



UNIVERSIDAD DE BUENOS AIRES
Facultad de Ciencias Exactas y Naturales
Departamento de Ecología, Genética y Evolución

Mapeo fino de un gen de resistencia a la roya de la hoja, de expresión en planta adulta en el cromosoma 4BL, proveniente del cultivar tradicional de trigo con resistencia durable Sinvalocho MA.

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires.
Área Ciencias Biológicas.

Lic. Marisol Alicia Dabove

Directora de Tesis: Dra. María José Diéguez

Director Adjunto de Tesis: Ing. Agr. Francisco Sacco

Consejero de Estudios: Dr. Horacio Esteban Hopp

Lugar de trabajo: Instituto de Genética "Ewald A. Favret" CICVyA – INTA

Fecha de defensa: 19 de diciembre de 2023



El objetivo general del presente proyecto es realizar el mapeo de alta resolución de un gen de resistencia a roya de la hoja de trigo identificado en una variedad con resistencia durable a esta enfermedad.

La identificación de marcadores moleculares ligados a caracteres de interés permite asistir de manera eficiente la incorporación de los mismos en los programas de mejoramiento. A su vez, la disponibilidad de un mapa de alta resolución permite definir un intervalo donde las distancias genéticas son representativas de las distancias físicas, requisito necesario para abordar la búsqueda de genes candidatos para su clonado posicional.

El gen *LrcSV2* es un gen de resistencia de efecto mayor, complementario del gen *LrSV2*, que fue reportado como uno de los factores con un efecto aditivo significativo en la resistencia durable a roya de la hoja del trigo en el cultivar tradicional argentino Sinvalocho MA.

El análisis de 2152 individuos F2 derivados del cruzamiento de Sinvalocho (parental resistente) X Purple Straw (parental susceptible), permitió delimitar al gen *LrcSV2* dentro de un intervalo de 0,09cM definido por los marcadores FSs135 y FSp16. Este intervalo genético equivale a 1,57Mb en la secuencia de la variedad modelo Chinese Spring donde se anotaron 16 genes de alta confiabilidad.

Palabras clave: *Triticum aestivum*. Mapeo de alta resolución. Resistencia durable. Genes de resistencia. *Puccinia triticina*. Roya de la hoja de trigo

"Fine Mapping of an Adult Plant Leaf Rust Resistance Gene, on Chromosome 4BL, from the Traditional Wheat Cultivar with Durable Resistance Sinvalocho MA."

The overall objective of the present project is to perform high-resolution mapping of a leaf rust resistance gene in wheat, identified in a variety with durable resistance.

The identification of molecular markers linked to traits of interest allows for the efficient incorporation of these markers into breeding programs. Furthermore, the availability of a high-resolution map allows the definition of an interval where genetic distances are representative of physical distances, a necessary requirement for the identification of candidate genes for positional cloning.

The *LrcSV2* gene is a major-effect resistance gene, complementary to the *LrSV2* gene, which has been reported as one of the factors with a significant additive effect on durable leaf rust resistance in the traditional argentine cultivar Sinvalocho MA.

The analysis of 2152 F₂ individuals derived from the cross between Sinvalocho (resistant parent) and Purple Straw (susceptible parent) allowed for the delimitation of the *LrcSV2* gene within an interval of 0.09cM defined by the markers FSs135 and FSp16. This genetic interval corresponds to 1.57Mb in the sequence of the model variety Chinese Spring, where 16 high confidence genes were reported.

Keywords: *Triticum aestivum*. High-resolution mapping. Durable resistance. Resistance genes. *Puccinia triticina*. Wheat leaf rust.

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN	1
2. HIPÓTESIS	17
3. OBJETIVOS	18
4. MATERIALES Y MÉTODOS	
4.1 Material vegetal	19
4.2 Infección con roya de la hoja	21
4.3 Extracción y cuantificación de ADN	22
4.4 Marcadores moleculares	23
4.4.1 SSR	23
4.4.2 SNPs	24
4.5 Amplificación por PCR	25
4.5.1 SSR	25
4.5.2 SNPs	25
4.6 Resolución y visualización de los productos de PCR	26
4.6.1 SSR	26
4.6.2 SNPs	28
4.7 Análisis de datos y mapeo genético	28
5. RESULTADOS	
5.1 Mapa de baja resolución del gen <i>LrcSV2</i>	30
5.2 Mapa de alta resolución del gen <i>LrcSV2</i>	33
5.2.1 Diseño de marcadores moleculares asociados al gen <i>LrcSV2</i>	34
5.2.1.1 SSR	34
5.2.1.2 SNPs	35
5.2.2 Análisis de una población segregante F2 de alto número de individuos	37
5.2.3 Análisis de recombinantes y mutantes de delección derivados de otras poblaciones	43
6. DISCUSIÓN	45
7. CONCLUSIONES	58

8. BIBLIOGRAFÍA	59
9. ANEXOS	
9.1 Lista de abreviaturas	74
9.2 Tablas de resultados	77

1. INTRODUCCIÓN

El trigo es uno de los cereales más cultivados en el mundo, con una producción en la campaña 2021/22 que superó las 700 millones de toneladas (<https://www.ers.usda.gov/webdocs/outlooks/104470/whs-22h.pdf?v=8189>). Más del 90% del trigo producido es el denominado “trigo pan”, perteneciente a la especie *Triticum aestivum*, cuyos granos son utilizados principalmente para la alimentación humana. En menor medida, se produce el “trigo candeal” (*T. durum*), utilizado generalmente para la elaboración de sémola y pastas. Durante ese mismo periodo, la producción en Argentina fue de 22 millones de toneladas, con un rinde promedio de 34qq/ha, volumen que representa un aumento del 22% en comparación con el ciclo previo y un 11% respecto al rendimiento promedio de las últimas 5 campañas (Bolsa de Cereales de Buenos Aires – Informe de cierre de campaña 2021/22). El valor estimado de esta producción fue superior a los 5.900 millones de dólares.

La zona triguera de Argentina se extiende desde el norte (Chaco y NOA) hasta el sur de la provincia de Buenos Aires (Figura 1), y la campaña 2021/22 abarcó más de 5.800.000ha de siembra, siendo Buenos Aires, Santa Fe, Córdoba y Entre Ríos las principales provincias productoras, abarcando un 83% del área total sembrada con trigo del país (SISA – Informe de trigo 2021-2022).

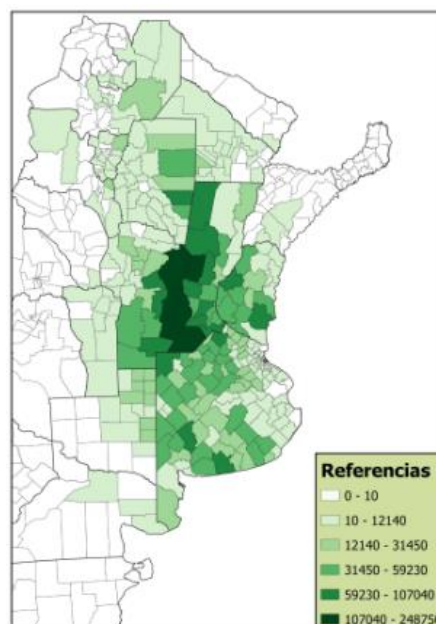


Figura 1: Distribución geográfica de la superficie informada de siembra de trigo, en hectáreas y por departamentos, durante la campaña 2021/22 (SISA – Informe de trigo 2021-2022).

T. aestivum es una monocotiledónea perteneciente a la familia de las gramíneas. Es alohexaploide, con tres subgenomas homeólogos (AABBDD, $2n=6x=42$), resultante de eventos de hibridación que probablemente involucraron a *T. monococcum* (genoma AA), a un grupo de especies del género *Aegilops spp* (genoma BB), y a *T. tauschii* (genoma DD). *T. aestivum* es una especie autógama, con un genoma complejo pero con comportamiento diploide, lo que resulta una ventaja operativa para la manipulación de las poblaciones experimentales desarrolladas a partir de cruzamientos, sumado a la plasticidad genómica que caracteriza a este tipo de especies (Dubcovsky y Dvorak 2007).

Los esfuerzos por secuenciar este genoma comenzaron en 2005 con la creación del IWGSC (*International Wheat Genome Sequencing Consortium*). La primera secuencia de referencia, de calidad y con una anotación completa, fue publicada en agosto de 2018 y corresponde a Chinese Spring (CS), una variedad originaria de Chengdu, provincia de Sichuan, China (IWGSC 2018). Se utilizó esta variedad como modelo de secuenciación ya que a partir de la misma se habían desarrollado diferentes líneas de adición, de delección y nulitretasómicas, entre otras. Este recurso ha desempeñado un rol fundamental en los avances sobre genética de trigo, permitiendo la localización precisa de numerosos caracteres, tanto a nivel de cromosoma como en subregiones dentro de los mismos (Sears 1952, 1954, 1977). La información generada a partir de la secuencia del genoma de CS, el mapeo físico utilizando líneas de delección, y las anotaciones de genes de alta calidad realizadas en especies modelo, ha generado un conocimiento robusto acerca de la organización de los genes en trigo, permitiendo el desarrollo de marcadores basados en secuencia (Clavijo *et al.* 2017). Hasta la fecha se han publicado 15 genomas adicionales de diferentes variedades, 10 de los cuales están ensamblados en cromosomas (Walkowiak *et al.* 2020).

Su contenido de nucleótidos es de aproximadamente 14.226.000.000pb/1C, uno de los genomas vegetales más grandes secuenciados, siendo más del 85% secuencias repetitivas (Zhu *et al.* 2021). La distribución de estas secuencias repetitivas no es al azar, sino que la densidad génica varía entre 1/87 a 1/184kb (Brenchley *et al.* 2012)

dando lugar a regiones con bajo contenido de ADN repetitivo y mayor cantidad de genes y regiones con alto contenido de ADN repetitivo y menor cantidad de genes.

Se han reportado un total de 266.753 genes en todo el genoma, de los cuales 106.913 son de alta confiabilidad (*high confidence*) y 159.840 de baja confiabilidad (*low confidence*) (Zhu *et al.* 2021). Estudios de transcriptómica han demostrado que en el grano de trigo en desarrollo se expresan más de 30.000 genes (Wan *et al.* 2008) mientras que análisis proteómicos en grano maduro revelaron la presencia de 1125 productos proteicos expresados en este estadio (Skylas *et al.* 2000).

La comparación entre la composición génica de *loci* ortólogos en trigo, cebada y arroz demostró una alta conservación, y en muchos casos, el mismo ordenamiento (*loci* sinténicos) permitiendo la búsqueda de genes de interés en genomas menos complejos, como los mencionados y *Brachypodium spp*, para luego explorar el genoma de trigo (Feuillet *et al.* 1999).

El principal objetivo del mejoramiento en trigo es la obtención de variedades con mayor rendimiento, mejor calidad y mayor seguridad de cosecha. Entre los factores que afectan a esta última están las enfermedades de origen fúngico, como las royas, siendo la roya de la hoja una de las enfermedades más importantes, presentando impacto en la producción a nivel mundial (Samborski 1985, Huerta-Espino *et al.* 2011, Kolmer *et al.* 2013). Esta enfermedad es endémica en Argentina y su agente causal es el hongo biótrofo *Puccinia triticina*. Los efectos perjudiciales que produce sobre las plantas de trigo se traducen en una disminución del rendimiento, tanto por un menor número de granos por espiga como por un menor tamaño de los mismos, particularmente en los años en los que las condiciones ambientales de temperatura y humedad son más favorables para su desarrollo.

La llanura pampeana es un área plana, considerada como una unidad epidemiológica junto con Uruguay, Paraguay y el sur de Brasil (Saari y Prescott 1985). En esta zona, la siembra de trigo se realiza cada año de mayo a septiembre, permitiendo al patógeno reproducirse de forma asexual por varias generaciones, comenzando en los cultivares más tempranos. En evaluaciones realizadas en la

Estación Experimental Agropecuaria Marcos Juárez del INTA, se pudo observar que las infecciones tempranas con roya de la hoja ocasionaban pérdidas de rendimiento de entre un 38 a un 50% de la producción, contrastando con el 8,7% de pérdida cuando la infección ocurría de forma tardía (Galich y Galich 1996).

P. triticina pertenece al *phylum* Basidiomycota y es un biótrofo obligado, ya que solamente se multiplica sobre el tejido vivo de su hospedante específico. Este patógeno consume fotosintatos disponibles y afecta el área verde fotosintética de toda la planta, pero principalmente de la hoja bandera, la cual es la mayor fuente de nutrientes para el llenado de los granos, y es la última que se forma antes de la espiga (McMullen y Rasmussen 2002). Es un hongo heteroico (dos hospedantes para completar su ciclo sexual) y policíclico (puede reinfectar al mismo u otro individuo hospedante en el mismo ciclo de vida), multiplicándose por esporas asexuales que reinfectan a las plantas de trigo cada 15-20 días (Figura 2). Dado que el huésped alternativo *Thalictrum speciosissimum* solo crece en algunas regiones del hemisferio norte, en Argentina no se produce la fase sexual del ciclo de vida. La fase asexual ocurre sobre *T. aestivum*, donde se producen las uredosporas unicelulares de unos 20µm, que pueden propagarse a través del viento con suma facilidad y a grandes distancias (Figura 3). Su germinación se produce al entrar en contacto con la superficie de la hoja de trigo, siempre y cuando las condiciones ambientales sean las propicias. La infección es activa y se produce a través de los estomas de la epidermis. Dentro de las 24 horas post-inoculación es emitido un tubo germinativo que forma los apresorios (Figura 4). Posteriormente, el micelio se propaga por los espacios intercelulares del mesófilo de la hoja y forma haustorios, un tipo de hifa especializada que actúa como estructura de alimentación. Si bien la pared de la célula vegetal es traspasada, este haustorio no es verdaderamente intracelular, dado que se encuentra separado del citoplasma del huésped por la membrana extra-haustorial. A los 7-10 días se forman las pústulas características, portadoras de uredosporas, las cuales reinician el proceso de infección y diseminación de la enfermedad (Bolton *et al.* 2008) (Figura 5). En cuanto a la supervivencia de las uredosporas en el ambiente, algunos estudios apoyan la idea de

que estas se mueven a través de grandes distancias, reiniciando los ciclos infecciosos cada año. En cambio, otros apoyan la hipótesis de la existencia de poblaciones locales que sobreviven en plantas voluntarias de un ciclo agrícola a otro, o bien la combinación de ambos fenómenos (Ingala 2008).

