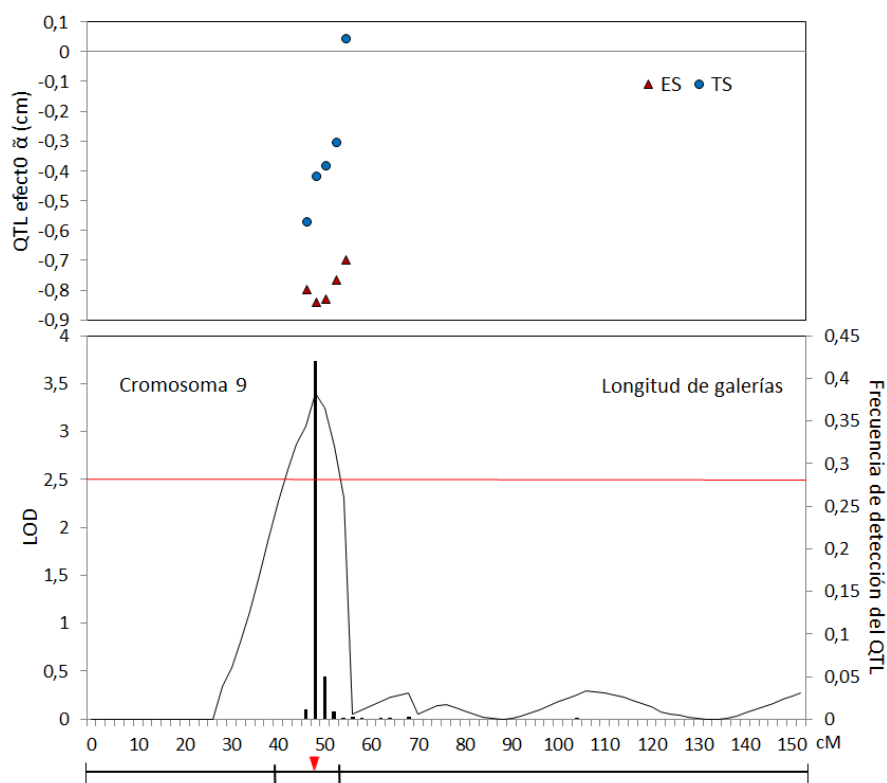


Figura 4.2 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para LG durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 9 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

Tabla 4.5 Estimación de la proporción de la varianza genética ($\hat{p}$) y la varianza fenotípica (R_{adj}^2) explicada por cada QTL para los caracteres de resistencia y sus efectos aditivos ($\hat{\alpha}$) en tres diferentes grupos de datos (DS, datos completos; VC_{ES}, grupo calibración y VC_{TS}, grupo de validación). Estimación del sesgo de cada parámetro mediante la prueba de validación cruzada.

		Longitud de galerías	Encamado de tallo	Resistencia de grano	Resistencia de pedúnculo		
	Cromosoma	9	3	5	1	5	8
R_{adj}^2	DS	6,80	5,50	9,40	4,89	11,97	8,0
	VC _{ES}	8,2/8,0 [†]	7,7/7,5	9,9/9,8	6,7/6,6	12,6/12,4	8,5/8,2
	VC _{TS}	0,74/-0,75	-0,90/-1,93	3,9/2,0	0,65/0,21	7,1/5,7	3,1/2,0
$\hat{p}$	DS	19,76	11,50	47,01	25,73	62,99	42,11
	VC _{ES}	24,0/23,6	16,0/15,6	49,7/49,2	35,3/34,8	66,2/65,3	44,5/43,1
	VC _{TS}	2,2/-2,2	-1,9/-4,0	19,4/9,8	3,4/1,1	37,3/30,2	16,2/10,7
	Sesgo [‡]	21,8(0,91)	17,9(1,0)	30,3(0,60)	31,9(0,90)	28,8(0,44)	28,3(0,64)
$\hat{\alpha}^§$	DS	-0,75**	-2,67**	0,29**	0,29**	0,60**	0,38**
	VC _{ES}	-0,84/-0,83	-3,1/-3,1	0,31/0,31	0,37/0,40	0,59/0,59	0,40/0,40
	VC _{TS}	-0,41/0,41	-0,84/-0,90	0,22/0,23	0,07/0,08	0,51/0,51	0,25/0,28
	Sesgo [‡]	-0,43(0,51)	-2,3(0,73)	0,09(0,29)	0,30(0,81)	0,08(0,14)	0,15(0,38)

[†] Los valores en color azul antes de la diagonal (/) corresponden a la media ($\bar{R}_{i adj}^2$, $\bar{p}_i$ y $\bar{\alpha}_i$) y los valores después de la diagonal corresponde a la mediana ($\tilde{R}_{i adj}^2$, $\tilde{p}_i$ y $\tilde{\alpha}_i$) de cada parámetro.

[‡] El sesgo de la estimación de $\hat{p}$ y $\hat{\alpha}$ calculados como la diferencia entre $\bar{p}_{ES} - \bar{p}_{TS,ES}$ y $\bar{\alpha}_{ES} - \bar{\alpha}_{TS,ES}$, el valores entre paréntesis denotan el fracción del sesgo de $\hat{p}$ y $\hat{\alpha}$ estimadas por $1-(\bar{p}_{TS,ES}/\bar{p}_{ES})$ y $1-(\bar{\alpha}_{TS,ES}/\bar{\alpha}_{ES})$, respectivamente.

[§] Los efectos aditivos de cada carácter están dados como: longitud de galerías en cm, el encamado de tallo en %, y la resistencia de grano y pedúnculo en una escala subjetiva de 1 a 9 (donde 1 = completamente dañado y 9 = no daño ocasionado por las larvas).

**, Significativamente diferente de cero a un nivel de probabilidad de 0,01.

58 Tabla 4.6 Estimación de la proporción de la varianza genética ($\hat{p}$) y la varianza fenotípica (R_{adj}^2) explicada por cada QTL para los caracteres de agrónomos y sus efectos aditivos ($\hat{\alpha}$) en tres diferentes grupos de datos (DS, datos completos; VC_{ES}, grupo de estimación y VC_{TS}, grupo de validación). Estimación del sesgo de cada parámetro mediante la prueba de validación cruzada.

	Cromosoma	Rendimiento	Humedad de grano		Días a floración masculina		Días a floración femenina		Altura de planta			Altura de mazorca	
		5	1	8	1	8	8	10	5	8	9	8	9
R_{adj}^2	DS	9,30	8,41	9,48	6,97	23,92	26,51	7,29	5,75	5,67	15,65	19,21	9,32
	VC _{ES}	10,0/9,8 [†]	9,0/8,8	9,8/9,5	8,1/7,9	23,5/23,3	26,1/25,9	8,9/8,8	7,3/7,3	9,0/8,8	16,9/16,9	20,0/19,4	9,6/9,4
	VC _{TS}	4,3/2,7	4,9/3,7	6,7/5,2	1,7/0,88	20,3/19,3	23,3/23,0	3,9/3,0	0,91/0,39	0,66/0,14	12,7/11,3	15,2/13,7	3,2/2,4
$\hat{p}$	DS	15,24	14,48	16,35	7,65	26,29	31,55	9,27	6,93	6,83	18,88	25,27	12,28
	VC _{ES}	16,4/16,1	15,7/15,31	16,8/16,3	8,9/8,7	25,9/25,6	31,1/30,9	10,6/10,4	8,8/8,8	10,9/10,6	20,4/20,0	26,4/25,6	12,6/12,3
	VC _{TS}	7,0/4,5	8,5/6,4	11,5/8,9	1,9/0,97	22,3/21,2	27,7/27,4	4,7/3,6	1,1/0,5	0,79/0,17	15,3/13,6	20,0/18,04	4,3/3,1
	Sesgo [‡]	9,4(0,57)	7,2(0,46)	5,4(0,32)	7,0(0,79)	3,5(0,13)	3,4(0,11)	5,9(0,56)	7,7(0,87)	10,1(0,93)	5,1(0,25)	6,4(0,24)	8,3(0,66)
$\hat{\alpha}^§$	DS	0,24**	0,61**	0,65**	1,37**	1,93**	1,81**	0,90**	-4,01**	5,47**	-7,27**	5,93**	-4,14**
	VC _{ES}	0,24/0,24	0,65/0,65	0,66/0,65	1,4/1,4	1,9/1,9	1,8/1,8	1,1/1,1	-4,7/-4,7	6,5/6,3	-7,6/-7,6	5,5/5,5	-3,6/-3,3
	VC _{TS}	0,17/0,17	0,49/0,52	0,57/0,59	0,6/0,62	1,9/1,9	1,8/1,8	0,62/0,66	-1,0/-1,1	1,2/1,2	-7,2/7,2	5,0/4,9	-2,0/-2,0
	Sesgo [‡]	0,07(0,29)	0,16(0,24)	0,09(0,13)	0,82(0,58)	0(0,0)	0,0(0,0)	0,44(0,42)	-3,7(0,78)	5,3(0,81)	-0,46(0,06)	1,0(0,10)	-1,7(0,46)

[†] Los valores en color azul antes de la diagonal (/) corresponden a la media ($\bar{R}_{i adj}^2$, $\bar{p}_i$ y $\bar{\alpha}_i$) y los valores después de la diagonal corresponden a la mediana ($\tilde{R}_{i adj}^2$, $\tilde{p}_i$ y $\tilde{\alpha}_i$) de cada parámetro.

[‡] El sesgo de la estimación de $\hat{p}$ y $\hat{\alpha}$ calculados como la diferencia entre $\bar{p}_{ES} - \bar{p}_{TS,ES}$ y $\bar{\alpha}_{ES} - \bar{\alpha}_{TS,ES}$, respectivamente; los valores entre paréntesis denotan la fracción del sesgo de $\hat{p}$ y $\hat{\alpha}$ estimadas por $1-(\bar{p}_{TS,ES}/\bar{p}_{ES})$ y $1-(\bar{\alpha}_{TS,ES}/\bar{\alpha}_{ES})$, respectivamente.

[§] Los efectos aditivos de cada carácter están dados como: longitud de galerías en cm, el encamado de tallo en %, y la resistencia de grano y pedúnculo en una escala subjetiva de 1 a 9 (donde 1 = completamente dañado y 9 = no daño ocasionado por las larvas).

** Significativamente diferente de cero a un nivel de probabilidad de 0.01.

Se detectaron 4 QTL para caracteres de resistencia en la mazorca (RG y RP), estos QTL fueron localizados únicamente cuando se utilizaron BLUE en el análisis de QTL. Para resistencia de grano se localizó un QTL en el cromosoma 5 cuyo pico del LOD fue registrado en la posición 106 cM (Figura 4.3) y fue flanqueado por los marcadores *umc1221* y *umc1822* localizados en los bins 5.04 y 5.05, respectivamente (Tabla 4.4). La proporción de la varianza genética y fenotípica explicada por este QTL es de 47,01% y 9,40% respectivamente. El alelo favorable es aportado por la línea A637 y tiene un efecto aditivo de 0,29 en la escala subjetiva de 1-9 utilizada para evaluar este carácter (Tabla 4.5).

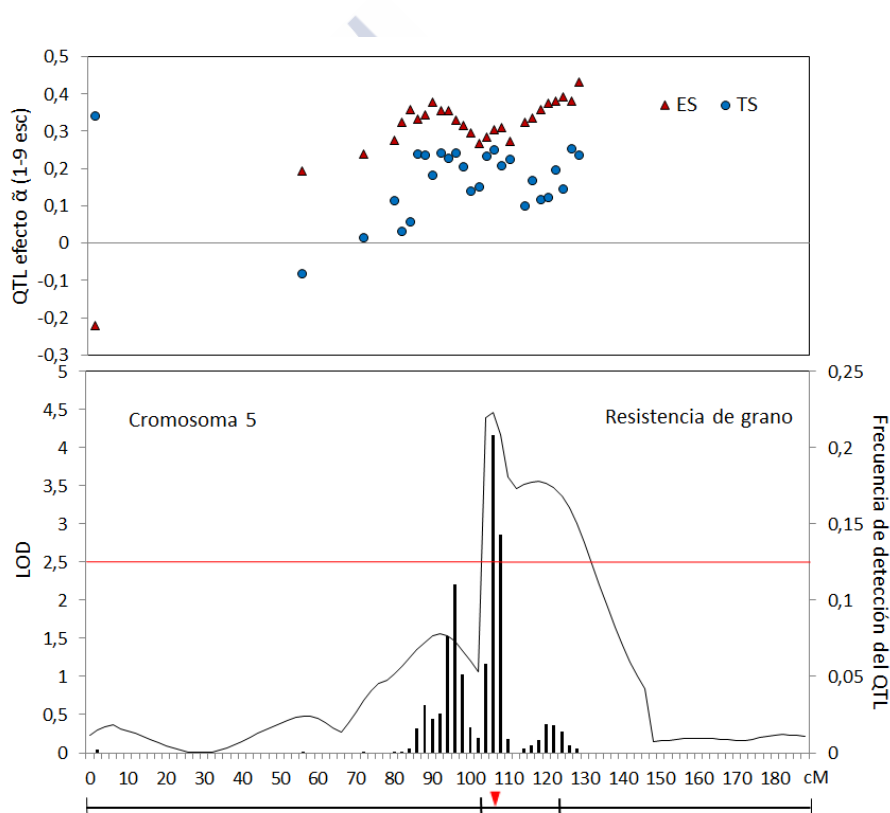


Figura 4.3 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para RG durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 5 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

Para el carácter resistencia de pedúnculo se localizaron tres QTL en los cromosomas 1, 5 y 8 (a menudo me referiré a ellos como RP1, RP5 y RP8, respectivamente). El pico del LOD para cada QTL fue de 4,73 para el QTL RP1, 4,42 para el QTL RP5 y 4,98 para el QTL RP8. Las posiciones en las que se localizaron los tres QTL fueron 168, 92 y 88 cM de los cromosomas 1 (bin 1.07), 5 (bin 5.03) y 8 (bin 8.04), respectivamente (Figuras 4.4, 4.5 y 4.6). La proporción de la varianza genética explicada por cada uno de los tres QTL osciló entre el 26 y el 63%, mientras que la proporción de la varianza fenotípica explicada osciló del 5 al 12% (Tabla 4.5). El alelo favorable para los tres QTL proviene de la línea A637. El efecto aditivo estimado de cada QTL para resistencia de pedúnculo fue 0,29 (QTL RP1), 0,60 (QTL RP5) y 0,38 (QTL RP8) en la escala subjetiva de 1 a 9.

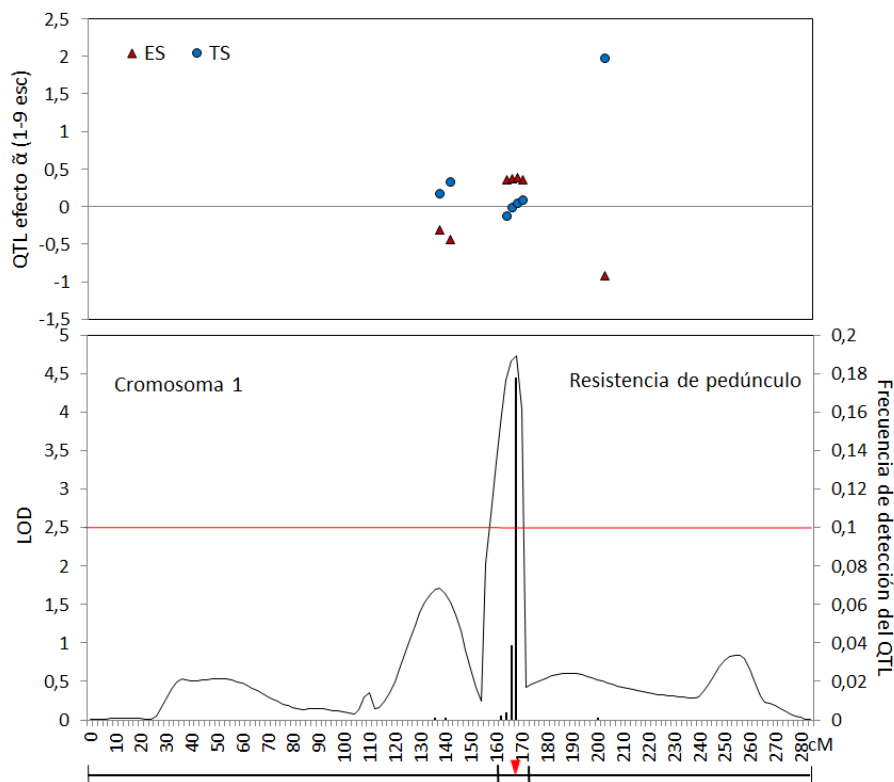


Figura 4.4 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para RP durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 1 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

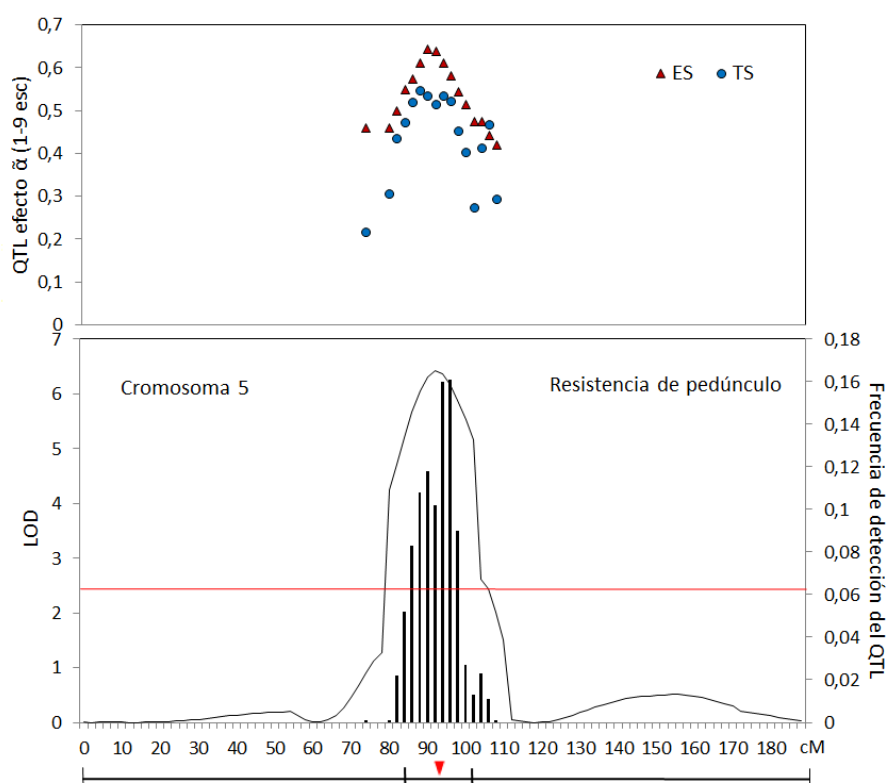


Figura 4.5 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para RP durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 5 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

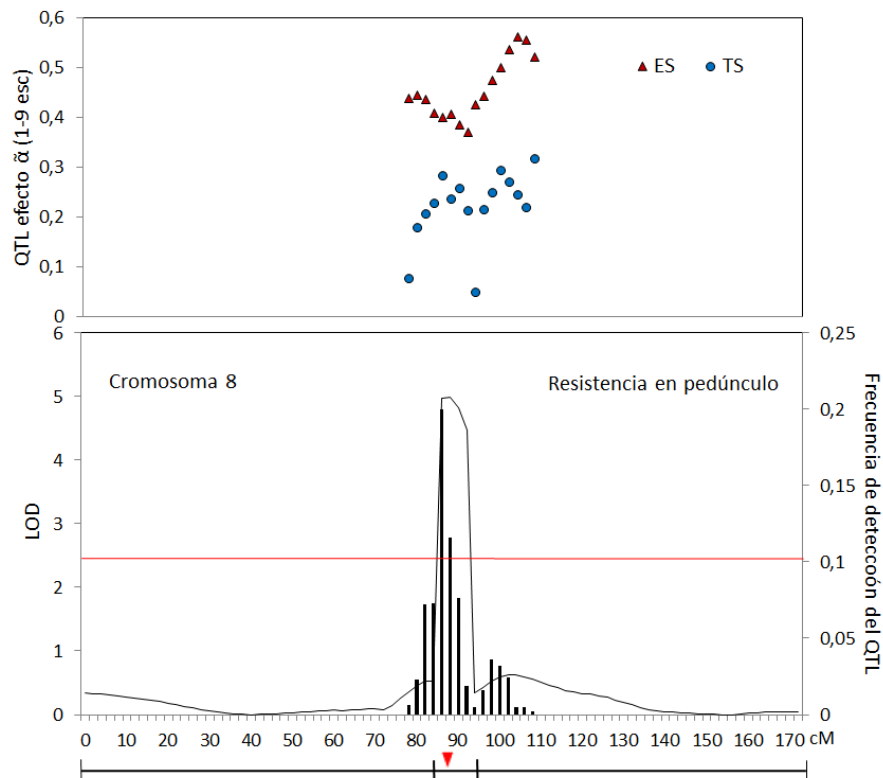


Figura 4.6 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para RP durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 8 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

Para el carácter encamado de tallo se detectó un QTL en el cromosoma 3 (bin 3.07), el pico del LOD (2,5) para este QTL se registró en la posición 162 cM (Figura 4.7). Los marcadores flanqueantes fueron *bnlg1449* y *umc1148* (Tabla 4.4). La proporción de la varianza genética y fenotípica explicadas por este QTL fue del 11,50% y 5,50%, respectivamente. El alelo favorable fue aportado por la línea A637 y su efecto aditivo fue de 2,67% (Tabla 4.5).

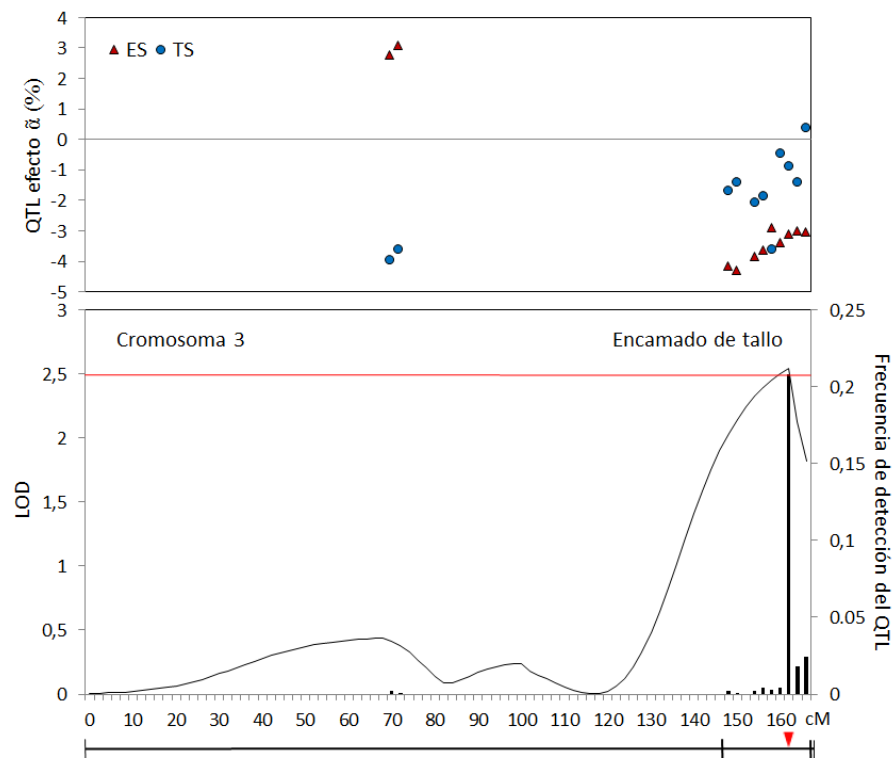


Figura 4.7 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para ET durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 3 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

4.1.3.2 QTL detectados para caracteres agronómicos

Para el rendimiento se detectó un QTL en el bin 5.03 del cromosoma 5, el pico del LOD fue de 3,95 y se registró en la posición 80 cM con un intervalo de confianza de 64 a 92 cM. La frecuencia con la que se detectó este QTL en las 1000 VC fue del 73%. (Tabla 4.4 y Figura 4.8). La proporción de la varianza genética y fenotípica explicada por este QTL fue de 15,24% y 9,30% respectivamente. El alelo favorable fue aportado por el parental tolerante A637 con un efecto aditivo de 0,24 Mg por hectárea (Tabla 4.6).

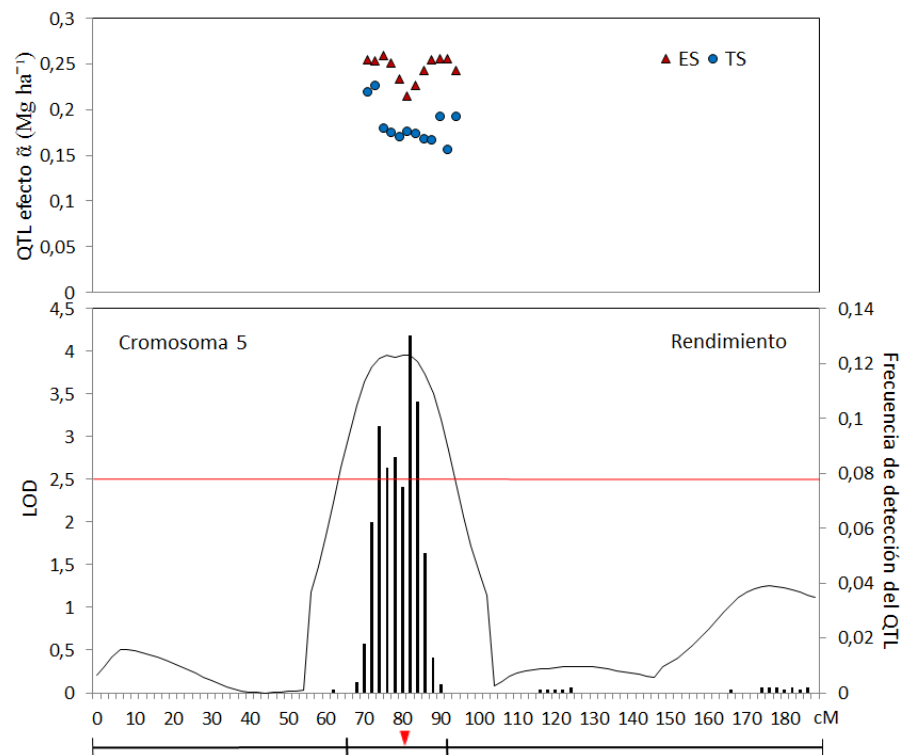


Figura 4.8 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para rendimiento durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 5 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

Para la humedad de grano se detectaron dos posibles QTL en los cromosomas 1 y 8 en los bins 1.07 y 8.05, respectivamente (a partir de aquí me referiré a estos QTL como HG1 y HG8, respectivamente). Los picos LOD alcanzados fueron de 2,80 para HG1 y 4,83 para HG8, registrados en las posiciones 138 y 90 cM de los respectivos cromosomas (Tabla 4.4 y Figuras 4.9 y 4.10). La frecuencia con la que se detectaron estos QTL en las 1000 VC fue de 74,2% para HG1 y 89,1% para HG8. La proporción de la varianza genética y fenotípica explicada por el QTL HG1 fue de 14,48% y 8,41%, respectivamente, mientras que para el QTL HG8 fue de 16,35% y 9,48%, respectivamente. Los efectos aditivos estimados fueron de 0,61% para el QTL HG1 y 0,65% para el HG8 (Tabla 4.6).

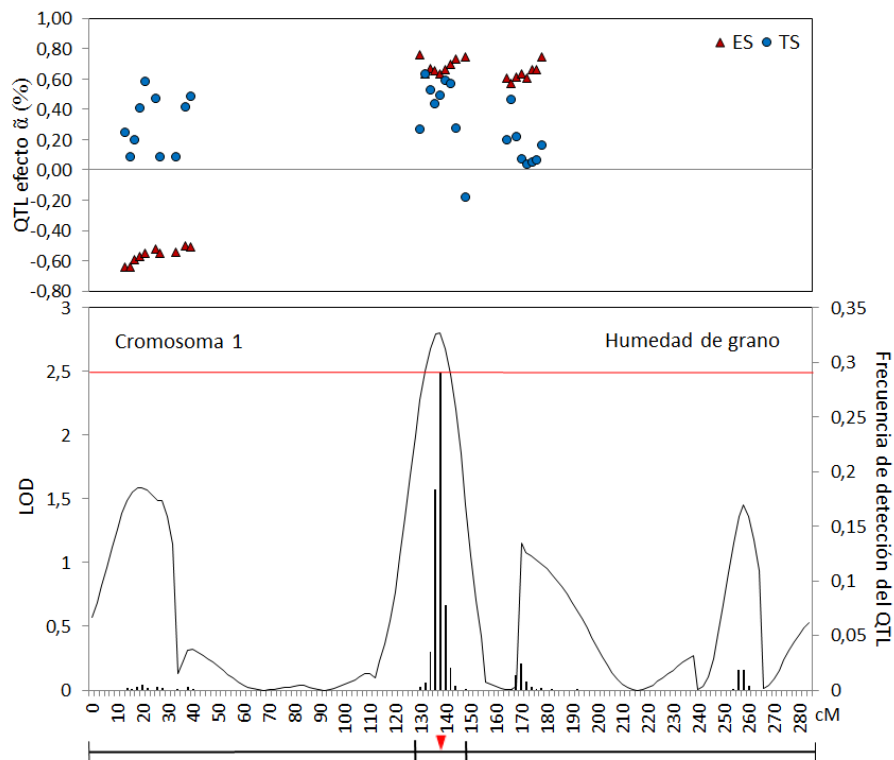


Figura 4.9 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para HG durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 1 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

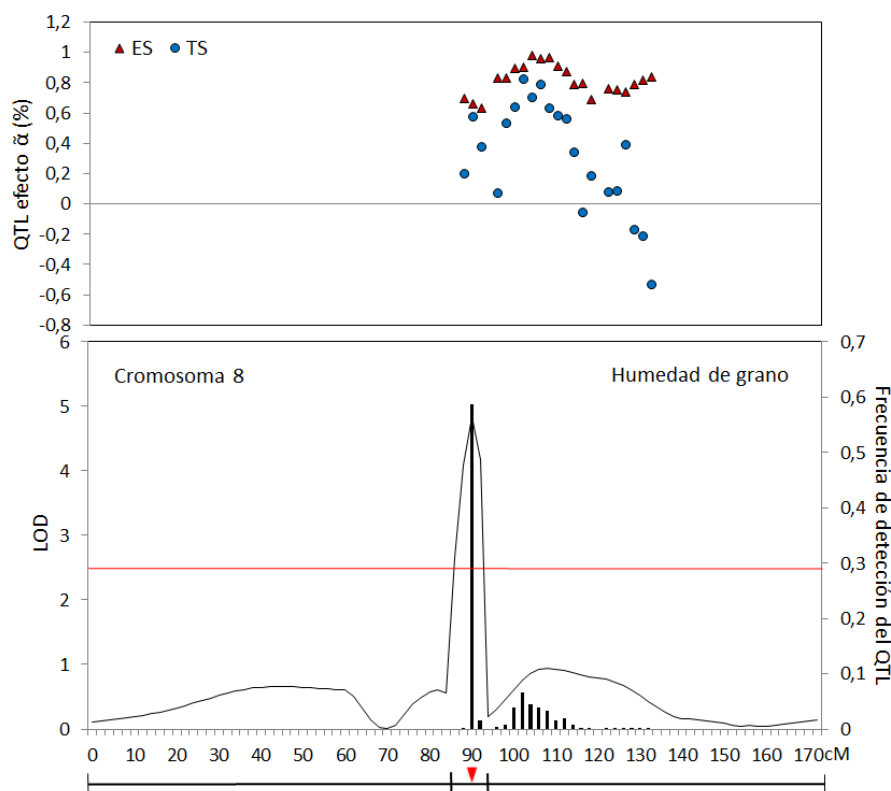


Figura 4.10 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para HG durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 8 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

Se detectaron 4 QTL para caracteres de floración, de los cuales 2 de ellos fueron para días a floración masculina, uno localizado en la posición 168 cM en el bin 1.07 del cromosoma 1 y otro localizado en la posición 90 cM en el bin 8.05 del cromosoma 8 (a menudo me referiré a estos QTL como DFM1 y DFM8, respectivamente). El pico del LOD registrado para estos QTL fue de 3,67 y 10,81, respectivamente (Tabla 4.4 y Figuras 4.11 y 4.12). La frecuencia con la que se detectaron en las 1000 VC fue de 45,4% para el QTL DFM1 y 96% para el QTL DFM8. Otros 2 QTL fueron detectados para días a floración femenina, uno de ellos fue co-localizado en la misma posición que el QTL DFM8 en el cromosoma 8 y el otro fue localizado en la posición 36 cM en el bin 10.2 (a menudo me referiré a estos QTL como DFF8 y DFF10, respectivamente).

El pico del LOD registrado para estos QTL fue de 10,51 y 4,26, respectivamente (Tabla 4.4 y Figuras 4.13 y 4.14). La frecuencia con la que se detectaron en la 1000 VC fue de 92,9% para el QTL DFF8 y 55,3% para el QTL DFF10. La proporción de la varianza genética explicada por los 4 QTL localizados para ambos caracteres de floración oscilo entre 7,65 y 31,55% mientras que la proporción de la varianza fenotípica explicada por estos mismos QTL oscilo entre 6,97 y 26,51%. El alelo de floración más tardía provino de la línea A637 y las estimas de los efectos aditivos para los 4 QTL de floración oscilaron entre 0,9 y 1,9 días (Tabla 4.6).

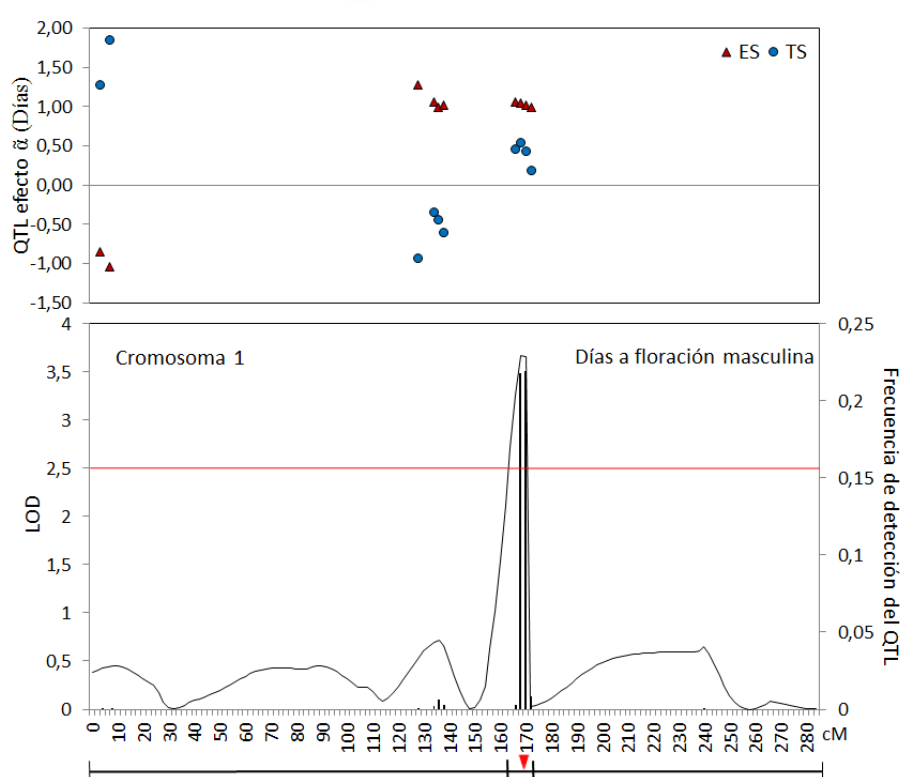


Figura 4.11 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para DFM durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 1 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

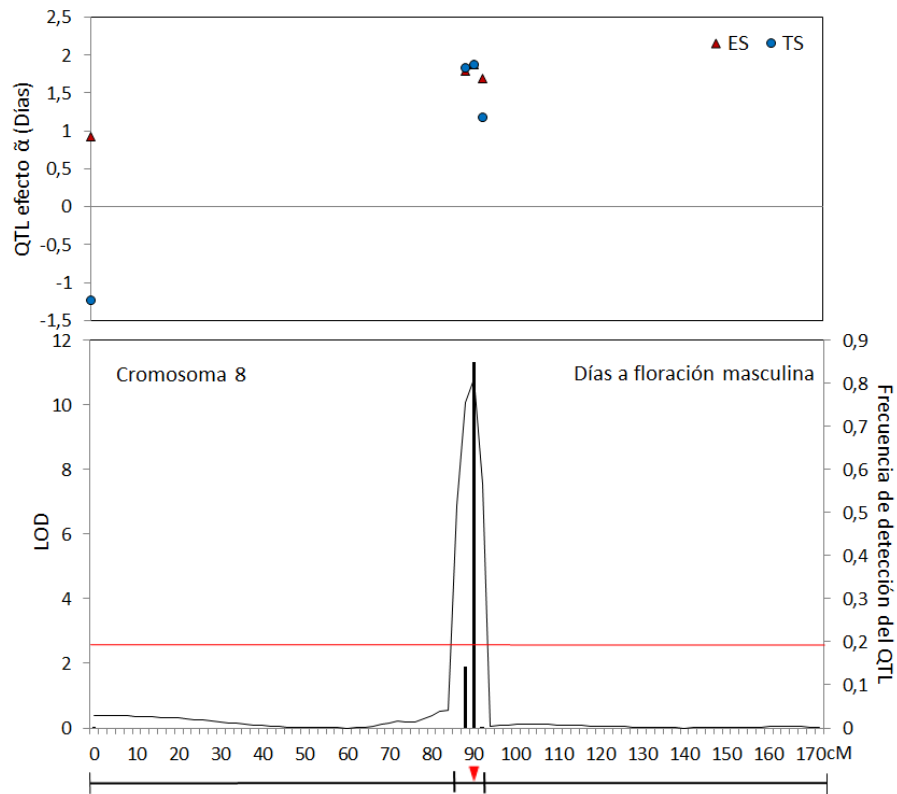


Figura 4.12 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para DFM durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 8 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

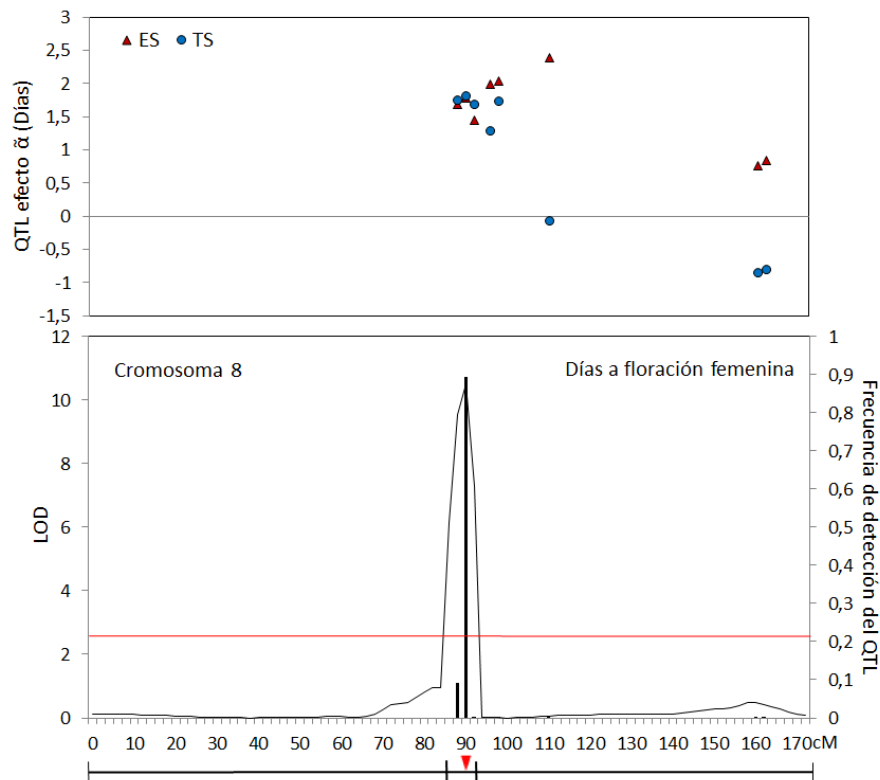


Figura 4.13 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para DFF durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 8 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

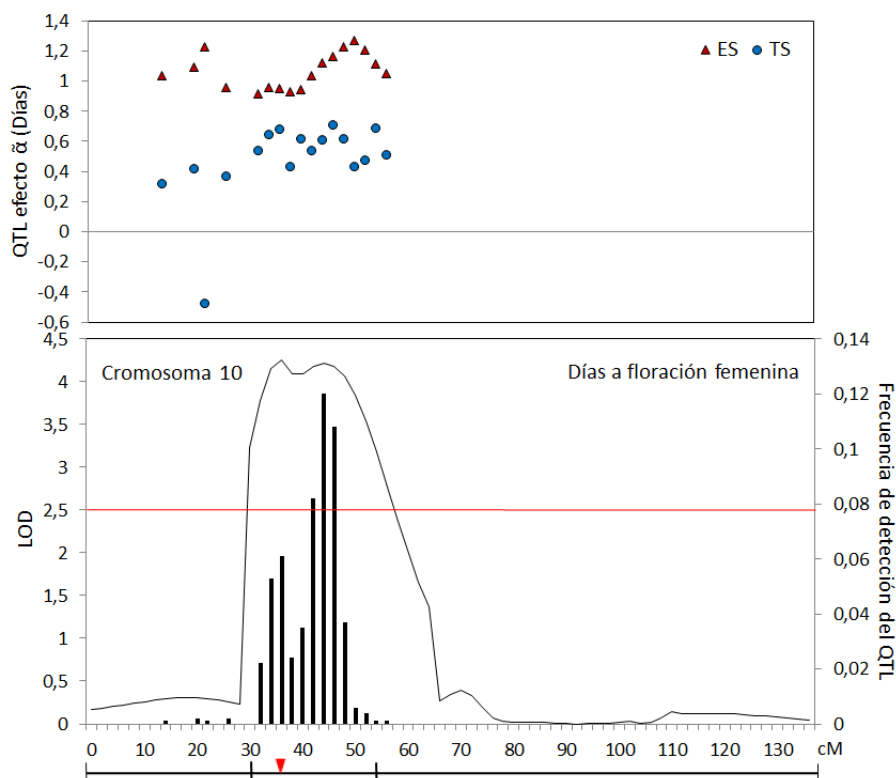


Figura 4.14 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para DFF durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 10 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

Se detectaron 3 QTL que afectan a la altura de planta en esta población, lo cuales fueron localizados en los bins 5.04, 8.05 y 9.03 (a partir de aquí me referiré a estos QTL como AP5, AP8 y AP9, respectivamente). El pico del LOD alcanzado fue de 3,02 para el QTL AP5, 3,29 para el QTL AP8 y 7,6 para el QTL AP9, registrados en las posiciones 102, 96 y 54 cM, respectivamente. La frecuencia con la que se detectaron estos QTL en las 1000 VC fue de aproximadamente el 23% para los QTL AP5 y AP8 y de 89% para el QTL AP9 (Tabla 4.4 y Figuras 4.15 – 4.17). La proporción de la varianza genética explicada por cada uno de estos 3 QTL osciló entre 6,83 y 18,88% mientras que la proporción de la varianza fenotípica explicada osciló entre 5,75 y 15,65%. Los efectos aditivos fueron de 4,01, 5,47 y 7,27 cm para los QTL AP5, AP8 y AP9, respectivamente.

Dos de los alelos que incrementan la altura de las plantas provinieron de la línea EP42 (QTL PH5 y PH9) y el del QTL PH8 provino de la línea A637 (Tabla 4.6).

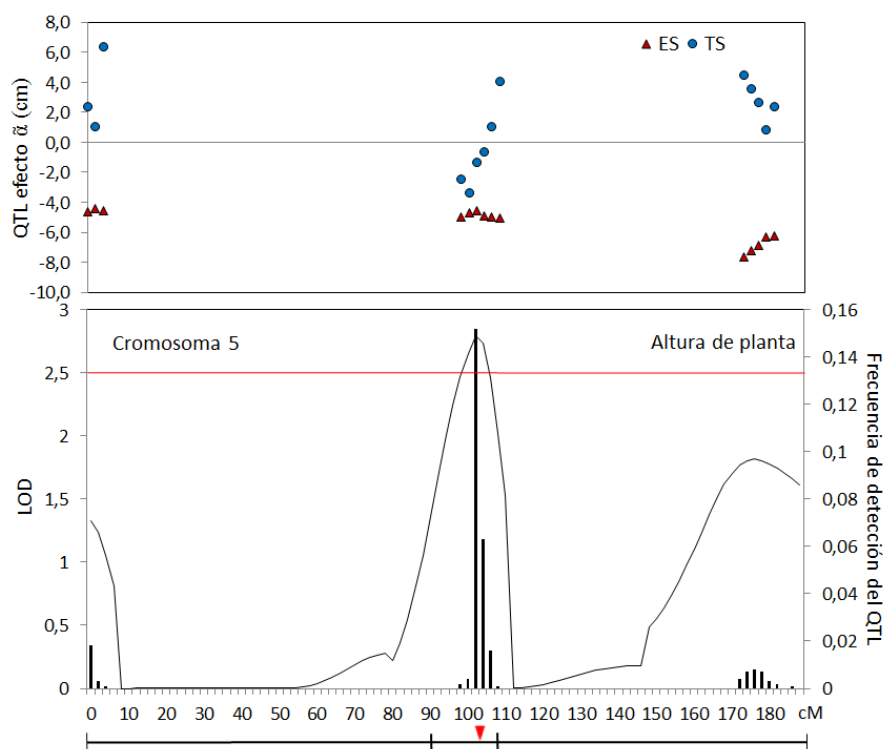


Figura 4.15 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para AP5 durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 5 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

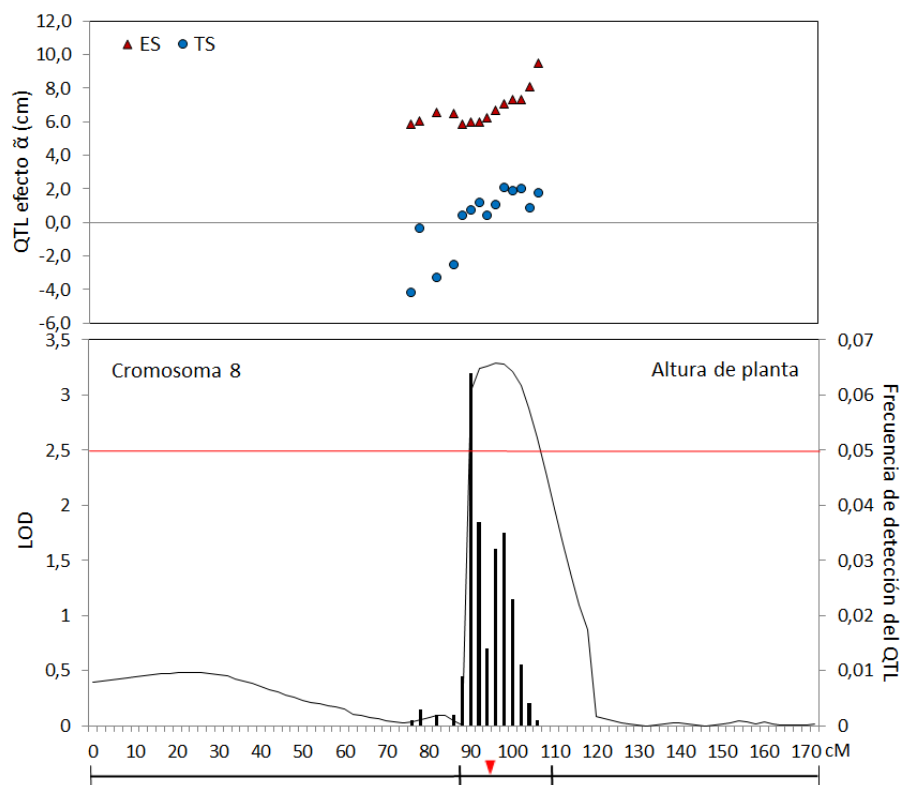


Figura 4.16 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para AP8 durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 8 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

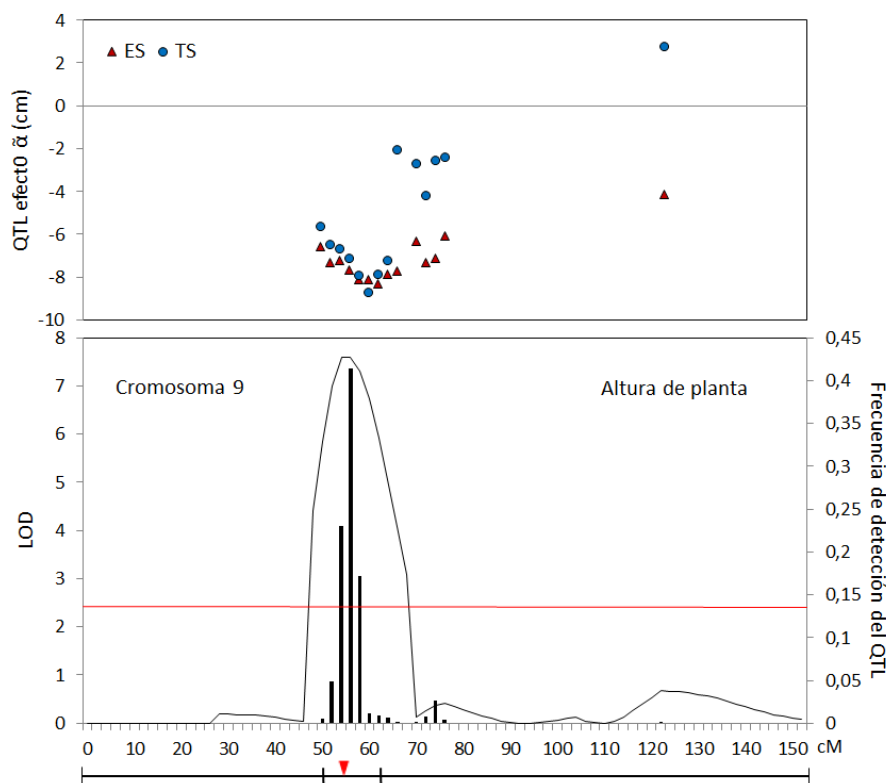


Figura 4.17 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para AP9 durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 9 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

Para el carácter de altura de mazorca se detectaron 2 QTL, uno localizado en la posición 98 cM del cromosoma 8 en el bin 8.05 y otro en la posición 9.03 del cromosoma 9 en el bin 9.03 (a partir de aquí los llamaré QTL AM8 y QTL AM9, respectivamente). El pico del LOD más alto registrado para cada uno fue de 9,02 para el QTL AM8 y 3,08 para el QTL AM9 y su frecuencia de detección en las 1000 VC fue de 54,1 y 62,1%, respectivamente (Tabla 4.4 y Figuras 4.18 y 4.19). La proporción de la varianza genética explicada fue de 25,27% para el QTL AM8 y 12,28% para el QTL AM9; mientras que la proporción de la varianza fenotípica explicada fue de 19,21 y

9,32, respectivamente. El alelo del QTL AM8 que incrementa la altura de la mazorca fue aportado por la línea A637 mientras que el otro provino de la línea EP42. Los efectos aditivos fueron 5,93 y 4,14 cm para el QTL AM8 y AM9, respectivamente (Tabla 4.6).

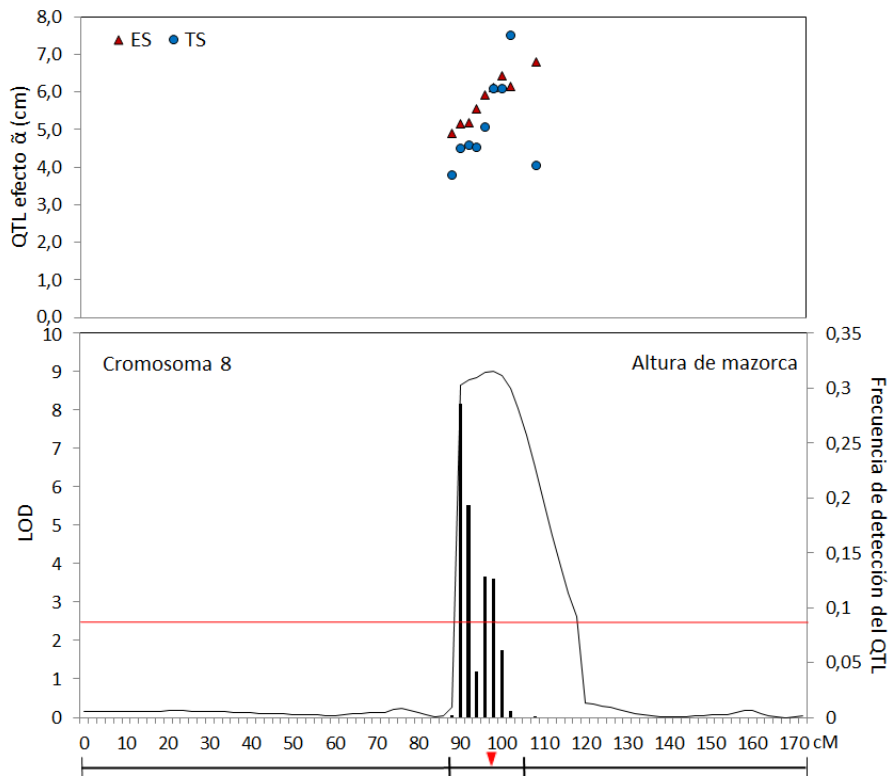


Figura 4.18 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para AM8 durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 8 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

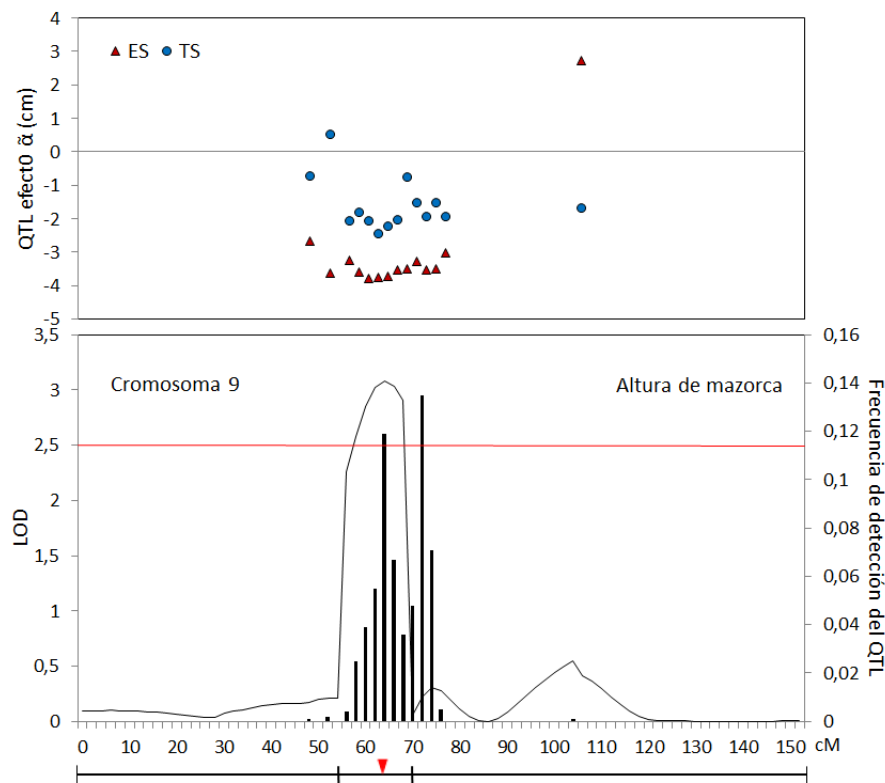


Figura 4.19 (Abajo) frecuencia de detección del QTL para AM9 durante el escaneo realizado cada 2 cM sobre el cromosoma 9 obtenido a partir de 1000 validaciones cruzadas, la línea continua en negro indica la curva del LOD estimada mediante CIM en todo el conjunto de datos, la línea roja indica el umbral LOD de 2,5 requerido para declarar al posible QTL como significativo, el triángulo indica la posición del QTL y las líneas verticales el intervalo de confianza. (Arriba) La media de los efectos aditivos de los posibles QTL detectados durante el escaneo en las calibraciones (ES) y las validaciones (TS).

Existen regiones en los cromosomas 1, 5, 8 y 9 que albergan QTL para múltiples caracteres en esta población biparental. Los alelos provenientes de la línea tolerante A637 tuvieron efectos favorables para los caracteres longitud de galerías, resistencia de la mazorca y rendimiento. Por ejemplo en el cromosoma 8 se detectó una región que abarca desde 84 a 106 cM en la cual se detectaron los QTL RP8, HG8, DFM8, DFF8, AP8 y AM8. En dicha región el alelo de A637 incrementó la humedad del grano, los días a floración y la altura de planta y mazorca; y mejoró la resistencia de pedúnculo al ataque de *S. nonagrioides* comparado con el alelo proveniente de la línea EP42.

4.1.4 Interacción QTL × ambiente

Se obtuvo una estima de la varianza de la interacción QTL × ambiente (QTL × E) significativa ($P < 0,05$) para el carácter de daño de tallo relativo y una estima altamente significativa ($P < 0,01$) para los caracteres RG, R, HG, DFF y AM. Se observó en los QTL con interacción QTL × E significativa que los efectos aditivos y la proporción de la varianza genética explicada por cada QTL fue mayor en el año 2011 en comparación con el año 2010, excepto para los dos QTL de humedad de grano y el QTL DFF10 para los cuales los mayores valores de $\hat{a}$ y $\hat{p}$ se obtuvieron en el año 2010 (Figura 4.20). Para el QTL de encamado de tallo y el QTL de rendimiento los efectos aditivos estimados en el experimento del 2010 no fueron significativos mientras que en el experimento del 2011 sí lo fueron (Figura 4.20).

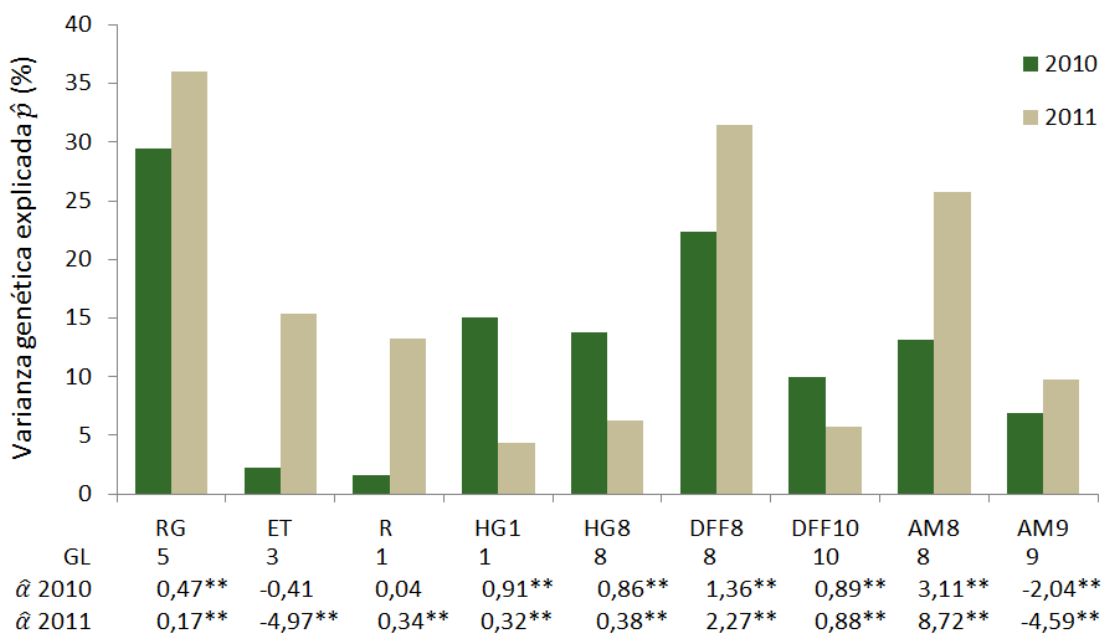


Figura 4.20 QTL con interacción QTL × E significativa en un conjunto de 140 RIL derivadas del cruce A637 × EP42. Se muestran los efectos aditivos ($\hat{a}$) y la proporción de la varianza genética explicada ($\hat{p}$) por cada QTL en cada año de experimentación (2010 y 2011). GL, grupo de ligamiento; RG, resistencia de grano; ET, encamado de tallo; R, rendimiento; HG, humedad de grano; DFM, días a floración masculina; DFF, días a floración femenina; AP, altura de planta; AM, altura de mazorca y **, significativamente diferente de cero a un nivel de probabilidad del 0,01.

4.1.5 Validación

Mediante la prueba de validación cruzada se obtuvo que la media ($\bar{R}_{iES}^2$) y la mediana ($\tilde{R}_{iES}^2$) de las estimas de la proporción de la varianza fenotípica explicada por cada QTL fue mayor en el grupo de calibración ES que las estimadas en el conjunto completo de datos ($\hat{R}_{iDS}^2$) excepto para los QTL para floración (masculina y femenina) y altura de mazorca localizados en el cromosoma 8 (ver resumen en las Tablas 4.5 y 4.6).

Se observó una considerable reducción en la media de la proporción de la varianza fenotípica explicada estimada en el grupo de validación $R_{TS,ES}^2$ comparado con el grupo de calibración ES para todos los caracteres. La media ($\bar{p}_{ES}$) y la mediana ($\tilde{p}_{ES}$) de la varianza genética explicada por cada QTL estuvieron muy cercanas para todos los caracteres (ver las Figuras 4.21 y 2.22). La media $\bar{p}_{ES}$ para todos los QTL osciló entre 8,8% para el QTL AP5 y 66,19% para el QTL RP5. En la mayoría de los casos los valores de la media $\bar{p}_{ES}$ fueron mayores que los valores de $\hat{p}_{DS}$ (estimados en el grupo completo de datos), excepto para los QTL DFM8 y DFF8 localizados en el cromosoma 8 (Tablas 4.5 y 4.6).

En muchos casos se obtuvieron algunas estimas de p_{iTS} fuera de los límites teóricos (0, 100) y además se observó una reducción considerable en los valores de la media $\bar{p}_{TS,ES}$ estimados en el grupo de validación comparados con los valores de la media $\bar{p}_{ES}$ estimados en el grupo de calibración, especialmente para el QTL de encamado de tallo. Estos valores ($\bar{p}_{TS,ES}$) oscilaron desde -1,87% para el QTL de ET y 37,34% para el QTL RP5. Tales reducciones son equivalentes al sesgo en las estimas de $\hat{p}$ y oscilaron entre el 11% para el QTL DFM8 y el 100% para el QTL de ET (Tablas 4.5 y 4.6). Por otra parte, se observó una mayor amplitud entre los cuantiles 0,1 y 0,9 de los valores de las estimas de $\hat{p}$ en el grupo de validación TS que la que se observó en el grupo de estimación ES, excepto para el QTL DFM1 y el QTL AP5 (Figuras 4.21 y 4.22).

En cuanto a los efectos aditivos estimados en los subconjuntos de datos de la VC se observó que los valores de la media $\bar{\alpha}_{iES}$ y los valores de la mediana $\tilde{\alpha}_{iES}$ fueron ligeramente diferentes de los valores estimados en el grupo de datos completo $\hat{\alpha}_{DS}$ para todos los QTL detectados, excepto para el QTL de rendimiento y los QTL DFM8 y DFF8, para los cuales las estimas de ese parámetro fueron las mismas (Tablas 4.5 y 4.6).

Los valores absolutos de las medias $\bar{\alpha}_{iTS,ES}$ y las medianas $\tilde{\alpha}_{iTS,ES}$ obtenidos en el grupo de validación TS fueron substancialmente más pequeños que los que se obtuvieron en el grupo de estimación ES, excepto para el QTL DFM8 y el QTL DFS8, ambos localizados en el cromosoma 8. El sesgo en la estimación de los efectos aditivos de los QTL detectados para los caracteres de resistencia osciló entre el 14% para el QTL RP5 y el 81% para el QTL RP1 (Tabla 4.5), mientras que para los caracteres agronómicos el sesgo osciló entre el 0% para los QTL DFM8 y DFF8 y el 81% para el QTL AP8 (Tabla 4.6). Los valores medios de los efectos aditivos estuvieron muy cercanos a los valores de las medianas para ese mismo parámetro en ambos subgrupos de la validación cruzada, ES y TS (Tablas 4.5 y 4.6). En la parte superior de las Figuras 4.2 – 4.19 se aprecia gráficamente la separación que existe entre los valores de los efectos aditivos de cada QTL detectado en los grupos de calibración y estimación en cada posición donde se detectó un QTL a lo largo del escaneo del cromosoma.

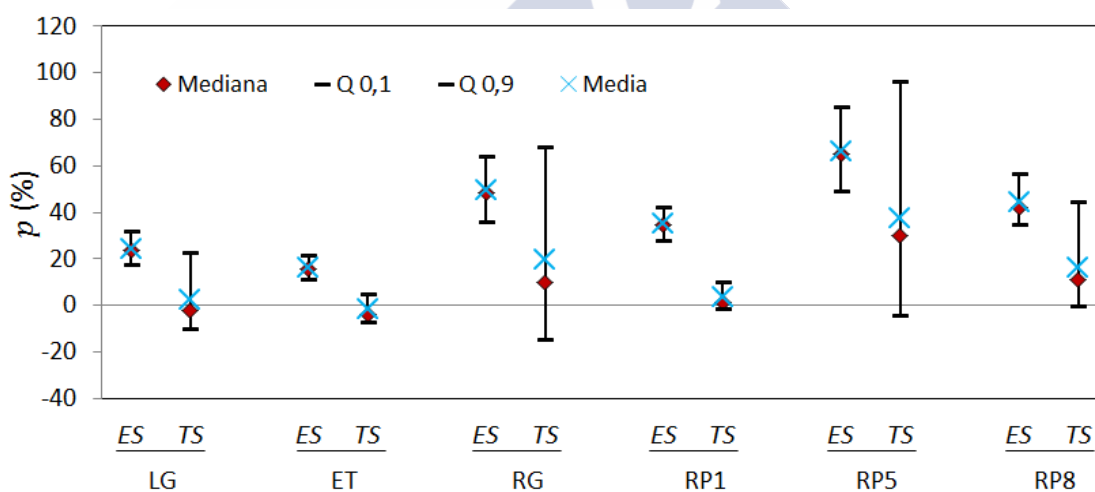


Figura 4.21 La media y la mediana de la proporción de la varianza genética explicada por cada QTL de resistencia a *S. nonagrioides*, y los cuantiles 0,1 y 0,9 de las estimaciones de p a través del grupo de calibración (ES) y de validación (TS) de las VC. LG = QTL para longitud de galerías, ET = QTL para encamado de tallo, RG = QTL para resistencia de grano, RP1, RP5 y RP8 = QTL para resistencia del pedúnculo en los cromosomas 1, 5 y 8, respectivamente.