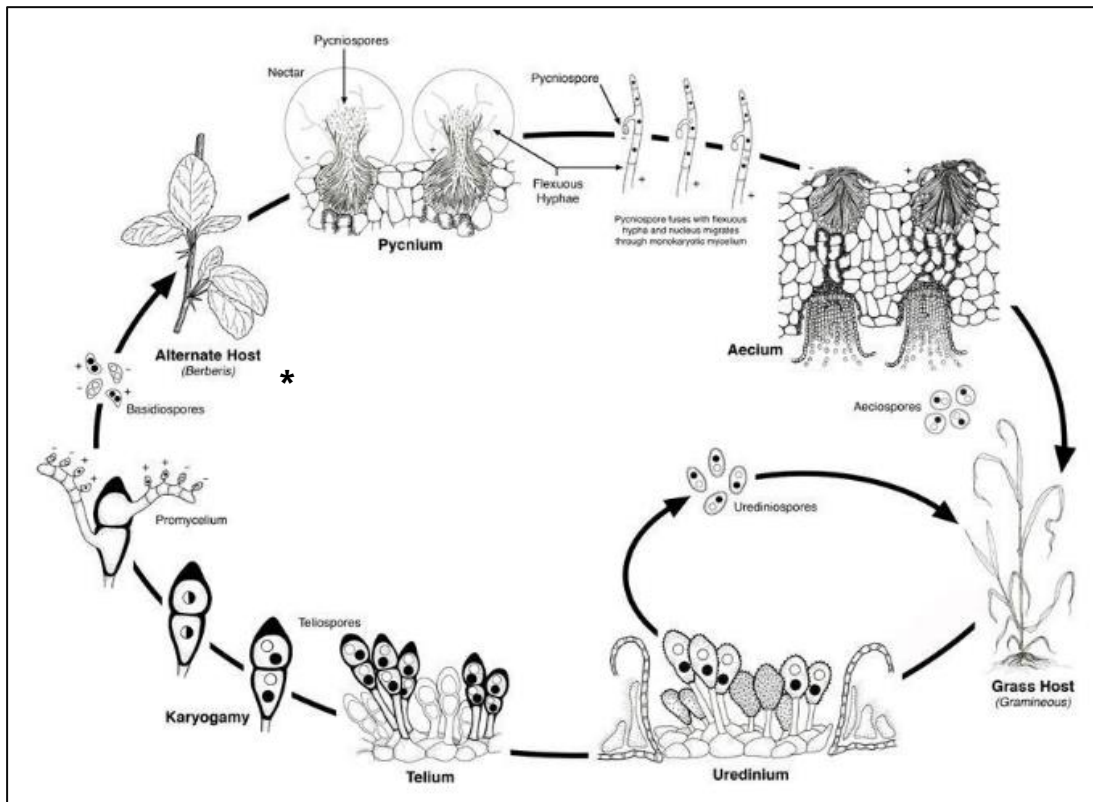


Figura 2: ciclo biológico de *Puccinia triticina* (Kolmer 2013). *El huésped alternativo de *P. triticina* es *T. speciosissimum*.

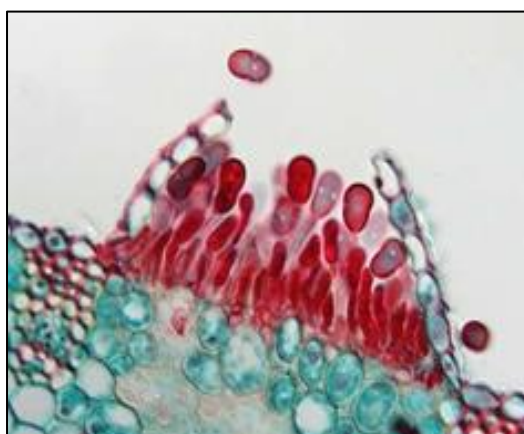


Figura 3: Vista microscópica de un uredo (1,5mm) y uredosporas (20µm). Departamento de Botánica, Universidad de Wisconsin.

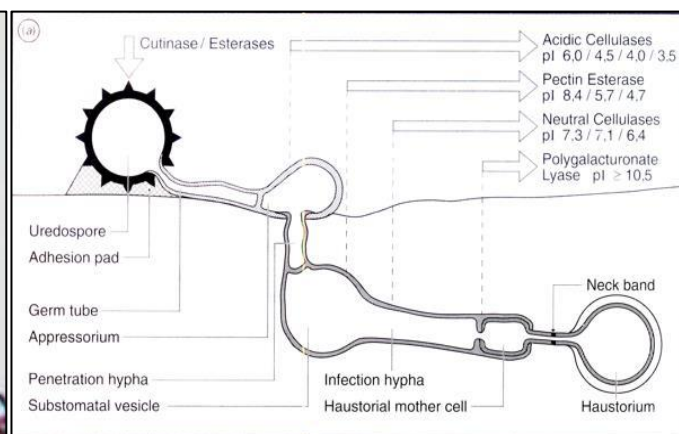


Figura 4: Esquema de las estructuras infecciosas generadas por *P. triticina* sobre *T. aestivum* (Mendgen 1996).



Figura 5: Vista macroscópica de los uredos generados por *P. triticina* sobre *T. aestivum*.

En Argentina se han encontrado numerosas variantes patogénicas, lo que indica la existencia de mecanismos que producen variación genética distintos a la meiosis, como pueden ser las mutaciones espontáneas y la recombinación somática (Ingala *et al.* 2003, Park y Wellings 2012). Estas variantes patogénicas se denominan "razas" y se definen mediante un sistema de clasificación estándar que establece relaciones entre fenotipos de la enfermedad y genes específicos presentes en líneas diferenciales de trigo (Long y Kolmer 1989, McIntosh *et al.* 1995, Chen *et al.* 2002, Jin *et al.* 2008). Esta gran variabilidad le otorga al patógeno una gran adaptabilidad (Kolmer 2005, Huerta-Espino *et al.* 2011, McCallum *et al.* 2016). La aparición de formas virulentas que sobrepasan la resistencia desplegada en el campo es un fenómeno conocido como "ciclos de auge y caída" (Hulbert y Pumphrey 2014). En la mayoría de los casos, cuando en una extensa área de cultivo se realiza un cambio abrupto de variedad, o grupos de variedades, se ejerce una presión de selección considerable sobre las poblaciones del patógeno, permitiendo que las nuevas cepas se seleccionen y se multipliquen asexualmente de forma rápida, provocando epifitias.

Dentro de los diversos mecanismos de defensa que poseen las plantas, la resistencia del no-hospedante es la primera barrera a la cual se enfrenta un patógeno al entrar en

contacto con ellas. Estas consisten principalmente en defensas físicas o químicas preformadas como paredes celulares gruesas, enzimas antimicrobianas presentes en la superficie foliar y metabolitos secundarios. Cuando las defensas preformadas son superadas, las plantas detectan ciertos dominios conservados en las membranas plasmáticas de los patógenos (PAMPs, *pathogen-associated molecular patterns*) e inducen un primer nivel de respuesta denominado Inmunidad activada por patrones (PTI, *pattern-triggered immunity*). Sin embargo, los patógenos más especializados sobre un determinado hospedante vegetal han desarrollado factores de virulencia, denominados efectores, capaces de neutralizar la PTI. Los efectores son proteínas secretadas dentro de la célula huésped, o en el apoplasto, para favorecer el desarrollo del patógeno. Si los efectores no son reconocidos por la planta, son capaces de suprimir la respuesta del primer nivel y así facilitar el proceso de infección y colonización por parte del patógeno (ETS, *effector triggered susceptibility*).

En contraposición a los factores de virulencia, las plantas han desarrollado un segundo nivel de resistencia mediante proteínas R, las cuales poseen receptores proteicos con dominios de unión a nucleótido (NBS, *nucleotide binding site*) y dominios ricos en leucina (LRR, *leucine rich repeat*) y son capaces de reconocer de forma directa o indirecta a los efectores, activando la denominada Inmunidad inducida por efectores (ETI, *effector-triggered immunity*). La mayoría de los genes R codifican proteínas citoplasmáticas de tipo NBS-LLR (Balint 2019). Este modelo de respuesta fue propuesto por Jones y Dangl (2006) y se lo denomina en "Zig-zag" (Figura 6).

Luego de este estadio, la interacción continúa evolucionando dado que la selección natural impulsa a los patógenos a evitar la ETI, ya sea mediante la eliminación o diversificación del efector que es reconocido, o adquiriendo efectores adicionales que la supriman. Del mismo modo, también se producen en el hospedante nuevas especificidades R, lo que permite que la ETI pueda activarse nuevamente. El resultado de este mecanismo es la activación de la Respuesta Hipersensible (HR, *hypersensitive response*). Este término fue acuñado por primera vez por E.C. Stakman en 1915, y es un tipo de respuesta caracterizado por una muerte celular rápida en el punto de penetración del patógeno, que se visualiza macroscópicamente como un halo

necrótico, y resulta en una supresión total o parcial del desarrollo de la enfermedad. Su presencia es generalizada entre las plantas superiores, sugiriendo que es un componente extremadamente efectivo en el sistema inmune vegetal. Sin embargo, el término HR describe una amplia gama de fenómenos cuyo único punto en común es la observación macroscópica de la muerte celular en forma de *flecks* (Figura 7) (Balint *et al.* 2019).

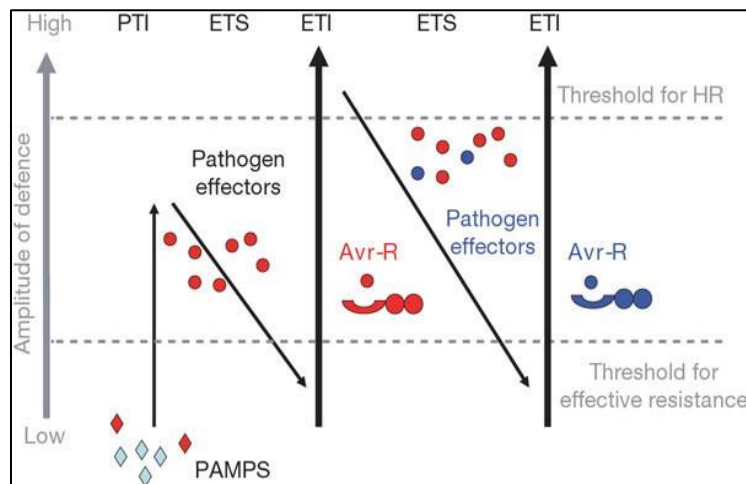


Figura 6: Modelo de respuesta en Zig-zag (Jones y Dangl 2006).



Figura 7: Flecks. Pequeños puntos necróticos en el tejido de *T. aestivum* en respuesta a la infección por *P. tritricina*, resultado de la activación de la respuesta hipersensible (HR).

En el caso de la roya de la hoja, el nivel de respuesta al patógeno varía de forma continua, pero Mains y Jackson (1926) desarrollaron una escala discreta a fin de cuantificar el nivel de infección (IT, *infection type*), considerando como 0 al más resistente y 4 al nivel máximo de susceptibilidad (Figura 8) (Tabla 1).

Los estudios realizados por Flor (1956) en roya del lino caracterizaron las bases genéticas de la interacción hospedante-patógeno, y los experimentos realizados sobre

la herencia de la virulencia en el patógeno y de la resistencia en el hospedante condujeron a la teoría gen a gen. Esta teoría establece que por cada gen de avirulencia (*Avr*) en el patógeno existe un gen de resistencia (*R*) en el huésped, y que de la interacción entre ambos productos deriva la activación de los mecanismos de defensa. Un gen de resistencia sólo es efectivo si el patógeno que intenta infectar posee el correspondiente alelo de avirulencia, cualquier otra combinación provocará una reacción de susceptibilidad (Tabla 2).

	Respuesta del huésped	Síntomas
0	Inmune	No se observan uredos o pústulas
;	Muy Resistente	Flecks* hipersensibles
1	Resistente	Pequeños uredos con necrosis
2	Resistente a moderadamente resistente	Uredos pequeños a medianos con islas verdes rodeadas por necrosis y clorosis
3	Resistencia moderada/susceptibilidad moderada	Uredos medianos con o sin clorosis
4	Susceptible	Uredos grandes sin clorosis
X	Resistente/susceptible	Heterogéneo, con todos los tipos de infección.

Figura 8: Escala de Mains y Jackson (1926), donde se establecen distintos grados de resistencia o susceptibilidad de acuerdo al tipo de respuesta del huésped. R: Resistente; MR: Moderadamente Resistente; MS: Moderadamente Susceptible; S: Susceptible (McIntosh *et al.* 1995) (izq).

Tabla 1: Clasificación de los tipos de infección (IT) según Mains y Jackson (1926). Extraído de Bowden 2000 (der).

	Genotipo hospedante	
Genotipo patógeno	R1	r1
Avr1	Huésped y patógeno incompatibles. RESISTENCIA	Huésped y patógeno compatibles. ENFERMEDAD
avr1	Huésped y patógeno compatibles. ENFERMEDAD	Huésped y patógeno compatibles. ENFERMEDAD

Tabla 2: Combinaciones de genes y sus respuestas en base a la teoría gen a gen propuesta por Flor (1956).

Las estrategias de control de roya de la hoja incluyen las prácticas culturales, el uso de agroquímicos, y el control genético (Ellis *et al.* 2014).

El uso de genes de resistencia representa una de las formas más sustentables ya que elimina, o al menos restringe, la necesidad del uso de agroquímicos, los cuales implican un gasto adicional para el productor y plantean preocupaciones a nivel ambiental y de salud (Pink 2002). Sin embargo, la alta variabilidad usualmente observada en las poblaciones de roya de la hoja requiere un esfuerzo constante de identificación, evaluación e incorporación de nuevos genes de resistencia dentro de los planes de mejoramiento (Favret *et al.* 1983, Kolmer 1996, Germán *et al.* 2007, Huerta-Espino *et al.* 2011).

Los genes de resistencia a la roya de la hoja son denominados *Lr* (*leaf rust*), y provienen de trigo o de especies afines. Usualmente, se clasifican en función del estadio en el cual comienzan a expresarse. Los genes de resistencia en todos los estadios (*ASR, all stage resistance*) son aquellos cuya expresión comienza en la primera hoja y se mantiene durante todo el ciclo de vida de la planta, mientras que los genes de resistencia en planta adulta (*APR, adult plant resistance*) expresan la resistencia en estadios posteriores al de plántula, alcanzando su máxima expresión en la hoja bandera (Samborski 1985). Además, los genes de resistencia también se han clasificado en específicos y no-específicos o "de amplio espectro". La resistencia específica sigue el modelo gen por gen descrito por Flor (1955), mientras que algunos de los genes no-específicos son además efectivos contra varios patógenos. Existen también los denominados genes "*slow rusting*", los cuales están asociados a un incremento en el tiempo entre la infección y la esporulación, y a una menor producción y menor tamaño de uredos.