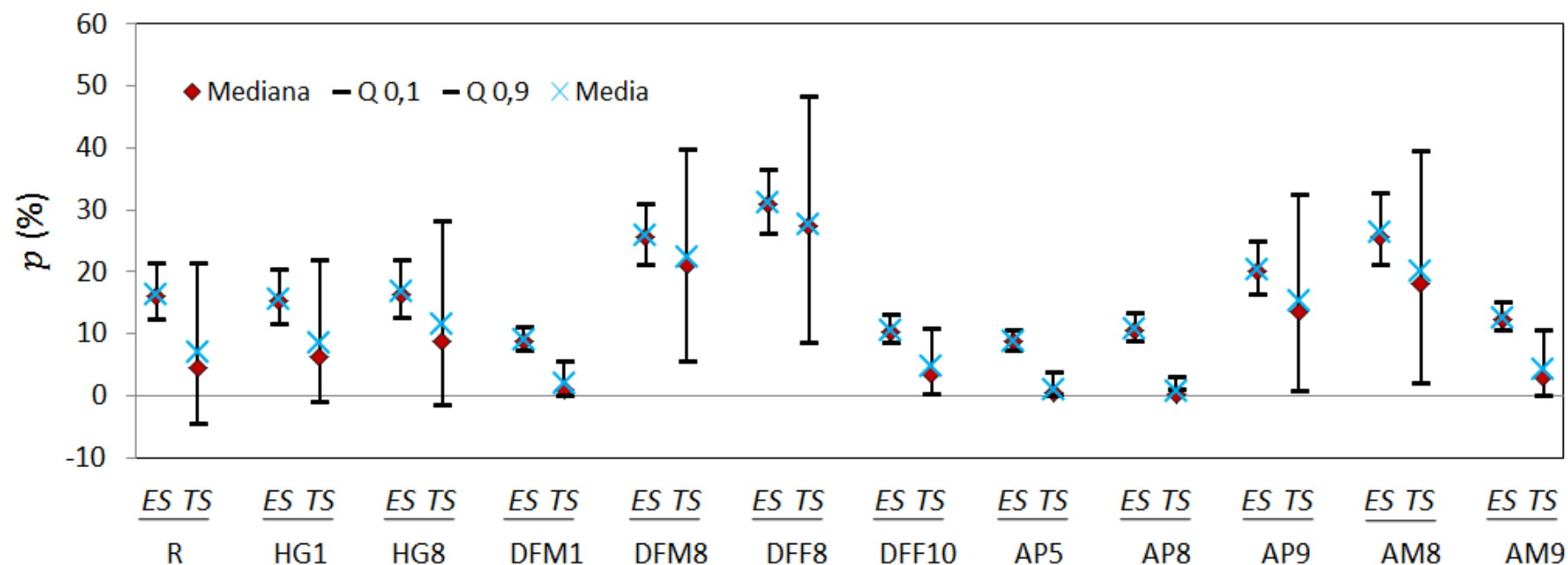


Figura 4.22 La media y la mediana de la proporción de la varianza genética explicada por cada QTL para los caracteres agronómicos, y los cuantiles 0,1 y 0,9 de las estimaciones de p a través del grupo de calibración (ES) y de validación (TS) de las VC. R = QTL para rendimiento; HG5 y HG8 = QTL para humedad de grano en los cromosomas 1 y 8, respectivamente; DFM1 y DFM8 = QTL para días a floración masculina en los cromosomas 1 y 8, respectivamente; DFF8 y DFF10 = QTL para días a floración femenina en los cromosomas 8 y 10, respectivamente; AP5, AP8 y AP9 = QTL para altura de planta en los cromosomas 5, 8 y 9, respectivamente; AM8 y AM9 = QTL para altura de mazorca en los cromosomas 8 y 9, respectivamente.

4.2 Mapeo de asociación

4.2.1 Medias, Análisis de varianzas y heredabilidades

El rango de las medias de cada línea para longitud de galerías fue 5,2-49,2 cm con un promedio general de 20,9 cm. La media general por año para la longitud de galerías fue mucho mayor en el 2012 (43,3 cm) comparada con las medias obtenidas en los años 2010 y 2011 (17,5 y 14,7 cm, respectivamente) (Tabla 4.7). Para el carácter daño relativo de tallo se observó que las medias de cada línea oscilaron entre 4,1 y 22,6% con una media general de 11,9%. Dado que este carácter depende de la longitud de galerías también se observó que la media general por año fue mayor en el 2012 (22,7%) comparado con los dos años restantes (10 y 8,7% en el 2010 y 2011, respectivamente). Las medias de cada línea para resistencia de grano oscilaron entre 5,4 y 9 puntos con un promedio general de 7,8 puntos en la escala de 1-9. La media general por año para resistencia de grano no osciló drásticamente como con los caracteres anteriores (7,6, 8,1 y 7,7 puntos en el 2010, 2011 y 2012, respectivamente).

Tabla 4.7 Medias anuales, promedio general y rango de variación de las medias de las líneas puras de maíz del panel de asociación para los caracteres de resistencia y agronómicos evaluados durante tres años consecutivos.

Ambiente	Caracteres de resistencia			Caracteres agronómicos		
	LG (cm)	DTR (%)	RG (1-9) [†]	AP (cm)	DFM (días)	DFF (días)
2010	17,5	9,9	7,6	180,6	79,6	81,5
2011	14,7	8,7	8,1	169,7	92,6	94,7
2012	43,3	22,7	7,7	182,1	92,1	93,9
Combinado	20,9	11,9	7,8	178,2	88,5	90,7
Rango	5,2-49,2	4,1-22,6	5,4-9	101-267,5	61,6-123,4	65,1-126,2

LG, longitud de galerías; DTR, daño de tallo relativo; RG, resistencia de grano, AP, altura de planta; DFM, días a floración masculina; DFF, días a floración femenina.

[†] La Resistencia del grano fue estimada sobre una escala visual subjetiva de 1 a 9 en la cual 1 indica completamente dañado y 9 indica no daño.

Se observó que las medias de las líneas para altura de planta variaron de 101 a 267,5 cm con un promedio general de 178,2 cm. El rango de variación de las medias de las líneas

puras para DFM fue 61,6-126,4 días con un promedio general de 88,5 días; mientras que para DFF las medias oscilaron entre 65,1 y 126,2 días con una promedio general de 90,7 días.

En el análisis de varianzas combinado a través de los años se obtuvo que la diferencia entre líneas o genotipos fue altamente significativa ($P < 0,01$) tanto para los caracteres de resistencia (LG, DRT y KR) como para los caracteres agronómicos (DFM, DFF y AP). Además también se observa en el mismo análisis que la interacción genotipo $\times$ ambiente ($G \times E$) fue significativa ($P < 0,05$) para altura de planta y altamente significativa ($P < 0,01$) para el resto de caracteres evaluados (Tabla 4.8).

4.2.2 Análisis de correlación

Los coeficientes de correlación genética y fenotípica entre longitud de galerías y daño relativo de tallo fueron altos ($r > 0,70$). Además el coeficiente de correlación genética entre longitud de galerías y altura de plantas fue superior a 0,5 y significativo (Tabla 4.9). El carácter de resistencia de grano mostró correlaciones fenotípicas significativas con los otros caracteres de resistencia pero los coeficientes fueron bajos. Por otro lado se observaron valores altos y significativos de los coeficientes de correlación genética entre resistencia de grano y los tres caracteres agronómicos (DFM, DFF y AP) (Tabla 4.9).

Tabla 4.8 Cuadrados medios del análisis de varianza y heredabilidades $\pm$ desviaciones estándar[†] de las líneas puras de maíz que constituyen el panel de asociación para los caracteres de resistencia a *S. nonagrioides* y caracteres agronómicos evaluados durante tres años.

Fuente	LG	DTR	RG	AP	DFM	DFF
Ambiente	110065,8**	29682,0**	31,0**	20012,2**	27888,1**	28088,7**
Repetición (E) [†]	3759,9**	1219,0**	17,0**	4664,0**	72,0**	76,5**
Genotipo,	380,1**	72,0**	2,1**	4329,9**	697,1**	677,1**
Genotipo $\times$ E	142,6**	50,1**	1,0**	254,1*	15,5**	12,0**
Error	95,3	36,5	0,8	217,9	9,6	6,3
Heredabilidades (%)	0.60 $\pm$ 0.04 [‡]	0.25 $\pm$ 0.08	0.52 $\pm$ 0.06	0.94 $\pm$ 0.01	0.98 $\pm$ 0	0.98 $\pm$ 0

LG, longitud de galerías; DTR, daño de tallo relativo; RG, resistencia de grano, AP, altura de planta; DFM, días a floración masculina; DFF, días a floración femenina.

* Significativo a un nivel de probabilidad de 0.05, ** Significativo a un nivel de probabilidad de 0.01

[†] La letra “E” significa ambiente, por lo tanto esta fuente de variación es repetición dentro de ambiente.

[‡] Heredabilidad $\pm$ error estándar estimadas sobre la base de la media familiar siguiendo a Holland *et al.* (2003).

Tabla 4.9 Coeficientes de correlación genética (encima de la diagonal) y fenotípica (debajo de la diagonal) estimados para cada par de caracteres.

	LG	DTR	RG	DFM	DFF	AP
LG		0,97*	NS	NS	NS	0,51*
DTR	0,74*		NS	NS	NS	NS
RG	-0,31*	-0,31*		0,75*	0,71*	0,51*
DFM	NS	NS	0,30*		0,99*	0,66*
DFF	NS	NS	0,28*	0,96*		0,65*
AP	0,24*	-0,06*	0,24*	0,51*	0,48*	

LG, longitud de galerías; DTR, daño de tallo relativo; RG, resistencia de grano, AP, altura de planta; DFM, días a floración masculina; DFF, días a floración femenina.

* Coeficientes de correlación genética y fenotípica que excedieron dos veces su error estándar; NS, no significativo.

4.2.3 Análisis de asociación

El modelo lineal mixto comprimido ejecutado para cada uno de los seis caracteres evaluados en el programa Tassel redujo los efectos genéticos dividiendo las 267 líneas en 32 grupos para longitud de galerías, 201 grupos para daño de tallo relativo, 166 grupos para resistencia de grano, 192 grupos para altura de planta y 240 para ambos caracteres de floración (DFM y DFF) (Tabla 4.10). La proporción de la varianza fenotípica explicada por los efectos del fondo genético (matriz K) fue de 39, 13 y 48% para los caracteres de longitud de galerías, daño de tallo relativo y resistencia de grano, respectivamente. Mientras que el 60, 94 y 90% de la variación fenotípica para los caracteres agronómicos altura de planta, días a floración masculina y femenina, respectivamente fueron explicados por la matriz de parentesco (Tabla 4.10).

Tabla 4.10 Resumen del análisis del modelo mixto comprimido para los tres caracteres de resistencia al ataque de *S. nonagrioides* y los tres caracteres agronómicos en un panel de asociación de líneas puras de maíz evaluado en Pontevedra durante tres años.

Carácter	$n^{\dagger}$	$s^{\ddagger}$	Nivel de compresión (c) [§]	$(\hat{\sigma}_g^2)^{\P}$	$(\hat{\sigma}^2)^{\dagger\dagger}$	$\left(\frac{\hat{\sigma}_g^2}{\hat{\sigma}_g^2 + \hat{\sigma}^2}\right)^{\ddagger\ddagger}$
LG	267	32	8,34	32,80	50,61	0,39
DTR	267	201	1,33	1,45	9,51	0,13
RG	265	166	1,60	0,15	0,16	0,48
AP	266	192	1,39	384,70	256,56	0,60
DFM	266	240	1,11	45,03	5,03	0,94
DFF	266	240	1,11	51,19	5,87	0,90

LG, longitud de galerías; DTR, daño de tallo relativo; RG, resistencia de grano, AP, altura de planta; DFM, días a floración masculina; DFF, días a floración femenina.

[†] Número total de líneas incluidas en el análisis

[‡] Número total de grupos obtenidos usando la matriz K con la opción “nivel de compresión óptimo P3D”

[§] El nivel de compresión es el número promedio de líneas por grupo estimado como n/s .

[¶] Componente de la varianza genética aditiva que es explicada por las relaciones de parentesco.

^{††} Componente de la varianza fenotípica que no es explicada por las relaciones de parentesco.

^{‡‡} Proporción de la varianza fenotípica explicada por la matriz K, estimada como la varianza aditiva del fondo genético dividida por la varianza fenotípica total.

Se identificaron 10 SNP significativamente asociados al carácter longitud de galerías bajo infestación con *S. nonagrioides* (Figura 4.23). Uno fue localizado en el cromosoma 2 ($P = 9,51 \times 10^{-6}$, RMIP = 0,51), uno en el cromosoma 3 ($P = 1,38 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,50), dos en el cromosoma 4 ($P = 3,26 \times 10^{-6}$, RMIP = 0,37 y $P = 3,37 \times 10^{-6}$, RMIP = 0,45, respectivamente), tres en el cromosoma 7 ($P = 5,28 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,37; $P = 9,84 \times 10^{-6}$, RMIP = 0,56; y $P = 1,55 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,38, respectivamente) y tres en el cromosoma 10 ($P = 7,40 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,30) (Tabla 4.11). Basado en los efectos aditivos, el alelo de mayor frecuencia redujo la longitud de galerías para todos los SNP significativamente asociados con el carácter, excepto para el SNP localizado en el cromosoma 10 (Tabla 4.11).

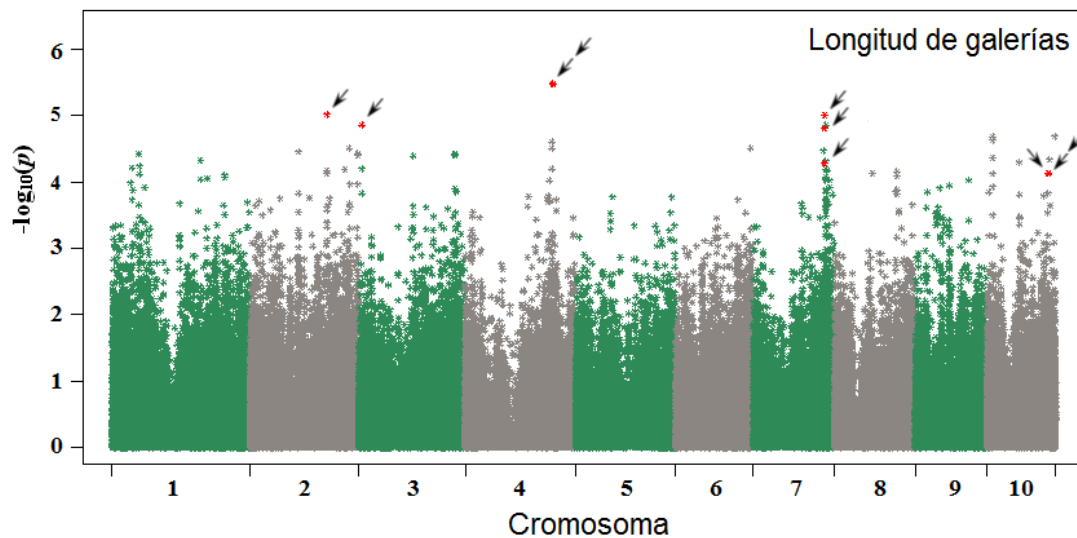


Figura 4.23 Resultados del GWAS para el carácter longitud de galerías hechas por *S. nonagrioides* en un panel de asociación de maíz. Cada punto representa los valores- P de los 246.477 SNP probados en el análisis. Los puntos rojos señalados por flechas señalan los SNP significativamente asociados con el carácter longitud de galerías. Dos o tres flechas señalando el mismo punto significan que hay dos o tres puntos, respectivamente con el mismo valor- P o similar.

Se identificaron cuatro SNP significativamente asociados al carácter daño de tallo relativo (Figura 4.24). De los cuales dos fueron localizados en el cromosoma 1 ($P = 7,86 \times 10^{-6}$, RMIP = 0,63 y $P = 2,39 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,38, respectivamente), uno en el cromosoma 2 ($P = 2,93 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,32), y uno en el cromosoma 5 ($P = 1,12 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,41) (Tabla 4.11). Los alelos de menor frecuencia para estos SNP incremento el daño de tallo relativo causado por *S. nongagrioides* en un 1,1 a 2%. La proporción de la varianza fenotípica (R^2) explicada por cada SNP significativamente asociado a este carácter varió de 7 a 9%.

Tabla 4.11 Nombre, efecto aditivo, variantes alélicas, valores para las pruebas de significación (valor-*P* y RMIP) y proporción de la varianza total explicada por cada SNP significativamente asociado a los caracteres de resistencia a *S. nonagrioides* (LG, DTR y RG).

Carác- ter ^a	ID SNP ^b	Alelos ^c	(Nº) ^d	Efecto aditivo ^e	Valor- <i>P</i>	(<i>R</i> ²) ^f	RMIP ^g
LG	S2_168004182	G/T	225/36	3,09	$9,51 \times 10^{-6}$	0,08	0,51
LG	S3_7081859	T/A	207/55	2,52	$1,38 \times 10^{-5}$	0,07	0,50
LG	S4_190444179	G/A	218/38	3,18	$3,26 \times 10^{-6}$	0,09	0,37
LG	ss4_190679094 ^h	G/A	226/41	3,09	$3,37 \times 10^{-6}$	0,08	0,45
LG	S7_154739818	G/C	248/14	4,25	$5,28 \times 10^{-5}$	0,07	0,37
LG	S7_154741622	C/T	217/47	2,84	$9,84 \times 10^{-6}$	0,08	0,56
LG	S7_155702328	T/A	171/67	2,43	$1,55 \times 10^{-5}$	0,08	0,38
LG	S10_133337924	G/T	133/99	-1,30	$7,40 \times 10^{-5}$	0,07	0,30
LG	S10_133337925	G/C	133/99	-1,30	$7,40 \times 10^{-5}$	0,07	0,30
LG	S10_133337950	T/C	133/99	-1,30	$7,40 \times 10^{-5}$	0,07	0,30
DTR	S1_208315891	C/A	126/106	1,09	$7,86 \times 10^{-6}$	0,09	0,63
DTR	S1_293163491	T/A	207/37	1,37	$2,39 \times 10^{-5}$	0,08	0,38
DTR	S2_59729532	A/T	235/17	1,90	$2,93 \times 10^{-5}$	0,07	0,32
DTR	ss5_176870721 ^h	G/A	228/38	1,37	$1,12 \times 10^{-5}$	0,08	0,41
RG	S3_187742562	C/A	244/12	-0,38	$1,30 \times 10^{-5}$	0,08	0,48
RG	S3_204458505	T/A	186/65	-0,19	$4,14 \times 10^{-5}$	0,07	0,40
RG	S3_204586960	C/G	251/13	-0,37	$1,25 \times 10^{-5}$	0,08	0,44
RG	S3_222733400	C/T	142/110	-0,15	$4,90 \times 10^{-5}$	0,07	0,34
RG	S4_227101950	C/T	242/17	-0,30	$1,26 \times 10^{-5}$	0,08	0,43
RG	S4_227101985	A/T	242/17	-0,30	$1,26 \times 10^{-5}$	0,08	0,43
RG	S5_93580059	C/T	230/28	-0,24	$2,27 \times 10^{-5}$	0,07	0,31
RG	S6_88149024	A/G	187/55	-0,17	$6,83 \times 10^{-5}$	0,07	0,48
RG	S6_88149036	G/C	187/55	-0,17	$6,83 \times 10^{-5}$	0,07	0,48
RG	S7_15072370	G/A	230/24	-0,26	$3,65 \times 10^{-5}$	0,07	0,46
RG	S7_19347596	A/G	250/11	-0,40	$7,47 \times 10^{-5}$	0,06	0,36

^a LG, longitud de galerías en cm; DTR, daño de tallo relativo en porcentaje y RG, resistencia de grano valorado mediante una escala visual subjetiva de 1 a 9 en la cual 1 indica completamente dañado y 9 indica no dañado.

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

^c La letra antes de la diagonal (/) es el nucleótido más frecuente; y la letra después de la diagonal (/) es el nucleótido menos frecuente.

^d N° = número de líneas homocigotas para una variante determinada. El número antes de la diagonal (/) representa el número de individuos con el alelo de mayor frecuencia; y el número después de la diagonal (/) representa el número de individuos con el alelo de menor frecuencia.

^e El efecto aditivo fue calculado como la mitad de la diferencia entre la media de los homocigotos para el alelo menor y la media del homocigoto para el alelo mayor.

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

^g RMIP, “resample model inclusion probability”.

^h SNP proveniente del chip de Illumina, los restantes SNP sin el superíndice fueron obtenidos mediante GBS.

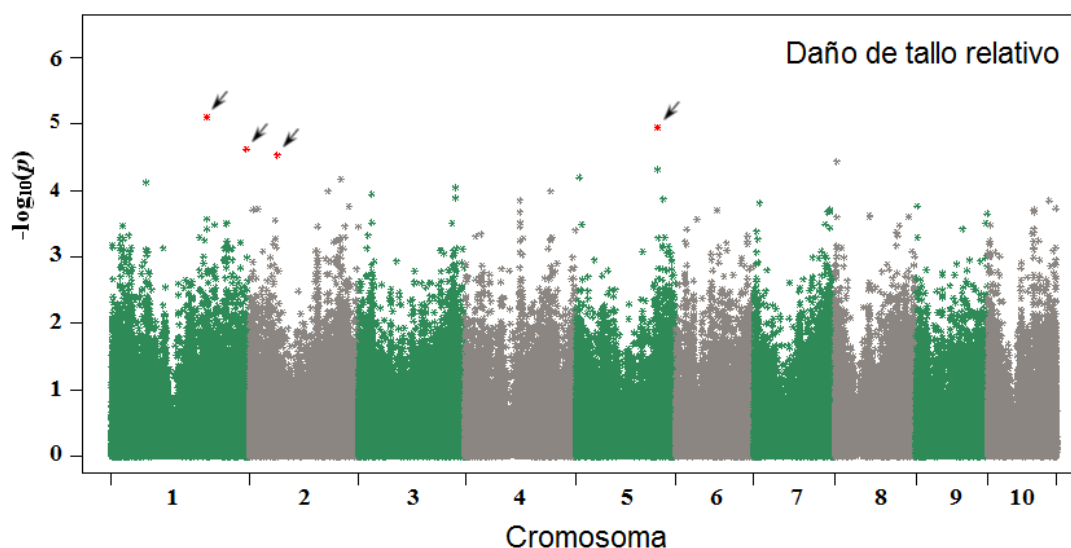


Figura 4.24 Resultados del GWAS para el carácter daño de tallo relativo hechas por *S. nonagrioides* en un panel de asociación de maíz. Cada punto representa los valor- P de los 246.477 SNP probados en el análisis. Los puntos rojos señalados por flechas indican a los SNP significativamente asociados al carácter daño de tallo relativo.

Once SNP se identificaron como significativamente asociados al carácter de resistencia de grano (Figura 4.25): cuatro de ellos fueron localizados en el cromosoma 3 ($P = 1,30 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,48; $P = 4,14 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,40; $P = 1,25 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,44; y $P = 4,90 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,34, respectivamente), dos se localizaron en el cromosoma 4 ($P = 1,26 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,43), uno en el cromosoma 5 ($P = 2,27 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,31), dos en el cromosoma 6 ($P = 6,83 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,48) y dos en el cromosoma 7 ($P = 3,65 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,46; y $P = 7,47 \times 10^{-5}$, RMIP = 0,36, respectivamente). La proporción de la varianza fenotípica (R^2) explicada por cada SNP significativamente asociado a resistencia de grano osciló entre el 6 y el 8%. Mientras que los efectos aditivos de los SNP variaron de 0,3 a 0,8 puntos en la escala visual 1-9 (Tabla 4.11).

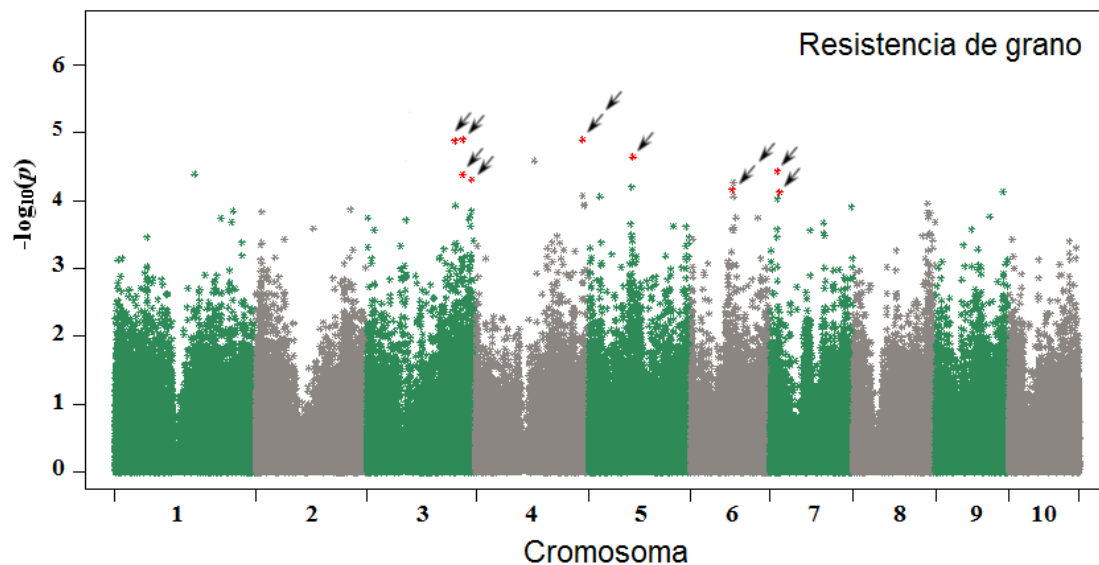


Figura 4.25 Resultados del GWAS para el carácter resistencia de grano al ataque de *S. nonagrioides* en un panel de asociación de maíz. Cada punto representa los valores- P de los 246.477 SNP probados en el análisis. Los puntos rojos señalados por flechas señalan los SNP significativamente asociados con el carácter resistencia de grano. Dos flechas señalando el mismo punto significan que hay dos puntos con el mismo valor- P .

En esta tesis solo se hace mención de los SNP significativamente asociados con los caracteres agronómicos (altura de planta y caracteres de floración) debido a que estos tres caracteres ya han sido previamente estudiados en esta panel de maíz por otros investigadores (Buckler *et al.*, 2009; Peiffer *et al.*, 2014). En esta investigación se evaluaron para buscar posibles correlaciones entre caracteres agronómicos y los caracteres de resistencia pero no se encontró ningún SNP co-localizado para ambos caracteres. Por lo tanto los SNP identificados para estos caracteres se presentan únicamente como anexos de esta tesis. Para altura de planta se identificaron 19 SNP significativamente asociados a este carácter localizados en todos los cromosomas del maíz, excepto en los cromosomas 7, 8 y 10. La proporción de la varianza fenotípica explicada por estos SNP varió entre el 6 y el 9% (Anexo VII). Para el carácter días a floración masculina se identificaron 48 SNP significativos (rango de $R^2 = 6 - 9\%$) localizados en todos los cromosomas excepto en el cromosoma 7 (Anexo VIII), mientras que para días a floración femenina se identificaron 43 SNP significativos (rango de $R^2 = 6 - 12\%$) localizados en los 10 cromosomas del maíz (Anexo IX).

4.2.4 Selección de genes candidatos

La selección y caracterización de los genes que contienen o están cerca de los SNP significativamente asociados a los caracteres de resistencia se realizó en base a la información descrita en la secuencia anotada del genoma de referencia de la línea B73 de maíz (Schnable *et al.*, 2009).

4.2.4.1 Genes candidatos para longitud de galerías

Se identificaron 8 genes candidatos los cuales contienen o están adyacentes a los SNP asociados al carácter longitud de galerías. El gen candidato GRMZM2G504910 se encuentra localizado a 46 bp (corriente abajo) del SNP asociado significativamente a la longitud de galerías en el cromosoma 2. Este gen codifica una proteína con un dominio conocido como repetición de tetratricopeptidos (TPR, “*tetratricopeptide repeat*”). El SNP significativamente asociado a LG localizado en la posición física 7.081.859 bp sobre el cromosoma 3 fue encontrado dentro de un exón del gen *hex1* “*hexokinase1*” (GRMZM2M2G104081).

Un exón del gen GRMZM2G013128 que codifica una proteína de la superfamilia “*Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hidrolases*” contiene el SNP significativamente asociado a LG que fue localizado en la región física 190.444.179 bp sobre el cromosoma 4. Además, localizado a 67,7 bp corriente arriba se encuentra el gen *ofp22* “*OVATE-transcription factor 22*” (GRMZM2G013271). El SNP significativamente asociado a LG localizado en la posición física 190.679.094 bp sobre el cromosoma 4 se encontró dentro de un gen que codifica una proteína centromérica “*Centromeric protein E*”. Sin embargo a 3,1 kbp (corriente abajo) de este SNP se encontró el gen GRMZM2G033820 que codifica una proteína PA2, “*Phospholipase A2*”.

Los dos SNP significativamente asociados a LG localizados en la posición física 154.739.818 y 154.741.622 bp del cromosoma 7 se encontraron dentro del gen GRMZM2G077008 que codifica una proteína “*Histidine kinase, hybrid-type, ethylene sensor*”. Además, estos dos SNP se encuentran rodeados por un conjunto de 5 genes adyacentes de la familia de genes receptores conocidos como “*Serine/Threonine Kinases*”. El gen GRMZM5G861541 que codifica una proteína de función desconocida fue

localizado a 2,7 kbp (corriente abajo) del tercer SNP significativamente asociado a LG localizado en la posición física 155.702.328 bp sobre el cromosoma 7.

El gen GRMZM2G057084, el cual codifica una proteína kinasa "*Calcium/calmodulin-dependent protein kinase*", se encontró a 10 kbp (corriente arriba) de los tres SNP significativamente asociados a longitud de galerías localizados en el cromosoma 10 (ver resumen en la Tabla 4.12).

4.2.4.2 Genes candidatos para daño de tallo relativo

Cinco genes que contienen o que están cerca de los SNP significativamente asociados al carácter daño de tallo relativo fueron propuestos como candidatos. Para el SNP significativamente asociado a daño de tallo relativo localizado en la posición física 208.315.891 bp sobre el cromosoma 1, se identificó como candidato al gen más cercano, GRMZM2G101422, el cual se encuentra localizado a 270 bp (corriente abajo) del SNP significativo. Este gen codifica para una proteína de función aún no descrita. El segundo SNP significativamente asociado a DTR y localizado en la posición física 293.163.491 bp del cromosoma 1 se encuentra dentro del exón del gen GRMZM2G060702 que codifica un Factor 4 de despolimerización de la actina APF4, "*actin depolymerizing factor 4*".

Próximo al SNP asociado significativamente a DTR localizado en la posición física 59.729.539 bp sobre el cromosoma 2 se encontró, a 11,4 kbp corriente abajo, el gen candidato GRMZM2G389097, que codifica una kinasa LRR-LKP, "*Leucine-Rich Receptor-Like Protein Kinase*". El gen GRMZM2G325683 que codifica una proteína expresada de función aún no descrita contiene el SNP significativamente asociado a DTR localizado en la posición física 176.870.721 pb sobre el cromosoma 5. Además, como dato interesante, se menciona que a 69 kbp corriente abajo de este SNP se encontró el gen *nactf30* que codifica una proteína de dominio NAC que actúa como factor de transcripción de otros genes (Tabla 4.12).

Tabla 4.12 Genes candidatos para cada SNP significativamente asociado con longitud de galerías (LG) y daño de tallo relativo (DTR) y las proteínas que codifican.

Cromosoma	Carácter	Posición física del SNP (bp)	Identificador del gen	Proteína codificada
2	TL	168.004.182	GRMZM2G504910	"Tetratricopeptide repeat (TPR)"
3	TL	7.081.859 [†]	GRMZM2G104081	" <i>hex1 (hexokinase1)</i> "
4	TL	190.444.179 [†]	GRMZM2G013128	"Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hydrolases superfamily protein"
4	TL	190.679.094	GRMZM2G033820	"Phospholipase A2"
7	TL	154.739.818 [‡]	GRMZM2G077008	"Histidine kinase, hybrid-type, ethylene sensor "
		154.741.622 [†]		
7	TL	155.702.328	GRMZM2G861541	"Expressed protein"
10	TL	133.337.924	GRMZM2G057084	"Calcium/calmodulin-dependent protein kinase"
		133.337.925		
		133.337.950		
1	DTR	208.315.891	GRMZM2G101422	"Expressed protein"
1	DTR	293.163.491 [†]	GRMZM2G060702	"Actin depolymerizing factor 4"
2	DTR	59.729.532	GRMZM2G389097	"Leucine-rich receptor-like protein kinase family"
5	DTR	176.870.721 [‡]	GRMZM2G325683	"Expressed protein"
3	RG	187.742.562	GRMZM2G438551	" <i>cystatin1</i> "
3	RG	204.458.505	GRMZM2G111666	"basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor"
3	RG	204.586.960 [‡]	GRMZM2G091494	"Starch branching enzyme interacting protein-1"
3	RG	222.733.400 [‡]	GRMZM2G055578	"Glycine-rich protein"
			GRMZM2G055629	"Plant thionin family protein precursor/Defensin"
4	RG	227.101.950	GRMZM2G116314	"Ubiquitin thiolesterase"
		227.101.985		
5	RG	93.580.059 [‡]	GRMZM2G037308	"Phytosulfokine receptor"
6	RG	88.149.024	GRMZM5G876960	"Polyamine oxidase (propa-1,3-diamine-forming)"
		88.149.036		
7	RG	15.072.370	GRMZM2G316256	"Catalase//L-ascorbate peroxidase"
7	RG	19.347.596	GRMZM2G042627	"Kinase associated protein phosphatase"

[†] SNP localizado dentro de un exón del gen candidato.

[‡] SNP localizado dentro de un intrón del gen candidato. Los SNP sin superíndice están localizados en una posición adyacente al gen.

4.2.4.3 Genes candidatos para resistencia de grano

Para el carácter resistencia de grano se identificaron 11 genes que contienen o que están cerca de la posición física de cada SNP significativamente asociado a este carácter. El primer gen candidato para este carácter es el gen *psei1* o *cystatin1* (GRMZM2G438551) identificado a 22,4 kbp corriente arriba del SNP localizado en la posición física 187.742.562 bp sobre el cromosoma 3 (Figura 4.26).

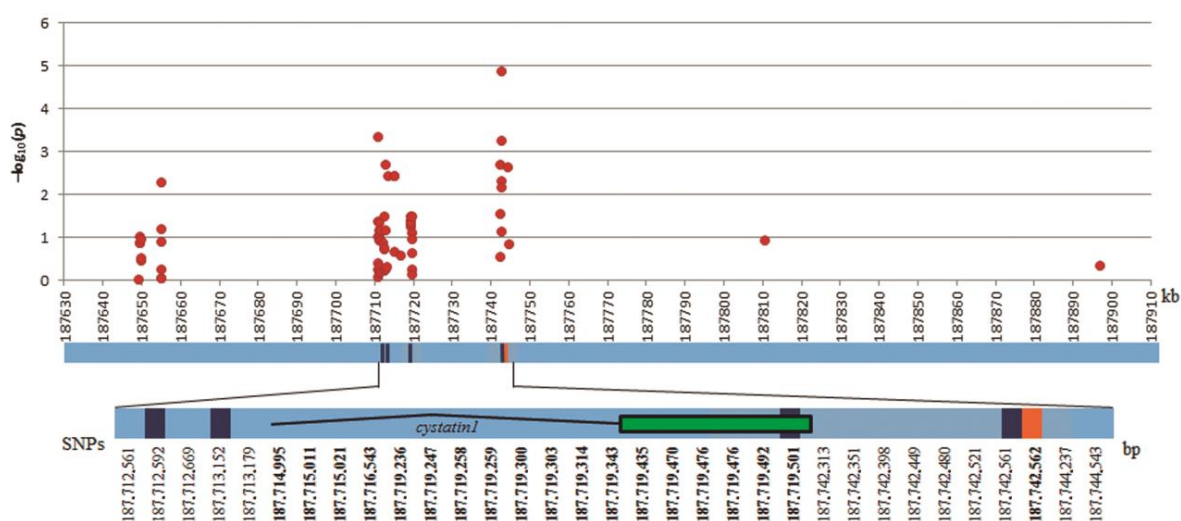


Figura 4.26 En una región de aproximadamente 280 kpb del cromosoma 3 se encontró un SNP significativamente asociado con resistencia de grano (RG). Los puntos en rojo representan el valor-P de los diferentes SNP en la región mencionada. La banda color naranja indica la localización del SNP significativamente asociado a RG y las bandas en azul oscuro representan las regiones genómicas en desequilibrio de ligamiento ($DL, r^2 > 0,2$) con el SNP asociado a RG. El rectángulo de color verde y la línea negra (en el extremo izquierdo del rectángulo) representan la región del exón y el intrón del gen *cystatin1*, respectivamente.