Hasta la fecha, se han confirmado y catalogado más de 80 de estos *loci* y al menos otros 14 han sido nombrados de manera temporal (McIntosh *et al.* 1995, 2022, Bariana *et al.* 2022, Kumar *et al.* 2022, Xu *et al.* 2022, Kolmer *et al.* 2023). Se han descrito además numerosos *loci* de caracteres cuantitativos (QTL, *quantitative trait loci*) (Pinto Da Silva *et al.* 2018). Diez genes *Lr* han sido clonados hasta el momento: los ASR *Lr1* (Cloutier *et al.* 2007), *Lr9* (Wang *et al.* 2023), *Lr10* (Feuillet *et al.* 2003), *Lr14a* (Kolodziej

et al. 2021), *Lr21* (Huang *et al.* 2003) y *Lr42* (Lin *et al.* 2022), y los APR *Lr13* (Hewitt *et al.* 2021), *Lr22a* (Thind *et al.* 2017), *Lr34/Yr18/Sr57/Pm83* (Krattinger *et al.* 2009) y *Lr67/Yr46/Sr55/Pm46* (Moore *et al.* 2015). Los genes ASR *Lr1*, *Lr10*, *Lr21* y *Lr42* pertenecen a la familia de genes NLR (*nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat*). El gen *Lr9* es una inusual proteína quinasa fusionada en tándem, y *Lr14a* es una proteína localizada en la membrana plasmática que contiene 12 repeticiones anquirinas (ANK), las cuales desempeñan un papel en la interacción entre proteínas, y similitudes estructurales con canales catiónicos no selectivos permeables a Ca²⁺. Los genes APR *Lr13* y *Lr22a* también pertenecen a la familia de genes NLR y son específicos. Por otro lado, dentro de los genes de amplio espectro, *Lr34* es un transportador ABC (*ATP binding cassette*) y *Lr67* es un transportador de hexosa defectuoso con efecto dominante negativo sobre el transportador funcional debido a dimerización.

Si bien existe una gran variabilidad patogénica, se han descrito algunas variedades de trigo que se comportan como resistentes por largos períodos de tiempo, aún luego de alcanzar una gran difusión (Johnson 1981). A estas variedades se las conoce como portadoras de resistencia durable a la roya.

Los programas de mejoramiento han favorecido el uso del apilado de genes ("*stacking*" o "*pyramiding*") para promover la durabilidad de la resistencia, usualmente combinando diferentes tipos de genes de resistencia. Por ejemplo, se obtuvieron altos niveles de resistencia durable en el cultivar canadiense Canberry al combinar los genes *Lr2a*, *Lr16*, *Lr23*, *Lr34* y *Lr46* (Bokore *et al.* 2022). En todas las variedades con resistencia durable se han identificado genes APR, lo que permite suponer una correlación positiva entre la presencia de los mismos y la durabilidad de la resistencia (Sawhney *et al.* 1989, Kolmer 1996, Pretorius y Roelfs 1996, Messmer *et al.* 2000, Schnurbusch *et al.* 2004, Ingala *et al.* 2012, Darino *et al.* 2015).

Dada la importancia de este tipo de variedades, y su uso potencial como fuente de resistencia, resulta de interés realizar estudios sobre su base genética. Una adecuada caracterización de estos genes, incluye la descripción de su modo de herencia, posibles

interacciones, localización cromosómica y mapeo genético. La identificación de los mismos a través de marcadores moleculares ligados permite la selección asistida por marcadores (MAS, *marker-assisted selection*), independientemente de los efectos epistáticos que pudieran existir. La validación de los genes de resistencia a campo bajo condiciones de infección natural brinda una información fundamental en la identificación de las combinaciones más efectivas para el control esta enfermedad.

Entre las variedades con resistencia durable a la roya de la hoja en Argentina, se puede mencionar a los cultivares Sinvalocho MA, Buck Manantial, Buck Poncho, El Gaucho FA, entre otras (Favret *et al.* 1983, Antonelli comunicación personal), todas ellas utilizadas en programas de mejoramiento tanto nacionales como internacionales. El cultivar Sinvalocho MA (SV), obtenido del cruzamiento Klein Sin Rival x 38 MA, ha sido fuente de resistencia a la roya de la hoja en Argentina y en el este de Europa (Favret *et al.* 1983, Sacco *et al.* 1995). Klein Sin Rival proviene de un derivado del cruzamiento Americano 44D x Barleta 7D, y 38MA de Chino x Barleta. Todos estos cultivares se produjeron a principios del s.XX en Argentina, y algunos de ellos, como Americano 44D y 38MA, son conocidos por llevar genes de resistencia en planta adulta (Antonelli 1983, Roelfs 1988, Pérez y Roelfs 1989).

Un estudio detallado sobre las bases genéticas de la resistencia durable en SV permitió identificar, hasta el momento, 3 genes específicos de resistencia a la roya de la hoja. Se localizó un gen ASR recesivo, alelo del gen *Lr3*, en el cromosoma 6BL (Haggag *et al.* 1973, Suárez y Favret 1984, Sacco *et al.* 1992, Diéguez *et al.* 2006), y dos genes APR dominantes: el *LrSV1* en el cromosoma 2DS y el *LrSV2* en el cromosoma 3BS (Ingala *et al.* 2012). En evaluaciones a campo, se observó que dentro de la población de RILs (*Recominant Inbred lines*) derivada del cruzamiento de SV x Gama6 (G6, línea experimental derivada de SV, susceptible), aquellos que contenían a los genes *LrSV1* y *LrSV2* presentaban respectivamente un 60 y 65% de las pústulas observadas en las líneas que no los contenían. Este porcentaje se vio reducido al 55% cuando ambos genes estaban presentes (Ingala *et al.* 2012). Durante el análisis de una población F2 derivada del cruzamiento del RIL46 (R46, línea portadora del gen *LrSV2* y derivada de SV x G6) por la variedad comercial susceptible Relmó Siriri (Si) se detectó

la presencia en SV de un cuarto gen de resistencia a la roya de la hoja en el cromosoma 4BL, al cual se lo denomino *LrcSV2* (Diéguez *et al.* 2018). Estos genes forman un sistema complementario, ya que es necesaria la presencia de alelos dominantes en ambos para la determinación de la resistencia a la roya de la hoja en planta adulta.

El uso de marcadores moleculares estrechamente ligados a genes de interés permite no solamente seguir el destino de los mismos en poblaciones segregantes, sino también desarrollar mapas genéticos con diferentes grados de resolución, con el objetivo de proponer genes candidatos y dilucidar las bases moleculares de la resistencia. Los SSR (*simple sequence repeats*) son también llamados microsatélites, y fueron descritos por Hamada *et al.* (1982). Se basan en la amplificación de fragmentos de ADN utilizando cebadores (*primers*) específicos que flanquean arreglos de mono-di-tri-tetra o pentanucleótidos en serie, que muestran altos niveles de variación basados en el diferente número de unidades repetidas en cada alelo (Morgante y Olivieri 1993). Son marcadores de bajo costo, alta reproducibilidad, codominancia y alto grado de polimorfismo. Hay una gran disponibilidad de SSR en trigo, ya que numerosos mapas genéticos fueron elaborados a partir de los mismos (<https://wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSRclub/GeneticPhysical/>).

Los marcadores de tipo ISBPs (*insertion insertion site-based polymorphisms*) se basan en el alto grado de polimorfismo existente entre los sitios de inserción de los elementos transponibles (TE, *transposable elements*), los cuales son propensos a insertarse dentro de otros TE, formando estructuras anidadas. Si bien son marcadores dominantes, se encuentran altamente metilados y la desaminación de las citosinas metiladas produce una alta frecuencia de transiciones CxT, haciendo de éstos buenos candidatos para la búsqueda de SNPs (*single nucleotide polymorphism*) (Paux *et al.* 2006, 2010). Los SNPs son el tipo de variación más frecuente en los organismos y debido a su carácter codominante, abundancia y fácil detección, son los marcadores más elegidos dentro de los programas de mejoramiento (Song *et al.* 2023).

Uno de los métodos propuestos para localizar marcadores asociados a un caracter es el de Análisis de bloques segregantes (BSA, *bulk segregant analysis*, Michelmore *et*

al. 1991). Esta técnica es simple y rápida y consiste en comparar dos conjuntos de muestras de ADN obtenidos a partir de una población segregante para un cruzamiento contrastante. Cada conjunto (*bulk*) contiene una selección de individuos que son idénticos para un rasgo particular o región genómica, pero con genotipos aleatorios para todas las demás regiones. Los dos *bulks* son, por lo tanto, genéticamente diferentes en la región seleccionada. Este método asume que los marcadores adyacentes al gen de interés estarán en desequilibrio de ligamiento. A medida que la distancia aumenta, habrá más recombinantes hasta que ambos *loci* (carácter de interés y marcador molecular) segreguen independientemente y desaparezca la diferencia entre ambos grupos. Los marcadores cercanos, a ambos lados del gen de interés, resultarán polimórficos entre ambos grupos, y estarán asociados de manera confiable al *locus* que determina el carácter para el cual se creó el *bulk*.

Para la elaboración de mapas genéticos mediante el análisis de ligamiento es necesario el desarrollo de una población segregante para una o más características de interés. Las ventajas y desventajas que las diferentes poblaciones segregantes presentan en los estudios de mapeo fue previamente descrita por Cavanagh *et al.* (2008). Cuanto mayor sea la distancia genética entre los parentales que darán origen a una población, mayor será la probabilidad de detectar marcadores polimórficos.

Los RILs son líneas genéticamente homogéneas y permiten disponer de un número grande de semillas, las cuales pueden ser usadas para evaluar distintos caracteres simultáneamente en distintos ambientes. El desarrollo de estas poblaciones en trigo es relativamente sencillo ya que se puede alcanzar un alto grado de homocigosis (teóricamente un 99,2%) para la 8^{va} generación de autofecundación. Las poblaciones segregantes F2, aunque altamente heterocigotas, también son frecuentemente utilizadas dado que pueden obtenerse fácilmente y en gran número por autofecundación de plantas F1.

La densidad y resolución de los mapas depende del número de marcadores y el tamaño de la población considerada. Los mapas genéticos saturados resultan útiles para identificar marcadores asociados a genes de interés. Algunos autores sugieren

que los marcadores en estos mapas deben distribuirse a intervalos no mayores de 15-20cM (Strachan y Read, 1999). Sin embargo, la saturación de los mapas depende de factores como la especie, la región cromosómica y la presencia de ADN repetitivo, entre otros. Para trigo se han reportado zonas más recombinogénicas, generalmente cercanas a los telómeros, en comparación con otras zonas menos recombinogénicas, como las cercanas a los centrómeros (Gill *et al.* 1993, 1996a, 1996b).

Los mapas pueden ser genéticos, si están basados en el porcentaje de recombinación entre los diferentes marcadores y expresados en centimorgans (cM), o físicos, cuyas distancias son expresadas en pares de bases (pb). A su vez, se consideran mapas de alta resolución si las distancias genéticas son representativas de las distancias físicas. El mapeo de alta resolución consiste en la identificación de un intervalo genético pequeño, de alta confianza, luego del análisis de un alto número de individuos segregantes. La disponibilidad de este tipo de mapas es un requisito fundamental para llevar a cabo el clonado posicional de los genes involucrados, lo que facilita su introducción en cultivares élite a través de cisgénesis, de edición génica de alelos susceptibles o su introgresión por métodos convencionales al utilizar marcadores desarrollados en base a su secuencia, aumentando así la eficiencia de la MAS. Además, los mapas posibilitan la identificación de genes que comparten secuencias con otras variedades y/o especies afines brindando información acerca de las bases moleculares de la interacción planta-patógeno y por extensión, de la resistencia durable. El conocimiento de los productos génicos subyacentes facilita el desarrollo de nuevas estrategias para el control de enfermedades, contribuyendo así a la seguridad alimentaria y a la estabilidad de la producción agrícola, brindando la oportunidad de desarrollar métodos de protección de cultivos mucho más eficaces (Lowe *et al.* 2011).

Con el objetivo final de realizar el clonado posicional del gen de resistencia a la roya de la hoja en planta adulta *LrcSV2*, en el presente trabajo se propuso el desarrollo de un mapa de alta resolución que delimite al intervalo más pequeño que lo contenga. Este gen había sido asignado al cromosoma 4BL por su asociación con dos marcadores

mapeados físicamente en el bin de delección terminal de este (Petignat 2010) y mapeado en un intervalo de 3,1cM en un mapa de baja resolución utilizando una población de 100 RILs (Ferella 2013).

El rescate de los genes responsables de la resistencia durable observada en las variedades tradicionales de trigo evita su potencial pérdida, la cual podría ocurrir como consecuencia de que éstas ya no son utilizadas en los planes de mejoramiento. Este consiguiente beneficio, económico y social, contribuye significativamente a mejorar la competitividad del cultivo de trigo, en el marco de una agricultura sustentable y en un escenario de cambio climático que podría favorecer a las enfermedades fúngicas.

2. HIPÓTESIS

El genotipado de un número elevado de individuos segregantes permite la identificación de aquellos con eventos de recombinación cercanos al gen responsable del carácter de interés. Esto, permite definir un intervalo físico de secuencia lo suficientemente reducido como para contener un número bajo de genes. La identificación de las regiones codificantes dentro de dicho intervalo permite realizar estudios comparativos para su postulación y posterior validación como determinantes del fenotipo estudiado.

3. OBJETIVOS

El objetivo general es desarrollar un mapa genético de alta resolución de la región del cromosoma 4BL donde mapea el gen *LrcSV2*, cuyo efecto se complementa con el gen *LrSV2* determinando resistencia en planta adulta. Estos genes aportan un efecto significativo a la durabilidad de la resistencia observada en la variedad tradicional Sinvalocho MA. Este mapa permitirá identificar un intervalo de secuencia que permita postular, y luego evaluar, genes candidatos a fin de permitir el clonado posicional del gen *LrcSV2*.

Los siguientes objetivos específicos contribuyen a identificar un mínimo intervalo físico de secuencia de la región cromosómica que contiene al gen de resistencia *LrcSV2*.

- ✓ Búsqueda de marcadores moleculares polimórficos asociados al gen *LrcSV2*, disponibles en la literatura o desarrollados a partir de información de secuencia pública del cromosoma 4BL de trigo.
- ✓ Incorporación de estos marcadores moleculares al mapa de ligamiento disponible, realizado en base a una población de 100 RILs, para la identificación de marcadores flanqueantes robustos.
- ✓ Análisis de una población F2 con alto número de individuos (mayor a 1500), con marcadores flanqueantes al gen en busca de individuos recombinantes.
- ✓ Genotipado de los individuos recombinantes con marcadores dentro del intervalo, y determinación del fenotipo de resistencia.
- ✓ Determinación del mínimo intervalo genético que contiene al gen, para permitir la búsqueda de genes candidato mediante análisis bioinformático de la secuencia.

4. MATERIALES Y MÉTODOS

4.1 Material vegetal

Se utilizaron dos poblaciones segregantes del cruzamiento de la variedad Sinvalocho MA (SV) x Purple Straw (P). Sinvalocho es el parental resistente en estadio de planta adulta a la raza Ca02G1R de roya de la hoja, y es portador de los genes complementarios *LrSV2* y *LrcSV2*. Purple Straw es el parental susceptible en estadio de planta adulta a la raza Ca02G1R de roya de la hoja y es portador del gen *LrSV2*.

Las poblaciones utilizadas son:

- Una población de 100 RILs F8.
- Una población F2 de varios miles de individuos.
- Además, se utilizaron líneas provenientes de otros cruzamientos:
 - s283, una línea susceptible en estadio de planta adulta a la raza Ca02G1R y recombinante dentro del intervalo de interés, derivada del cruzamiento de RIL46 (R46) x Relmó Siriri (Si). El R46 es una línea derivada del cruzamiento de SV x Gama6 (G6), resistente en estadio de planta adulta a la raza Ca02G1R de roya de la hoja y portadora de los genes *LrSV2* y *LrcSV2*. La variedad comercial Relmó Siriri es susceptible en estadio de planta adulta a la raza Ca02G1R de roya de la hoja (Petignat 2010).
 - H3B, una línea de sustitución de Chinese Spring (CS) con el cromosoma 3B de la variedad Hope (H), resistente desde el estadio de plántula a la raza Ca02G1R (Mago *et al.* 2011).
 - M39 y M48, dos líneas mutantes de delección de H3B, susceptibles en el estadio de planta adulta a la raza Ca02G1R (Mago *et al.* 2011).

Los RILs fueron obtenidos por descendientes de semilla única (SSD, *single seed descendant*) donde a partir de una población F2 cada individuo aportó un único descendiente a la siguiente generación. Las plantas fueron crecidas individualmente en macetas de 180ml en el invernáculo hasta la generación F8.

Para obtener la población F2, las semillas F1 fueron crecidas en macetas de 5L en invernáculo, y las espigas fueron ensobradas durante el estadio previo a antesis para asegurar su autofecundación. Se obtuvieron 2152 individuos F2, los cuales fueron sembrados individualmente en macetas de 180ml (Figura 9). Las progenies F3 de aquellos individuos F2 que resultaron recombinantes para los marcadores de interés fueron sembradas en macetas de 1L, 5 plantas por maceta, y rotuladas individualmente (Figura 10). Las plantas se mantuvieron en los invernáculos del Instituto de Genética "Ewald A. Favret" (IGEAF – INTA, 34°36'59,7"S 58°39'39,9"W) durante los meses de abril a diciembre entre los años 2017 a 2022, exceptuando 2020 y 2021.



Figura 9: Plantas F1 cubiertas con sobres para garantizar su autofecundación (izq). Plantas F2 en invernáculo (der).



Figura 10: Plantas F3, descendientes de aquellas F2 recombinantes, rotuladas individualmente para su identificación.

4.2 Infección con roya de la hoja.

Las inoculaciones se realizaron en el estadio de hoja bandera y en cámaras metálicas, con una humedad relativa del 100%. Se utilizó la raza Ca02G1R (nomenclatura MBGJ, según la clasificación de Long y Kolmer 1989) de *P. triticina*, proveniente de la colección conservada en IGEAF – INTA. Esta raza produce una reacción incompatible en planta adulta en presencia de los genes *LrSV2+LrcSV2* (Dieguez *et al.* 2018). Para la pulverización de estas esporas se utilizó un pequeño compresor y un recipiente con un pico. El material pulverizado consistió en una suspensión de 20mg de uredosporas en 50ml de agua con el agregado de 5 gotas/L del detergente tween20 para disminuir la tensión superficial. Las cámaras se mantuvieron a 18-20°C con 100% humedad durante aproximadamente 16 horas (Figura 11) y posteriormente las plantas se colocaron en las banquinas del invernáculo a una temperatura entre 15 y 25°C.

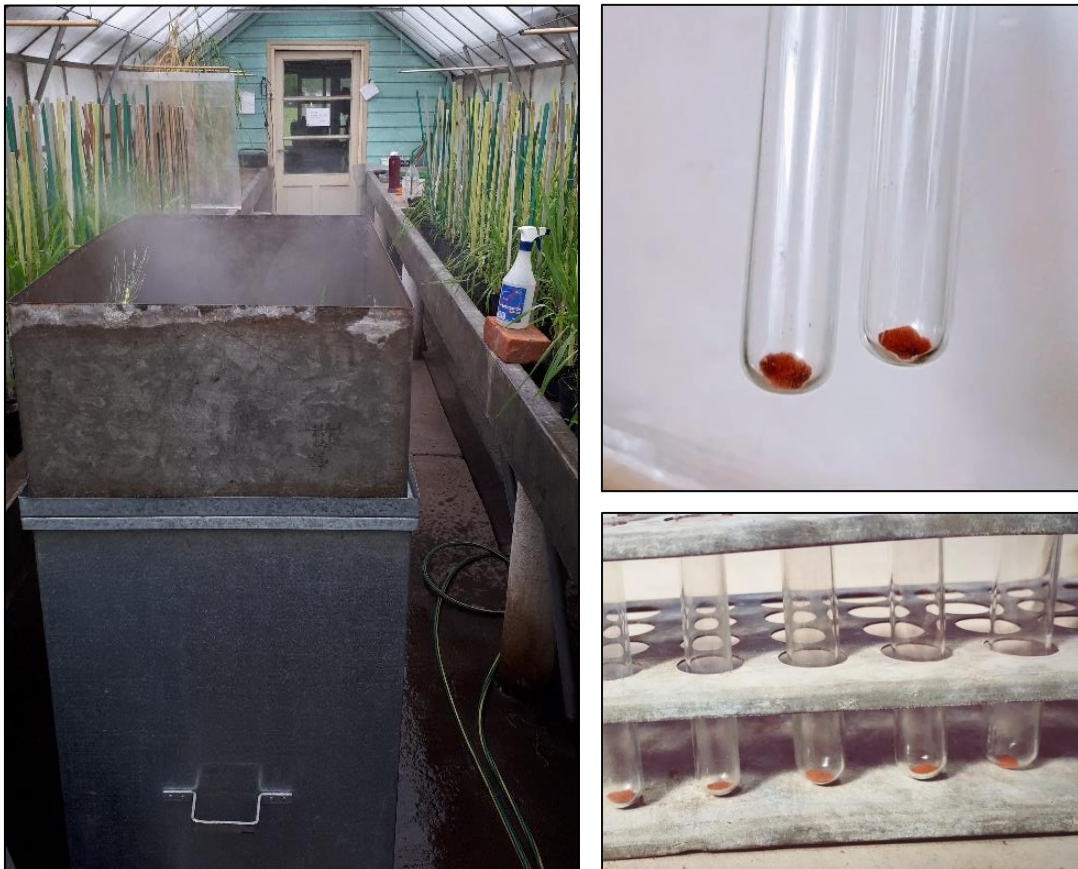


Figura 11: Proceso de inoculación artificial de plantas de *T. aestivum* con *P. triticina*. Cámara de pulverización (izq). Uredosporas de roya colectadas (der).

La resistencia o susceptibilidad a la infección se evaluó visualmente examinando las hojas bandera y las dos anteriores (bandera -1 y bandera -2) a los 15-28 días post-inoculación. Se aplicó una escala cualitativa desde S (susceptible, tipo de infección 34), MS (moderadamente susceptible, 2++3), MR (moderadamente resistente 1++2) a R (resistente ;01) considerando los tipos de infección propuestos en la escala de Mains y Jackson (1926).

4.3 Extracción y cuantificación de ADN

Se colectó tejido vegetal de las plantas cultivadas en el invernáculo en tubos Eppendorf de 2ml (aproximadamente 300mg) y se deshidrató en un desecador en presencia de Sílica gel por 10-14 días. El tejido vegetal deshidratado se molió agregando 2 bolitas de acero inoxidable de 3mm de diámetro en cada tubo, con un "Tissue Lyser" (Qiagen) (Frecuencia: 30/s Tiempo: 10 minutos) (Figura 12).



Figura 12: Colecta de tejido vegetal (izq). Desecador de vacío (centro) *Tissue Lyser* (der).

Para la extracción de ADN se utilizó el siguiente método:

1. Se agregó al tejido molido 700µl del buffer de extracción a 65°C (100µl Tris-HCl 1M pH 7,5; 140µl NaCl 5M; 100µl EDTA 0,5M pH 8 y 360µl de H₂O bidestilada), 100µl de CTAB 10% con agitación. Luego se agregaron 200µl de SDS 10% con inversión.
2. Se incubó 60 minutos a 65°C en horno con agitación suave.

3. Se llevó a temperatura ambiente y luego se le agregaron 900µl de cloroformo:isoamílico (24:1). Se agitó por inversión 5 minutos y se centrifugó 10 minutos a 12000rpm.

4. Se trasvaso la fase acuosa a otro tubo, y en algunos casos se repitió el agregado de 900µl de cloroformo:isoamílico (24:1). Se agitó por inversión 5 minutos y se centrifugó 10 minutos a 12000rpm a temperatura ambiente.

5. Se trasvasó la fase acuosa a otro tubo y se incubo con 5µl de ARNasa (10mg/ml) por al menos 30 minutos a 37°C.

6. Se agregaron 500µl de isopropanol a 4°C, se lo mezclo por inversión durante 5 minutos y se centrifugo 10 minutos a 14000rpm a temperatura ambiente.

7. Al pellet resultante, se le agregó 100µl de etanol 70% y se dejó reposar por unos minutos a temperatura ambiente.

8. Se centrifugó 10 minutos a 14000rpm. Se retiró el alcohol y se dejó secar sobre papel en el flujo laminar.

1. Se resuspendió el ADN extraído en 50µl de H₂O de grado HPLC.

La cuantificación del ADN extraído se realizó con un espectrofotómetro modelo ND-1000, NanoDrop®.

4.4 Marcadores moleculares

4.4.1 SSR

Se utilizaron marcadores moleculares de tipo SSR disponibles en bases de datos públicos del cromosoma 4BL, correspondientes a la serie barc (*Beltsville Agricultural Research Center – UDSA, Song et al. 2005*), gwm (*Gatersleben Wheat Microsatellite, Röder et al. 1998*), gpw (*GenoPlante Wheat, Sourdille et al. 2004*) y wmc (*Wheat Microsatellite Consortium, Somers et al. 2004*). Además, se diseñaron nuevos mediante herramientas genómicas, a los cuales se los denominó FSs. Para ello, se alinearon las secuencias de los *primers* gwm149 y gwm251, reportados como flanqueantes del gen *Lr12* (Singh y Bowden, 2011) sobre ensamblados de secuencia parciales (*contigs*) del genoma de la variedad modelo CS disponibles en una base de datos local del TGAC

(*The Genome Analysis Center* <http://www.tgac.ac.uk/>). Los *contigs* seleccionados como resultado de este alineamiento fueron utilizados para realizar una búsqueda usando BLAST (*basic local alignment search tool*, Altschul *et al.* 1997) en bases de datos de secuencias de *Brachypodium distachyon* alojadas en los servidores de Gramene (<https://gramene.org/>) y Phytozome (<https://phytozome-next.jgi.doe.gov/>). Se siguió la estrategia utilizada por Burt *et al.* (2011) para poder identificar la región de *B. distachyon* homóloga a la región cromosómica de interés en el genoma de trigo. Las secuencias de los transcritos de *B. distachyon* incluidas en la región sinténica fueron utilizadas para efectuar un nuevo alineamiento sobre los *contigs* de trigo a fin de identificar aquellos que abarquen la región de interés.

En una etapa posterior, estuvo disponible el ensamblado del genoma completo de la variedad modelo CS (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies>). Para el diseño de *primers* apropiados para la amplificación por PCR de regiones conteniendo SSR se utilizó el programa WEBSAT (Martins *et al.* 2009).

4.4.2 SNPs

Se utilizaron dos pares de *primers*, denominados ABC1 y ABC2, diseñados sobre el gen *TraesCS4B03G0782200* (https://urgi.versailles.inrae.fr/jbrowseiwgsc/gmod_jbrowse/), el cual está incluido dentro del intervalo en estudio, y se corresponde a una proteína que tiene homología con un dominio ABC *transporter* (R.Mago, comunicación personal).

Para el diseño de los *primers* correspondientes a regiones con marcadores de tipo ISBP se utilizó la secuencia disponible de CS (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies>) y el programa ISBP-Finder (Paux *et al.* 2010). Los mismos fueron denominados FSp.

4.5 Amplificación por PCR.

4.5.1 SSR

Las reacciones de PCR se realizaron de manera estándar en un volumen de 10µl con 25-50ng de ADN molde, 1,5mM de MgCl₂, 0,16µM de dNTPs, 0,08-0,16µM de cada *primer* y 0,032unidades/µl de Taq DNA polimerasa (Inbio Highway) en su buffer correspondiente. El ciclado se realizó en equipos Mastercycler Gradient 5331 (Eppendorf) y TProfessional Basic (Biometra) y el programa estándar utilizado se detalla en la Tabla 3. Se utilizaron cuatro diferentes TH, 50°C, 55°C, 60°C y 65°C, según la puesta a punto de cada *primer*.