El gen GRMZM2G111666 que codifica un factor de transcripción bHLH “*basic Helix-Loop-Helix (bHLH) transcription factor*” se encuentra a 3,5 kbp (corriente abajo) del SNP significativamente asociado a RG localizado en la posición física 204.458.505 bp sobre el cromosoma 3. El gen GRMZM2G091494 que codifica una proteína “*Strach branching enzyme interacting protein-1*” contiene al SNP asociado significativamente con RG localizado en la posición física 204.586.960 bp sobre el cromosoma 3. Además el gen GRMZM2G425638 que codifica la producción de la proteína Gemin 1-2 se encontró a

una distancia relativamente corta de este SNP (106 kbp corriente abajo). El cuarto SNP significativamente asociado a RG localizado en el cromosoma 3 cuya posición física fue 222.733.4000 bp se encontró dentro de un intrón del gen GRMZM2G055578 que codifica una proteína rica en glicina o GRP, "*Glycine-Rich Protein*". Sin embargo, también se propuso como candidato al gen GRMZM2G055629, que codifica una proteína de la familia Tionina "*Thionin family protein*" o defensina, y está localizado a 5,3 kbp (corriente arriba) del SNP. Además, otros tres genes que codifican proteínas defensinas estuvieron relativamente cerca de este SNP a una distancia entre 62 y 110 kbp corriente arriba.

En el cromosoma 4 se propone como candidato al gen GRMZM2G116314 que codifica una Ubiquitina Tiolesterasa ("*Ubiquitin Thiolesterase Protein*") y se localizó a 4,5 kbp corriente abajo de los dos SNP asociados significativamente a resistencia de grano localizados en las posiciones físicas 227.101.950 y 227.101.985 bp sobre el cromosoma 4.

En el cromosoma 5, un intrón del gen GRMZM2G03708, que codifica una proteína receptora de fitosulfoquina PSK, "*Phitosulfokine receptor*", contiene el SNP significativamente asociado a RG localizado en la posición física 93.580.059 del cromosoma 5. En el cromosoma 6, el gen GRMZM5G876960 que codifica una Poliamina Oxidasa PAO, "*Polyamine Oxidase, propa-1,3-diamine-forming*" se encontró localizado a 0,7 kbp (corriente arriba) de los dos SNP asociados significativamente a RG localizados en las posiciones 88.149.024 y 88.149.036 bp de este cromosoma.

Mientras que en el cromosoma 7, el gen GRMZM2G316256 que codifica una "*Catalase//L-ascorbate peroxidase*" se encontró a 4.6 kbp (corriente abajo) del SNP localizado en la posición física 15.072.370 bp de este cromosoma. Y por último, el gen GRMZM2G042627 que codifica una proteína kinasa "*Kinase associated protein phosphatase*" se localizó a 127 bp (corriente abajo) del SNP asociado significativamente a RG ubicado en la posición física 19.347.596 bp sobre el cromosoma 7. Además, a una distancia de 71 kbp (corriente abajo) de este SNP se encuentra localizado el gen *ipt4 isopentenyl transferase4* (GRMZM2G104559).

En general el desequilibrio de ligamiento decae ($r^2 \leq 0,10$) en distancias muy cortas en las regiones donde fueron localizados los SNP significativamente asociados a los tres

caracteres de resistencia como se observa en la Figura 4.26. Pero, en algunos casos, el DL en algunas regiones específicas puede ser mayor que 0,20 (Figura 4.26). Para longitud de galerías, las estimas del DL entre SNP significativos fueron inferiores a 0,1 con 2 excepciones. Dos SNP localizados en el cromosoma 4 y distanciados por 235 kbp presentan un altísimo desequilibrio de ligamiento y también se observa un desequilibrio de ligamiento significativo entre los SNP localizados en el cromosoma 7, aunque puedan estar separados por 1 Mbp (Tablas 4.13). Mientras que el DL entre los SNP significativamente asociados para DTR (Tabla 4.14) y entre los SNP significativamente asociados a RG fue inferior a 0,20, excepto para unos SNP contiguos asociados a RG y localizados en los cromosomas 4 y 6 (Tablas 4.15).

Tabla 4.13 Desequilibrio de ligamiento (r^2) entre los diez SNP significativamente asociados a longitud de galerías hechas por *S. nonagrioides*.

	SNP	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]
[1]	S2_168004182		0.05	0.09	0.10	0.01	0.00	0.00	0.02	0.02	0.02
[2]	S3_7081859			0.01	0.00	0.00	0.00	0.01	0.04	0.04	0.04
[3]	S4_190444179				0.91	0.00	0.00	0.01	0.08	0.08	0.08
[4]	ss4_190679094					0.00	0.00	0.01	0.08	0.08	0.08
[5]	S7_154739818						0.24	0.13	0.00	0.00	0.00
[6]	S7_154741622							0.24	0.01	0.01	0.01
[7]	S7_155702328								0.00	0.00	0.00
[8]	S10_133337924									1	1
[9]	S10_133337925										1
[10]	S10_133337950										

Los SNP con $r^2 \geq 0.20$ están indicados en negrita.

Tabla 4.14 Desequilibrio de ligamiento (r^2) entre los cuatro SNP significativamente asociados a daño de tallo relativo hecho por *S. nonagrioides*.

	SNP	[1]	[2]	[3]	[4]
[1]	S1_208315891		0.01	0.02	0.00
[2]	S1_293163491			0.11	0.01
[3]	S2_59729532				0.01
[4]	ss5_176870721				

Tabla 4.15 Desequilibrio de ligamiento (r^2) entre los once SNP significativamente asociados a resistencia del grano contra el ataque de *S. nonagrioides*.

	SNP	[1]	[2]	[3]	[4]	[5]	[6]	[7]	[8]	[9]	[10]	[11]
[1]	S3_187742562		0.01	0.00	0.00	0.01	0.01	0.01	0.03	0.03	0.00	0.04
[2]	S3_204458505			0.04	0.01	0.01	0.01	0.00	0.00	0.00	0.05	0.03
[3]	S3_204586960				0.00	0.00	0.00	0.05	0.00	0.00	0.03	0.00
[4]	S3_222733400					0.00	0.00	0.01	0.02	0.02	0.00	0.02
[5]	S4_227101950						1	0.02	0.02	0.02	0.00	0.02
[6]	S4_227101985							0.02	0.02	0.02	0.00	0.02
[7]	S5_93580059								0.02	0.02	0.00	0.02
[8]	S6_88149024									1	0.00	0.01
[9]	S6_88149036										0.00	0.01
[10]	S7_15072370											0.03
[11]	S7_19347596											

Los SNP con $r^2 \geq 0.20$ están indicados en negrita.

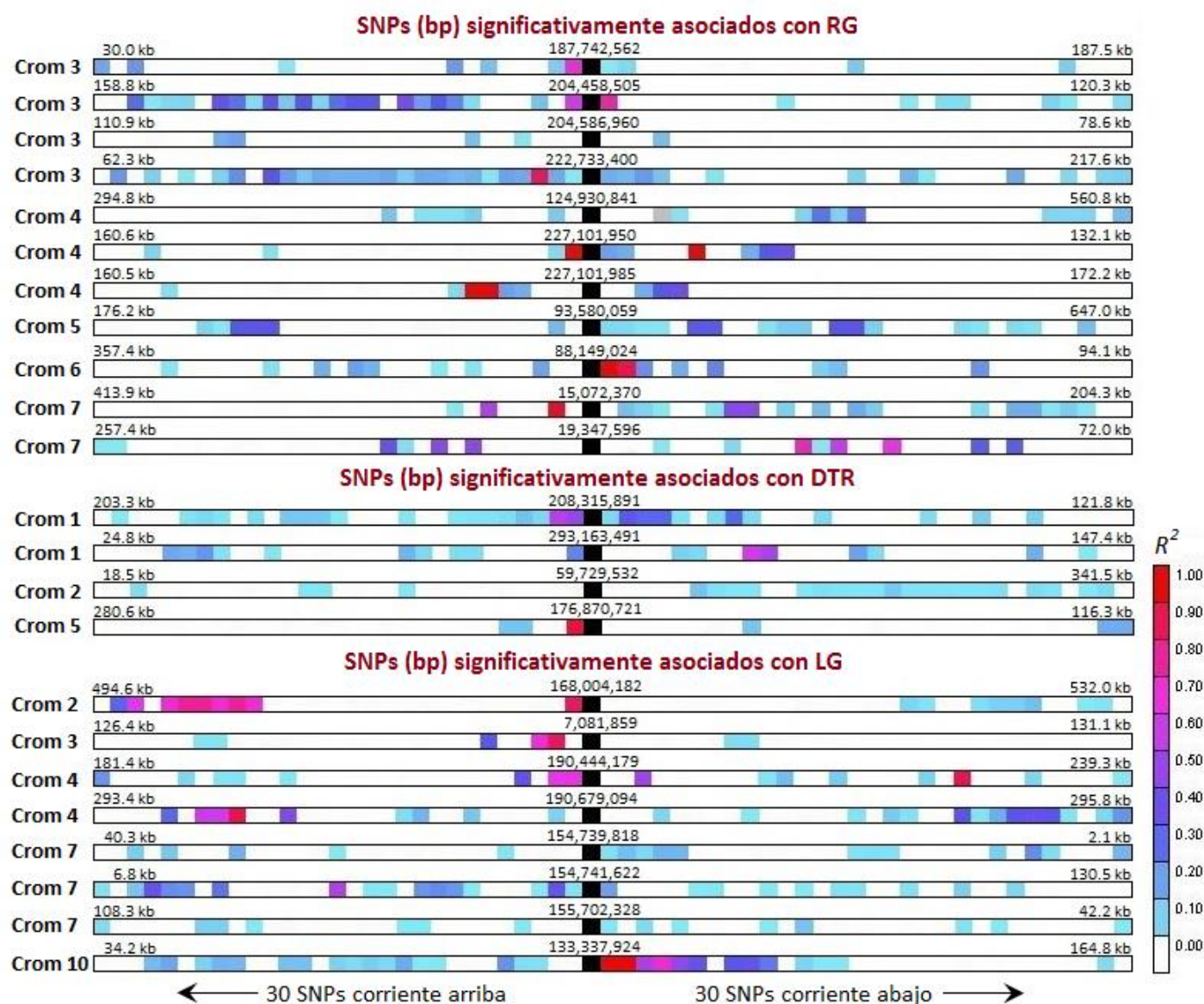


Figura 4.26 Desequilibrio de ligamiento (r^2) entre los SNP significativamente asociados a caracteres de resistencia al ataque de *S. nonagroides* y los 60 SNP más cercanos. Cada barra representa la región (oscilando entre ~0,15 a ~1 Mbp) conteniendo cada SNP significativamente asociado (cuadro negro) al carácter de resistencia. El DL (valor de r^2) con los 30 SNP corriente arriba se muestran al lado izquierdo del cuadro negro, y el DL con los 30 SNP corriente abajo se muestran al lado derecho del cuadro negro; en los extremos de cada barra, se indica la distancia (en kbp) que abarcan los SNP tanto corriente arriba como corriente abajo del SNP.



DISCUSIÓN



5. Discusión

5.1 Mapeo convencional de QTL

Las heredabilidades de los caracteres de resistencia fueron más bajas que las que se obtuvieron para los caracteres agronómicos coincidiendo con los resultados obtenidos por Bohn *et al.* (2000) y Papst *et al.* (2004). Además las estimas de la varianza genética obtenidas para los caracteres de resistencia fueron bajas. En un trabajo previo de Ordás *et al.* (2010) se observó que, bajo infestación con *S. nonagrioides*, la heredabilidad del carácter longitud de galerías fue alta o similar al valor de la heredabilidad obtenida para rendimiento, pero el estudio de esos autores se realizó sobre una población derivada del cruce de un material resistente $\times$ susceptible, mientras que en nuestro estudio ambas líneas parentales fueron susceptibles al ataque de *S. nonagrioides*; aunque diferían para tolerancia. A pesar de lo dicho se han encontrado 6 QTL para caracteres de resistencia en el cruzamiento empleado en esta investigación.

5.1.1 QTL para caracteres de resistencia a *S. nonagrioides* y para caracteres agronómicos

La mayoría de los QTL fueron detectados usando en el análisis tanto BLUP como BLUE, además los parámetros asociados a dichos QTL tales como posición del QTL, LOD, intervalo de confianza, $\hat{R}^2$, $\hat{p}$ y $\hat{a}$ fueron similares en ambos análisis. Sin embargo, los QTL detectados para los caracteres de resistencia en la mazorca (RG, RP y RZ) únicamente fueron detectados cuando se usaron BLUE en el análisis de QTL debido a que la variabilidad fenotípica para esos caracteres fue baja y por lo tanto la restricción de la variabilidad atribuida al uso de BLUP puede estar enmascarando las pequeñas diferencias genéticas para esos caracteres. Cabe destacar que un QTL con una alta frecuencia de detección en la prueba de validación cruzada fue detectado para el carácter de resistencia de pedúnculo (RP5) aunque la estima de la varianza genética para este carácter no fue significativamente distinta de cero. Por otra parte el QTL detectado para rendimiento solo se detectó cuando se utilizaron BLUP en el análisis y

puede deberse a que para caracteres como éste la dispersión de los datos es mayor debido a que sufren una mayor influencia ambiental.

En general se detectó un máximo de tres QTL por cada carácter evaluado. Esto se puede considerar como un número notable de QTL teniendo en cuenta que ambos parentales mostraron medias similares para todos los caracteres evaluados. Esto demuestra que, incluso, materiales con bajos niveles de resistencia son portadores de alelos favorables para caracteres relacionados con la resistencia. Además, Ordás *et al.* (2009, 2010) propusieron que el bajo número de QTL encontrados en experimentos con *S. nonagrioides* es debido a la alta agresividad de esta especie, por lo que la mayoría de los genotipos parecen ser susceptibles, a diferencia de los experimentos con *O. nubilalis*, en los cuales el número de QTL identificados ha sido mayor.

El QTL para longitud de galerías identificado en este estudio en el cromosoma 9 ha sido detectado en la misma región donde otros autores han reportado antes QTL para resistencia al daño de hoja y para longitud de galerías hechos por otras especies de taladros. Jampatong *et al.* (2002) localizaron en el bin 9.02 un QTL ($\hat{\alpha}$ = 0,53 cm y R^2 = 10,8%) para longitud de galerías ocasionadas por *O. nubilalis* en un conjunto de 244 $F_{2:3}$ familias derivadas del cruce B73Ht $\times$ Mo47. Ordás *et al.* (2009) encontraron un QTL para longitud de galerías ocasionadas por *S. nonagrioides* en el bin 9.04 con un 96,2% de ocurrencia en las 1000 pruebas de validación cruzada. Groh *et al.* (1998) localizaron en una región superpuesta entre los bins 9.02 y 9.03 un QTL para daño de hoja ocasionado por el taladro del maíz *Diatraea grandiosella* y por el taladro de la caña de azúcar, *D. saccharalis*, y para el carácter concentración de proteínas en hoja en un conjunto de RIL derivadas del cruce CML131 $\times$ CML67. Cardinal *et al.* (2006) localizaron un QTL ($\hat{\alpha}$ = 0,24 en la 1-9) en el bin 9.03 para el carácter de resistencia al daño en hoja ocasionado por *O. nubilalis* en una población F_3 de maíz derivadas del cruce de las líneas Mo17 $\times$ H99. Por lo tanto, es probable que los genes en esta región del cromosoma 9 que controlan la resistencia para longitud de galerías ocasionadas por los taladros podrían también estar relacionados con aquellos que confieren resistencia al daño en hoja, y además, las variantes alélicas favorables podrían estar presentes en una amplia variedad de germoplasma de este cultivo ya que se han encontrado variantes alélicas interesantes en diferentes materiales de maíz.

Se sabe por estudios previos que algunos componentes de la pared celular están relacionados con la resistencia a diferentes taladros del maíz (Buendgen *et al.*, 1990; Santiago *et al.*, 2003). Varios QTL y genes candidatos que afectan los componentes de la pared celular se han co-localizado en la región del cromosoma 9 donde se localizó el QTL para resistencia a longitud de galerías en este estudio (Krakowsky *et al.*, 2007; Truntzler *et al.*, 2010), pero las regiones que contienen los QTL localizados aquí son excesivamente grandes como para proponer genes candidatos específicos que afecten a la resistencia a *S. nonagrioides*.

Sin embargo, la región en el bin 9.03 podría ser considerada como un “hot spot” para la resistencia a los taladros, en la cual podría haber muchos genes de efectos pequeños controlando este carácter, por lo que valdría la pena realizar estudios con mayor resolución de mapeo en esta región del cromosoma 9 que permitan la identificación de estas variantes.

En relación al otro carácter de resistencia en tallo, encamado de tallo, se localizó un QTL para este carácter en el mismo bin (3.07) donde previamente Flint-Garcia *et al.* (2003) detectaron un QTL para la resistencia de la caña al penetrómetro en una población F_{2:3} derivada del cruce B73 × Mo47. También, la posible relación entre la dureza del tallo y la resistencia de éste al ataque de las larvas taladradoras encontrado en cruces que involucran germoplasma Reid pero no puede ser generalizado a otros germoplasmas (Butrón *et al.*, 2002).

Se detectó un QTL para rendimiento en el bin 5.03 en una región vecina a la región donde Ordás *et al.* (2010) previamente había localizado un QTL (bin 5.05) para este mismo carácter en otra población de RIL distinta. Esta región del cromosoma 5 ha sido previamente asociada con rendimiento de grano tanto en condiciones bajo estrés como en condiciones normales (no estrés) en varios estudios realizados por Graham *et al.* (1997). En el escaneo para buscar QTL para rendimiento también se detectó un pico con un LOD de 2,48 en la posición 126 cM del cromosoma 4, cerca del marcador *umc1015* (bin 4.08, datos no mostrados), pero al no haber superado el nivel de corte preestablecido (LOD 2,5) este QTL no fue declarado como significativo. Sin embargo, en esta región del cromosoma 4, Papst *et al.* (2001) detectaron un QTL para rendimiento bajo infestación con *O. nubilalis*. Por lo tanto, es probable que en esta región haya genes

de efectos pequeños sobre el rendimiento bajo condiciones de infestación por taladros del maíz.

Es notable que los QTL para días a floración masculina y femenina DFM8 y DFF8 localizados en el bin 8.05 fueron detectados en el 93 y 94% de las 1000 VC, respectivamente. Además estos QTL explicaron porcentajes considerablemente altos de la varianza genética para estos dos caracteres ($\hat{p} = 26,3$ y $31,6\%$, respectivamente) y los efectos aditivos estimados no sufrieron ningún sesgo como se puede ver al comparar los efectos aditivos de las calibraciones y validaciones (ver Tabla 4.6). Por otra parte, Ordás *et al.* (2010) también localizaron un QTL para días a floración femenina en la misma región del cromosoma 8 cuya frecuencia de detección en 1000 VC fue del 92%. En el estudio de esos autores la línea parental EP42 aportó el alelo con efecto de reducción sobre los días a floración, al igual que en el presente estudio en el que el alelo de dicha línea redujo el tiempo hasta floración en más de 1,8 días. Estos QTL probablemente se refieren al QTL mayor *Vgt1* el cual controla la transición de la fase vegetativa a la reproductiva en maíz y ha sido previamente diseccionado mediante clonación posicional (Salvi *et al.*, 2002; 2007). Por otra parte, la región en el cromosoma 10 donde fue localizado otro QTL para floración femenina coincide con otras regiones donde otros autores han reportado previamente genes que regulan la floración mediante la sensibilidad al fotoperiodo (Ducrocq *et al.*, 2009).

5.1.2 Interacción QTL $\times$ E

De acuerdo con los resultados del ANOVA, no se observó interacción genotipo $\times$ ambiente significativa para ningún carácter de resistencia de acuerdo con los resultados obtenidos previamente por otros autores con experimentos bajo infestación con *S. nonagrioides* (Butron *et al.*, 1999; Velasco *et al.*, 2002; Ordás *et al.*, 2009). Sin embargo, se observó una interacción QTL $\times$ E significativa para dos caracteres de resistencia y cuatro caracteres agronómicos, aunque esta interacción fue más de magnitud que de rango debido a que las condiciones experimentales de los ensayos del 2010 fueron menos favorables para el desarrollo del cultivo que las del 2011. Por lo tanto, los QTL detectados podría decirse que son estables.

5.1.3 Relación entre caracteres de resistencia a *S. nonagrioides* y caracteres agronómicos (no incluyendo el rendimiento).

Hubo una correlación genética positiva y significativa entre longitud de galerías y días a floración masculina ($r_g = 0,40$) sugiriendo que los genotipos más tardíos tendrían una menor resistencia en tallo; esto concuerda con los resultados obtenidos en estudios previos por otros autores (Krakowsky *et al.*, 2002; Ordás *et al.*, 2010) y, a la vez, está en desacuerdo con los resultados de otros estudios en los cuales se ha encontrado una relación positiva entre floración femenina y/o masculina y resistencia del tallo bajo condiciones de infestación con *O. nubilalis* (Hudon y Chiang, 1991; Bohn *et al.*, 2000; Krakowsky *et al.*, 2004; Papst *et al.*, 2004). La relación entre floración y resistencia a los taladros es compleja porque depende de varios factores tales como el estado de desarrollo del maíz en el que se realiza la infestación y el material bajo estudio (Ordás *et al.*, 2013). En este estudio, la infestación artificial se realizó antes de la floración mientras que resultados contradictorios se han obtenido cuando la infestación se realiza en pos-floración (Hudon y Chiang, 1991; Bohn *et al.*, 2000; Papst *et al.*, 2004). Ordás *et al.* (2013) han mostrado que, cuanto más se retrase la infestación con respecto al momento de floración, menores serán los daños causados por el taladro. Pese a la moderada correlación genética entre floración y longitud de galerías, ninguno de los dos QTL detectados en este estudio para floración masculina fue localizado cerca del QTL detectado para longitud de galerías, aunque varios autores han co-localizado QTL para estos dos caracteres (Bohn *et al.*, 2000; Krakowsky *et al.*, 2002; 2004; Ordás *et al.*, 2010).

Por otra parte, un programa de selección por precocidad podría afectar negativamente a la resistencia en mazorca, puesto que los QTL (DFM1 y DFM8) para días a floración masculina y los QTL para resistencia en pedúnculo (RP1 y RP8) co-localizan en los cromosomas 1 y 8; aunque este efecto negativo no debe ser generalizado a otros materiales porque la población sintética BS17 fue mejorada por precocidad sin que la resistencia en mazorca se viera alterada (Samayoa *et al.*, 2012).

En esta población (EP42 × A637) no se encontró ningún QTL para longitud de galerías cerca de los dos QTL para humedad de grano, pero la correlación genética ($r_g = 0,69$)

significativa y positiva entre humedad de grano y longitud de galerías obtenida en este estudio nos lleva a pensar que existen regiones genómicas con efectos pequeños sobre ambos caracteres que no fueron detectadas. Ordás *et al.* (2010) también obtuvo una correlación genética significativa ($r_g = 0,61$) para estos dos caracteres y además co-localizó un QTL para longitud de galerías y otro para humedad de grano en el bin 3.05. Esto significa que la selección para incrementar la resistencia podría conducir a una disminución en la humedad del grano.

QTL para longitud de galerías, altura de planta, y altura de mazorca fueron localizados en el mismo bin del cromosoma 9. Los QTL para longitud de galerías y altura de planta fueron localizados en el mismo intervalo (entre los marcadores *phi065* y *umc1267*). El alelo proveniente de la línea EP42 incrementó significativamente el valor de estos tres caracteres. El QTL para altura de mazorca AM9 localizado en el bin 9.03 ha sido reportado previamente en el mismo bin por Krakowski *et al.* (2002) en un estudio realizado bajo infestación artificial con *O. nubilalis*. Estos autores reportaron que los alelos asociados con el incremento de la longitud de galerías estuvieron también asociados con el incremento de la altura de planta. Shön *et al.* (1993) encontraron un QTL para altura de planta y otro para longitud de galerías ocasionadas por *O. nubilalis* dentro del mismo intervalo de marcadores en el cromosoma 3, y el alelo proveniente de la misma línea parental incrementó ambos caracteres en una población de 300 familias de maíz F₃ derivadas del cruce B73 × B52. Ordás *et al.* (2010) co-localizó en la misma región del cromosoma 3 un QTL para longitud de galerías y otro para altura de planta en una población de 178 RIL obtenidas a partir del cruce entre líneas lisas europeas (EP42 × EP39), y además encontraron una correlación genética moderada ($r_g = 0,52$) entre ambos caracteres. Cardinal *et al.* (2001) también co-localizaron un QTL mayor para longitud de galerías bajo infestación con *O. nubilalis* y altura de planta en un conjunto de 200 RIL derivadas del cruce B73 × B52. En el presente estudio, al igual que en el de Ordás *et al.* (2010), se obtuvo una correlación genética significativa entre estos dos caracteres (LG y AP, $r_g = 0,66$) y entre LG y altura de mazorca ($r_g = 0,84$). Estos resultados sugieren que las regiones genómicas con efectos aditivos sobre alturas de planta y mazorca también pueden influir en gran medida sobre la longitud de galerías y proponemos estudiar en más profundidad la región del bin 9.03. El mapeo fino de

esta región nos permitirá conocer si los mismos genes o genes ligados están afectando a la altura de planta y a la longitud de galerías.

5.1.4 Rendimiento y su relación con la resistencia.

El rendimiento de grano no estuvo genética o fenotípicamente asociado con longitud de galerías coincidiendo con los resultados obtenidos por Bohn *et al.* (2000) en una población de familias $F_{2.3}$ derivadas del cruce D06 $\times$ D408, aunque otros autores han encontrado una relación negativa entre resistencia en tallo a los taladros y rendimiento de grano (Schulz *et al.*, 1997; Kreps *et al.*, 1998; Butrón *et al.*, 2012).

5.1.5 Relación entre caracteres agronómicos (no incluyendo el rendimiento).

El carácter días a floración masculina estuvo genéticamente asociado con altura de mazorca porque la correlación genética entre ambos fue alta ($r_g = 0,62$) y QTL para ambos caracteres co-localizaron en la misma región del cromosoma 8, lo que corroboró la idea general de que los genotipos más tardíos presentan mazorcas más altas (Hallauer y Miranda, 1981). Sin embargo, Krakowsky *et al.* (2002) obtuvieron una pequeña, pero negativa asociación entre la floración masculina y altura de mazorca ($r_g = -0,36$) en una población de 150 F_3 derivadas del cruce B73 $\times$ De811.

Los resultados de los QTL respaldan la alta correlación genética entre floración masculina, femenina, altura de mazorca y humedad de grano porque los efectos aditivos de los QTL DFM8, DFF8 y HG8 co-localizaron dentro del mismo intervalo de marcadores (*umc1309a-bnlg1812*) en el cromosoma 8 y los QTL HG1 y DFM1 co-localizaron en la misma región del cromosoma 1, donde estuvieron ligados al mismo marcador (*bnlg1556*).

5.1.6 Validación

En base a los resultados de las prueba de validación cruzada tres QTL para caracteres de resistencia (LG, ET y RP1) y otro para altura de planta (AP8) mostraron los mayores valores de la estimación del sesgo para la proporción de la varianza genética (sesgo de $\hat{p} \geq 90\%$) explicada por cada QTL. Es decir que la varianza genética explicada por esos QTL fue sobreestimada en un 91 a 100%. Además la estimación del sesgo de los efectos aditivos para esos caracteres oscilo entre 51 y 81%. En el caso de los caracteres de resistencia, esos resultados fueron esperados, puesto que los valores más bajos de la heredabilidad fueron obtenidos para esos caracteres y los valores de la heredabilidad se usan para el cálculo de p_{iES} y p_{iTS} . Por otra parte, los QTL que mostraron los niveles más alto de ocurrencia o frecuencia de detección en las 1000 VC fueron los más precisos, en base a los bajos valores observados en la estimación del sesgo de la varianza genética explicada $\hat{p}$ por cada QTL y de la estimación del sesgo de los efectos aditivos $\hat{a}$. En general, los valores de $\hat{p}$ y $\hat{a}$ para cada QTL detectado fueron notables para la mayoría de los caracteres, pero esos parámetros podrían estar sobre estimados debido al tamaño pequeño de la población. Sin embargo, la variación de la magnitud del sesgo de las estimas observadas a través de todos los caracteres podría haberse debido a las diferencias de heredabilidad así como a las diferencias de complejidad en la medición del carácter.

En un estudio realizado por Schön *et al.* (2004) se concluye que las pruebas de VC arrojan mejores resultados cuando al menos se cumple con un tamaño mínimo de muestra ($N > 200$) así como también un número mínimo de ambientes ($E > 4$) en el análisis. Los grandes valores de los sesgos mostrados en nuestro experimento para la mayoría de los QTL detectados corroboraron los resultados de esos autores.

Los valores de la mediana $\tilde{p}_{iES}$ de la proporción de la varianza genética explicada por el QTL fueron más altos que las estimas que se obtuvieron para este parámetro en el grupo completo $\hat{p}_{DS}$, y esta inflación en $\tilde{p}_{iES}$ es reflejada en la magnitud del sesgo de p . Shön *et al.* (2004) obtuvieron resultados similares cuando los tamaños de la población fueron pequeños ($N < 200$). Por otra parte, se observó una gran variación en los cuantiles 10 y 90% en la distribución de los valores de p estimados en el grupo de

validación TS comparados con los que se obtuvieron en el grupo de calibración ES. Así también las estimas de los cuantiles de la distribución de los valores de p fuera de los límites teóricos (0, 100) observados en el grupo de validación TS en este estudio corroboran los resultados obtenidos por Schön *et al.* (2004) en el cual ellos observaron (con datos de rendimiento de grano) que los cuantiles (12,5 y 87,5%) de la distribución de p fueron mayores en el grupo de validación TS y además estuvieron fuera de los límites teóricos cuando el tamaño de la población fue pequeño ($N = 122$). Dicho lo anterior, los QTL que mostraron los mayores valores en la estima del sesgo de $\hat{p}$ y $\hat{a}$, no son adecuados para ser usados en programas de SAM debido a la sobreestimación de sendos parámetros.

5.2 Mapeo de asociación

5.2.1 Medias, heredabilidades y correlaciones

Se observaron diferencias substanciales entre las medias anuales para longitud de galerías hechas por *S. nonagrioides*. En estos experimentos la infestación artificial es usada para asegurar el contacto de los insectos con la planta, pero la severidad del ataque está condicionada por una serie de factores ambientales que a su vez influyen en la infestación natural; de modo que, como la infestación natural de la plaga varía enormemente entre años (Cordero *et al.*, 1998; Velasco *et al.*, 2007), los daños, aún bajo infestación artificial, también deberían hacerlo. Así los muestreos mensuales del nivel de infestación natural en una parcela adyacente a los ensayos de GWAS indicaron que en el 2012 hubo una alta tasa de infestación natural comparada con las de 2010 y 2011 y paralelamente la longitud de galerías media en el ensayo GWAS fue especialmente elevada en 2012. Además, el experimento de 2011 fue cosechado antes que los de 2010 y 2012, lo cual limitó el tiempo que las larvas podrían causar daños a las plantas. Por lo tanto, estas diferencias en el nivel de infestación natural y en el tiempo de cosecha podrían ser las mayores causas de las diferencias entre años para longitud de galerías.

Se observó una interacción genotipo $\times$ ambiente significativa para todos los caracteres, aunque en estudios previos bajo infestación con *S. nonagrioides* no se había observado interacción $G \times E$ significativa para longitud de galerías (Butrón *et al.*, 2009; Ordás *et al.*,

2009). Cuando el análisis se hizo descartando los datos del 2012, la interacción $G \times E$ para los caracteres de resistencia dejó de ser significativa, excepto para el carácter resistencia de grano. Por lo tanto, la alta tasa de infestación en 2012 podría eliminar en gran parte las diferencias fenotípicas entre las distintas líneas puras para longitud de galerías, produciendo interacciones significativas cuando se hace el análisis combinado de los tres años. La heredabilidad para los caracteres de resistencia osciló entre baja y moderada mientras que para altura de planta y floración fueron altas, tal como se esperaba con estos caracteres agronómicos. 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).

En este panel de líneas de maíz de diferentes orígenes se observó que la correlación genética entre longitud de galerías y altura de planta era significativa ($r_g = 0,51$). Sin embargo, no se encontró ningún SNP o SNP ligados a ambos caracteres. Esta relación entre altura de planta y longitud de galerías no siempre se observa en poblaciones segregantes biparentales como ponen de manifiesto 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).

Los coeficientes de correlación genética entre resistencia de grano y ambos caracteres de floración ($r_g = 0,75$ para DFM y $r_g = 0,71$ para DFF) fueron elevados así como la correlación entre resistencia de grano y altura de planta. Estos resultados sugieren que los genotipos más altos y más tardíos serán los que presenten una mazorca menos dañada; pero estos resultados deben ser tomados con precaución porque la infestación fue hecha simultáneamente para todos los genotipos situando los huevos de *S. nonagrioides* cerca del suelo, por lo que en las plantas más altas y más tardías las larvas podrían tener más dificultad para llegar a la mazorca por encontrarse más alejada del punto de infestación. Además la preferencia de las larvas de *S. nonagrioides* por los tejidos del tallo comparados con los tejidos de la mazorca podría ser menos evidente cuando los tejidos del tallo están más lignificados (genotipos precoces).