	Nº de ciclos	Ciclo		
		Desnaturalización	Hibridación de <i>primers</i>	Polimerización
Desnaturalización inicial	1	94°C 3min	-	-
Paso 1	7	95°C 30seg	TH+7°C (-1°C/ciclo) 30seg	72°C 30seg
Paso 2	31	95°C 30seg	TH°C 30seg	72°C 30seg
Paso 3	11	95°C 30seg	TH+1°C 30seg	72°C 30seg
Extensión Final	1	-	-	72°C 10min

Tabla 3: Programa de ciclado utilizado para la amplificación de marcadores SSR. TH: temperatura de hibridación.

4.5.2 SNP

Las reacciones de PCR se realizaron de manera estándar en un volumen de 20µl con: 50ng de ADN molde, 1,5mM de MgCl₂, 0,16µM de dNTPs, 0,1µM de cada *primer* y 0,8unidades/µl de Taq DNA polimerasa (Inbio Highway) en su buffer correspondiente. El ciclado estándar utilizado para los amplicones ISBPs fue el antes mencionado.

Para los marcadores ABC se utilizó el programa detallado en la Tabla 4.

ABC 70 a 60	Nº de ciclos	Ciclo		
		Desnaturalización	Hibridación de primers	Polimerización
Desnaturalización inicial	1	95°C 5 min	-	-
Paso 1	10	95°C 30 seg	70°C (-1°C/ciclo) 30seg	72°C 90seg
Paso 2	30	95°C 30seg	60°C 30seg	72°C 90seg
Extensión Final	1	-	-	72°C 10min

Tabla 4: Programa de ciclado utilizado para la amplificación de marcadores SNP ABC.

4.6 Resolución y visualización de los productos de PCR

4.6.1 SSR

Los productos de la amplificación se resolvieron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida desnaturalizantes al 5%.

La preparación de estos geles requiere un tratamiento previo de los vidrios que van a contener al gel. El vidrio al cual queda adherido el gel, se trató con una solución de 950µl de alcohol, 5µl de ácido acético y 3µl de Bind (PlusOne Bind-Silane. Amersham Biosciences) y posteriormente se lo lavó 3 veces con 1ml de alcohol, en intervalos de 3 minutos. El vidrio que debe ser retirado fue tratado con 400µl de Repel-Silane ES (PlusOne). El armado de los vidrios consistió en colocar las caras tratadas de forma enfrentada, colocando en los bordes un espaciador de 0,4mm de espesor. Para fijarlos y evitar el corrimiento durante el llenado se colocaron ganchos en los bordes que sujetan los vidrios. El gel se preparó con una solución de poliacrilamida 5% Acri:bis (19:1), urea 7M en buffer TBE 1X (0,89mM tris, 0,89mM ácido bórico y 20mM EDTA pH8.0) y se agregaron los catalizadores Temed (1µl/ml de gel) y Persulfato de amonio 25% en agua (1µl/ml de gel).

A los productos de amplificación se les agregó 8µl de buffer de siembra (10mM NaOH, 0,05% Azul de Bromofenol, 0,05% Xylene Cyanol y 95% (v/v) formamida desionizada) y se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos. Para la resolución de los

productos de amplificación, se sembraron 7 μ l de la muestra en cada pocillo y la electroforesis se realizó en buffer TBE 0,5X durante aproximadamente 90 minutos a 60 Watts constantes. Se incluyó un marcador de peso molecular de 25bp (Invitrogen) (Figura 13).

La visualización de la corrida electroforética se realizó mediante tinción con nitrato de plata (AgNO_3) e hidróxido de sodio (NaOH), de acuerdo al siguiente procedimiento:

1. Se fijó el gel por al menos 5 minutos en una solución de ácido acético-etanol (0,05% ac.acético y 10% etanol en agua bidestilada).
2. Se incubó por 10 minutos en 200ml de solución de AgNO_3 (15mg/ml de agua bidestilada) a la que se le agregó 300 μ l de formaldehído.
3. Se lavó 15 segundos en agua bidestilada.
4. Se reveló en 400ml de solución de NaOH (15g/L de agua bidestilada) a la que se le agregó 800 μ l formaldehído hasta ver las bandas.
5. Se detuvo la tinción con cantidad suficiente de la solución de ácido acético-etanol por 10 minutos.
6. Por último, se realizó un lavado con agua corriente durante 10 minutos y se dejó secar.



Figura 13: Visualización de marcadores moleculares de tipo SSR. Cuba de electroforesis conectada a la fuente de energía (izq). Gel de poliacrilamida desnaturalizante 5% teñido con nitrato de plata (der).

4.6.2 SNP

Las reacciones se realizaron por sextuplicado, para garantizar volumen suficiente para los siguientes pasos. Se tomó una alícuota de 20µl de la mezcla de reacciones provenientes de la misma muestra a fin de corroborar el éxito de la amplificación. Luego del agregado de 3µl de buffer de siembra Cresol Red fue sembrada en geles de agarosa al 1% p/v con el agregado de bromuro de etidio (BrEt) (10µg/ml). La electroforesis se realizó en buffer TBE 0,5x durante aproximadamente 2 horas a 70V constantes, y la visualización de los fragmentos se realizó con el equipo White/UV Transiluminator (Life Sciences). Una vez corroborado el éxito, se realizó la purificación del resto del volumen a fin de eliminar remanentes de reactivos que pudieran afectar la posterior secuenciación de los mismos. Las purificaciones se realizaron con kits, siguiendo el protocolo indicado por el fabricante. Los kits utilizados según disponibilidad fueron "UltraClean GelSpin" (MoBio) y "ADN PuriPrep – GP" (Inbio Highway).

Las muestras fueron cuantificadas y enviadas para su secuenciación capilar en el servicio UGB de INTA Castelar (<https://inta.gob.ar/servicios/secuenciacion-de-acidos-nucleicos-adn-por-electroforesis-capilar>) utilizando uno de los *primers* utilizados para su amplificación.

El análisis del cromatograma se realizó con el programa FinchTV 1.4.0 (<https://geospiza.com/finchtv>) y el análisis de las secuencias para detectar poliformismos con VectorNTI Advanced 10 (Invitrogen).

4.7 Análisis de datos y mapeo genético.

La asociación entre aquellos marcadores moleculares que resultaron polimórficos, con el carácter fenotípico de reacción a la raza Ca02G1R de roya de la hoja en planta adulta se realizó mediante BSA (Michelmore *et al.* 1991).

Los marcadores fueron evaluados sobre los parentales SV y P, y sobre dos grupos de individuos, cada uno conformado por 6 RILs resistentes y 6 RILs susceptibles. Los

marcadores que se encontraron asociados al gen de resistencia fueron evaluados en toda la población.

Se realizó una matriz de datos de doble entrada en donde los alelos iguales al parental resistente (SV) fueron denominados "1" y los iguales al parental susceptible (P) fueron denominados "0" . En los casos que el marcador fue heterocigota se lo codificó "H" . El análisis de ligamiento y las distancias genéticas se calcularon con el software Carthagene (De Givry *et al.* 2005) con un LOD mínimo de 3,0 y una distancia máxima de 30cM. Las frecuencias de recombinación fueron convertidas a cM con la función de Haldane. El mapa se graficó con el software Map-Chart (Voorrips 2002).

5. RESULTADOS

5.1 Mapa de baja resolución del gen *LrcSV2*

Con el objeto de aumentar el número de marcadores moleculares en el mapa de ligamiento disponible del cromosoma 4BL (Ferella 2013) se realizó una búsqueda en bases de datos públicos (<https://wheat.pw.usda.gov/GG3/node/876#wheat6x>) de marcadores moleculares de tipo SSR ubicados en el brazo largo del cromosoma 4B, lugar donde mapea el gen *LrcSV2*, y se seleccionaron 18. Además, se desarrollaron mediante herramientas genómicas 7 marcadores SSR adicionales, denominados FSs, utilizando la información disponible de la variedad secuenciada Chinese Spring (<https://wheat-urgi.versailles.inra.fr/Seq-Repository/Assemblies>). Estos 25 SSRs fueron evaluados en los parentales, Sinvalocho MA (SV, parental resistente) y Purple Straw (P, parental susceptible), para identificar la existencia de polimorfismos (Tabla 1 - Anexo). Se incluyó además el cultivar Relmó Siriri (Si), ya que se cuenta con la línea s283, derivada del cruzamiento de este cultivar por R46 (RIL de Sinvalocho MA x Gamma6) recombinante dentro del intervalo de interés (Petignat 2010, Diéguez *et al.* 2018).

Catorce de los 25 marcadores resultaron polimórficos entre SV y P, siendo 13 codominantes y uno dominante. Seis resultaron monomórficos y 5 mostraron bandas inespecíficas que no correspondieron al tamaño esperado, incluso después de aumentar la temperatura de hibridación de los *primers* para aumentar la especificidad. Los 14 marcadores polimórficos se evaluaron siguiendo la metodología de BSA (Michelmore *et al.* 1991) sobre 6 RILs resistentes y 6 RILs susceptibles en planta adulta a la raza Ca02G1R de *P. triticina*, derivados del cruzamiento SV x P. Nueve de estos marcadores (FSs34, FSs35, gpw311, gpw4388, gpw4412, gpw7390, wmc652, wmc657 y wmc692) resultaron 100% asociados al carácter reacción a la roya de la hoja en planta adulta en estos 12 individuos, por lo que fueron evaluados sobre la población de 100 RILs provenientes del cruzamiento de SV x P (Tabla 2 - Anexo). La segregación de cada uno de estos marcadores se ajustó a la proporción 1:1 esperada ($p > 0,1$).

Estos 9 marcadores fueron incorporados al mapa de ligamiento disponible del cromosoma 4BL (Ferella 2013), obteniéndose un mapa con 25 marcadores ligados al gen *LrcSV2*. Diez de estos marcadores, *cf22*, *cf239*, *cf283*, *gwm6*, *gwm149*, *gwm165*, *gwm192*, *gwm251*, *gwm375* y *barc163*, fueron mapeados físicamente en el bin de delección 4BL1-0.86-1.00 (https://wheat.pw.usda.gov/cgi-bin/cmap/viewer?mapMenu=1&featureMenu=1&corrMenu=1&displayMenu=1&advancedMenu=1&ref_map_accs=Chinese_Spring_Deletion_SSR_4B&sub=Draw+Selected+Maps&ref_map_set_acc=Chinese_Spring_Deletion_SSR_4B&data_source=GrainGenes).

El carácter reacción a la roya de la hoja en planta adulta quedó así delimitado en un intervalo de 1cM entre los marcadores FSs34 proximal y gpw4388 distal, y cosegregó con el marcador wmc692 (Figura 14). Este intervalo equivale a 23Mb en la secuencia de CS. Dos de los RILs de la población utilizada, el RIL28 y el RIL123, resultaron recombinantes entre los marcadores flanqueantes FSs34 y gpw4388.

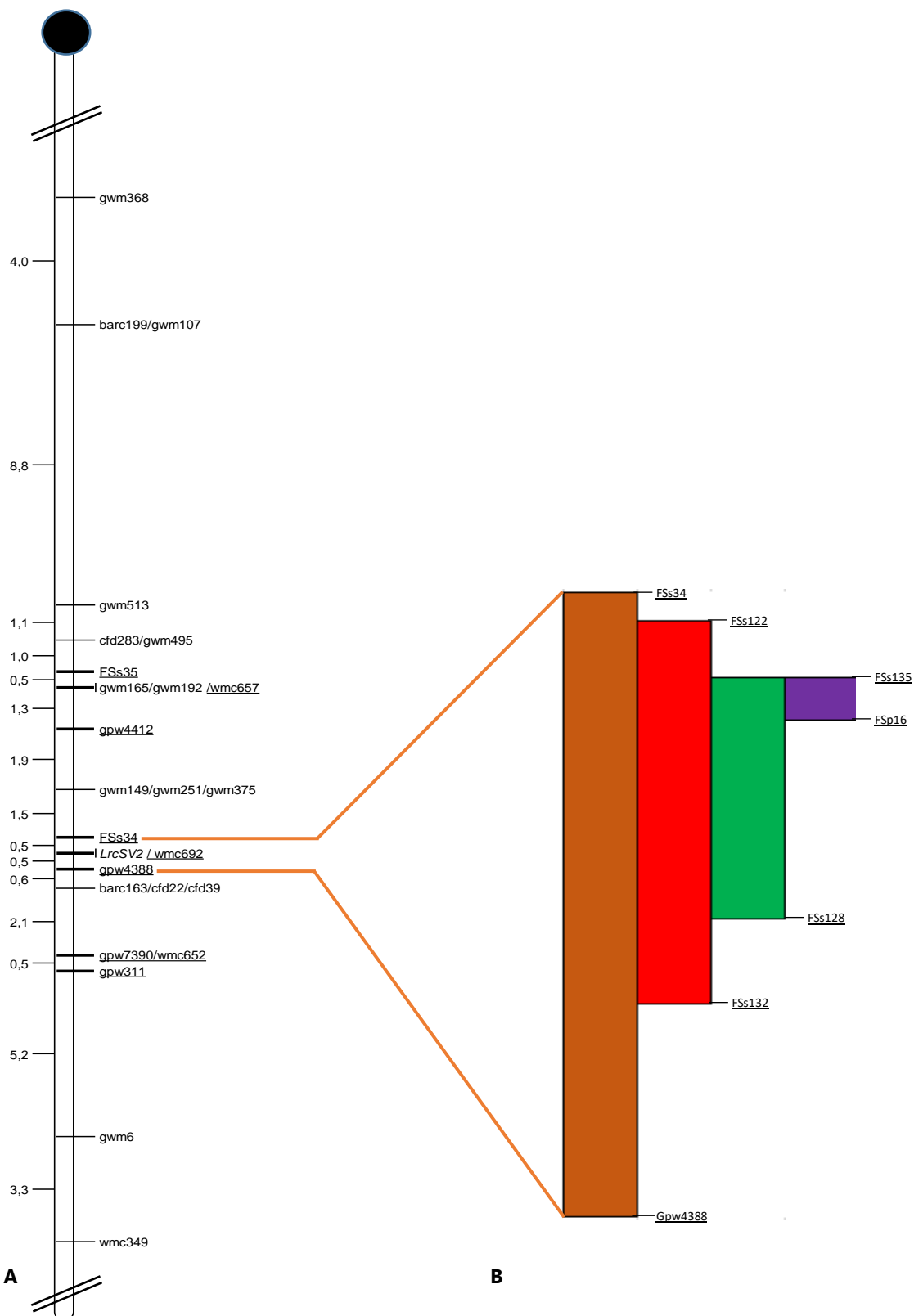


Figura 14: **A**: Mapa genético del cromosoma 4BL en base a una población de 100 RILs derivados del cruzamiento SV x P. A la izquierda se indica la distancia en cM. Los 9 marcadores moleculares incorporados en este estudio se encuentran subrayados.

B: Representación a escala de los intervalos físicos en donde fue delimitado el gen *LrcSV2* en las sucesivas etapas del análisis de una población de 2152 individuos F2 derivada del mismo cruzamiento. La barra marrón corresponde a 23Mb, la roja a 14Mb, la verde a 9Mb y la violeta, a 1,57Mb en base a la secuencia de CS (RefSeq v2.1).

5.2 Mapa de alta resolución del gen *LrcSV2*

Con el objeto de aumentar la resolución del mapa de la figura 14, se desarrolló una población F2 de varios miles de individuos, provenientes del mismo cruzamiento SV x P. En el siguiente diagrama, se presenta un esquema del diseño experimental utilizado:

1. Búsqueda de marcadores moleculares asociados al gen *LrcSV2*
 - Diseño utilizando la secuencia disponible de CS.
 - Prueba de polimorfismo entre los parentales.
 - Asociación al gen de interés mediante BSA.

2. Análisis de una población segregante F2 de alto número de individuos
 - Genotipado con los marcadores flanqueantes del intervalo de interés.
 - Identificación de recombinantes entre los marcadores flanqueantes.
 - Obtención de una población F3 de los individuos F2 recombinantes.
 - Identificación de individuos F3 homocigotas para el evento de recombinación entre los marcadores flanqueantes.
 - Genotipado de estos individuos con los marcadores internos del intervalo.
 - Obtención de datos fenotípicos para el carácter reacción a la roya de la hoja, mediante inoculación artificial en planta adulta con la raza Ca02G1R de *P.triticina*.

3. Análisis de datos
 - Determinación del menor intervalo físico posible que contenga al gen *LrcSV2*.

5.2.1 Diseño de marcadores moleculares asociados al gen *LrcSV2*

5.2.1.1 SSR

Se desarrollaron mediante herramientas genómicas un total de 44 marcadores moleculares de tipo SSR. Ocho fueron desarrollados utilizando los *contigs* 4B de trigo que abarcan la región de interés (Diéguez *et al.* 2018) y 36 mediante la utilización de la secuencia homóloga de CS, una vez que ésta estuvo disponible. Todos fueron evaluados en los parentales SV y P, a fin de identificar polimorfismos. Se incluyó además a la variedad CS como control, y a Si debido a que se dispone de la línea s283, derivada de este cultivar y recombinante dentro del intervalo blanco (Tabla 3 - Anexo).

Veinte de los 44 marcadores analizados resultaron codominantes y polimórficos entre los parentales. Catorce resultaron monomórficos y 10 mostraron bandas inespecíficas que no correspondieron al tamaño esperado, incluso después de aumentar la temperatura de hibridación de los *primers* para aumentar la especificidad.

El programa de ciclado utilizado para la correcta amplificación de las bandas difirió de un marcador a otro. Los 20 marcadores polimórficos fueron evaluados siguiendo la metodología de BSA sobre 6 RILs resistentes y 6 RILs susceptibles en planta adulta a la raza Ca02G1R de *P. triticina*, derivados del cruzamiento SV x P (Figura 15). Todos ellos resultaron asociados al gen de interés.

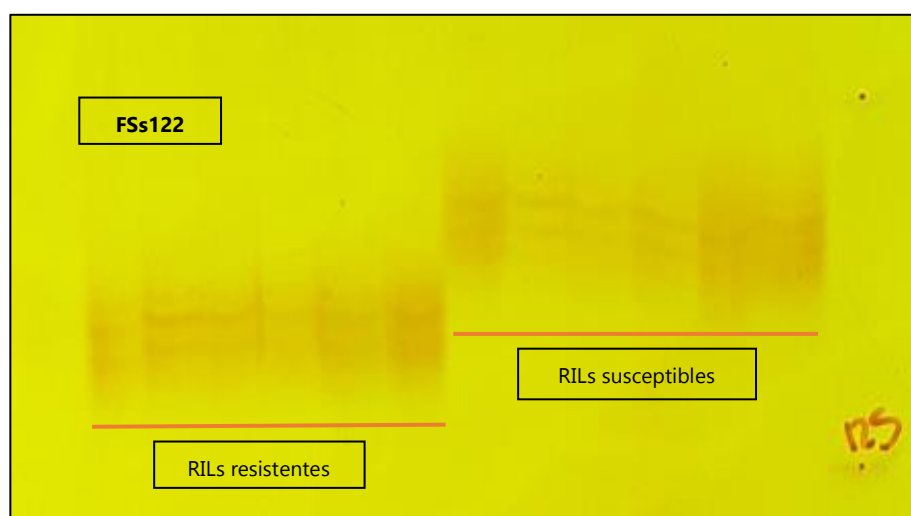


Figura 15: Ejemplo de marcadores moleculares de tipo SSR analizados por BSA. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante 5% teñido con nitrato de plata.

5.2.1.2 SNPs

Se probaron 17 marcadores moleculares adicionales, de tipo SNP dentro de la región de interés. Los marcadores ABC1 y ABC2 son dos productos de amplificación superpuestos sobre la secuencia de un gen con homología a un transportador ABC (R. Mago, comunicación personal), mientras que los marcadores FSp son de diseño propio, y corresponden al tipo ISBP.

Luego de su amplificación por PCR, se chequeó mediante geles de agarosa la presencia de bandas (Figura 16). En los casos donde se obtuvo una banda única, definida y de tamaño esperado, se purificó el producto de PCR y se envió a secuenciar desde ambos lados, mediante electroforesis capilar, utilizando los *primers* previamente usados para la amplificación.

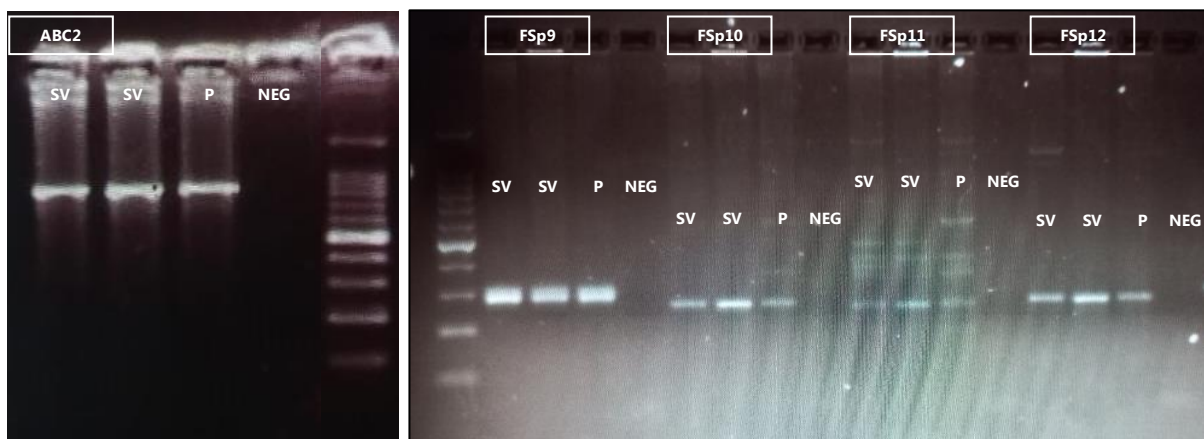


Figura 16: Ejemplo de productos de PCR de uno de los marcadores ABC e ISBPs. Electroforesis en el de agarosa 2%. El marcador de peso molecular es de 100pb (Pb-L) siendo la más brillante la banda de 500pb. SV: Sinvalocho. P: Purple Straw. NEG: control negativo.

Con respecto a los dos marcadores ABC analizados, el marcador ABC1 no fue polimórfico entre los parentales, siendo 100% homólogo a CS. El marcador ABC2 fue polimórfico, resultando SV homólogo a CS, y P presentando un cambio de base CxT en la posición 619 del amplicón (Figura 17). Para el genotipado de estos SNPs, el amplicón de cada uno de los individuos recombinantes fue secuenciado a partir del *primer reverse*.

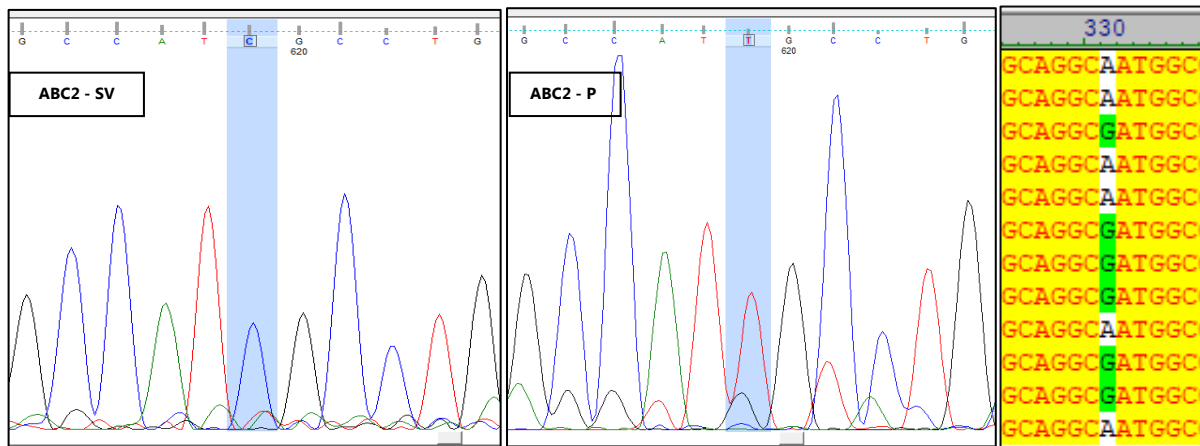


Figura 17: Cromatograma correspondiente al marcador ABC2 (polimórfico) en ambos parentales. Alineamiento de las secuencias, correspondientes al mismo marcador pero secuenciadas con el *primer reverse*, de algunos de los individuos recombinantes.

En cuanto a los marcadores SNPs de diseño propio, se analizaron un total de 15 ISBPs. Once presentaron una banda única, definida y de tamaño esperado, en geles de agarosa y 4 de ellos mostraron bandas inespecíficas que no correspondieron al tamaño esperado, incluso después de aumentar la temperatura de hibridación de los *primers* para aumentar la especificidad (Tabla 4 - Anexo). Los amplicones de los 11 ISBPs que presentaron una banda única y de tamaño esperado fueron secuenciados desde ambos lados, mediante electroforesis capilar, utilizando los *primers* previamente usados para la amplificación. La secuencia de SV y P fue 100% homologa a CS en nueve de estos marcadores. En dos de ellos se detectó polimorfismo, en donde SV fue 100% homologa a CS y P presento una sustitución AxG en la posición 57 del amplicón correspondiente al marcador FSp8, y en la posición 26 del amplicón correspondiente al marcador FSp16 (Figura 18). Para el genotipado de estos SNPs, el amplicón de cada uno de los individuos recombinantes fue secuenciado a partir del *primer reverse* correspondiente.

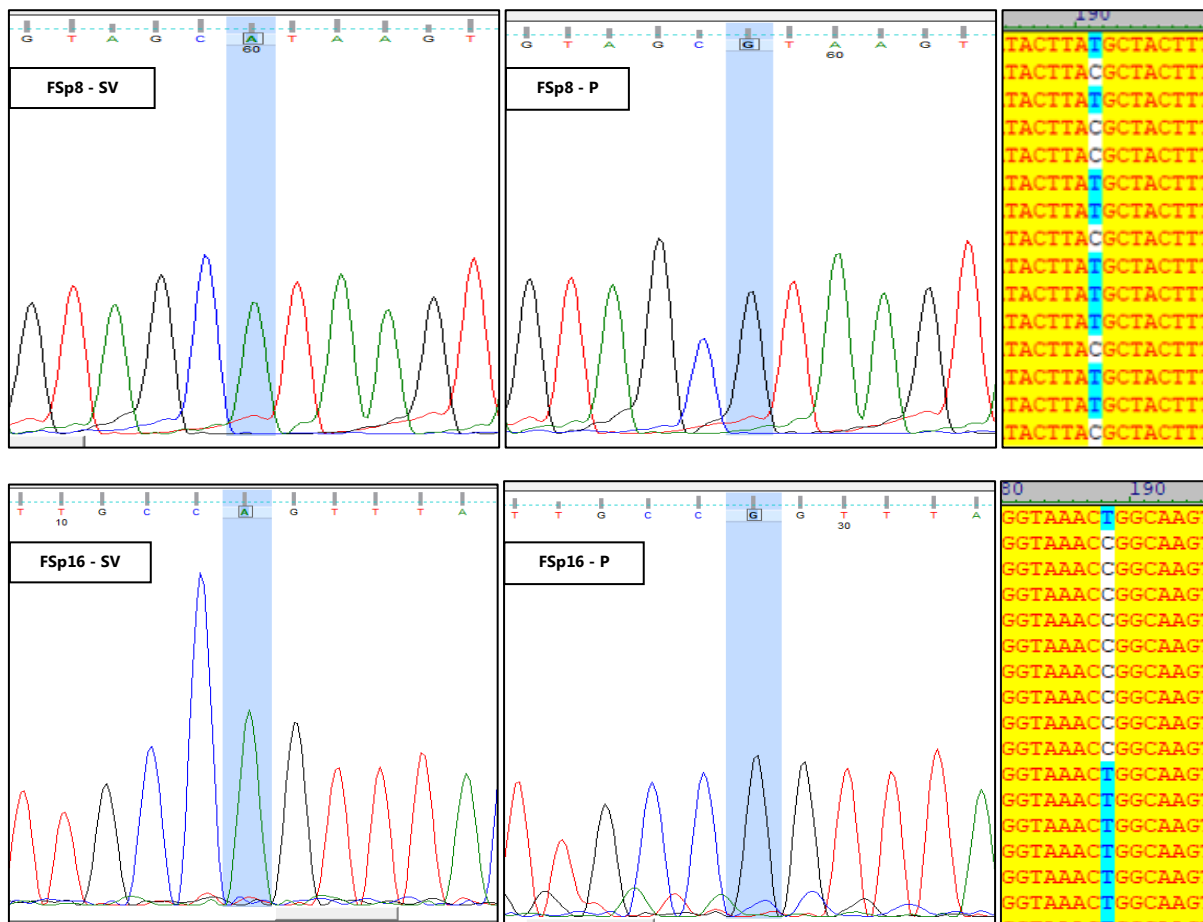


Figura 18: Cromatograma correspondiente a marcadores ISBPs en ambos parentales. Alineamiento de las secuencias, correspondientes al mismo marcador secuenciado con el *primer reverse*, de algunos de los individuos recombinantes.