5.2.2 Análisis de asociación

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 ($c = 1,1$ a $1,6$), excepto para el carácter longitud de galerías, el cual tuvo el valor más alto del nivel de compresión ($c = 8,3$). Por lo tanto la variabilidad genética aleatoria para longitud de galerías 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, Zhang *et al.* (2010) demostraron que este método controla bien la tasa de falsos positivos cuando los niveles de compresión son de 1,5 a 10.

Los SNP localizados en los cromosomas 3 y 7 para longitud de galerías co-localizaron con los QTL previamente reportados para longitud de galerías hechas por *O. nubilalis* en los bin 3,02 y 7,03 (Krakowsky *et al.*, 2004). La proporción de la varianza fenotípica explicada ($R^2 = 7-9\%$) 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). En ningún estudio previo se han reportado QTL para daño de tallo relativo y resistencia de grano en las regiones donde se encontraron SNP asociados a estos caracteres en este estudio, excepto el QTL para resistencia de grano localizado en el bin 5.04 y descrito en la sección anterior de este trabajo (Mapeo convencional de QTL). Por lo tanto, además de incrementar enormemente el poder de resolución, el mapeo de asociación descubre regiones genómicas involucradas en la resistencia a los barrenadores del maíz que no fueron detectadas anteriormente usando poblaciones biparentales.

5.2.3 Genes candidatos

5.2.3.1 Genes asociados con longitud de galerías hechas por *S. nonagrioides*

El gen candidato adyacente al SNP significativamente asociado a longitud de galerías en el cromosoma 2 codifica una proteína que contiene un dominio TPR (“*Tetratricopeptide repeat*”). Los dominios TPR median las interacciones proteína-proteína en varios procesos celulares incluyendo la translocación y degradación de proteínas (Blatch y Lässle, 1999; Allan y Ratajczak, 2011) y, en un estudio reciente, se ha propuesto que actúan como moduladores de la función y expresión de los genes durante la respuesta al estrés causado por la invasión de patógenos (Pogorelko *et al.*, 2014).

El gen candidato *hex1* que contiene dentro de un exón al SNP significativo del cromosoma 3 codifica la enzima “*hexoquinase1*”, un sensor de azúcar con numerosas funciones fisiológicas dentro de la célula incluyendo la respuesta al estrés oxidativo y la resistencia a patógenos (Granot *et al.*, 2013; Hellmann y Smeekens, 2014; Morkunas y Ratajczak, 2014). Un SNP significativo localizado en el cromosoma 4 está dentro de un gen que codifica una hidrolasa de la superfamilia “*Double Clp-N motif-containing P-loop nucleoside triphosphate hidrolases*”. Este gen muestra una ligera similitud con el gen AtHSP101 de *Arabidopsis*, que codifica una proteína de choque térmico requerida para la aclimatación a altas temperaturas de la planta y que podría estar involucrada en la respuesta a otros estreses (Lee *et al.*, 2007). Además, es interesante mencionar que en esta región se encontró un gen regulador de transcripción *ofp44*, y se sabe que algunos factores de transcripción de la familia proteica Ovate interactúan con factores de transcripción de otras familias tales como la proteína1 de dominio NAC, factores de transcripción MYB y proteínas de homeodominio KNOX para regular la síntesis de los tres principales componentes de la pared celular secundaria (lignina, celulosa y hemicelulosa) (Mitsuda *et al.*, 2005; Zhong *et al.*, 2007; 2008; Liu, 2010), y el fortalecimiento de la pared celular parece tener un papel relevante en la resistencia al ataque de los taladros (Barros-Rios *et al.*, 2011).

El gen candidato para el otro SNP significativo en el cromosoma 4 codifica una enzima PLA₂ “*Phospholipase A2*”. Esta enzima es un precursor de la oxilipina y el ácido

jasmónico, dos importantes hormonas reguladoras de los genes de defensa contra el ataque de herbívoros (Ryan, 2000; Meijer y Munnik, 2003; Zhu-Salman *et al.*, 2005).

En una región de aproximadamente 1 Mbp del cromosoma 7; en la cual tres SNP han sido asociados significativamente a longitud de galerías; el desequilibrio de ligamiento entre estos SNP fue significativo. Los SNP 154.739.818 y 154.741.622 están localizados dentro de un gen que codifica presumiblemente para una proteína “*Histidine kinase*” y está cerca de otros cinco genes que codifican proteínas similares, receptores con actividad serina /treonina kinasa y proteínas RLK “*Receptor-like kinase*”.

Es bien conocido que tanto las proteínas quinasas como las RLK juegan un papel central en la señalización durante el reconocimiento de patógenos y la subsecuente activación de los mecanismos de defensa de las plantas (Nürnberger y Kemmerling, 2006; Afzal *et al.*, 2008; Duan *et al.*, 2013). Estas proteínas también están involucradas en la activación de los mecanismos de defensa que se inducen por el daño mecánico (Arimura *et al.*, 2005) y en el mantenimiento de la integridad de la pared celular (Engelsdorf y Hamann, 2014). Polimorfismos en estos genes propuestos podrían ser los responsables de los QTL previamente detectados en el bin 7.03 para longitud de galerías en una población biparental (Krakowsky *et al.*, 2004).

El gen candidato que codifica una proteína kinasa CDPK “*Calcium/Calmodulin-dependent protein kinase*” cercano a los tres SNP significativos del cromosoma 10, podría estar jugando un importante papel en la activación de los mecanismos de defensa de la planta contra el ataque de *S. nonagrioides*; ya que se ha demostrado previamente que la CDPK es inducida por las heridas mecánicas ocasionadas por el ataque de herbívoros y media la acumulación de ácido jasmónico en el maíz y otras especies (Szczegieliński *et al.*, 2005; Ma *et al.*, 2012; 2012; Yang *et al.*, 2012).

5.2.3.2 Genes asociados con daño relativo de tallo ocasionado por *S. nonagrioides*

El gen GRMZM2G101422, que codifica una proteína desconocida, podría ser también un buen candidato para este carácter porque se encuentra localizado a 207 bp corriente abajo del SNP significativamente asociado a DTR sobre el cromosoma 1. El otro SNP

significativo del cromosoma 1 está localizado en un gen que codifica una proteína APF4; una de las funciones de la proteína APF4 es la remodelación de la actina del citoesqueleto bajo diferentes estímulos, incluyendo lesiones y el ataque de patógenos (Staiger *et al.*, 1997). Algunos estudios en *Arabidopsis* indican que la APF4 media la señalización de la respuesta defensiva y de la inmunidad innata de la planta (Tian *et al.*, 2009; Porter *et al.*, 2012; Henty-Ridilla *et al.*, 2014).

El gen candidato para el SNP significativamente asociado a daño de tallo relativo en el cromosoma 2 codifica una proteína de la familia de las LRR-RLK “*Leucine-rich receptor-like protein kinase*”, la cual desempeña un papel importante en la señalización célula-célula, entre otras. Estas proteínas están involucradas en la activación sistemática de inhibidores de proteasas en respuesta a las heridas ocasionadas por insectos (Jones y Jones, 1997; Wu y Zhou, 2013).

El SNP significativo localizado en el cromosoma 5 está dentro de un intrón del gen que codifica una proteína de función desconocida, pero que podría tener un papel importante en el carácter en estudio. Como dato adicional, también se menciona que este SNP se encuentra relativamente cerca del gen *nactf30*, un factor de transcripción de las proteínas de dominio NAC. Se ha mencionado anteriormente en este capítulo que este gen y otros factores de transcripción regulan la síntesis de la pared celular secundaria (Zhong *et al.*, 2006; McCann y Carpita, 2008). Además otros autores han asociado las proteínas de dominio NAC con la respuesta a estreses ocasionados por el ataque de herbívoros (Nogueira *et al.*, 2005).

5.2.3.3 Genes asociados con resistencia de grano al ataque de *S. nonagrioides*.

El SNP asociado significativamente a resistencia de grano en el cromosoma 3 se encuentra en desequilibrio de ligamiento con un SNP cercano posicionado dentro de un exón del gen *cystatin1* o *psei1*, cuyo producto es un inhibidor de cisteína proteinasa (Abe *et al.*, 1992). La expresión de algunos genes inhibidores de proteinasas es inducida en respuesta a heridas mecánicas y al daño ocasionado por insectos herbívoros (McMullen *et al.*, 2009) y se ha demostrado que los inhibidores de cisteína proteinasa interfieren con los procesos digestivos de algunas especies de insectos incluyendo los

lepidópteros (Ussuf *et al.*, 2001; Fabrick *et al.*, 2002).. Por lo tanto, si la asociación encontrada entre el SNP en la posición 187.742.562 y la resistencia del grano es debida al ligamiento entre ese SNP y un cierto polimorfismo no detectado en el gen *cystatin1*, el efecto de este polimorfismo se esperaría que fuera especialmente grande porque el ligamiento entre el SNP significativo y el SNP en el gen *cystatin1* es bajo ($r^2 = 0,20$), aunque muy significativo.

Otro SNP significativo asociado a resistencia del grano estuvo localizado cerca de un factor de transcripción de la familia “*basic Helix-Loop-Helix*” (bHLH). Recientes estudios realizados en otras especies de plantas han demostrado que esta familia de genes tiene una importante función en la regulación de la respuesta al ácido jasmónico (Niu y Figueroa, 2011; Zhang *et al.*, 2011; Sasaki-Sekimoto *et al.*, 2013; Song *et al.*, 2013; Qi *et al.*, 2014). El tercer SNP significativamente asociado a resistencia de grano localizado en el cromosoma 3 estuvo dentro de un gen que codifica una proteína que interactuaría con las enzimas SBE (“*Starch Branching Enzyme*”) que ramifican el almidón, cuya deficiencia en maíz resulta en una disminución de la digestibilidad del grano (Xia *et al.*, 2011). Aunque no se encontró evidencia previa sobre su relación con la resistencia a insectos, sería interesante realizar estudios más profundos para revelar dicha asociación si la hubiera. Sin embargo, hay otro gen interesante relativamente cerca de este SNP, el cual codifica para una proteína Germin 1-2; este tipo de proteínas han sido implicadas previamente en la respuesta a estreses bióticos y abióticos incluyendo la respuesta a heridas por daño de insectos herbívoros (Dunwell *et al.*, 2008; Davidson *et al.*, 2009; Breen y Bellgard, 2010; Armstrong *et al.*, 2013).

Otro SNP significativo localizado en el cromosoma 3 se encontró dentro de un intrón de un gen que codifica una proteína rica en glicina (GRP, “*Glicine-rich protein*”), una proteína estructural que puede desempeñar un papel importante en la fortificación de la pared celular (Ringli *et al.*, 2001; Ryser *et al.*, 2004; Mangeon *et al.*, 2010) y es inducida por heridas mecánicas (Sturm, 1992; Showalter, 1993). Por otro lado, un grupo de genes de la familia de los precursores de las tioninas fue encontrado cerca de la posición de otro SNP significativo dentro del cromosoma 3. Este resultado es particularmente interesante ya que esas proteínas pertenecen a la familia de las proteínas Defensinas, las cuales tienen una actividad antibacteriana, antifúngica e

insecticida (Bohlmann y Apel, 1991; Bohlmann y Broekaert, 1994; Kessler y Baldwin, 2002; Shiau *et al.*, 2006; De Coninck *et al.*, 2013).

Los dos SNP significativamente asociados a resistencia de grano en el cromosoma 4 estuvieron adyacentes a un gen que codifica una “*Ubiquitin thiolesterase*”. Estas proteínas forman sistemas complejos de degradación selectiva de proteínas (Hershko y Ciechanover, 1992; Zeng *et al.*, 2006) y median la biosíntesis de hormonas de señalización tales como el ácido salicílico, ácido jasmónico, ácido abscísico y las auxinas (Santner y Estelle, 2010; Kelley y Estelle, 2012). El gen candidato que contiene el SNP significativamente asociado a resistencia de grano en el cromosoma 5 codifica un receptor PSK “*Phytosulfokine receptor*”, la fitosulfokina es una hormona de reconocimiento cuyo nivel de expresión es incrementado por elicitores de los patógenos (Rodríguez, 2011; Igarashi *et al.*, 2012).

El gen candidato adyacente al SNP significativo localizado en el cromosoma 6 codifica una Poliamina Oxidasa (PAO). La PAO desempeña un papel importante en la tolerancia al estrés por generación de H_2O_2 , el cual es un componente clave en las rutas de señalización que median la respuesta a estreses. En maíz, la función de la PAO en la cicatrización de heridas es probable debido a un aumento de la deposición de lignina y suberina como consecuencia de la liberación de H_2O_2 (Angelini *et al.*, 2008). Además, se ha descrito que desempeñan una función importante en la fortificación de la pared celular y en la mediación de la respuesta a estreses abióticos y bióticos (Wimalasekera *et al.*, 2011).

El gen candidato adyacente al SNP significativo en el cromosoma 7 codifica una “*Catalase//L-ascorbate peroxidase*”, estas son enzimas desintoxicantes de peróxido de hidrogeno cuya actividad es muy importante en la reducción del estrés oxidativo causado por H_2O_2 (Willekens *et al.*, 1997; Rizhsky *et al.*, 2002), y la importancia de estas enzimas desintoxicantes en la resistencia al ataque de insectos ha sido recientemente reportada (Kaur *et al.*, 2014).

Un gen candidato para el segundo SNP significativo en el cromosoma 7 codifica una “*Kinase associated protein phosphatase*”. Este tipo de genes ha sido propuesto como reguladores de la respuesta a diferentes tipos de estrés incluyendo el ocasionado por

patógenos y por el ataque de insectos herbívoros (Bajsa *et al.*, 2011). Otro gen relativamente cercano que vale la pena comentar es el *ipt4* (*isopentenyl transferase4*), el cual está involucrado en la regulación de la ruta de biosíntesis de la citoquina (Vyrubalová *et al.*, 2009). La expresión de un gen *itp* (fusionado con un promotor inducible por heridas) en plantas transgénicas de *Nicotiana plumbaginifolia* disminuyó el consumo de hojas por parte del lepidóptero *Manduca sexta* y redujo la supervivencia del áfido *Myzus persicae* (Smigocki *et al.*, 1993). Hay varios reportes sobre la importancia de las citoquinas en la modulación de la defensa de las plantas contra el ataque de patógenos e insectos, pero su papel principal aún no está muy claro (Giron *et al.*, 2013).

Para finalizar se mencionan resumidamente los principales hallazgos de la tesis: en el primer estudio, el mapeo de QTL en la población biparental derivada del cruce EP42 × A637 se detectaron 6 QTL (en cinco cromosomas diferentes) que podrían albergar genes con efectos pequeños sobre la resistencia del maíz al ataque de *S. nongrioides* en este fondo genético; y además se detectaron 12 QTL asociados con caracteres agronómicos, incluyendo un QTL de rendimiento en el cromosoma 5 en el cual podrían haber genes que afectan el rendimiento de grano bajo condiciones de infestación con este insecto. En el segundo estudio, el mapeo de asociación o GWAS realizado en un panel de líneas puras que representan la variabilidad mundial del maíz se detectaron 25 SNP significativamente asociados a tres caracteres de resistencia al ataque de *S. nongrioides*, y se propusieron 22 genes candidatos que podrían estar afectado la resistencia a esta plaga, la mayoría de estos genes desempeñan un papel funcional importante en los mecanismos de defensa de las plantas al ataque de patógenos e insectos. El siguiente paso a este estudio sería la validación de estos genes para ser usados en selección genómica dentro programas de mejoramiento genético del maíz al ataque los taladros.





CONCLUSIONES



6. Conclusiones

- 1.1 Los QTL identificados para longitud de galerías, resistencia de grano y resistencia de pedúnculo en la población de RIL derivada del cruce EP42 x A637 muestran la existencia de genes con efectos aditivos sobre la resistencia del maíz al ataque de *S. nonagrioides* en materiales derivados del cruce entre dos líneas susceptibles.
- 1.2 En base a estos resultados y a resultados previos, el QTL para longitud de galerías hechas por *S. nonagrioides* localizado en un “hot spot” del cromosoma 9 podría estar relacionado con genes que controlan la resistencia en tallo y en hoja al ataque de diferentes especies de barrenadores de maíz y también podría estar ligado a genes que afectan a la altura de planta y mazorca en este material.
- 1.3 La región del cromosoma 5 donde se localizó un QTL para rendimiento bajo infestación artificial con *S. nongarioides* podría estar jugando un papel importante en la tolerancia del maíz a la plaga de los taladros en esta población de líneas recombinantes.
- 1.4 A juzgar por los grandes valores de las estimas del sesgo de la proporción de la varianza genética y de los efectos de los QTL detectados para la mayoría de los caracteres, se concluye que los marcadores asociados con los QTL localizados no son adecuados para usar en selección asistida por marcadores.
- 1.5 El mapeo de asociación descubre regiones genómicas involucradas en la resistencia a los barrenadores del maíz que no fueron detectadas anteriormente usando poblaciones biparentales.
- 1.6 En el panel de asociación se observaron correlaciones genéticas significativas entre caracteres de resistencia y agronómicos, pero no se encontró ninguna región

genómica que albergara polimorfismos significativamente asociados a ambos caracteres.

- 1.7 Se han propuesto veintinueve genes candidatos para los tres caracteres de resistencia. La mayoría de los genes candidatos forman parte de rutas de señalización, otros actúan como reguladores de expresión bajo condiciones de estrés biótico y unos pocos genes codifican enzimas con efecto antibiótico contra insectos tales como el gen *cystatin1* y los que codifican defensinas.
- 1.8 La identificación de polimorfismos en maíz asociados significativamente a caracteres de resistencia al ataque de *S. nonagrioides* son de gran utilidad para entender los mecanismos moleculares que intervienen en la resistencia y, de esa manera, avanzar en el entendimiento de las interacciones planta-insecto. No obstante, es necesario realizar estudios adicionales para validar los genes candidatos identificados en este estudio.





BIBLIOGRAFÍA



7. Bibliografía

- Abe M, Abe K, Kuroda M y Arai S. (1992). Corn kernel cysteine proteinase inhibitor as a novel cystatin superfamily member of plant origin. *Eur. J. Biochem.* 209:933-937.
- Abel C, Pollak LM, Salhuana W, Widrlechner MP y Wilson R. (2001). Registration of GEMS-0001 maize germplasm resistant to leaf blade, leaf sheath, and collar feeding by European corn borer. *Crop Sci.* 41:1651.
- Abel CA, Berhow MA, Wilson RL, Binder BF y Hibbard BE. (2000). Evaluation of conventional resistance to European corn borer (Lepidoptera: Crambidae) and western corn rootworm (Coleoptera: Chrysomelidae) in experimental maize lines developed from a backcross breeding program. *J. Econ. Entomol.* 93:1814-1821.
- Afzal AJ, Wood AJ y Lightfoot DA. (2008). Plant receptor-like serine threonine kinases: Roles in signaling and plant defense. *Mol. Plant-Microbe Interact.* 21:507-517.
- 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. *Mol. Ecol.* 14:3267-3274.
- Allan RK y Ratajczak T. (2011). Versatile TPR domains accommodate different modes of target protein recognition and function. *Cell Stress Chaperones* 16:353-367.
- Anderson JT y Mitchell-Olds T. (2011). Ecological genetics and genomics of plant defences: evidence and approaches. *Funct. Ecol.* 25:312-324.
- Angelini R, Tisi A, Rea G, Chen MM, Botta M, Federico R y Cona A. (2008). Involvement of polyamine oxidase in wound healing. *Plant. Physiol.* 146:162-177.

- Arcade A, Labourdette A, Falque M, Mangin B, Chardon F, Charcosset A y Joets J. (2004). BioMercator: integrating genetic maps and QTL towards discovery of candidate genes. *Bioinformatics* 20:2324-2326.
- Arias A y Alvez C. (1973). Ciclos biológicos de los "taladros de maíz" (*Sesamia nonagrioides* Lef. y *Pyrausta nubilalis* Hb.) durante 1971 en Los Vegas del Guadiana (Badajoz). *Boletín Informativo Plagas* 103:9-87.
- Arimura G-i, Kost C y Boland W. (2005). Herbivore-induced, indirect plant defences. *BBA-Mol. Cell Biol. L.* 1734:91-111.
- Armstrong JS, Abdel-Mageed H, Fokar M, Allen R y Adamczyk Jr JJ. (2013). Dietary effects of cotton tissue expressing germin like protein on beet armyworm (Lepidoptera: Noctuidae) growth, survival and pupation. *Fla. Entomol.* 96:693-700.
- Arriagada O, Mora F, Dellarossa JC, Ferreira MF, Cervigni GD y Schuster I. (2012). Bayesian mapping of quantitative trait loci (QTL) controlling soybean cyst nematode resistant. *Euphytica* 186:907-917.
- Asokan R, Swamy HMM, Thimmegowda GG y Mahmood R. (2014). Diversity analysis and characterization of Coleoptera-, Hemiptera-and Nematode-active *cry* genes in native isolates of *Bacillus thuringiensis*. *Ann. Microbiol.* 64:85-98.
- Atwell S, Huang YS, Vilhjálmsson BJ, Willems G, Horton M, Li Y, . . . Nordborg M. (2010). Genome-wide association study of 107 phenotypes in *Arabidopsis thaliana* inbred lines. *Nature* 465:627-631.
- Bajsa J, Pan Z y Duke SO. (2011). Serine/threonine protein phosphatases: Multi-purpose enzymes in control of defense mechanisms. *Plant. Signal. Behav.* 6:1921.
- Balestre M, Garcia Von Pinho R, Lopes de Souza Junior C y de Sousa Bueno Filho JS. (2012). Bayesian mapping of multiple traits in maize: the importance of pleiotropic effects in studying the inheritance of quantitative traits. *Theor. Appl. Genet.* 125:479-493.

- Barros-Rios J, Malvar RA, Jung H-JG y Santiago R. (2011). Cell wall composition as a maize defense mechanism against corn borers. *Phytochemistry* 72:365-371.
- Barry D y Darrah LL. (1988). Nonpreference resistance to European corn borer (Lepidoptera: Pyralidae) in the Mo-2 ECB maize cultivar. *J. Kansas Entomol. Soc.* 61:72-75.
- Basten CJ, Weir BS y Zeng Z-B. (2004). QTL Cartographer, version 1.17. Department of Statistics, North Carolina State University, Raleigh, NC.
- Beavis WD. (1998). QTL analyses: Power, precision, and accuracy, en: AH Paterson (Ed.), *Molecular dissection of complex traits*, CRC Press, Boca Raton, FL. pp. 145-162.
- Benjamini Y y Hochberg Y. (1995). Controlling the false discovery rate: A practical and powerful approach to multiple testing. *J. Roy. Stat. Soc. B. Met.* 57:289-300.
- Bink M, Jansen J, Madduri M, Voorrips R, Durel C-E, Kouassi A, . . . Gobbin D. (2014). Bayesian QTL analyses using pedigreed families of an outcrossing species, with application to fruit firmness in apple. *Theor. Appl. Genet.* 127:1073-1090.
- Blatch GL y Lässle M. (1999). The tetratricopeptide repeat: a structural motif mediating protein-protein interactions. *Bioessays* 21:932-939.
- Bliss CI. (1967). *Statistics in Biology* McGraw-Hill, New York. pp. 558.
- Bohlmann H y Apel K. (1991). Thionins. *Annu. Rev. Plant Biol.* 42:227-240.
- Bohlmann H y Broekaert W. (1994). The role of thionins in plant protection. *Crit. Rev. Plant Sci.* 13:1-16.
- Bohn M, Groh S, Khairallah MM, Hoisington DA, Utz HF y Melchinger AE. (2001). Re-evaluation of the prospects of marker-assisted selection for improving insect resistance against *Diatraea* spp. in tropical maize by cross validation and independent validation. *Theor. Appl. Genet.* 103:1059-1067.

- Bohn M, Khairallah M, Jiang C, González-de-León D, Hoisington D, Utz H, . . . Melchinger A. (1997). QTL mapping in tropical maize: II. Comparison of genomic regions for resistance to *Diatraea spp.* Crop Sci. 37:1892-1902.
- Bohn M, Khairallah MM, González-de-León D, Hoisington DA, Utz HF, Deutsch JA, . . . Melchinger AE. (1996). QTL mapping in tropical maize: I. Genomic regions affecting leaf feeding resistance to sugarcane borer and other traits. Crop Sci. 36:1352-1361.
- Bohn M, Schulz B, Kreps R, Klein D y Melchinger AE. (2000). QTL mapping for resistance against the European corn borer (*Ostrinia nubilalis* H.) in early maturing European dent germplasm. Theor. Appl. Genet. 101:907-917.
- Bradbury PJ, Zhang Z, Kroon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y y Buckler ES. (2007). TASSEL: software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics 23:2633-2635.
- Breen J y Bellgard M. (2010). Germin-like proteins (GLPs) in cereal genomes: gene clustering and dynamic roles in plant defence. Funct. Integr. Genomics 10:463-476.
- Broekgaarden C, Snoeren TA, Dicke M y Vosman B. (2011). Exploiting natural variation to identify insect-resistance genes. Plant Biotechnol. J. 9:819-825.
- Broman K. (2001). Review of statistical methods for QTL mapping in experimental crosses. Lab Animal 30:44.
- Broman KW, Wu H, Sen S y Churchill GA. (2003). R/qtl: QTL mapping in experimental crosses. Bioinformatics 19:889-890.
- Buckler ES, Holland JB, Bradbury PJ, Acharya CB, Brown PJ, Browne C, . . . McMullen MD. (2009). The genetic architecture of maize flowering time. Science 325:714-718.

- Buendgen MR, Coors JG, Grombacher AW y Russell WA. (1990). European corn borer resistance and cell wall composition of three maize populations. *Crop Sci.* 30:505-510.
- Butrón A, Malvar R, Revilla P, Soengas P, Ordás A y Geiger H. (2002). Rind puncture resistance in maize: inheritance and relationship with resistance to pink stem borer attack. *Plant Breeding* 121:378-382.
- Butrón A, Malvar R, Velasco P, Vales M y Ordás A. (1999a). Combining abilities for maize stem antibiosis, yield loss, and yield under infestation and non infestation with pink stem borer. *Crop Sci.* 39:691-696.
- Butrón A, Malvar RA, Cartea ME, Ordás A y Velasco P. (1999b). Resistance of maize imbeds to pink stem borer. *Crop Sci.* 39:102-107.
- Butrón A, Malvar RA, Velasco P, Cartea ME y Ordás A. (1998a). Combining abilities and reciprocal effects for maize ear resistance to pink stem borer. *Maydica* 43:117-122.
- Butrón A, Malvar RA, Velasco P, Revilla P y Ordás A. (1998b). Defense mechanisms of maize against pink stem borer. *Crop Sci.* 38:1159-1163.
- Butron A, Malvar RA, Velasco P, Vales MI y Ordas A. (1999). Combining abilities for maize stem antibiosis, yield loss, and yield under infestation and non infestation with pink stem borer. *Crop Sci.* 39:691-696.
- Butrón A, Romay MC, Peña-Asin J, Alvarez A y Malvar RA. (2012). Genetic relationship between maize resistance to corn borer attack and yield. *Crop Sci.* 52:1176-1180.
- Butrón A, Samayoa F, Santiago R y Malvar R. (2014). Selection efficiency of tunnel length and stalk breakage to obtain maize inbred lines resistant to stem borer attack. *Euphytica* 197:295-302.

- Butrón A, Sandoya G, Revilla P y Malvar R. (2009). Genetics of resistance to the pink stem borer (*Sesamia nonagrioides*) in maize (*Zea mays*). *Ann. Appl. Biol.* 154:205-217.
- Butrón A, Sandoya G, Revilla P, Ordás A y Malvar R. (2005a). Evaluation of popcorn germplasm for resistance to *Sesamia nonagrioides* attack. *J. Econ. Entomol.* 98:1694-1697.
- Butrón A, Sandoya G, Santiago R, Ordás A, Rial A y Malvar RA. (2006). Searching for new sources of pink stem borer resistance in maize (*Zea mays* L). *Genet. Resour. Crop Ev.* 53:1455-1462.
- Butrón A, Tarrío R, Revilla P, Malvar RA y Ordás A. (2003). Molecular evaluation of two methods for developing maize synthetic varieties. *Mol. Breeding* 12:329-333.
- Butrón A, Tarrío R, Revilla P, Ordás A y Malvar R. (2005b). Molecular changes in the maize composite EPS12 during selection for resistance to pink stem borer. *Theor. Appl. Genet.* 110:1044-1051.
- Campagne P, Kruger M, Pasquet R, Le Ru B y Van den Berg J. (2013). Dominant inheritance of field-evolved resistance to *Bt* corn in *Busseola fusca*. *PloS One* 8:e69675.
- Camus-Kulandaivelu L, Veyrieras J-B, Madur D, Combes V, Fourmann M, Barraud S, . . Charcosset A. (2006). Maize adaptation to temperate climate: relationship between population structure and polymorphism in the *Dwarf8* gene. *Genetics* 172:2449-2463.
- Cardinal AJ, Lee M, Guthrie WD, Bing J, Austin DF, Veldboom LR y Senior ML. (2006). Mapping of factors for resistance to leaf-blade feeding by European corn borer (*Ostrinia nubilalis*) in maize. *Maydica* 51:93-102.

- Cardinal AJ, Lee M, Sharopova N, Woodman WL y Long MJ. (2001). Genetic mapping and analysis of quantitative trait loci for resistance to stalk tunneling by European corn borer in maize. *Crop Sci.* 41:835-845.
- Cartea ME, Malvar RA, Butrón A, Vales MI y Ordás A. (1999). Inheritance of antibiosis to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *J. Econ. Entomol.* 92:994-998.
- Cartea ME, Malvar RA, Vales I, Butrón A y Ordás A. (2001). Inheritance of resistance to ear damage caused by *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) in maize. *J. Econ. Entomol.* 94:277-283.
- 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.
- Cordero A, Malvar RA, Butrón A, Revilla P, Velasco P y Ordás A. (1998). Population dynamics and life-cycle of corn borers in South Atlantic European Coast. *Maydica* 43:5-12.
- Chan EK, Rowe HC y Kliebenstein DJ. (2010). Understanding the evolution of defense metabolites in *Arabidopsis thaliana* using genome-wide association mapping. *Genetics* 185:991-1007.
- Chen M-S. (2008). Inducible direct plant defense against insect herbivores: A review. *Insect Sci.* 15:101-114.
- Davidson RM, Reeves PA, Manosalva PM y Leach JE. (2009). Germins: A diverse protein family important for crop improvement. *Plant Sci.* 177:499-510.
- De Coninck B, Cammue B y Thevissen K. (2013). Modes of antifungal action and *in planta* functions of plant defensins and defensin-like peptides. *Fungal Biol. Rev.* 26:109-120.

- Devlin B y Roeder K. (1999). Genomic control for association studies. *Biometrics* 55:997-1004.
- Doerge RW. (2002). Mapping and analysis of quantitative trait loci in experimental populations. *Nat. Rev. Genet.* 3:43-52.
- Donnelly P. (2008). Progress and challenges in genome-wide association studies in humans. *Nature* 456:728-731.
- Duan Y, Ge C, Liu S, Wang J y Zhou M. (2013). A two-component histidine kinase *Shk1* controls stress response, sclerotial formation and fungicide resistance in *Sclerotinia sclerotiorum*. *Mol. Plant Pathol.* 14:708-718.
- Ducrocq S, Giauffret C, Madur D, Combes V, Dumas F, Jouanne S, . . . Charcosset A. (2009). Fine mapping and haplotype structure analysis of a major flowering time quantitative trait locus on maize chromosome 10. *Genetics* 183:1555-1563.
- Dunwell JM, Gibbings JG, Mahmood T y Saqlan Naqvi S. (2008). Germin and germin-like proteins: evolution, structure, and function. *Crit. Rev. Plant Sci.* 27:342-375.
- Edwards M, Stuber C y Wendel J. (1987). Molecular-marker-facilitated investigations of quantitative-trait loci in maize. I. Numbers, genomic distribution and types of gene action. *Genetics* 116:113-125.
- Eizaguirre M y Albajes R. (1992). Diapause induction in the stem corn borer *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera, Noctuidae). *Entomol. Gen.* 17:277-283.
- Eizaguirre M y Fantinou AA. (2012). Abundance of *Sesamia nonagrioides* (Lef.)(Lepidoptera: Noctuidae) on the edges of the Mediterranean basin. *Psyche: A J. Entomol.* 2012:1-7.
- Engelsdorf T y Hamann T. (2014). An update on receptor-like kinase involvement in the maintenance of plant cell wall integrity. *Ann. Bot.* DOI: 10.1093/aob/mcu043.

- Fabrick J, Behnke C, Czapla T, Bala K, Rao A, Kramer K y Reeck G. (2002). Effects of a potato cysteine proteinase inhibitor on midgut proteolytic enzyme activity and growth of the southern corn rootworm, *Diabrotica undecimpunctata howardi* (Coleoptera: Chrysomelidae). *Insect Biochem. Mol. Biol.* 32:405-415.
- FAOSTAT. (2011). Statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>. Acceso: May 2014.
- FAOSTAT. (2014). Statistical database. Food and Agriculture Organization of the United Nations, FAO. Disponible en: <http://faostat.fao.org/>. Acceso: May 2014.
- Faria MRd y Wraight SP. (2007). Mycoinsecticides and mycoacaricides: A comprehensive list with worldwide coverage and international classification of formulation types. *Biol. Control* 43:237-256.
- Fernando R, Nettleton D, Southey B, Dekkers J, Rothschild M y Soller M. (2004). Controlling the proportion of false positives in multiple dependent tests. *Genetics* 166:611-619.
- Flint-Garcia SA, Jampatong C, Darrah LL y McMullen MD. (2003). Quantitative trait locus analysis of stalk strength in four maize populations. *Crop Sci.* 43:13-22.
- Flint-Garcia SA, Thuillet A-C, Yu J, Pressoir G, Romero SM, Mitchell SE, . . . Buckler ES. (2005). Maize association population: a high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant J.* 44:1054-1064.
- Ganal MW, Durstewitz G, Polley A, Bérard A, Buckler ES, Charcosset A, . . . Falque M. (2011). A large maize (*Zea mays* L.) SNP genotyping array: development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. *PloS One* 6:e28334.
- Giron D, Frago E, Glevarec G, Pieterse CM y Dicke M. (2013). Cytokinins as key regulators in plant-microbe-insect interactions: connecting plant growth and defence. *Funct. Ecol.* 27:599-609.

- GNU. (2009). GNU Grep: Print lines matching a pattern. Versión. 2.5.4. Free Software Foundation, Inc. Boston, MA. USA.
- Graham GI, Wolff DW y Stuber CW. (1997). Characterization of a yield quantitative trait locus on chromosome five of maize by fine mapping. *Crop Sci.* 37:1601-1610.
- Granot D, David-Schwartz R y Kelly G. (2013). Hexose kinases and their role in sugar-sensing and plant development. *Front. Plant Sci.* 4:1-17.
- Groh S, González-de-León D, Khairallah MM, Jiang C, Bergvinson D, Bohn M, . . . Melchinger AE. (1998). QTL mapping in tropical maize III. Genomic regions for resistance to *Diatraea spp.* and associated traits in two RIL populations. *Crop Sci.* 1998:1062-1072.
- Haley CS y Knott SA. (1992). A simple regression method for mapping quantitative trait loci in line crosses using flanking markers. *Heredity* 69:315-324.
- Hallauer AR y Miranda J. (1981). Quantitative genetics in maize breeding Iowa State University Press, Ames, Iowa, USA. pp. 869.
- Harper LC, Schaeffer ML, Thistle J, Gardiner J, Andorf C, Campbell D, . . . Sen T. (2011). The MaizeGDB Genome Browser tutorial: one example of database outreach to biologists via video. *Database* 2011:1-7.
- Hastings WK. (1970). Monte Carlo sampling methods using Markov chains and their applications. *Biometrika* 57:97-109.
- Hellmann HA y Smeeckens S. (2014). Sugar sensing and signaling in plants. *Front. Plant Sci.* 5:113.
- Henty-Ridilla JL, Li J, Day B y Staiger CJ. (2014). ACTIN DEPOLYMERIZING FACTOR4 regulates actin dynamics during innate immune signaling in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 26:340-352.

- Hershko A y Ciechanover A. (1992). The ubiquitin system for protein degradation. *Annu. Rev. Biochem.* 61:761-807.
- Holland JB. (2006). Estimating genotypic correlations and their standard errors using multivariate restricted maximum likelihood estimation with SAS Proc MIXED. *Crop Sci.* 46:642-656.
- Holland JB. (2007). Genetic architecture of complex traits in plants. *Curr. Opin. Plant Biol.* 10:156-161.
- Holland JB, Nyquist WE y Cervantes-Martínez CT. (2003). Estimated an interpreting heritability for plant breeding: An update, en: J Janick (Ed.), *Plant Breeding Reviews*, John Wiley & Sons, Hoboken, New Jersey, USA. pp. 9-112.
- Hudon M y Chiang MS. (1991). Evaluation of resistance of maize germplasm to the univoltine European corn borer *Ostrinia nubilalis* (Hübner) and relationship with maize maturity in Quebec. *Maydica* 36:69-74.
- Igarashi D, Tsuda K y Katagiri F. (2012). The peptide growth factor, phytosulfokine, attenuates pattern-triggered immunity. *Plant J.* 71:194-204.
- James C. (2012). Global status of commercialized biotech/GM crops: 2012 ISAAA, Ithaca, NY, USA. pp. 307.
- James C. (2013). Executive Summary - Global status of commercialized biotech/GM crops: 2013 ISAAA, Ithaca, NY, USA. pp. 13.
- Jamapatong C, McMullen MD, Barry D, Darrah LL, Byrne PF y Kross H. (2002). Quantitative trait loci for first- and second-generation European corn borer resistance derived from the maize inbred Mo47. *Crop Sci.* 42:584-593.
- Jansen RC. (1993). Interval mapping of multiple quantitative trait loci. *Genetics* 135:205-211.
- Jiang C y Zeng Z-B. (1995). Multiple trait analysis of genetic mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 140:1111-1127.

- Jones DA y Jones J. (1997). The role of leucine-rich repeat proteins in plant defences. *Adv. Bot. Res.* 24:90-168.
- Joukhadar R, El-Bouhssini M, Jighly A y Ogbonnaya F. (2013). Genome-wide association mapping for five major pest resistances in wheat. *Mol. Breeding* 32:943-960.
- Kao C-H, Zeng Z-B y Teasdale RD. (1999). Multiple interval mapping for quantitative trait loci. *Genetics* 152:1203-1216.
- Kaur R, Gupta AK y Taggar GK. (2014). Role of catalase, H₂O₂ and phenolics in resistance of pigeonpea towards *Helicoverpa armigera* (Hubner). *Acta Physiol. Plant.* 36:1513-1527.
- Kelley DR y Estelle M. (2012). Ubiquitin-mediated control of plant hormone signaling. *Plant. Physiol.* 160:47-55.
- Kessler A y Baldwin IT. (2002). Plant responses to insect herbivory: The emerging molecular analysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 53:299-328.
- Khairallah M, Bohn M, Jiang C, Deutsch J, Jewell D, Mihm J, . . . Hoisington D. (1998). Molecular mapping of QTL for southwestern corn borer resistance, plant height and flowering in tropical maize. *Plant Breeding* 117:309-318.
- Kloth KJ, Thoen MP, Bouwmeester HJ, Jongsma MA y Dicke M. (2012). Association mapping of plant resistance to insects. *Trends Plant Sci.* 17:311-319.
- Knapp S. (1991). Using molecular markers to map multiple quantitative trait loci: models for backcross, recombinant inbred, and doubled haploid progeny. *Theor. Appl. Genet.* 81:333-338.
- Knapp SJ. (1994). Mapping quantitative trait loci, en: RL Phillips and IK Vasil (Eds.), *DNA-Based markers in plants*, Kluwer Academic Publishers Dordrecht. pp. 384.

- Krakowsky MD, Brinkman MJ, Woodman WL y Lee M. (2002). Genetic components of resistance to stalk tunneling by the European corn borer in maize. *Crop Sci.* 42:1309-1315.
- Krakowsky MD, Lee M y Holland JB. (2007). Genotypic correlation and multivariate QTL analyses for cell wall components and resistance to stalk tunneling by the European corn borer in maize. *Crop Sci.* 47:485-488.
- Krakowsky MD, Lee M, Woodman WL, Long MJ y Sharopova N. (2004). QTL mapping of resistance to stalk tunneling by the European corn borer in RILs of maize population B73×De811. *Crop Sci.* 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.
- Lacey L, Frutos R, Kaya H y Vail P. (2001). Insect pathogens as biological control agents: Do they have a future? *Biol. Control* 21:230-248.
- Lander ES y Botstein D. (1989). Mapping mendelian factors underlying quantitative traits using RFLP linkage maps. *Genetics* 121:185-199.
- Lander ES, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daly MJ, Lincoln SE y Newburg L. (1987). MAPMAKER: An interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1:174-181.
- Larue P. (1984). La sesamie du maïs (*Sesamia nonagrioides* Lef) degats et actualisation de la lutte. *Def. Veg.* 227:163-179.
- Lee U, Rioflorido I, Hong SW, Larkindale J, Waters ER y Vierling E. (2007). The Arabidopsis ClpB/Hsp100 family of proteins: chaperones for stress and chloroplast development. *Plant J.* 49:115-127.

- Li MJ, Wang P, Liu X, Lim EL, Wang Z, Yeager M, . . . Wang J. (2011). GWASdb: a database for human genetic variants identified by genome-wide association studies. *Nucleic Acids Res.* 40:D1047-D1050.
- Lipka AE, Tian F, Wang Q, Peiffer J, Li M, Bradbury PJ, . . . Zhang Z. (2012). GAPIT: genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics* 28:2397-2399.
- Liu K, Goodman M, Muse S, Smith JS, Buckler ES y Doebley J. (2003). Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics* 165:2117-2128.
- Liu Y. (2010). Investigation of a KNAT7-BLH-OFP transcription factor complex involved in regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis thaliana*. MSc Thesis. Botany. University of British Columbia. Vancouver. pp. 67.
- Liu YG y Whittier RF. (1994). Rapid preparation of megabase plant DNA from nuclei in agarose plugs and microbeads. *Nucleic Acids Res.* 22:2168.
- Long AD, Grote MN y Langley CH. (1997). Genetic analysis of complex diseases. *Science* 275:1328.
- Ma F, Lu R, Liu H, Shi B, Zhang J, Tan M, . . . Jiang M. (2012). Nitric oxide-activated calcium/calmodulin-dependent protein kinase regulates the abscisic acid-induced antioxidant defence in maize. *J. Exp. Bot.* 63:4835-4847.
- Mackay I y Powell W. (2007). Methods for linkage disequilibrium mapping in crops. *Trends Plant Sci.* 12:57-63.
- Malvar RA, Butrón A, Alvarez A, Ordás B, Soengas P, Revilla P y Ordás A. (2004a). Evaluation of the European Union maize landrace core collection for resistance to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae) and *Ostrinia nubilalis* (Lepidoptera: Crambidae). *J. Econ. Entomol.* 97:628-634.
- Malvar RA, Butrón A, Revilla P y Ordás A. (2004b). Resistance to the pink stem borer, *Sesamia nonagrioides*, in maize. *Recent. Res. Devel. Plant Sci.* 2:1-32.

- Malvar RA, Cartea ME, Revilla P, Ordás A, Alvarez A y Mansilla JP. (1993). Sources of resistance to pink stem borer and European corn borer in maize. *Maydica* 38:313-319.
- Mangeon A, Junqueira RM y Sachetto-Martins G. (2010). Functional diversity of the plant glycine-rich proteins superfamily. *Plant. Signal. Behav.* 5:99-104.
- Martinez O y Curnow R. (1992). Estimating the locations and the sizes of the effects of quantitative trait loci using flanking markers. *Theor. Appl. Genet.* 85:480-488.
- Mazomenos B. (1989). Sex pheromone components of corn stalk borer *Sesamia nonagriodes* (Lef.) isolation, identification, and field tests. *J. Chem. Ecol.* 15:1241-1247.
- McCann MC y Carpita NC. (2008). Designing the deconstruction of plant cell walls. *Curr. Opin. Plant Biol.* 11:314-320.
- McMullen MD, Frey M y Degenhardt J. (2009). Genetics and biochemistry of insect resistance in maize, en: JL Bennetzen and SC Hake (Eds.), *Handbook of maize: Its biology*, Springer. pp. 271-289.
- Meihls LN, Kaur H y Jander G. (2012). Natural variation in maize defense against insect herbivores. *Cold Spring Harb. Sym.* 77:269-283.
- Meijer HJ y Munnik T. (2003). Phospholipid-based signaling in plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* 54:265-306.
- Meissle M, Romeis J y Bigler F. (2011). *Bt* maize and integrated pest management - a European perspective. *Pest. Manag. Sci.* 67:1049-1058.
- Melchinger AE, Utz HF y Schön CC. (2004). QTL analyses of complex traits with cross validation, bootstrapping and other biometric methods. *Euphytica* 137:1-11.
- Metzker ML. (2009). Sequencing technologies-the next generation. *Nat. Rev. Genet.* 11:31-46.

- Mithöfer A y Boland W. (2012). Plant defense against herbivores: Chemical aspects. *Annu. Rev. Plant Biol.* 63:431-450.
- Mitsuda N, Seki M, Shinozaki K y Ohme-Takagi M. (2005). The NAC transcription factors NST1 and NST2 of *Arabidopsis* regulate secondary wall thickenings and are required for anther dehiscence. *Plant Cell* 17:2993-3006.
- Monetti L, Ordás Pérez A, Malvar Pintos RA y Cordero-Rivera A. (2003). PARASITOIDS INCIDENCE AND DIVERSITY ON MAIZE STEM BORERS *Sesamia nonagrioides* Lefèbvre AND *Ostrinia nubilalis* Hübner IN NW SPAIN. *Maydica* 48:133-139.
- Moreno-Gonzalez J. (1992a). Estimates of marker-associated QTL effects in Monte Carlo backcross generations using multiple regression. *Theor. Appl. Genet.* 85:423-434.
- Moreno-Gonzalez J. (1992b). Genetic models to estimate additive and non-additive effects of marker-associated QTL using multiple regression techniques. *Theor. Appl. Genet.* 85:435-444.
- Morkunas I y Ratajczak L. (2014). The role of sugar signaling in plant defense responses against fungal pathogens. *Acta Physiol. Plant.* 8:409-414.
- Myles S, Peiffer J, Brown PJ, Ersoz ES, Zhang Z, Costich DE y Buckler ES. (2009). Association mapping: Critical considerations shift from genotyping to experimental design. *Plant Cell* 21:2194-2202.
- Nielsen DM y Zaykin D. (2001). Association mapping: where we've been, where we're going. *Expert Rev. Mol. Diagn.* 1:334-342.
- Niu Y y Figueroa P. (2011). Characterization of JAZ-interacting bHLH transcription factors that regulate jasmonate responses in *Arabidopsis*. *J. Exp. Bot.* 62:2143-2154.

- Nogueira FT, Schlögl PS, Camargo SR y Fernandez JH. (2005). SsNAC23, a member of the NAC domain protein family, is associated with cold, herbivory and water stress in sugarcane. *Plant Sci.* 169:93-106.
- Nürnberg T y Kemmerling B. (2006). Receptor protein kinases–pattern recognition receptors in plant immunity. *Trends Plant Sci.* 11:519-522.
- Olukolu BA, Negeri A, Dhawan R, Venkata B, Sharma P, Garg A, . . . Balint-Kurti P. (2013). A connected set of genes associated with programmed cell death implicated in controlling the hypersensitive response in maize. *Genetics* 193:609-620.
- Oraguzie NC y Wilcox PL. (2007). An overview of association mapping, en: NC Oraguzie, et al. (Eds.), *Association mapping in plants*, Springer, New York, USA. pp. 1-9.
- Ordás B, Alvarez A, Revilla P, Butrón A y Malvar RA. (2013). Relationship between time to flowering and stalk and ear damage by second generation corn borers. *J. Econ. Entomol.* 106:1234-1239.
- 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.). *Theor. Appl. Genet.* 124:1183-1191.
- Ordás B, Butrón A, Soengas P, Ordás A y Malvar RA. (2002). Antibiosis of the pith maize to *Sesamia nonagrioides* (Lepidoptera: Noctuidae). *J. Econ. Entomol.* 95:1044-1048.
- Ordás B, Malvar RA, Santiago R y Butrón A. (2010). QTL mapping for Mediterranean corn borer resistance in European flint germplasm using recombinant inbred lines. *BMC Genomics* 11:1-10.
- Ordás B, Malvar RA, Santiago R, Sandoya G, Romay MC y Butrón A. (2009). Mapping of QTL for resistance to the Mediterranean corn borer attack using the

- intermated B73×Mo17 (IBM) population in maize. *Theor. Appl. Genet.* 119:1451-1459.
- Orsini E, Krchov L, Uphaus J y Melchinger A. (2012). Mapping of QTL for resistance to first and second generation of European corn borer using an integrated SNP and SSR linkage map. *Euphytica* 183:197-206.
- Painter RH. (1951). Insect resistance in crop plants. *Soil Sci.* 72:481.
- Papst C, Bohn M, Utz HF, Melchinger AE, Klein D y Eder J. (2004). QTL mapping for European corn borer resistance (*Ostrinia nubilalis* Hb.), agronomic and forage quality traits of testcross progenies in early- maturing European maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 108:1545-1554.
- Papst C, Melchinger AE, 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.
- Paterson AH, Lander ES, Hewitt JD, Peterson S, Lincoln SE y Tanksley SD. (1988). Resolution of quantitative traits into Mendelian factors by using a complete linkage map of restriction fragment length polymorphisms. *Nature* 335:721-726.
- Peiffer JA, Roday MC, Gore MA, Flint-Garcia SA, Zhang Z, Millard MJ, . . . Buckler ES. (2014). The genetic architecture of maize height. *Genetics* 196:1337-1357.
- Poelman EH, van Loon JJ y Dicke M. (2008). Consequences of variation in plant defense for biodiversity at higher trophic levels. *Trends Plant Sci.* 13:534-541.
- Pogorelko GV, Mokryakova M, Fursova OV, Abdeeva I, Piruzian ES y Bruskin SA. (2014). Characterization of three *Arabidopsis thaliana* immunophilin genes involved in the plant defense response against *P. syringae*. *Gene* 538:12-22.

- Porter K, Shimono M, Tian M y Day B. (2012). Arabidopsis Actin-Depolymerizing Factor-4 links pathogen perception, defense activation and transcription to cytoskeletal dynamics. *PloS Pathog.* 8:e1003006.
- Pritchard JK, Stephens M y Donnelly P. (2000). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155:945-959.
- Qi T, Huang H, Wu D, Yan J, Qi Y, Song S y Xie D. (2014). Arabidopsis DELLA and JAZ Proteins Bind the WD-Repeat/bHLH/MYB Complex to Modulate Gibberellin and Jasmonate Signaling Synergy. *Plant Cell* 26:1118-1133.
- R Core Team. (2013). R: A language and environment for statistical computing. Versión. 3.0.1. R Foundation for Statistical Computing. Vienna, Austria.
- Raman H, Stodart B, Ryan PR, Delhaize E, Emebiri L, Raman R, . . . Milgate A. (2010). Genome-wide association analyses of common wheat (*Triticum aestivum* L.) germplasm identifies multiple loci for aluminium resistance *Genome* 53:957-966.
- Rincent R, Laloë D, Nicolas S, Altmann T, Brunel D, Revilla P, . . . 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.
- Ringli C, Keller B y Ryser U. (2001). Glycine-rich proteins as structural components of plant cell walls. *Cell. Mol. Life Sci.* 58:1430-1441.
- Risch N y Merikangas K. (1996). The future of genetic studies of complex human diseases. *Science* 273:1516-1517.
- Ritland K. (1996). Estimators for pairwise relatedness and individual inbreeding coefficients. *Genet. Res.* 67:175-185.
- Rizhsky L, Hallak-Herr E, Van Breusegem F, Rachmilevitch S, Barr JE, Rodermeil S, . . . Mittler R. (2002). Double antisense plants lacking ascorbate peroxidase and

catalase are less sensitive to oxidative stress than single antisense plants lacking ascorbate peroxidase or catalase. *Plant J.* 32:329-342.

Rodriguez PA. (2011). Analysis of *AtPSKR1*, an LRR receptor protein kinase, and other PSK-signalling components in plant defence responses. PhD Thesis. Mathematics and Natural Sciences. University of Tübingen. Tübingen, Germany. pp. 123.

Romay MC, Millard MJ, Glaubitz JC, Peiffer J, Swarts K, Casstevens TM, . . . Gardner C. (2013). Comprehensive genotyping of the USA national maize inbred seed bank. *Genome Biol.* 14:1-18.

Russell WA, Guthrie WD y Grindeland RL. (1974). Breeding for resistance in maize to first and second broods of the European corn borer. *Crop Sci.* 14:725-727.

Ryan CA. (2000). The systemin signaling pathway: differential activation of plant defensive genes. *BBA-Protein Struct. M.* 1477:112-121.

Ryser U, Schorderet M, Guyot R y Keller B. (2004). A new structural element containing glycine-rich proteins and rhamnogalacturonan I in the protoxylem of seed plants. *J. Cell Sci.* 117:1179-1190.

Salvi S, Sponza G, Morgante M, Tmes D, Niu X, Fengler KA, . . . Bruggemann E. (2007). Conserved noncoding genomic sequences associated with a flowering-time quantitative trait locus in maize. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 104:11376-11381.

Salvi S, Tuberosa R, Chiapparino E, Maccaferri M, Veillet S, van Beuningen L, . . . Phillips RL. (2002). Toward positional cloning of *Vgt1*, a QTL controlling the transition from the vegetative to the reproductive phase in maize. *Plant Mol. Biol.* 48:601-613.

Samayoa LF, Butrón A, Revilla P, Alvarez A y Malvar RA. (2012). Five cycles of mass selection for earliness and ear appearance under corn borer infestation in the maize synthetic BS17. *Crop Sci.* 52:2432-2437.

- Sandoya G, Butrón A, Alvarez A, Ordás A y Malvar R. (2008). Direct response of a maize synthetic to recurrent selection for resistance to stem borers. *Crop Sci.* 48:113-118.
- Sannino L, Espinosa B y Campese B. (2004). Melon: a new host of *Sesamia nonagrioides* (Lefebvre). *Inf. Fitopatol.* 54:32-34.
- Santiago R, Souto X, Sotelo J, Butrón A y Malvar R. (2003). Relationship between maize stem structural characteristics and resistance to pink stem borer (Lepidoptera: Noctuidae) attack. *J. Econ. Entomol.* 96:1563-1570.
- Santner A y Estelle M. (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. *Plant J.* 61:1029-1040.
- SAS Institute Inc. (2011). SAS 9.3 Guide to software updates. Cary, NC: SAS Institute Inc.
- Sasaki-Sekimoto Y, Jikumaru Y, Obayashi T, Saito H, Masuda S, Kamiya Y, . . . Shirasu K. (2013). Basic Helix-Loop-Helix transcription factors JASMONATE-ASSOCIATED MYC2-LIKE1 (JAM1), JAM2, and JAM3 are negative regulators of jasmonate responses in Arabidopsis. *Plant. Physiol.* 163:291-304.
- Schnable PS, Ware D, Fulton RS, Stein JC, Wei F, Pasternak S, . . . Graves TA. (2009). The B73 maize genome: complexity, diversity, and dynamics. *Science* 326:1112-1115.
- Schnepf E, Crickmore N, Van Rie J, Lereclus D, Baum J, Feitelson J, . . . Dean D. (1998). *Bacillus thuringiensis* and its pesticidal crystal proteins. *Microbiol. Mol. Biol.* 62:775-806.
- Schön CC, Lee M, Melchinger AE, Guthrie WD y Woodman WL. (1993). Mapping and characterization of quantitative trait loci affecting resistance against second-generation European corn borer in maize with the aid of RFLPs. *Heredity* 70:648-659.

- Schön CC, Utz HF, Groh S, Truberg B, Openshaw S y Melchinger AE. (2004). Quantitative trait locus mapping based on resampling in a vast maize testcross experiment and its relevance to quantitative genetics for complex traits. *Genetics* 167:485-498.
- 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 TG y McMahon FJ. (2002). Genetic association mapping at the crossroads: Which test and why? Overview and practical guidelines. *Am. J. Med. Genet.* 114:1-11.
- Sen S y Churchill GA. (2001). A statistical framework for quantitative trait mapping. *Genetics* 159:371-387.
- Shiau Y-S, Horng S-B, Chen C-S, Huang P-T, Lin C, Hsueh Y-C y Lou K-L. (2006). Structural analysis of the unique insecticidal activity of novel mungbean defensin VrD1 reveals possibility of homoplasy evolution between plant defensins and scorpion neurotoxins. *J. Mol. Recognit.* 19:441-450.
- Showalter AM. (1993). Structure and function of plant cell wall proteins. *Plant Cell* 5:9.
- Smigocki A, Neal Jr J, McCanna I y Douglass L. (1993). Cytokinin-mediated insect resistance in *Nicotiana* plants transformed with the *ipt* gene. *Plant Mol. Biol.* 23:325-335.
- Solé J, Sans A, Riba M, Rosa E, Bosch M, Barrot M, . . . 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. *Entomol. Exp. Appl.* 126:28-39.
- Song S, Qi T, Fan M, Zhang X, Gao H, Huang H, . . . Xie D. (2013). The bHLH subgroup IIIId factors negatively regulate jasmonate-mediated plant defense and development. *PloS Genet.* 9:e1003653.

- Soto-Cerda BJ y Cloutier S. (2012). Association mapping in plant genomes, en: M Çalışkan (Ed.), Genetic Diversity in Plants, InTech. pp. 29-54.
- Speiser B y Tamm L. (2011). Regulation of plant protection in organic farming, en: R-U Ehlers (Ed.), Regulation of Biological Control Agents, Springer, Kiel, Germany. pp. 113-125.
- Staiger CJ, Gibbon BC, Kovar DR y Zonia LE. (1997). Profilin and actin-depolymerizing factor: modulators of actin organization in plants. Trends Plant Sci. 2:275-281.
- Storey JD. (2002). A direct approach to false discovery rates. J. Roy. Stat. Soc. B. Met. 64:479-498.
- Storey JD y Tibshirani R. (2003). Statistical significance for genomewide studies. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 100:9440-9445.
- Sturm A. (1992). A wound-inducible glycine-rich protein from *Daucus carota* with homology to single-stranded nucleic acid-binding proteins. Plant. Physiol. 99:1689-1692.
- Szczegielniak J, Borkiewicz L, Szurmak B, Lewandowska-Gnatowska E, Statkiewicz M, Klimecka M, . . . Muszyńska G. (2012). Maize calcium-dependent protein kinase (ZmCPK11): local and systemic response to wounding, regulation by touch and components of jasmonate signaling. Physiol. Plant. 146:1-14.
- Szczegielniak J, Klimecka M, Liwosz A, Ciesielski A, Kaczanowski S, Dobrowolska G, . . . Muszyńska G. (2005). A wound-responsive and phospholipid-regulated maize calcium-dependent protein kinase. Plant. Physiol. 139:1970-1983.
- Tabashnik BE, Brévault T y Carrière Y. (2013). Insect resistance to Bt crops: lessons from the first billion acres. Nat. Biotechnol. 31:510-521.
- Tarasco E. (2001). "Damaging insects in asparagus". Informatore Agrario 57:36-38.
- Tian M, Chaudhry F, Ruzicka DR, Meagher RB, Staiger CJ y Day B. (2009). Arabidopsis actin-depolymerizing factor AtADF4 mediates defense signal transduction

- triggered by the *Pseudomonas syringae* effector AvrPphB. Plant. Physiol. 150:815-824.
- Truntzler M, Barrière Y, Sawkins MC, Lespinasse D, Betran J, Charcosset A y Moreau L. (2010). Meta-analysis of QTL involved in silage quality of maize and comparison with the position of candidate genes. Theor. Appl. Genet. 121:1465-1482.
- Ussuf K, Laxmi N y Mitra R. (2001). Proteinase inhibitors: plant-derived genes of insecticidal protein for developing insect-resistant transgenic plants. Curr. Sci. India 80:847-853.
- Utz HF. (2012). PlabMQTL - Software for meta-QTL analysis with composite interval mapping. Version 0.9. Institute of Plant Breeding, Seed Science, and Population Genetics, University of Hohenheim.
- Utz HF y Melchinger AE. (1994). Comparison of different approaches to interval mapping of quantitative trait loci, en: JW Van Ooijen and J Jansen (Eds.), Biometrics in plant breeding: applications of molecular markers. Proceedings of the Ninth Meeting of the EUCARPIA Selection Biometrics in Plant Breeding. CPRO-DLO. Wageningen, The Netherlands. pp. 195-204.
- Utz HF, Melchinger AE y Schön CC. (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. Turk. Entomol. Derg.-Turk. J. Entomol. 17:33-40.
- Valdar W, Holmes CC, Mott R y Flint J. (2009). Mapping in structured populations by resample model averaging. Genetics 182:1263-1277.

- Vega FE, Goettel MS, Blackwell M, Chandler D, Jackson MA, Keller S, . . . Roy H. (2009). Fungal entomopathogens: new insights on their ecology. *Fungal Ecology* 2:149-159.
- Velasco P, Malvar RA, Butrón A, Revilla P y Ordás A. (1999). Ear feeding resistance of sweet corn inbreds to pink stem borer. *J. Am. Soc. Hortic. Sci.* 124:268-272.
- Velasco P, Revilla P, Butrón A, Ordás B, Ordás A y Malvar RA. (2002). Ear damage of sweet corn inbreds and their hybrids under multiple corn borer infestation. *Crop Sci.* 42:724-729.
- Velasco P, Revilla P, Monetti L, Butrón A, Ordás A y Malvar RA. (2007). Corn borers (Lepidoptera: Noctuidae; Crambidae) northwestern Spain: population dynamics and distribution. *Maydica* 52:195-203.
- Vyroubalová Š, Václavíková K, Turečková V, Novák O, Šmehilová M, Hluska T, . . . Galuszka P. (2009). Characterization of new maize genes putatively involved in cytokinin metabolism and their expression during osmotic stress in relation to cytokinin levels. *Plant. Physiol.* 151:433-447.
- Wang D, Shi J, Carlson SR, Cregan PB, Ward RW y Diers BW. (2003). A low-cost, high-throughput polyacrylamide gel electrophoresis system for genotyping with microsatellite DNA markers. *Crop Sci.* 43:1828-1832.
- Wang D, Zhu J, Li Z y Paterson A. (1999). Mapping QTLs with epistatic effects and QTL× environment interactions by mixed linear model approaches. *Theor. Appl. Genet.* 99:1255-1264.
- Weller JL, Song JZ, Heyen DW, Lewin HA y Ron M. (1998). A new approach to the problem of multiple comparisons in the genetic dissection of complex traits. *Genetics* 150:1699-1706.
- Willekens H, Chamnongpol S, Davey M, Schraudner M, Langebartels C, Van Montagu M, . . . Van Camp W. (1997). Catalase is a sink for H₂O₂ and is indispensable for stress defence in C₃ plants. *EMBO J.* 16:4806-4816.

- Willmot D, Hibbard B, Barry B, Antonio A y Darrah L. (2005). Registration of Mo48 and Mo49 maize germplasm lines with resistance to European corn borer. *Crop Sci.* 45:426-427.
- Wimalasekera R, Tebartz F y Scherer GF. (2011). Polyamines, polyamine oxidases and nitric oxide in development, abiotic and biotic stresses. *Plant Sci.* 181:593-603.
- Wu Y y Zhou JM. (2013). Receptor-Like Kinases in Plant Innate Immunity. *J. Integr. Plant Biol.* 55:1271-1286.
- Xia H, Yandeu-Nelson M, Thompson DB y Guiltinan MJ. (2011). Deficiency of maize starch-branching enzyme i results in altered starch fine structure, decreased digestibility and reduced coleoptile growth during germination. *BMC Plant Biol.* 11:1-13.
- Xu C, Wang X, Li Z y Xu S. (2009). Mapping QTL for multiple traits using Bayesian statistics. *Genet. Res.* 91:23-37.
- Yandell BS, Mehta T, Banerjee S, Shriner D, Venkataraman R, Moon JY, . . . Yi N. (2007). R/qtlbim: QTL with Bayesian interval mapping in experimental crosses. *Bioinformatics* 23:641-643.
- Yang D-H, Hettenhausen C, Baldwin IT y Wu J. (2012). Silencing *Nicotiana attenuata* calcium-dependent protein kinases, *CDPK4* and *CDPK5*, strongly up-regulates wound-and herbivory-induced jasmonic acid accumulations. *Plant. Physiol.* 159:1591-1607.
- Yu J, Pressoir G, Briggs WH y *et al.* (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat. Genet.* 38:203-208.
- Zehnder G, Gurr GM, Kühne S, Wade MR, Wratten SD y Wyss E. (2007). Arthropod pest management in organic crops. *Annu. Rev. Entomol.* 52:57-80.

- Zeng L-R, Vega-Sánchez ME, Zhu T y Wang G-L. (2006). Ubiquitination-mediated protein degradation and modification: an emerging theme in plant-microbe interactions. *Cell Res.* 16:413-426.
- Zeng Z-B. (1994). Precision mapping of quantitative trait loci. *Genetics* 136:1457-1468.
- Zhang H, Hedhili S, Montiel G, Zhang Y, Chatel G, Pré M, . . . Memelink J. (2011). The basic helix-loop-helix transcription factor CrMYC2 controls the jasmonate-responsive expression of the ORCA genes that regulate alkaloid biosynthesis in *Catharanthus roseus*. *Plant J.* 67:61-71.
- Zhang Z, Ersoz E, Lai C-Q y *et al.* (2010). Mixed linear model approach adapted for genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 42:355-360.
- Zhao K, Aranzana MJ, Kim S, Lister C, Shindo C, Tang C, . . . Nordborg M. (2007). An *Arabidopsis* example of association mapping in structured samples. *PloS Genet.* 3:e4.
- Zhong R, Demura T y Ye Z-H. (2006). SND1, a NAC domain transcription factor, is a key regulator of secondary wall synthesis in fibers of *Arabidopsis*. *Plant Cell* 18:3158-3170.
- Zhong R, Lee C, Zhou J, McCarthy RL y Ye Z-H. (2008). A battery of transcription factors involved in the regulation of secondary cell wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 20:2763-2782.
- Zhong R, Richardson EA y Ye Z-H. (2007). The MYB46 transcription factor is a direct target of SND1 and regulates secondary wall biosynthesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19:2776-2792.
- Zhu-Salman K, Bi J-L y Liu T-X. (2005). Molecular strategies of plant defense and insect counter-defense. *Insect Sci.* 12:3-15.
- Zhu S, Rossnagel BG y H.F. K. (2004). Genetic analysis of quantitative trait loci for groat protein and oil content in oat. *Crop Sci.* 44:254-260.





ANEXOS



ANEXO I

Protocolo de extracción con molinillo de ADN utilizado en el genotipado de las líneas recombinantes derivadas del cruce EP42 × A637.

1. Cortar **1-2 cm** de coleoptilo o **30-50 mg** de hoja (10 cm aproximadamente), cortar en trozos y mantener en hielo dentro de tubos de QIAGEN.
2. Poner una bolita de tungsteno en cada tubo.
3. Añadir **400 µl de tampón de extracción**. Y tapar los tubos.
4. Colocar los tubos equilibrados en dos cajas.
5. Moler las muestras en el molinillo durante 1.5 minutos. Rotar las cajas 180° y moler nuevamente durante 1.5 minutos.
6. Centrifugar a 4.000 rpm durante 10 minutos para bajar la espuma formada.
7. Abrir los tubos y empleando una vara magnética extraer las bolitas de tungsteno y colocarlas en vaso con SDS al 2% (20 ml: 18 ml H₂O destilada y 2 ml de SDS al 20%).
8. Añadir **250 µl de fenol: cloroformo (1:1)** a cada uno de los tubos. Cerrar los tubos y mezclarlo bien hasta que la solución sea homogénea.
9. Centrifugar a 4.000 rpm 15 minutos.
10. Transferir la capa acuosa a tubos Eppendorf nuevos (de 100 en 100 µl).
11. Añadir **500 µl de fenol: cloroformo (1:1)** y mezclar manualmente.
12. Centrifugar a máxima velocidad durante 4 minutos.
13. Transferir la fase acuosa a un tubo Eppendorf nuevo.
14. Añadir 3µl de RNasa (4mg/ml). dejar en un baño a 37°C durante 30 minutos.
15. Añadir **1/10** del volumen obtenido de **Acetado de sodio 3M** (pH 5) y mezclar manualmente.
16. Añadir **2,5 volúmenes de Etanol absoluto** frío y mezclar suavemente. El precipitado de ADN debe ser visible.
17. Centrifugar a máxima velocidad durante 4 minutos.
18. Decantar el sobrenadante en un vaso de precipitados.
19. Rellenar el tubo con **1.000 µl de Etanol 70%**.