5.2.2 Análisis de una población segregante F2 de alto número de individuos

Este análisis fue realizado por etapas, utilizando los marcadores moleculares flanqueantes correspondientes, a medida que el intervalo que contiene al gen *LrcSv2* se fue reduciendo (Figura 19). Todos los marcadores utilizados fueron codominantes y el polimorfismo entre los parentales fue bien diferenciable, lo que permitió distinguir inequívocamente entre individuos homocigotas de uno u otro tipo y los heterocigotas (Figura 20). Los individuos F2 recombinantes fueron aquellos heterocigotas para uno de los dos marcadores flanqueantes y homocigotas (tipo SV o tipo P) para el otro marcador.

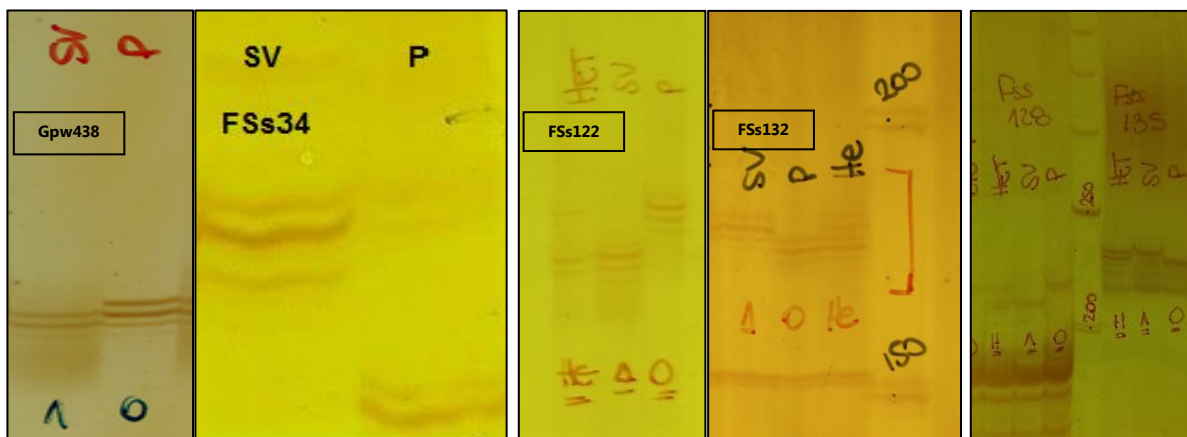


Figura 19: Marcadores moleculares de tipo SSR utilizados como flanqueantes para el análisis de la población F2, en gel de poliacrilamida desnaturalizante 5% teñido con nitrato de plata.

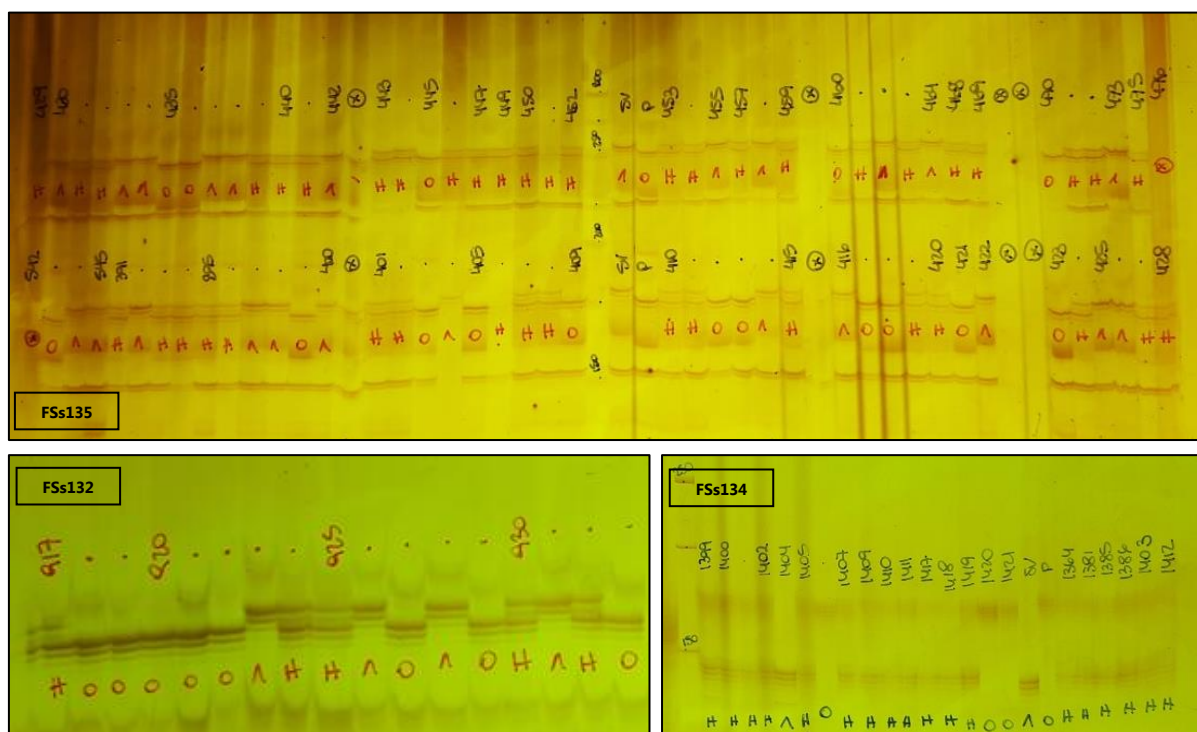


Figura 20: Ejemplo de marcadores moleculares de tipo SSR utilizados para el análisis de la población F2. Electroforesis en gel de poliacrilamida desnaturalizante 5% teñido con nitrato de plata.

De cada uno de los individuos F2 recombinantes dentro del intervalo se obtuvo su descendencia F3 y se buscaron los individuos que presentaban el evento de recombinación en homocigosis. Estos individuos fueron genotipados con marcadores que, de acuerdo con su posición en la secuencia de CS, resultaban internos del intervalo (Tabla 5 - Anexo). La F3 de los individuos recombinantes hallados fue fenotipada para el carácter reacción a la roya de la hoja mediante inoculaciones artificiales con la

raza Ca02G1R de *P. triticina* en planta adulta (Tabla 6 - Anexo). Dentro de esta población, la segregación del fenotipo de reacción fue el esperado de acuerdo al genotipo de los marcadores flanqueantes. El fenotipo de los individuos F3 que resultaron homocigotas para el evento de recombinación fue confirmado en F4.

Fueron analizados un total de 2152 individuos F2.

En una primera etapa, 584 individuos fueron analizados con los marcadores codominantes FSs34 y gpw4388, los cuales se encuentran a una distancia de 23Mb en la secuencia de CS (RefSeq v2.1). En algunos casos, se utilizaron los marcadores gwm375 y FSs91, externos a este intervalo (Figura 14), para confirmación de los datos.

Los recombinantes fueron denominados con una letra "p" y el número de semilla F2 asignado al momento de la siembra.

Se encontraron 9 recombinantes entre los marcadores FSs34 y gpw4388 dentro de estos primeros 584 individuos analizados, lo cual equivale a una distancia genética de 0,77cM. El genotipado de estos recombinantes con 21 marcadores, que de acuerdo a su posición en la secuencia de CS son internos del intervalo, sumado a los datos fenotípicos de reacción en planta adulta a la raza Ca02G1R de roya de la hoja, permitió reducir el intervalo que contiene al gen *LrcSV2* entre los marcadores FSs122 y FSs132 (Tabla 5). Estos marcadores se encuentran a una distancia de 14Mb en la secuencia de CS y fueron utilizados, en una segunda etapa, para analizar 704 individuos F2 adicionales. Se hallaron 10 individuos recombinantes. De los recombinantes hallados en la etapa anterior, 4 poseen su punto de recombinación dentro de este intervalo, lo cual totaliza 14 recombinantes entre los marcadores FSs122 y FSs132 en 1288 F2s, estableciendo una distancia genética de 0,54cM. El posterior genotipado de estos individuos con 18 marcadores internos, sumado a los datos fenotípicos obtenidos, permitió delimitar al intervalo que contiene al gen entre los marcadores FSs135 y FSs128. Estos marcadores se encuentran a una distancia de 9Mb en la secuencia de CS y fueron utilizados, en una tercera etapa, para analizar 864 nuevos individuos F2, dentro de los cuales se hallaron 4 recombinantes. De los recombinantes hallados en las etapas anteriores 6 poseen su punto de recombinación dentro de este intervalo, lo

cual totaliza 10 recombinantes en 2152 F2s, estableciendo así una distancia genética entre FSs135 y FSs128 de 0,23cM. El posterior genotipado de estos individuos con 11 marcadores internos, sumado a los datos fenotípicos obtenidos, permitió delimitar al menor intervalo que contiene al gen. Los genotipos de todos los individuos recombinantes mencionados se encuentran detallados en la Tabla 5 - Anexo.

De esta manera, el gen de resistencia a la roya de la hoja en planta adulta *LrcSV2* quedo finalmente delimitado en una región correspondiente a 1,57Mb en la secuencia de referencia de CS. Los marcadores FSs135 (SSR, proximal) y FSp16 (ISBP, distal), están ubicados en el bin de delección 4BL1-0.86-1.00, entre las posiciones 581288651 y 582862239 (RefSeq v2.1).

Cuatro individuos, de los 2152 analizados, poseen su punto de recombinación dentro de este intervalo (Tabla 6), estableciendo una distancia genética de 0,09cM (Tabla 4 - Anexo). Este mínimo intervalo definido posee tres marcadores codominantes que cosegregan con el gen de resistencia *LrcSV2*: el marcador ISBP FSp8, el SSR FSs124 y el SNP ABC2 (Tabla 5 - Anexo). Tres de los cuatro individuos poseen su punto de recombinación entre FSp8 y el flanqueante proximal FSs135, y un individuo posee su punto de recombinación entre ABC2 y el flanqueante distal FSp16 (Tabla 7).

La segregación de los marcadores dentro del intervalo FSs135-FSp16 fue evaluada mediante una prueba de Chi-cuadrado en la progenie F2 y el resultado se ajustó a la proporción esperada 1:2:1 para individuos homocigota SV: heterocigota: homocigota P ($p < 0,05$) (Tabla 8).

Marcadores flanqueantes	Recombinantes encontrados en esta etapa	Total de recombinantes dentro del intervalo
FSs34 y gpw4388	9 (p19, p146, p168, p210, p302, p327, p690, p740, p746)	9 (p19, p146, p168, p210, p302, p327, p690, p740, p746)
FSs122 y FSs132	10 (p478, p528, p537, p860, p966, p1022, p1058, p1060, p1093, p1099)	14 (p302, p327, p478, p528, p537, p740, p746, p860, p966, p1022, p1058, p1060, p1093, p1099)
FSs135 y FSs128	4 (p1387, p1944, p2010, p2088)	10 (p740, p746, p966, p1022, p1058, p1060, p1387, p1944, p2010, p2088)
FSs135 y FSp16	-	4 (p746, p966, p1944, p2010)

Tabla 5: Marcadores utilizados y recombinantes encontrados en cada etapa.

Marcadores flanqueantes utilizados para el análisis	Distancia física entre marcadores flanqueantes* (Mb)	Distancia genética del intervalo (cM)	Número de individuos F2 analizados	Total de individuos F2 acumulado
FSs34 y gpw4388	23	0,77	584	584
FSs122 y FSs132	14	0,54	704	1288
FSs135 y FSs128	9	0,23	864	2152
FSs135 y FSp16	1,57	0,09	Menor intervalo que contiene al gen <i>LrcSV2</i>	

Tabla 6: Marcadores utilizados en cada etapa del análisis, distancia física y genética entre ellos y cantidad de individuos F2 analizados.

*En base a la secuencia de Chinese Spring, RefSeq v2.1 (<https://wheat-urgi.versailles.inrae.fr/Seq-Repository/Annotations>).

LrcSV2

↔

Marcador	Posición en CS (RefSeq v2.1)		Recombinantes																										
	Recombinante	Roya *	FSs34	FSs122	FSs134	FSs135	FSp8	FSs124	ABC2	FSp16	FSs99	FSs148	FSs101	FSs103	FSs150	FSs127	FSs105	FSs128	FSs106	FSs136	Wmrc692	FSs131	FSs132	FSs109	Gpw438				
p19	R																									1	0		
p146	S																										0	1	
p168	S																										0	1	
p210	S																										0	1	
p302	R	0	1																										
p327	R	0	1																										
p478	R	0	1																										
p528	S	1	0																										
p537	R	0	1																										
p690	R																									1	0		
p740	R																1	0											
p746	R			0	1																								
p860	R	0	1																										
p966	S							0	1																				
p1022	R												1	0															
p1058	S												0	1															
p1060	S															0	1												
p1093	R	0	1																										
p1099	R																									1	0		
p1387	R																												
p1944	S				1	0																							
p2010	R				0	1																							
p2088	R														1	0													

Tabla 7: genotipos de la progenie F3 homocigota de los recombinantes encontrados entre gpw4388 y FSs34. La zona coloreada indica la posible ubicación del gen *LrcSV2* en base al fenotipo de reacción a la raza Ca02G1R de roya de la hoja en planta adulta. Los cuatro recombinantes críticos que definen el menor intervalo están señalados con color violeta. 0: alelo correspondiente a la variedad Purplestraw (P). 1: alelo correspondiente a la variedad Sinvalocho MA (SV).

* Reacción a la inoculación artificial en planta adulta con la raza Ca02G1R de *P. triticultura*.

Genotipo	Cantidad de individuos
Tipo SV (1)	578
Tipo P (0)	479
Heterocigota (H)	1091
Recombinantes	4

Tabla 8: total de individuos obtenidos para cada uno de los genotipos dentro del intervalo FSs135 y FSp16.

5.2.3 Análisis de recombinantes y mutantes de delección derivados de otras poblaciones

La posición postulada para el gen *LrcSV2* fue confirmada mediante el análisis de 6 líneas provenientes de otras poblaciones (Tablas 7 y 8 - Anexo):

- Las líneas RIL 28 y RIL 123, provenientes también del cruzamiento de SV x P, resultaron ambas susceptibles a la raza Ca2G1R en planta adulta. Su punto de recombinación se ubica entre los marcadores FSs122 y FSs132, fuera del mínimo intervalo.