20. Centrifugar a máxima velocidad durante 2 minutos.
21. Decantar el sobrenadante y dejar secar (no se deben ver gotas en las paredes y el ADN debe ser transparente). Aproximadamente 30 minutos.
22. Disolver en **100 µl de agua destilada**.
23. Mantener los tubos durante al menos una noche a 4°C para permitir que el ADN se disuelva.
24. Cuantificar.



ANEXO II

Tabla A-II Listado de cebadores (*primers*) empleados para el genotipado de las líneas recombinantes derivadas del cruce EP42 × A637.

ID [†] MBG	Nombre	Bin	Vía [‡]	Secuencia
m003	<i>phi001</i>	1.03	F R	TGACGGACGTGGATCGCTTCAC AGCAGGCAGCAGGTCAGCAGCG
m007	<i>phi120</i>	1.11	F R	GACTCTCACGGCGAGGTATGA TGATGTCCCAGCTCTGAACTGAC
m011	<i>nc132</i>	2.05	F R	TCATCTTGCTCTGATGCTCG TGTGGGGGCACGTTAATTAC
m019	<i>phi029</i>	3.04	F R	TTGTCTTTCTTCCTCCACAAGCAGCGAA ATTTCAGTTGCCACCGACGAAGAAGCTT
m021	<i>bnlg197</i>	3.06	F R	GCGAGAAGAAAGCGAGCAGA CGCCAAGAAGAAACACATCACA
m025	<i>phi072</i>	4.01	F R	ACCGTGCATGATTAATTTCTCCAGCCTT GACAGCGCGCAAATGGATTGAACT
m027	<i>phi021</i>	4.03	F R	TTCCATTCTCGTGTTCTTGGAGTGGTCCA CTTGATCACCTTTCCTGCTGTCGCCA
m033	<i>phi024</i>	5.01	F R	ACTGTTCCACCAAACCAAGCCGAGA AGTAGGGGTTGGGGATCTCCTCC
m035	<i>phi113</i>	5.04	F R	GCTCCAGGTCGGAGATGTGA CACAACACATCCAGTGACCAGAGT
m037	<i>phi101</i>	5.06	F R	TGTTTCGCCGTCTAGCCTGGATT TCATCAGCAACGACGACTACTCC
m043	<i>phi077</i>	6.01	F R	GAGAAGAGGATCAGGTTTCGTTCCA CGCGTTGTACATCTTGCCTGCTT
m049	<i>phi112</i>	7.01	F R	TGCCCTGCAGGTTACATTGAGT AGGAGTACGCTTGGATGCTCTTC
m051	<i>phi114</i>	7.03	F R	CCGAGACCGTCAAGACCATCAA AGCTCCAAACGATTCTGAACTCGC
m055	<i>phi116</i>	7.06	F R	GCATACGGCCATGGATGGGA TCCCTGCCGGGACTCCTG
m057	<i>phi115</i>	8.03	F R	GCTCCGTGTTTCGCCTGAA ACCATCACCTGAATCCATCACA
m059	<i>bnlg240</i>	8.06	F R	AAGAACAGAAGGCATTGATACATAA TGCAGGTGTATGGGCAGCTA
m063	<i>phi015</i>	8.08	F R	GCAACGTACCGTACCTTTCCGA ACGCTGCATTCAATTACCGGGAAG
m067	<i>phi065</i>	9.03	F R	AGGGACAAATACGTGGAGACACAG CGATCTGCACAAAGTGGAGTAGTC
m075	<i>phi050</i>	10.03	F R	TAACATGCCAGACACATACGGACAG ATGGCTCTAGCGAAGCGTAGAG

Continúa en la siguiente página

Tabla A-II (continuación)

ID [†] MBG	Nombre	Bin	Vía [‡]	Secuencia
m079	<i>bnlg279</i>	9.07	F R	GCATGCGTACCTTCAAGCTA TGTGTTTCATCGGCAATTTTG
m081	<i>umc1222</i>	1.02	F R	CTCAGAACAGAAGCCATCAAAAGC CGTCTTCGTGAGAGACATCCTGT
m089	<i>bnlg1556</i>	1.07	F R	ACCGACCTAAGCTATGGGCT CCGGTTATAAACACAGCCGT
m091	<i>umc1147</i>	1.07	F R	GAGAAACCATCGACCCTTCCTAAC TTCCTATGGTACAGTTCTCCCTCG
m099	<i>umc1165</i>	2.01	F R	TATCTTCAGACCCAAACATCGTCC GTCGATTGATTTCCCGATGTTAAA
m103	<i>umc1265</i>	2.02	F R	GCCTAGTCGCCTACCCTACCAAT TGTGTTCTTGATTGGGTGAGACAT
m117	<i>bnlg1523</i>	3.02	F R	GAGCACAGCTAGGCAAAAGG CTCGCACGCTCTCTCTTCTT
m121	<i>bnlg1449</i>	3.06	F R	AGTCAACGTAGCTGGCGAGT TTCACGACGGGTCTCTCTCT
m127	<i>bnlg1318</i>	4.01	F R	TTATGTGTGCAGAACGACTCG AGCATGGCAGAGAAGGTGAT
m129	<i>umc1652</i>	4.04	F R	GAGAGCAGTAGCACTGACCCTTTC CACTCGACCTCGATCGGAAC
m135	<i>umc1329</i>	4.06	F R	CCTCTCACATCTCCTCTCCCCT GTGTCGGTGTAGGTCTCCGTCTT
m143	<i>umc1097</i>	5.00	F R	CTCGTCAACGTCAACCCAAGTAAG CTGTTAGATGTGCGACAACAGAGC
m151	<i>umc1225</i>	5.08	F R	CTAGCTCCGTGTGAGTGAGTGAGT TTCCTTCTTTCTTTCTGTGCAAC
m153	<i>umc1006</i>	6.02	F R	AATCGCTTACTTGTAACCCACTTG AGTTTCCGAGCTGCTTTCTCT
m157	<i>umc1014</i>	6.04	F R	GAAAGTCGATCGAGAGACCCTG CCCTCTCTTCACCCCTTCCTT
m159	<i>umc1424</i>	6.06	F R	CCGGCTGCAGGGGTAGTAGTAG ATGGTCAGGGGCTACGAGGAG
m161	<i>umc1248</i>	6.07	F R	CTTTGTCCATCGGCTTTATTCTTT CACATTAAGTTACAAATACAAATCACCG
m163	<i>umc1653</i>	6.07	F R	GAGACATGGCAGACTCACTGACA GCCGCCACGTACATCTATC
m167	<i>umc1545</i>	7.00	F R	GAAAACTGCATCAACAACAAGCTG ATTGGTTGGTTCTTGCTTCCATTA
m171	<i>umc1134</i>	7.03	F R	AAAATAACAGGCAGCAGACCAAC ATCAGCAAGTGAATTCCTCC
m173	<i>umc1295</i>	7.04	F R	GTCGATCTTCCTCCCCATCA CGTTTCTATCTATGGAGGAGTGCG

Continúa en la siguiente página

Tabla A-II (continuación)

ID [†] MBG	Nombre	Bin	Vía [‡]	Secuencia
m175	<i>umc1327</i>	8.01	F R	AGGGTTTTGCTCTTGGAATCTCTC GAGGAAGGAGGAGGTCGTATCGT
m179a	<i>umc1309</i>	8.05	F R	CTCTCATTAGTTCGTGCCAGTCAA CCAGAAATCAGAGGAAGCTCTCAG
m179b	<i>umc1309</i>	8.05	F R	CTCTCATTAGTTCGTGCCAGTCAA CCAGAAATCAGAGGAAGCTCTCAG
m181	<i>bnlg1812</i>	8.05	F R	CGAGAAGACTTGCGTGAACA TTACGTGCGTCGTCAGAATC
m183	<i>umc1149</i>	8.06	F R	TACAGTAGGGATTCTTGCAGCCTC GTGGGACCTTGTTGCTTCCTTT
m185	<i>umc1055</i>	8.07	F R	CTCCAACCTTGCACTCTCCAGTCTC TTCTGCCAGCTGCAATAATCTTCT
m193	<i>bnlg1884</i>	9.04- 9.05	F R	TTCGGATGCATGTGTAACGT CGGAAGTCCCATCTGTTTGT
m195	<i>umc1078</i>	9.05	F R	AGGCACTAGCAGGCGAGAGG GCGTAGTAACATCCATCCAACCAA
m197	<i>umc1494</i>	9.05	F R	CCACAGCAGCTCAGCTCGTC GACGACCGCTACTTCTTCAGCA
m199	<i>umc1505</i>	9.08	F R	TTACACAGAAGCCCATTGAAGGT GGATGGTTGTTGGTGGTGTAGAAT
m203	<i>umc1152</i>	10.01	F R	CCGAAGATAACCAAACAATAATAGTAGG ACTGTACGCCTCCCCTTCTC
m205	<i>umc1453</i>	10.04	F R	AATACCAAGCTGCACTCAGAAACC CGTCAAATCCAGCCTAAGCATC
m209	<i>bnlg1360</i>	10.07	F R	TCTGCTCATCCACAACCTGC AGAACGTGAAGCTGAGCGTT
m213	<i>umc1363</i>	1.010	F R	TGTTTAAGTGTTGGCAGAAAGCAA TCTCCCTCCCCTGTACATGAATTA
m215	<i>umc1335</i>	1.07	F R	ATGGCATGCATGTGTTTGTTTTAC ACAGACGTCGCTAATTCCTGAAAG
m217	<i>umc1431</i>	1.09	F R	GTTGCTGTCCCCGACGTAGTAG GTGAGAGTACCGAGATGGCTGAG
m221	<i>umc1737</i>	1.11	F R	ATGCTTCTCTTCAGAAGCCATCC TAGCTAGGTAGTGATGTGCGTGCT
m227	<i>umc1065</i>	2.06	F R	ACAAGGCCATCATGAAGAGCAGTA CACGGTCTGGCACACTAACCTTAT
m231	<i>mmc0191</i>	2.08	F R	GGTGTTCAAGTGTAAGGTTA AAGATTTCCGCAAGGTTAAAC
m233	<i>umc1682</i>	4.01	F R	AGCAAGCAAGCAAGTCACTGAGTA GAGCTAGCCGGAGATAGAGAGGAG
m237	<i>umc1963</i>	4.04	F R	CTCGTTCGAGGGGATGTACAAG CTTGCACTGGCACAGAGACG

Continúa en la siguiente página

Tabla A-II (continuación)

ID [†] MBG	Nombre	Bin	Vía [‡]	Secuencia
m239	<i>bnlg1927</i>	4.07	F R	TTTTTTTGTAAGCGATCCGG GATGAATCTGCGTCCGTCTT
m243	<i>umc1051</i>	4.08	F R	CTGATCTGACTAAGGCCATCAAAC AATGATCGAAATGCCATTATTTGT
m245	<i>umc1738</i>	4.10	F R	CCAGACATTCCCCAAACCCTA CGTCGGTGTCGTACTGGTTG
m247	<i>umc1532</i>	4.10	F R	ATCTAGAAAATTATAATGGCATGGATTC CTCTCGGTTTTGGACTCTGCT
m249	<i>umc1058</i>	4.11	F R	AGCAAGCAGTTCGAAACAAGGAT GACACCAGCACCACCTGAACG
m255	<i>umc1692</i>	5.03	F R	AGAGACGAACTGAAGCCTGAAGTG GATGTCCACGTCCTGGTAGAAGTT
m257	<i>bnlg1046</i>	5.03	F R	TGAGCCGAAGCTAACCTCTC GATGCAAAGGAGGTTTCAGGA
m261	<i>umc1221</i>	5.04	F R	GCAACAGCAACTGGCAACAG AAACAGGCACAAAGCATGGATAG
m263	<i>umc1822</i>	5.05	F R	GGTATAATTTTGCAAGCAGAAAGGG GGTTTGCTCAGGAAGAGCATGT
m269	<i>bnlg1306</i>	5.07	F R	CACCTTGAAAGCATCCTCGT CAAAAACAAATGGCAGCTGA
m275	<i>bnlg161</i>	6.00	F R	GCTTTCGTCATACACACACATTCA ATGGAGCATGAGCTTGCATATTT
m277	<i>bnlg1371</i>	6.01	F R	TTGCCGATAAGAACCAAACA ACGACCGGTGTGGTTACATT
m281	<i>umc1887</i>	6.03	F R	CTTGCCATTTTAATTTGGACGTTT CGAAGTTGCCCAAATAGCTACAGT
m283	<i>umc1857</i>	6.04	F R	TTCTTGCCAACAAATACAAGGAT GTTTCATTGCTTCATCTTGGAACCT
m287	<i>umc1979</i>	6.04	F R	AATTTTCGGGAAACAGGCCAT GAGTCCCCGAAACTGAACACC
m289	<i>bnlg1154</i>	6.05	F R	GGGTGATCACATGGGTTAGG AAATCAATGCTCCAAATCGC
m291	<i>bnlg1702</i>	6.05	F R	TTATCATCAAATGGAGGACACG AAAGACACACGCTAATGGGC
m295	<i>mmc0411</i>	7.03	F R	CGATGCAAGAGTGTCAAGTA ACTCCCTAGTGCAAAAATCA
m297	<i>umc1393</i>	7.02	F R	CCTTCTTCTTATTGTCACCGAACG GCCGATGAGATCTTTAACAACCTG
m299	<i>umc1301</i>	7.03	F R	AACAGTCAAGCTCACTTTCCGC CATCCATAAGCTGAAGGAGTGAGG
m301	<i>umc1015</i>	7.03	F R	CAGACACAAGCAGCAAAGCAAG TCCGACTCCAAGAAGAGGAGAA

Continúa en la siguiente página

Tabla A-II (continuación)

ID [†] MBG	Nombre	Bin	Vía [‡]	Secuencia
m303	<i>umc1029</i>	7.04	F R	AACACCTGCTGGATATGGATCACT GGAAGAAAAATGTCGACCTGCTC
m305	<i>umc1154</i>	7.05	F R	CCACCACAAGACAAGACAAGAATG CCTGATCGATCTCATCGTCGT
m317	<i>bnlg1863</i>	8.03	F R	GGCGTTCGTTTTGCACTAAT CGACACAGTTGACATCAGGG
m321	<i>umc1005</i>	8.08	F R	TTTGATCACAGACTTATCCCTGTT CTAATGACGAACCCCTAAAAGGT
m323	<i>umc1771</i>	9.04	F R	CATCAGGAAGGAAGACGACTAGGA GTGAAATGTTGTTTCCAATGCAAG
m325	<i>umc1267</i>	9.03	F R	TTACAACACGCATGCATCTAGCTT AACAACAAAGAACTCACCAGCCTC
m327	<i>umc1120</i>	9.04	F R	GCACAGCTTTGTCCCTCGAA GACCCTCGAGCTTCTCTCATCTTT
m329	<i>umc1492</i>	9.04	F R	GAGACCCAACCAAACTAATAATCTCTT CTGCTGCAGACCATTGAAATAAC
m349	<i>bnlg640</i>	10.03	F R	TGCGGATCCAACACGGACTGTCC GCAGGCTCTCCGCCACACCTC
m357	<i>umc2043</i>	10.05	F R	GAGGCATACGGCATAACCATAACC GTAGGAGAAACAGGTGCTGGTGTC
m359	<i>umc1930</i>	10.04	F R	TCTTCTCCAAGTGTGTTAATGCCC CACACAGTGAGTCGTTTCTTTCGT
m361	<i>umc1084</i>	10.07	F R	GATAAAAAGGCAAGTGCAACAAGG ATATCAACCAGAGGCTGGAACCTG
m363	<i>umc1556</i>	10.07	F R	CCGAACAAAACAAGTAAGCACACA GAAGACAGCTAGCCATCATCGG
m367	<i>bnlg1014</i>	1.01	F R	CACGCTGTTTCAGACAGGAA CGCCTGTGATTGCACTACAC
m371	<i>bnlg2295</i>	1.04	F R	CGGAGGAGTGGTTCTTGAAA GGTTAGTGAAAGGGTTGCCA
m373	<i>umc1144</i>	1.04	F R	ATGGCCCACTCATCATATCTCTGT TGTGTTGATTAGCAGCGGATAAAA
m375	<i>bnlg1720</i>	1.09	F R	CAACCCGGATGTCTCAAGTT TTCGATGCGTATGTACTCAGC
m381	<i>phi402893</i>	2.00	F R	GCCAAGCTCAGGGTCAAG CACGAGCGTTATTCGCTGT
m385	<i>bnlg2248</i>	2.03	F R	CCACCACATCCGTTACATCA ACTTTGACACCGGCGAATAC
m391a	<i>umc1875</i>	2.06	F R	AAGCGACAGTTGGTTTCAGTTTTC AGTTGCATGACCTTGTCAACCTTT
m391b	<i>umc1875</i>	2.06	F R	AAGCGACAGTTGGTTTCAGTTTTC AGTTGCATGACCTTGTCAACCTTT

Continúa en la siguiente página

Tabla A-II (continuación)

ID [†] MBG	Nombre	Bin	Vía [‡]	Secuencia
m393	<i>umc2101</i>	3.00	F R	CCCGGCTAGAGCTATAAAGCAAGT CTAGCTAGTTTGGTGCGTGGTGAT
m397	<i>umc2259</i>	3.03	F R	GGCTCGACTTCGAGGACACC GAGGAGGAGAGGGACAGGGAAG
m401	<i>umc1148</i>	3.07	F R	AAAATTACAGAGCATTTTGAAAGAAGAA TAGCCGTGTCAGTTTGTAGATCCT
m405	<i>umc2150</i>	4.02	F R	GTTGTTCACTTTCCAAAACCCTTG GCCTTGTGCTTCTTGAGTGTT
m409	<i>umc1142</i>	4.05	F R	CCGAAAACCCATTCTTCTAGCATC GTGCGGTGTTCTCTCTTTCACTCT
m417	<i>umc2115</i>	5.02	F R	CTGTCTGTCTACCCAACCCAACAG GGGGATAGGCGTGTGTATGTACTG
m427	<i>umc2324</i>	6.08	F R	GATCCTCTGTCGCCAAACACTAAG AGATGGTGACGATGAGTGATGAAC
m429	<i>umc2190</i>	7.06	F R	GATCCGTTGAGGTCGATCCTTT GAGGAGTTCCTGCAGTTTCTTGAC
m433	<i>umc1034</i>	8.02	F R	GTGTTTCCGTTTCGCTGATTTTAC TCATCCATGTGACAGAGACGACTT
m437	<i>umc1858</i>	8.04	F R	GTTGTTCTCCTTGCTGACCAGTTT ATCAGCAAATTAAAGCAAAGGCAG
m439	<i>umc1380</i>	10.00	F R	CTGCTGATGTCTGGAAGAACCCT AGCATCATGCCAGCAGGTTTT
m441	<i>umc1506</i>	10.05	F R	AAAAGAAACATGTTTCAGTCGAGCG ATAAAGGTTGGCAAACGTCAGCCT
m449	<i>umc1384</i>	8.08	F R	GGCCTAAAACTACATGCACACACA AGCTTATAAAGGACGGGTTCGGTAA
m453	<i>umc1353</i>	1.00	F R	AGACAGGATCATCGAAAACACACA ACCTCAGCCTCCTCGTCAACTACT
m455	<i>bnlg1429</i>	1.02	F R	CTCCTCGCAAGGATCTTCAC AGCACCGTTTCTCGTGAGAT
m459	<i>phi037</i>	1.08	F R	CCCAGCTCCTGTTGTCGGCTCAGAC TCCAGATCCGCCGCACCTCACGTCA
m463	<i>umc2100</i>	1.12	F R	AAAGGCATTATGCTCACGTTGATT TGACGTGCAAACAACCTTCATTAC
m465	<i>umc1028</i>	2.05	F R	CCCAGGTAAAATTCGCTAGCCT GGAACAAGGAAAGCTGAATACACG
m467	<i>umc1637</i>	2.07	F R	GTTCCAGTTCAGCTTCCAGCA CTGTCGTGTACAGCATCACTTCTG
m473	<i>umc1173</i>	4.09	F R	ATCCGCCAAAAAGGGGAAAA TAGAAGTAGCACACGCGCCG
m475	<i>bnlg1583</i>	9.01	F R	ATCAAGCTTATCGAGAGAGAGAGAG CGACGGTGGAAAGACTGC

Continúa en la siguiente página

Tabla A-II (continuación)

ID [†] MBG	Nombre	Bin	Vía [‡]	Secuencia
m477	<i>umc1037</i>	9.02	F R	GTGCGCGATTCTTAGTTTGC CTTCTTCGTAAAGGCATTTTGTGC
m481	<i>mmc0501</i>	10.02	F R	TGCTGAACACTCTAAGCAATAC ATTACTCTACTCGCTGCCTG
m483	<i>umc1993</i>	10.06	F R	CTTTTCTGCTACTCCTGCCTGC CTAGCTGATGGAGGCTGTAGCG
m489	<i>mmc0022</i>	3.05	F R	AGGTGTTGTTTTTGTTCGCT TGCTTGTTTAAGCTCATTATT
m491	<i>umc1102</i>	3.05	F R	AAAATTAAAGTCAAGAGCGGGGAG TCTAGCCGTAGCTTTAGCTGCATT
m493	<i>umc1789</i>	9.06	F R	ACCTCTCCTTTTCCTCGCCTT GTCAGAGAAGAGGCCGGGTC

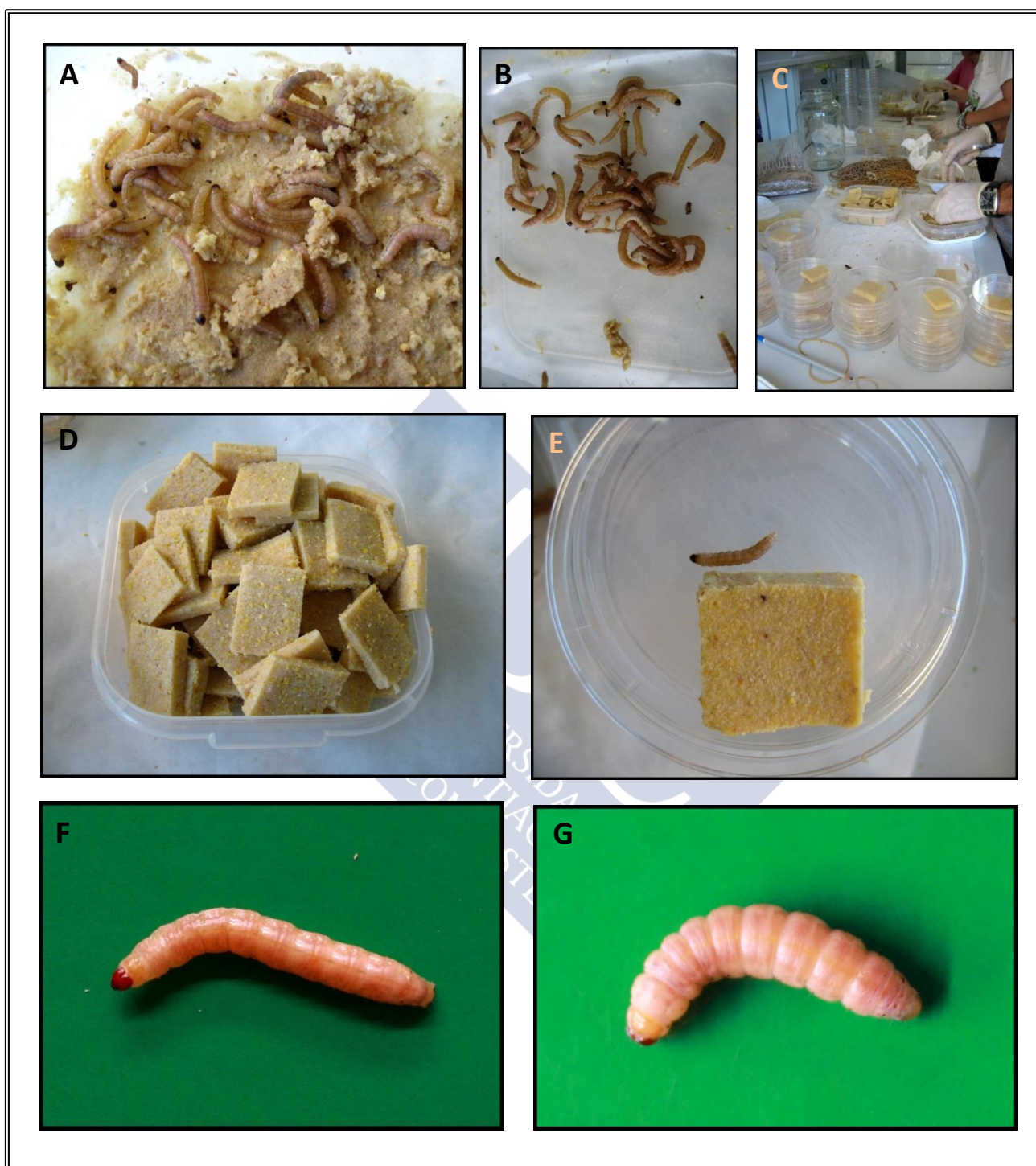
[†] Código utilizado en la Misión Biológica de Galicia-CSIC para identificar cada cebador (*primer*).

[‡] F, secuencia del primer en dirección 5' a 3' (del inglés *Forward*) y R, secuencia del cebador en dirección 3' a 5' (del inglés *Reverse*).





ANEXO III

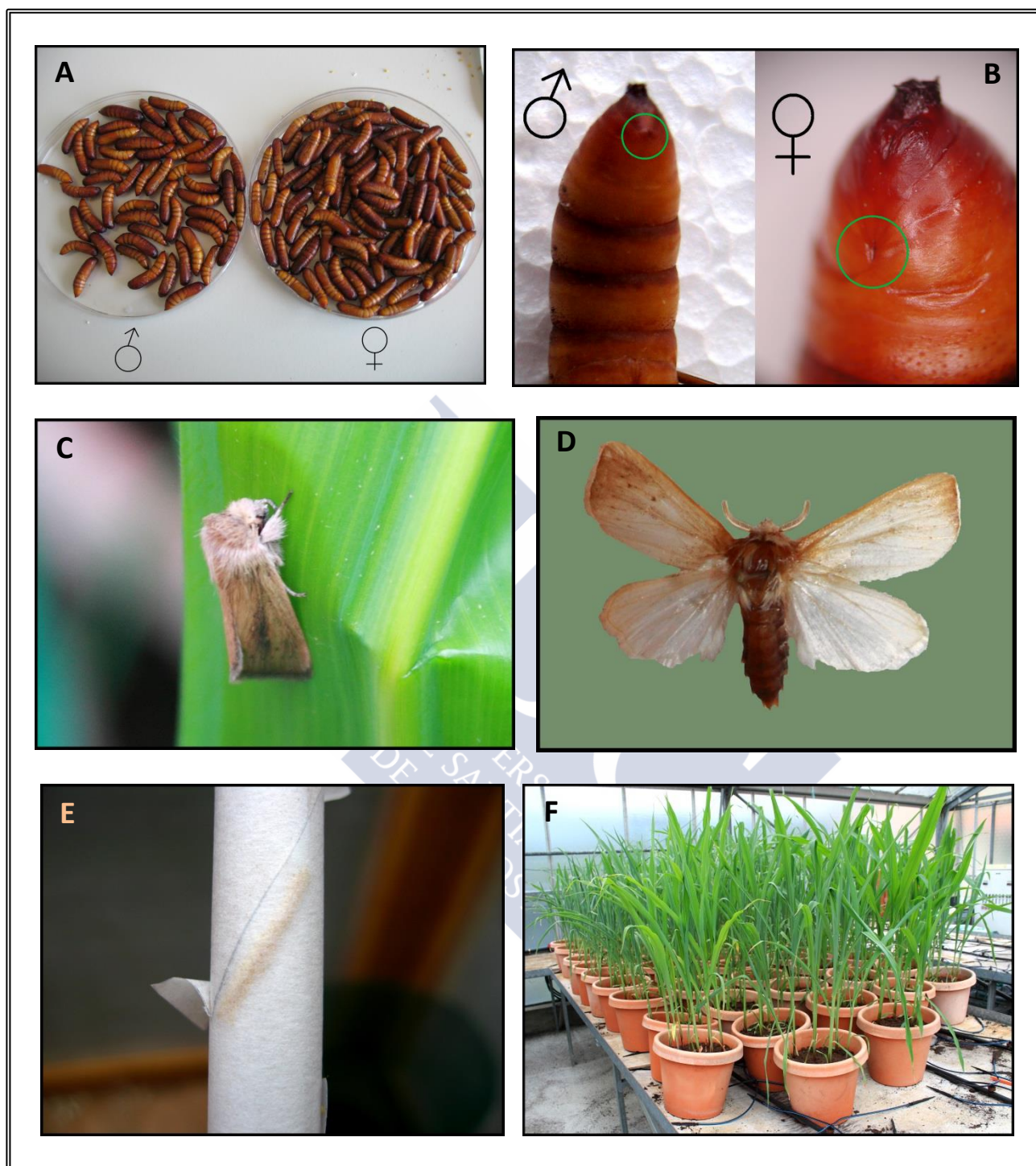


Lamina A-III Ilustración gráfica de la crianza de *S. nonagrioides* en condiciones de laboratorio. (A-B) Desde el nacimiento de las larvas hasta que alcanzan un tamaño de aproximadamente 2 cm las larvas son alimentadas en contenedores de plástico con dieta elaborada especialmente para estos insectos. (C) Cuando alcanzan una longitud aproximada de 2 o más centímetros son colocadas individualmente en las cajas Petri con un trozo de dieta, o cuando salen del estado de diapausa después del invierno

también son individualizadas de la misma forma. (D) Trozos de dieta especial para alimentar larvas de *S. nonagrioides*. (E) Larva individualizada en una caja Petri con un trozo de dieta para su alimentación. (F) Larva de *S. nonagrioides* en estado activo de alimentación. (G) Larva preparándose para iniciar el estado de pupa (pre-pupa).



ANEXO IV



Lamina A-IV Ilustración gráfica de la crianza de *S. nonagrioides* en condiciones de laboratorio. (A-B) Pupas de *S. nonagrioides* clasificadas por sexo. (C-D) *S. nonagrioides* en estado adulto y reproductivo. (E) Tallo artificial de madera y papel encerado para la ovoposición de los polillas, la franja color morrón son huevos colocados por el insecto bajo el papel. Esta técnica se utiliza para obtener huevos de la primera generación ya que facilita la extracción de los mismo para trasladarlos a los contenedores donde se alimentarán las larvas neonatas (F) Plantas de maíz sembradas en invernadero para la

ovoposición de los adultos. Esta técnica se utiliza para obtener trozos de hoja con huevos que serán utilizadas para infestar artificialmente los ensayos de campo.



ANEXO V



Lamina A-V Ilustración gráfica de la crianza de *S. nonagrioides* en condiciones de laboratorio. (A) Plantas de maíz sembradas previamente en invernadero e infestadas por *S. nonagrioides*. Las plantas son cortadas desde la base del tallo y llevadas al laboratorio para la extracción de los huevos. (B) Cortando pequeños segmentos de hoja que contienen una masa de aproximadamente 40 huevos de *S. nonagrioides*. (C) Segmentos de hoja conteniendo las ristras de huevos de *S. nonagrioides*. Cada trozo es utilizado para infestar artificialmente una planta de maíz en los ensayos de campo.

ANEXO VI

Tabla A-VI Medias de los tres años evaluados (2010, 2011 y 2012) de los datos fenotípicos de tres caracteres de resistencia a *S. nonagrioides* y tres caracteres agronómicos en un panel de diversidad de maíz.

Línea	LG [†] (cm)	DTR (%)	RG (1-9)	AP (cm)	DFM (días)	DFE (días)
4226	43,93	18,5	7,56	197,73	80,95	82,58
4722	16,82	12,23	8,19	146,77	89,08	91,82
33-16	26,2	13	7,38	217,67	87,57	89,3
38-11	49,2	17,35	6,37	190,66	91,59	93,29
A188	17,72	8,81	7,46	160,86	71,97	72
A214N	13,51	11,76	8,01	185,88	85,42	101,96
A239	20,06	12,33	7,38	163,75	79,82	81,39
A272	-	-	-	-	-	-
A441-5	16,32	12,18	7,51	147,34	92,32	94,23
A554	13,24	8,16	7,99	145,27	70,85	70,85
A556	22,09	13,48	8,26	142,62	75,49	74,95
A6	36,72	20,02	7,05	197,16	100,3	106,96
A619	21,14	11,81	6,45	151,42	75,18	82,43
A632	29,81	17,81	7,79	172,5	80,63	81,11
A634	23,92	11,45	7,86	163,71	79,23	80,29
A635	24,91	11,17	7,7	152,23	78,05	81,41
A641	20,26	9,13	7,33	136,45	73,15	73,77
A654	13,33	12,16	7,29	131,35	69,43	70,54
A659	19,36	9,85	7,55	182,6	78,95	80,29
A661	13,29	8,48	8,09	160,06	69,08	72,16
A679	23,19	9,85	8,19	182,05	78,93	76,8
A680	36,16	15,14	7,85	198,51	83,8	84,3
A682	30,93	14,21	7,44	172,36	74,11	75,56
AB28A	17,92	10,98	7,74	175,03	93,25	95,37
B10	18,57	12,88	7,66	134,54	91,54	96,7
B103	22,22	13,9	7,54	144,53	78,84	80,22
B104	9,48	9,07	8,47	149,42	86,96	88,87
B105	27,07	13,11	7,58	178,17	83,71	85,04
B109	30,23	12,55	7,74	196,7	82,47	81,68
B115	-	-	-	-	-	-
B14A	19,27	8,73	7,88	182,74	87,17	92,36
B164	18,45	6,06	8,36	182,64	80,22	82,88
B2	29,03	11,62	6,58	181,67	87,05	89,3
B37	25,16	11,61	7,51	165,75	81,97	86,55
B46	26,16	12,96	7,32	160,09	86,13	88,77
B52	7,3	5,47	7,57	183,94	90,15	89,55
B57	13,11	8,14	7,32	150,79	83,67	85,72
B64	17,13	9,68	8,49	202,24	90,52	90,58
B68	32,59	20	7,38	192,91	89,96	91,8
B73	26,99	14,24	8,31	195,62	84,6	85,85
B73HTRHM	32,51	14,56	8,56	210,34	85,36	86,61
B75	40,41	17,26	7,69	187,34	81,31	84,2
B76	25,13	12,91	6,81	139,51	81,6	81,25
B77	13,09	10,47	7,91	208,6	87,13	88,12

Continúa en la siguiente página

Tabla A-VI (continuación)

Línea	LG [†] (cm)	DTR (%)	RG (1-9)	AP (cm)	DFM (días)	DFF (días)
B79	17,93	8,57	7,08	168,74	87,96	87,97
B84	16,53	11,39	7,94	140,57	88,44	90,32
B97	22,15	12,24	7,64	177,97	84,47	87,51
C103	18,27	13,22	7,23	200,45	80,74	84,83
C123	21,28	13,02	7,37	160,94	74,84	76,73
C49A	11,15	8,92	5,69	129,01	66,54	69,13
CH701-30	25,14	15,08	7,7	175,71	75,56	80,86
CH9	18,31	10,36	6,8	160,01	80,9	85,54
CI,7	35,74	14,24	7,33	222,07	93,57	93,34
CI187-2	26,31	11,09	7,08	153,39	85,3	90,52
CI21E	23,97	10,29	7,73	203,65	90,13	92,26
CI28A	11,13	8,45	7,04	167,41	90,6	93,45
CI31A	23,03	8,29	7,94	158,86	91,9	93,76
CI3A	28,28	12,35	7,53	204,18	87,96	90,88
CI64	28,91	10,24	6,95	193,7	95,48	93,59
CI66	13,17	10,18	7,98	171,65	98,43	107,3
CI90C	17,68	12,16	7,66	172,77	95,91	102,05
CI91B	15,9	9,57	7,54	143,44	87,93	91,48
CM105	20,67	11,11	8,08	144,23	71,31	72,84
CM174	12,51	7,85	7,78	138,4	66,67	69,32
CM37	11,76	14,78	7,2	104,26	63,73	66,15
CM7	12,8	11,2	6,91	114,02	61,63	65,07
CML10	15,17	8,82	8,91	212,46	109,4	112,16
CML103	24,33	11,25	8,35	201,28	95,14	94,5
CML108	18,78	9,72	7,52	185,71	94,34	94,77
CML11	15,5	8,98	8,76	198,42	106,77	108,9
CML14	-	-	-	-	-	-
CML154Q	16,26	11,32	7,99	178,67	95,79	96,84
CML157Q	15,49	9,21	8,94	202,04	100,9	104,89
CML158Q	9,72	7,97	9,02	189,59	102,65	106,3
CML218	15,15	10,29	8,78	210,3	99,76	102,24
CML220	12,87	9,01	7,77	135,86	91,59	92,29
CML228	8,27	8,27	8,51	199,58	104,34	105,51
CML238	14,14	11,5	8,08	168,78	96,92	98,32
CML247	14,39	11,3	8,16	168,64	110,21	114,36
CML254	13,95	16,62	9,04	-	-	126,22
CML258	22,83	11,3	9	212,12	117,66	118,88
CML261	19,73	6,03	-	241,08	117,97	118,48
CML264	5,19	6,96	-	224,81	123,39	-
CML277	7,83	4,67	9,06	167,88	107,81	109,13
CML281	-	-	-	-	-	-
CML287	16,75	9,94	8,74	217,16	115,41	114,18
CML311	18,09	7,41	6,93	187,7	100,11	104,17
CML314	20,73	9,76	8	216,5	102,19	107,25
CML321	24,16	12,14	8,4	205,38	110,75	113,21
CML322	18,26	13,9	8,43	185,72	94,74	96,3
CML323	12,85	14,19	8,33	159,15	93,27	96,93
CML328	18,55	11,51	8,02	196,29	99,79	100,84

Continúa en la siguiente página

Tabla A-VI (continuación)

Línea	LG [†] (cm)	DTR (%)	RG (1-9)	AP (cm)	DFM (días)	DFF (días)
CML331	18,64	12,3	8,9	235,41	112,3	118,71
CML332	9,63	9,88	7,9	182,32	101,31	109,07
CML333	20,77	11,29	8,73	213,13	100,15	103,25
CML341	7,15	8,11	8,94	225,83	108,32	113,46
CML38	19,6	8,73	8,86	195,59	106,43	107,09
CML45	32,99	12,2	8,71	220,03	119,06	118,94
CML5	25,59	14,72	8,52	228,14	116,31	116,03
CML52	11,16	14,79	8,45	183,7	114,69	113,14
CML61	14,21	14,59	8,92	267,51	118,26	122,01
CML69	19,08	9,3	8,95	201,85	101,49	104,34
CML77	17,06	9,44	7,69	187,71	92,3	90,72
CML91	11,11	5,55	8,64	204,79	99,72	100,98
CML92	17,35	9,32	8,36	211,72	94,66	94,65
CMV3	7,55	6,5	6,44	136,8	62,84	66,37
CO106	14,32	8,39	7,65	135,36	66,45	68,42
CO125	19,15	13,05	7,2	133,99	70,46	71,66
CO255	22,95	12,81	7,49	164,94	62,96	66,01
D940Y	14,32	8,31	7,61	202,21	100,23	103,79
DE_2	20	14,69	7,23	178,86	87,36	87,34
DE_3	-	-	-	-	-	-
DE1	25,49	8,79	7,32	179,07	84,65	87,26
DE811	16,83	11,31	8,02	184,35	89,47	88,31
E2558W	34,95	15,38	7,82	192,88	89,85	93,89
EP1	23,05	10,68	6,53	135,37	65,68	70,11
F2834T	20,11	9,4	8,14	179,77	86,98	88,63
F44	23,18	14,58	8,21	219,92	99,76	100,6
F6	20,56	15,73	8,08	201,53	100,46	101,87
F7	13,98	11,11	7,23	116,13	62,78	66,1
GA209	11,77	9,99	8,07	189,29	93,95	95,71
GT112	27,14	15,25	7,38	206,41	100,98	103,85
H105W	27,3	16,57	7,97	179,66	81	83,32
H49	42,15	22,62	6,42	174,08	89,01	89,68
H84	20,68	12,65	7,68	169,94	80,74	86,09
H91	25,58	14,33	7,9	186,39	84,18	85,8
H95	18,21	10,23	7,78	172,71	85,95	87,89
H99	16,63	11,45	7,38	116,95	77,28	77,33
HI27	19	10,17	8,1	198,42	97,26	100,57
HP301	34,61	17,99	8,21	178,04	81,13	83,03
HY	34,58	13,64	7,35	199,12	83,22	87,24
I137TN	19,8	14,25	8,54	167,91	92,68	95,26
I205	12,47	5,15	7,62	147,51	85,01	87,77
I29	13,38	10,66	7,65	148,6	70,82	70,62
IA2132	19,63	10,9	7,76	141,2	74,46	75,21
IA5125	-	-	-	-	-	-
IDS28	16,21	6,78	7,37	183,5	83,98	86,51
IDS69	21,24	13,23	7,28	125,59	83,06	85,32
IDS91	19,55	14,67	7,34	168,13	80,5	84,88
IL101	13,57	13,09	5,4	124,95	71,66	74,48

Continúa en la siguiente página

Tabla A-VI (continuación)

Línea	LG [†] (cm)	DTR (%)	RG (1-9)	AP (cm)	DFM (días)	DFE (días)
IL14H	18,41	7,93	7,8	190,62	78,79	80,58
IL677A	20,29	12,45	6,3	157,19	85,39	90,66
K148	10,71	6,83	8,03	185,23	88,07	92,07
K4	19,3	10,95	7,85	181,73	93,17	96,69
K55	28,15	17,48	7,21	160,81	85,95	87,09
K64	27,43	14,32	7,59	203,6	93,76	96,11
KI11	11,19	11,41	8,61	155,57	104,35	109,41
KI14	35,71	14,76	8,26	202,31	110,01	119,13
KI2021	38,31	19,62	8,37	194,02	99,34	101,26
KI21	28,79	16,96	8,32	197,77	95,36	95,33
KI3	8,72	8,05	8,9	167,71	98,1	101,76
KI43	7,88	10,97	8,29	158,59	96,81	96,47
KI44	6,68	7,3	8,85	164,94	104,04	109,13
KY21	28,94	12,63	8,04	176,69	90,52	93,06
KY226	29,84	15,91	5,88	208,35	93,23	94,09
KY228	34,42	10,19	7,2	181,56	92,79	96,68
L317	28,54	9,89	6,82	197,31	86,67	93,96
L578	23,36	9,87	8,34	223,06	95,62	96,51
M14	24,98	9,73	7,75	150,42	81,17	81,95
M162W	25,07	12,71	8,02	174,22	95,78	96,29
M37W	25	14,13	7,9	188,29	89,75	92,13
MEF156-55-2	-	-	-	-	-	-
MO17	29,72	14,78	7,89	197,46	79,99	83,41
MO18W	31,97	18,48	7,81	195,54	100,69	112,44
MO1W	20,32	13,32	7,34	177,67	85,36	89,47
MO24W	31,22	10,54	7,44	226,87	88,51	92,63
MO44	39,58	16,86	7,71	205,21	85,28	88,61
MO45	22,41	14,69	8,15	191,61	84,16	83,97
MO46	15,15	9,86	8,12	180,32	80,92	85,14
MO47	21,64	11,07	7,17	156,02	79,52	81
MOG	37,23	14,35	8,06	221,97	92,22	92,56
MP339	32,41	14,58	8,37	184,23	96,49	100,99
MS1334	20,55	9,99	7,04	169,69	70,31	71,25
MS153	27,18	12,47	7,76	181,7	70,91	72,39
MS71	20,67	13,03	7,29	167,97	78,51	80,58
MT42	10,95	10,61	7,68	129,56	65,85	69,38
N192	24,62	12,98	8,1	159,85	76,92	78,2
N28HT	18,48	11,85	7,67	101	87,66	88,76
N6	22,05	11,36	7,74	155,82	81,01	84,5
N7A	21,03	9,78	8,21	164,08	82,15	82,3
NC222	18,51	8,26	8,57	189,85	96,19	100,93
NC230	13,03	7,13	8,35	153,35	91,01	93,03
NC232	27,98	18,52	8,03	170,03	90,08	91,93
NC236	23,53	14,77	6,98	156,79	95,03	94,32
NC238	-	-	-	-	-	-
NC250	24,38	18,15	7,79	128,94	84,04	85,76
NC258	15,43	7,33	8,72	187,92	90,92	91,95

Continúa en la siguiente página

Tabla A-VI (continuación)

Línea	LG [†] (cm)	DTR (%)	RG (1-9)	AP (cm)	DFM (días)	DFF (días)
NC260	15,88	5,78	7,73	200,37	84,23	86,45
NC262	16,73	9,88	8,18	161,42	76,12	79,1
NC264	14,12	11,09	8,6	171,56	86,41	88,12
NC290A	20,19	11,25	7,85	175,14	84,83	87,43
NC294	21,9	15,27	8,67	178,14	85,79	87,97
NC296	18,31	9,23	8,38	196,22	95,35	95,34
NC296A	11,76	9,61	8,72	175,38	94,44	97,11
NC298	15,49	14,13	8,05	166,29	92,74	94,88
NC300	13,44	7,17	7,96	181,79	102,58	104,19
NC302	24,41	13,59	8,69	167,1	89,91	92,86
NC304	12,84	13,33	8,39	118,93	93,66	96,38
NC306	35,2	19,96	7,95	185,44	88,25	88,11
NC310	19,08	9,71	8,31	173,98	83,18	85,87
NC314	18,9	13,14	6,61	131,32	83,09	87,02
NC318	21,96	10,85	8,97	199,98	94,78	92,93
NC320	19,85	9,96	8,32	208,75	94,3	95,55
NC324	25,69	21,43	7,23	133,7	83,7	88,41
NC326	29,24	13,32	8,04	184,09	84,54	87,35
NC328	30,93	14,16	8,54	192,11	88,45	88,36
NC33	33,22	12,65	7,7	245,34	97,5	103,99
NC336	15,41	8,42	8,17	177,72	99,63	101,88
NC338	13,25	10,16	8,29	173,46	95,15	96,65
NC340	18,98	11,38	8,48	190,5	96,11	96,55
NC342	30,99	16,36	8,18	193,25	87,41	88,09
NC344	11,1	8,46	8,22	206,89	90,25	90,02
NC346	6,66	6,92	8,39	187,34	92,82	94,92
NC348	8,94	4,1	8,56	189,85	90,49	90,92
NC350	20,26	11,19	8,65	157,4	93,9	96,24
NC352	12,77	9,58	8,57	188,52	93,7	97,08
NC354	23,19	10,67	7,67	179,91	92,52	93,11
NC356	11,96	14,4	8,45	166,93	91,71	93,13
NC358	12,01	8,97	8,53	164,71	86,34	87,59
NC360	22,98	15,06	7,96	163,52	90,52	89,16
NC362	34,75	16,39	7,22	194,58	86,12	86,84
NC364	28,28	19,91	8,02	156,62	80,3	79,44
NC366	12,85	8,21	8,06	183,54	98,47	98,76
NC368	21,93	10,35	7,66	192,81	88,02	89,17
ND246	14,12	9,55	7,92	124,18	63,96	70,95
OH40B	13,83	13,83	7,29	169,86	80,15	84,74
OH43	22,69	14,71	7,44	166,14	78,37	81,84
OH43E	11,2	9,36	8,05	143,59	77,89	80,51
OH603	40,41	19,05	7,03	189,64	85,05	85,7
OH7B	19,96	6,17	8,25	224,08	91,71	95,39
OS420	-	-	-	-	-	-
P39	13,32	12,12	6,25	128,2	70,4	72,82
PA762	34,24	14,85	8,28	168,83	83,99	85,38
PA875	23,72	19,81	7,16	152,22	83,85	85,85
PA880	14,2	9,1	7,51	194,84	85,22	86,39

Continúa en la siguiente página

Tabla A-VI (continuación)

Línea	LG [†] (cm)	DTR (%)	RG (1-9)	AP (cm)	DFM (días)	DFF (días)
PA91	21,61	10,84	7,29	213,18	85,39	87,59
R109B	14,8	7,54	7,58	174,72	80,16	82,38
R168	14,04	6,66	7,95	170,2	81,57	80,28
R177	-	-	-	-	-	-
R229	31,34	14,56	7,86	188,25	86,99	88,38
R4	20,18	10,54	6,99	189,63	86,53	91,03
SA24	18,9	14,97	8,06	171,51	87,02	87,3
SC213R	15,73	14,34	8,43	189,16	105,27	108,86
SC357	20,84	10,36	8,14	184,94	95,19	94,03
SC55	22,57	11,05	8,21	205,76	103,55	106,58
SD40	25,18	15,56	8,26	154,44	81,11	84,4
SD44	20,42	12,33	7,57	191,77	74,95	76,77
SG1533	33,65	16,57	8,71	188,63	86,34	86,86
SG18	26,09	11,32	7,42	201,32	82,46	84,63
T232	25,02	13,4	8,08	212,44	90,41	92,1
T234	24,64	10,38	8,11	178,24	90,81	94,67
T8	21,76	11	7,96	202,18	91,47	91,22
TX303	37,7	15,09	7,9	223,81	97,46	101,19
TX601	31,67	18,37	8,65	210,23	109,12	109,74
TZI10	20,49	11,59	8,95	222,55	110,93	117,69
TZI11	14,44	8,71	7,93	202,23	96,86	99,3
TZI16	17,75	6,65	8,5	231,49	95,95	92,96
TZI18	20,82	11,8	8,45	200,75	100,19	101,22
TZI25	17,55	12,21	8,03	200,43	91,59	93,68
TZI9	16,44	10,23	7,56	213,31	94,08	93,39
U267Y	23,7	14,18	6,85	177,83	94,63	99,02
VA102	24,03	12,97	6,89	178,44	80,46	86,84
VA14	19,87	11,64	7,74	192,95	91,39	94,66
VA17	22,83	9,66	7,96	161,55	88,52	92,99
VA22	24,26	15,09	7,78	182,61	86,98	88,1
VA26	13,41	12,27	8,03	199,57	82,03	83,22
VA35	16,55	8,46	7,76	177,92	84,03	84,99
VA59	22,66	12,43	8,1	173,81	78,09	81,17
VA85	24,96	18,71	7,09	207,13	85,39	87,25
VA99	30,6	14,8	7,63	198,97	82,73	86,44
VAW6	17,64	12,59	7,53	136,51	83,03	86,22
W117HT	12,18	8,9	7,42	109,93	70,09	72,82
W153R	12,67	9,3	6,63	115,48	75,1	76,77
W182B	23,42	16,77	7,87	148,46	66,81	68,76
W22	20,07	16,19	7,99	158,89	84,11	86,1
W22_R	-	-	-	-	-	-
WD	-	-	-	-	-	-
WF9	35,73	19,44	6,59	181,72	83,73	84,7
YU796	12,7	9,14	7,86	149,12	79,42	80,62

[†] LG, longitud de galerías; DTR, daño de tallo relativo; RG, resistencia de grano; AP, altura de planta; DFM, días a floración masculina y DFF, días a floración femenina.

ANEXO VII

Tabla A-VII Nombre, efecto aditivo, variantes alélicas, valores para las pruebas de significación (valor-*P* y RMIP) y proporción de la varianza total explicada por cada SNP significativamente asociado con la **altura de planta**.

#	ID SNP ^a	Alelos ^b	(Nº) ^c	Efecto aditivo ^d	Valor- <i>P</i>	(<i>R</i> ²) ^e	RMI P ^f
1	S1_77272761	C/G	242/22	-13	$6,51 \times 10^{-5}$	0,06	0,3
2	S1_243506545	C/G	221/26	13,05	$1,22 \times 10^{-5}$	0,08	0,41
3	S1_271903514	T/C	150/104	8,2	$9,21 \times 10^{-6}$	0,08	0,4
4	S2_3990193	C/A	158/103	7,9	$4,84 \times 10^{-6}$	0,08	0,51
5	S2_28000786	G/T	253/12	16,2	$1,11 \times 10^{-5}$	0,08	0,58
6	S2_105720343	C/T	239/24	-11,55	$5,56 \times 10^{-5}$	0,06	0,56
7	S3_127931464	A/C	186/67	8,6	$1,36 \times 10^{-5}$	0,08	0,4
8	S3_127931465	G/A	186/67	8,6	$1,36 \times 10^{-5}$	0,08	0,4
9	ss3_156639988 ^g	C/A	219/45	-8,85	$6,10 \times 10^{-5}$	0,06	0,38
10	S3_156788803	C/T	224/37	-9,4	$1,13 \times 10^{-4}$	0,06	0,46
11	ss3_157051848 ^g	A/C	128/128	-7,75	$1,90 \times 10^{-6}$	0,09	0,7
12	S4_220906905	G/A	182/72	-8,7	$4,71 \times 10^{-5}$	0,07	0,35
13	S5_1527023	T/C	238/21	-11,8	$6,76 \times 10^{-5}$	0,06	0,31
14	S6_5301001	G/A	217/31	10,8	$2,74 \times 10^{-5}$	0,07	0,36
15	S6_79550091	C/G	158/89	-8,45	$1,26 \times 10^{-5}$	0,08	0,45
16	S6_80646742	T/C	169/93	7,15	$3,16 \times 10^{-5}$	0,07	0,45
17	S9_20470625	C/T	217/13	15,75	$1,47 \times 10^{-5}$	0,09	0,57
18	S9_142752809	A/G	201/43	-8,7	$4,00 \times 10^{-5}$	0,07	0,34

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

^b La letra antes de la diagonal (/) es el nucleótido más frecuente; y la letra después de la diagonal (/) es el nucleótido menos frecuente.

^c Nº = número de líneas homocigotas para una variante determinada. El número antes de la diagonal (/) representa el número de individuos con el alelo mayor; y el número después de la diagonal (/) representa el número de individuos con el menor alelo.

^d El efecto aditivo fue calculado como la mitad de la diferencia entre la media de los homocigotos para el alelo menor y la media del homocigoto para el alelo mayor. Esta dado en cm.

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

^f RMIP, "resample model inclusion probability".

^g SNP proveniente del chip de Illumina, los restantes SNP sin el superíndice fueron obtenidos mediante GBS.

ANEXO VIII

Tabla A-VIII Nombre, efecto aditivo, variantes alélicas, valores para las pruebas de significación (valor-*P* y RMIP) y proporción de la varianza total explicada por cada SNP significativamente asociado con **días a floración masculina**.

#	ID SNP ^a	Alelos ^b	(N°) ^c	Efecto aditivo ^d	Valor- <i>P</i>	(<i>R</i> ²) ^e	RMIP ^f
1	S1_208762624	C/T	231/29	3,7	$1,13 \times 10^{-5}$	0,08	0,52
2	S1_237922464	C/T	191/52	2,7	$7,20 \times 10^{-5}$	0,07	0,36
3	S1_268434937	G/C	204/30	3,8	$1,19 \times 10^{-5}$	0,08	0,78
4	ss1_271970014 ^g	A/C	244/21	-3,9	$6,37 \times 10^{-5}$	0,06	0,3
5	S1_272275112	G/A	244/19	-4,1	$5,14 \times 10^{-5}$	0,06	0,35
6	S1_295982332	C/T	223/26	3,65	$7,26 \times 10^{-6}$	0,08	0,71
7	S2_13616629	C/G	239/6	-6,75	$3,20 \times 10^{-5}$	0,07	0,5
8	S3_158897644	T/C	162/82	-3,1	$1,62 \times 10^{-8}$	0,14	0,99
9	S3_159389461	C/G	166/80	-2,75	$9,22 \times 10^{-7}$	0,11	0,73
10	S3_159389463	C/A	174/70	-3,05	$1,25 \times 10^{-7}$	0,12	0,99
11	S3_159555813	C/A	185/66	-2,9	$3,97 \times 10^{-7}$	0,11	0,94
12	S3_161702976	G/T	197/42	3,05	$4,60 \times 10^{-6}$	0,09	0,53
13	S3_161702979	T/A	197/42	3,05	$4,60 \times 10^{-6}$	0,09	0,53
14	S4_5466142	T/C	128/116	2,05	$8,94 \times 10^{-5}$	0,06	0,35
15	S4_15583016	A/T	119/115	-2,45	$1,63 \times 10^{-5}$	0,08	0,53
16	ss4_44749825 ^g	G/A	224/39	3,45	$5,20 \times 10^{-5}$	0,06	0,51
17	ss4_44751539 ^g	C/A	226/39	3,45	$5,30 \times 10^{-5}$	0,06	0,5
18	S4_213549036	A/G	246/12	6,15	$1,38 \times 10^{-5}$	0,08	0,64
19	S5_175211216	T/C	172/69	-2,2	$7,22 \times 10^{-5}$	0,07	0,32
20	S5_175211217	G/A	172/69	-2,2	$7,22 \times 10^{-5}$	0,07	0,32
21	S5_175211218	T/C	172/69	-2,2	$7,22 \times 10^{-5}$	0,07	0,32
22	S5_175211219	T/A	172/69	-2,2	$7,22 \times 10^{-5}$	0,07	0,32
23	S5_176047685	A/C	209/44	2,95	$3,80 \times 10^{-5}$	0,07	0,4
24	S5_176047686	G/T	209/44	2,95	$3,80 \times 10^{-5}$	0,07	0,4
25	S5_176047687	C/A	209/44	2,95	$3,80 \times 10^{-5}$	0,07	0,4
26	S5_176047690	A/G	207/44	3	$3,29 \times 10^{-5}$	0,07	0,47
27	S5_176047703	A/G	209/44	2,95	$3,80 \times 10^{-5}$	0,07	0,4
28	S5_176047734	G/C	209/44	2,95	$3,80 \times 10^{-5}$	0,07	0,4
29	ss6_81693857 ^g	A/C	243/16	4,45	$5,47 \times 10^{-5}$	0,06	0,31
30	S8_123506087	C/G	168/86	-2,35	$6,50 \times 10^{-6}$	0,08	0,65
31	S8_123506089	A/T	168/86	-2,35	$6,50 \times 10^{-6}$	0,08	0,65
32	S8_123506141	C/T	168/86	-2,35	$6,50 \times 10^{-6}$	0,08	0,65
33	ss8_123507284 ^g	A/C	169/97	-2,25	$7,30 \times 10^{-6}$	0,08	0,61
34	S8_123509373	G/C	165/94	-2,3	$6,16 \times 10^{-6}$	0,08	0,61
35	S8_130796873	T/G	223/39	-3,05	$7,24 \times 10^{-6}$	0,08	0,59
36	S8_131176630	C/T	210/39	-3,1	$7,10 \times 10^{-6}$	0,09	0,51
37	S8_131176643	G/A	210/46	-2,55	$2,98 \times 10^{-5}$	0,07	0,55
38	S8_132047205	G/A	218/30	-3,5	$4,45 \times 10^{-5}$	0,07	0,46

Continúa en la siguiente página

Tabla A-VIII (continuación)

#	ID SNP ^a	Alelos ^b	(Nº) ^c	Efecto aditivo ^d	Valor- <i>P</i>	(<i>R</i> ²) ^e	RMIP ^f
39	S8_132199932	G/A	213/44	-2,5	$9,55 \times 10^{-5}$	0,06	0,4
40	S8_132201362	T/C	201/57	-2,45	$4,31 \times 10^{-5}$	0,07	0,6
41	S8_132201389	C/T	212/46	-2,5	$8,88 \times 10^{-5}$	0,06	0,37
42	S8_132328071	C/T	205/47	-2,55	$5,64 \times 10^{-5}$	0,07	0,48
43	S9_128723807	G/T	208/43	3,1	$3,41 \times 10^{-5}$	0,07	0,6
44	S9_144881095	C/A	209/32	3	$3,11 \times 10^{-5}$	0,08	0,31
45	S9_144881314	C/T	222/31	3,15	$1,22 \times 10^{-5}$	0,08	0,46
46	S9_147640561	T/G	236/17	3,95	$7,02 \times 10^{-5}$	0,07	0,33
47	S10_34232746	T/C	177/80	2,6	$2,93 \times 10^{-5}$	0,07	0,52
48	S10_148435462	T/C	202/58	2,4	$1,29 \times 10^{-4}$	0,06	0,31

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

^b La letra antes de la diagonal (/) es el nucleótido más frecuente; y la letra después de la diagonal (/) es el nucleótido menos frecuente.

^c N° = número de líneas homocigotas para una variante determinada. El número antes de la diagonal (/) representa el número de individuos con el alelo mayor; y el número después de la diagonal (/) representa el número de individuos con el menor alelo.

^d El efecto aditivo fue calculado como la mitad de la diferencia entre la media de los homocigotos para el alelo menor y la media del homocigoto para el alelo mayor. Esta dado en cm.

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

^f RMIP, “resample model inclusion probability”.

^g SNP proveniente del chip de Illumina, los restantes SNP sin el superíndice fueron obtenidos mediante GBS.

ANEXO IX

Tabla A-IX Nombre, efecto aditivo, variantes alélicas, valores para las pruebas de significación (valor-*P* y RMIP) y proporción de la varianza total explicada por cada SNP significativamente asociado con **días a floración femenina**.

#	ID SNP ^a	Alelos ^b	(Nº) ^c	Efecto aditivo ^d	Valor- <i>P</i>	(<i>R</i> ²) ^e	RMIP ^f
1	ss1_271970014 ^g	A/C	244/21	-4,15	5,95 × 10 ⁻⁵	0,06	0,39
2	S1_272275112	G/A	244/19	-4,3	6,29 × 10 ⁻⁵	0,06	0,33
3	S1_295982332	C/T	224/25	3,8	1,38 × 10 ⁻⁵	0,08	0,58
4	S2_41889238	A/C	242/15	4,25	5,63 × 10 ⁻⁵	0,07	0,35
5	S3_158897644	T/C	162/82	-3	2,03 × 10 ⁻⁷	0,12	0,96
6	S3_159389461	C/G	166/80	-2,7	8,85 × 10 ⁻⁶	0,09	0,56
7	S3_159389463	C/A	174/70	-2,9	2,11 × 10 ⁻⁶	0,1	0,8
8	S3_159555813	C/A	185/66	-2,85	3,26 × 10 ⁻⁶	0,09	0,84
9	S3_159610878	G/C	125/117	-2,35	7,90 × 10 ⁻⁶	0,08	0,63
10	S3_159610899	A/G	133/117	-2,15	1,70 × 10 ⁻⁵	0,08	0,52
11	S3_159610900	A/C	133/117	-2,15	1,70 × 10 ⁻⁵	0,08	0,52
12	S3_159610920	G/A	133/117	-2,15	1,70 × 10 ⁻⁵	0,08	0,52
13	S3_161702976	G/T	197/42	3,35	3,56 × 10 ⁻⁶	0,09	0,73
14	S3_161702979	T/A	197/42	3,35	3,56 × 10 ⁻⁶	0,09	0,73
15	S4_5466142	T/C	128/116	1,9	5,81 × 10 ⁻⁴	0,05	0,31
16	S4_5466378	G/C	139/101	2,3	6,14 × 10 ⁻⁵	0,07	0,33
17	S4_237030511	C/A	213/31	3,7	5,32 × 10 ⁻⁵	0,07	0,35
18	S5_174408639	A/C	232/17	4,3	4,11 × 10 ⁻⁵	0,07	0,3
19	S5_175211216	T/C	172/69	-2,45	3,70 × 10 ⁻⁵	0,07	0,45
20	S5_175211217	G/A	172/69	-2,45	3,70 × 10 ⁻⁵	0,07	0,45
21	S5_175211218	T/C	172/69	-2,45	3,70 × 10 ⁻⁵	0,07	0,45
22	S5_175211219	T/A	172/69	-2,45	3,70 × 10 ⁻⁵	0,07	0,45
23	S6_7124668	C/G	228/20	3,8	8,95 × 10 ⁻⁶	0,08	0,49
24	S6_36001139	G/A	229/27	3,7	3,40 × 10 ⁻⁵	0,07	0,37
25	S6_70572080	A/G	164/86	2,2	7,88 × 10 ⁻⁵	0,06	0,33
26	ss6_104859110 ^g	A/G	194/70	3,5	1,51 × 10 ⁻⁵	0,07	0,34
27	ss6_104865093 ^g	A/G	195/68	2,95	1,75 × 10 ⁻⁵	0,07	0,39
28	S6_139199401	C/A	246/19	5,2	6,27 × 10 ⁻⁶	0,08	0,77
29	S6_139199437	G/A	246/19	5,2	6,27 × 10 ⁻⁶	0,08	0,77
30	S6_139212559	T/G	246/19	4,7	2,99 × 10 ⁻⁵	0,07	0,51
31	S7_152699257	T/G	185/54	-2,35	4,45 × 10 ⁻⁵	0,07	0,41
32	S8_130796873	T/G	223/39	-3,3	5,12 × 10 ⁻⁶	0,08	0,72
33	S8_131176630	C/T	210/39	-3,45	3,01 × 10 ⁻⁶	0,09	0,71
34	S8_131176643	G/A	210/46	-2,6	5,91 × 10 ⁻⁵	0,07	0,48
35	ss8_131981829 ^g	G/A	195/66	-2,4	9,32 × 10 ⁻⁵	0,06	0,31
36	S8_132047205	G/A	218/30	-4	1,60 × 10 ⁻⁵	0,08	0,6
37	S8_162964995	A/C	226/37	2,75	3,49 × 10 ⁻⁵	0,07	0,33
38	S9_128723807	G/T	208/43	3,3	3,78 × 10 ⁻⁵	0,07	0,57
39	S10_34232746	T/C	177/80	2,9	1,76 × 10 ⁻⁵	0,07	0,53

Continúa en la siguiente página

Tabla A-IX (continuación)

#	ID SNP ^a	Alelos ^b	(Nº) ^c	Efecto aditivo ^d	Valor- <i>P</i>	(<i>R</i> ²) ^e	RMIP ^f
40	S10_34232747	T/C	180/78	2,9	$2,12 \times 10^{-5}$	0,07	0,48
41	S10_34232749	C/A	180/78	2,8	$4,27 \times 10^{-5}$	0,07	0,38
42	ss10_148435462 ^g	A/G	202/62	2,7	$5,83 \times 10^{-5}$	0,06	0,35
43	S10_148435462	T/C	202/58	2,55	$7,18 \times 10^{-5}$	0,06	0,33

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

^b La letra antes de la diagonal (/) es el nucleótido más frecuente; y la letra después de la diagonal (/) es el nucleótido menos frecuente.

^c Nº = número de líneas homocigotas para una variante determinada. El número antes de la diagonal (/) representa el número de individuos con el alelo mayor; y el número después de la diagonal (/) representa el número de individuos con el menor alelo.

^d El efecto aditivo fue calculado como la mitad de la diferencia entre la media de los homocigotos para el alelo menor y la media del homocigoto para el alelo mayor. Esta dado en cm.

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

^f RMIP, “*resample model inclusion probability*”.

^g SNP proveniente del chip de Illumina, los restantes SNP sin el superíndice fueron obtenidos mediante GBS.

PUBLICACIONES

De los resultados de la presente investigación surgen dos publicaciones SCI:

- 1) Samayoa LF, Butrón A y Malvar AM. 2014. QTL mapping for maize resistance and yield under infestation with *Sesamia nonagrioides*. Molecular Breeding DOI 10.1007/s11032-014-0119-y

Mol Breeding
DOI 10.1007/s11032-014-0119-y

QTL mapping for maize resistance and yield under infestation with *Sesamia nonagrioides*

Luis Fernando Samayoa · Ana Butron ·
Rosa Ana Malvar

Received: 4 January 2014 / Accepted: 20 May 2014
© Springer Science+Business Media Dordrecht 2014

- 2) Samayoa LF, Malvar RA, Olukolu BA, Holland JB y Butrón A. 2014. 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. Enviado a la revista Molecular Plant-Microbe Interactions.

Page 1 of 56

Molecular Plant-Microbe Interactions

- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
 - 8
 - 9
 - 10
 - 11
 - 12
 - 13
 - 14
 - 15
 - 16
 - 17
- 1
 - 2
 - 3
 - 4
 - 5
 - 6
 - 7
- 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.**
- Luis Fernando Samayoa^{1*}, Rosa Ana Malvar¹, Bode A Olukolu², James B Holland^{2,3}, Ana Butrón¹.