- La línea H3B, línea de sustitución de CS con el cromosoma 3B de la variedad Hope (H), mostro resistencia a la raza Ca2G1R desde plántula. Fue evaluada con 17 de los marcadores diseñados, y para todos ellos resulto tener el alelo de tipo SV.

- La línea M39, mutante de delección de H3B, resultó susceptible a la raza Ca2G1R en planta adulta, y los marcadores testeados en este trabajo resultaron ausentes.

- La línea M48, mutante de delección de H3B, resultó susceptible a la raza Ca2G1R en planta adulta. Su punto de delección se encuentra entre los marcadores FSs148 y FSs101, abarcando el intervalo propuesto para el gen *LrcSV2*.

- La línea s283 es derivada del cruzamiento de la variedad resistente RIL46 (R46, línea recombinante homocigota de Sivalocho MA x Gama6, y portadora del gen *LrcSV2*) por la variedad susceptible Si resultó susceptible a la raza Ca2G1R en planta adulta, y posee su punto de recombinación entre los marcadores FSs134 y FSs95, fuera del mínimo intervalo. En el cruzamiento R46 x Si, ambos genes complementarios están segregando. Para el intervalo que contiene al gen *LrcSV2* en el 3BS, los alelos fueron de tipo SV, pero dado que la progenie F3 resulto toda susceptible, se infirió que el gen *LrcSV2* no estaba presente. Esto se confirmó al cruzar la línea s283 x Gama6

(susceptible en planta adulta a la raza Ca2G1R, pero portadora del gen *LrcSV2*), cuya progenie F1 fue resistente a la raza Ca2G1R en planta adulta (Figura 21).

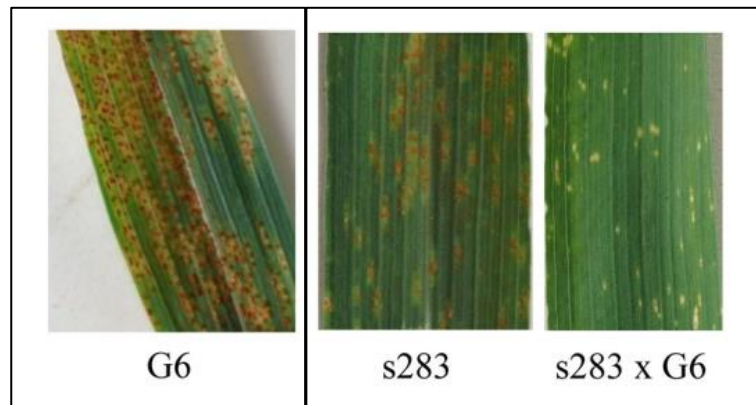


Figura 21: Hojas bandera infectadas con *P. triticina* raza Ca2G1R (Diéguez *et al.* 2018).

6. DISCUSIÓN

La roya de la hoja es una enfermedad endémica en las zonas trigueras de Argentina que ocasiona pérdidas de rendimiento, pudiendo afectar también la calidad de los granos de trigo si el ataque es muy intenso. La utilización de genes de resistencia es una herramienta muy eficaz para su control, y además mejora la sustentabilidad del cultivo, dado que contribuye a reducir el uso de agroquímicos. La caracterización de los genes involucrados en la resistencia, su modo de herencia y la identificación de marcadores moleculares estrechamente ligados a los mismos permite la acumulación estratégica de genes beneficiosos gracias a una eficaz introgresión durante el proceso de mejoramiento de nuevas variedades comerciales, sin depender de las razas del patógeno que los identificaron. La disponibilidad de un mapa de alta resolución es además una de las herramientas necesarias para abordar el clonado posicional, lo cual contribuye a una mejor comprensión de los mecanismos moleculares involucrados y abre nuevas perspectivas para su uso en mejoramiento a través de la edición genética.

La identificación y caracterización de genes de resistencia usualmente se lleva a cabo a través del análisis de progenies provenientes de un único cruzamiento, el cual involucra a la variedad resistente y una susceptible. Sin embargo, el análisis de diferentes cruzamientos, con distintos parentales susceptibles, puede revelar los efectos de interacciones entre genes de resistencia.

La interacción entre los genes *LrSV2* y *LrcSV2* fue inicialmente observada en el cruzamiento de R46 x Si, en donde la segregación de la resistencia se ajustó a una proporción 9 resistentes/7 susceptibles (Diéguez *et al.* 2018). La misma interacción fue estudiada en otras dos poblaciones, derivadas de diferentes cruzamientos, donde solamente uno de los 2 genes del sistema en estudio estaba segregando. En el cruzamiento de SV x G6 la resistencia se asoció a la segregación monogénica de *LrSV2* en el cromosoma 3BS (Ingala *et al.* 2012). La hipótesis de que ambos parentales llevan el mismo alelo para el gen *LrcSV2* se apoya en el hecho de que, de los 15 marcadores moleculares ligados a *LrcSV2* evaluados entre estas líneas, los 13 más cercanos al gen

resultaron monomórficos (Diéguez *et al.* 2018). En contraste, en el cruzamiento de SV x P, la resistencia se asoció a la presencia del gen *LrcSV2* en el cromosoma 4BL (Diéguez *et al.* 2018). En cuanto al polimorfismo entre SV y Si, 19 de 24 marcadores moleculares ligados a *LrcSV2* fueron diferentes entre ambos, apoyando la hipótesis de su ausencia en esta última variedad (Diéguez *et al.* 2018). De acuerdo con estas observaciones, la región que contiene al *LrcSV2* no segrega en el cruzamiento de SV x G6, pero si lo hace en los cruzamientos R46 x Si y SV x P.

La F1 del cruzamiento de G6 x P mostró resistencia moderada en la etapa adulta, mientras que ambos padres son susceptibles en ese estadio. Una situación similar se observó en la línea s283, derivada de R46 x Si, que resultó susceptible en planta adulta pero de acuerdo con el genotipo de los marcadores del 3BS es portadora del gen *LrSV2*. La F1 derivada del cruzamiento de la línea s283 x G6, mostró resistencia moderada en planta adulta. Este fenotipo podría explicarse por la heterocigosis de ambos genes en ambas F1. La segregación 9 resistentes/7 susceptibles observada en progenies F3 de R46 x Si no solo se ajusta a las proporciones esperadas para dos genes complementarios dominantes, sino también lo hace para un gen de resistencia dominante asociado a un supresor recesivo no ligado (Herrera-Foessel *et al.* 2005). Si bien los trabajos sobre la interacción de genes complementarios para resistencia a la roya de la hoja en trigo son limitados, siendo el único ejemplo bien estudiado el del sistema *Lr27+Lr31*, existen varios trabajos sobre genes supresores (Bai y Knott 1992, Nelson *et al.* 1997, Knott 2000, Assefa y Fehrmann 2000).

La hipótesis más plausible es que *LrSV2* y *LrcSV2* sean los componentes de un sistema de genes complementarios, donde al menos una copia de cada uno de ellos es necesaria para la expresión del fenotipo de resistencia. De lo contrario, en los casos donde solo uno de los miembros del par estaba segregando se debería postular que ambos genes actúan mutuamente como supresores recesivos.

Una hipótesis alternativa para explicar este fenómeno es que la resistencia sea dependiente de la dosis génica, donde su expresión puede ser desencadenada al superar un umbral de cantidad de productos génicos del huésped y/o del patógeno. Sacco *et al.* (2001) observaron que con respecto al gen *Lr3* presente en SV, los tipos

de infección observados concordaban con los inferidos en base a la dosis génica, demostrando una alta correlación entre esta y la expresión de la resistencia. Este efecto de dosis podría explicar algunos de los trabajos sobre resistencia a roya atribuidos a la acción de genes complementarios (Sacco *et al.* 2001).

La expresión de la enfermedad generalmente se evalúa con una clasificación visual de los tipos de infección entre diferentes combinaciones genotípicas de huésped-patógeno. Esta determinación cualitativa del fenotipo de resistencia, si bien es inequívoca para los valores extremos, genera incertidumbre cuando hay reacciones intermedias. Kolmer y Dyck (1994) demostraron en el sistema *T. aestivum*-*P. triticina*, al analizar simultáneamente la herencia de la patogenicidad y la de los genes para reacción, que tanto la resistencia del huésped como la avirulencia en el patógeno pueden ser completamente dominantes, parcialmente dominantes o recesivas. También es posible que otros genes que modifican características morfológicas de la planta modifiquen la respuesta frente al patógeno, especialmente en el estadio de planta adulta, generando matices en el tipo de infección (Darino *et al.* 2012). Según Saione *et al.* (1993), el nivel de expresión entre las combinaciones homocigotas y heterocigotas en el patosistema *T. aestivum*-*P. triticina* podría detectarse, en algunos casos, contando el número de pústulas por unidad de superficie.

Como se mencionó anteriormente, el gen *LrSV2* no segregó en el cruzamiento SV x P, permitiendo detectar la segregación monogénica del gen *LrcSV2*. Sin embargo, en la cruce G6 x P la F1 mostró un nivel de resistencia intermedio, sugiriendo la presencia de un probable alelo del gen *LrSV2* en P. La variedad P ha sido reportada como susceptible por más de 50 años en Argentina (Sacco *et al.* 1998), y ha sido utilizada como parental susceptible en varias poblaciones de mapeo (Darino *et al.* 2015, Diéguez *et al.* 2021). Es originaria de Australia, y hasta el momento, no hay registros de genes de resistencia identificados en la misma. Hasta donde se conoce, esta variedad no aparece en la genealogía de SV. Además, la hipótesis de que el gen de P es otro alelo del *LrSV2*, se sustenta en el hecho de que 19 marcadores ligados a este gen resultaron polimórficos entre SV y P (Ferella 2013, Diéguez, comunicación

personal). La identificación de distintos alelos funcionales de un gen de resistencia resulta interesante, no solo porque podrían tener diferentes especificidades que ampliarían la variabilidad disponible para su utilización en mejoramiento, sino también para realizar estudios moleculares acerca de las regiones génicas responsables de la especificidad y su relación con los mecanismos de resistencia. Otro ejemplo de genes de resistencia detectados en variedades frecuentemente utilizadas como parentales susceptibles es el caso de G6, donde fue detectado el gen *LrG6* (Ingala *et al.* 2012).

Varios genes y QTLs de resistencia a la roya de la hoja han sido identificados en el cromosoma 4BL. Singh y McIntosh (1984) describieron al gen ASR *Lr31* en el cromosoma 4B (anteriormente 4A β), el cual interactúa de manera complementaria con el gen *Lr27* (3BS), otorgando resistencia desde plántula solo cuando ambos están presentes. Posteriormente, Nelson *et al.* (1997) asociaron este gen al marcador RFLP ksuG10, el cual fue asignado físicamente al bin de delección terminal 4BL1-0.86-1.00 (Sourdille *et al.* 2004). William *et al.* (2006) reportaron a *QLr.cimmyt-4BL* entre los microsatélites gwm368 y gwm495, proximal al intervalo que contiene a *LrcSV2*. Naz *et al.* (2008) describieron al QTL *QLrs.B22-4B* asociándolo al marcador wmc349, distal a *LrcSV2*. Se sugiere que este QTL es diferente al *Lr31*, ya que no se detectó la presencia del gen *Lr27* complementario como un QTL en el cromosoma 3BS. Sin embargo, si la población en estudio no muestra segregación para *Lr27*, la resistencia sería observada como un único *locus*, completamente ligado al *Lr31*.

En el estudio llevado a cabo por Bansal *et al.* (2008), se ubicó al gen APR *Lr49* entre los marcadores wmc349 y barc163, también distales a *LrcSV2*. Singh *et al.* (2009) describieron a un QTL proximal al intervalo que contiene a *LrcSV2*, y sugirieron que podría ser el mismo que *QLr.cimmyt-4BL*, reportado por William *et al.* (2006). El gen ASR *Lr25* fue mapeado entre los marcadores gwm251 y gwm6, en un intervalo que incluye al de *LrcSV2* (Singh *et al.* 2012). Sin embargo, es poco probable que se trate del mismo gen, dado que *Lr25* fue introgresado desde centeno en los años '40 (Discroll *et al.* 1964) mientras que, según los *pedigrees* disponibles, SV fue desarrollada con

anterioridad a esto, en los años '30. Además, el alelo de gwm251 que describen los autores (124pb) es diferente al encontrado en SV (110pb. Petignat 2010).

Singh y Bowden (2011) ubicaron al gen APR *Lr12* entre los marcadores gwm251 y gwm149, proximales a *LrcSV2*, coincidiendo con el *QLr.cim-4BS* descrito por Rosewarne *et al.* (2015). Este QTL presento una interacción aditiva con *QLr.cim-3BS*, el cual fue asociado al marcador gwm533, mapeado a 0,3cM de *Lr27* (Kota *et al.* 2006). Ambos QTLs reducen significativamente el AUDPC cuando están presentes solos, pero al estar juntos actúan de manera aditiva reduciendo la severidad de la enfermedad a niveles observados en líneas con el *QLr.cim-7DS*, que se presume sea *Lr34*. Es probable que *QLr.cim-4BS* sea el *Lr12* (*Lr31*). Sin embargo, estos autores proponen que *QLr.cim-3BS* no es *Lr27*, dado que ninguno de los parentales de la población es portador del par complementario *Lr27+Lr31* (Rosewarne *et al.* 2015). Zhang *et al.* (2017) detectaron a *QLr.hebau-4B* en CS (portador de *Lr12*) entre los marcadores gwm149 y gwm375. Este intervalo coincide con el reportado para el *Lr12* (Singh y Bowden 2011). A su vez, *Lr31* se describe como completamente ligado o idéntico al gen *Lr12* para APR raza-específica (Singh *et al.* 1999). Park y McIntosh (1994) notaron que todos los patotipos virulentos para *Lr12*, también lo fueron para el sistema *Lr27+Lr31*. Singh *et al.* (1999) observaron que cuando cultivares portadores del *Lr27* se cruzaban con líneas portadoras del *Lr12*, la F1 presentaba una reacción intermedia, pero con un tipo de infección claramente resistente, y la segregación de la F2 se ajustaba a la proporción 9:7 esperada para genes complementarios no ligados.

Si *Lr12* y *Lr31* son el mismo gen, entonces *Lr27* actúa de forma complementaria en estadio de plántula, pero su presencia no sería necesaria para la expresión en planta adulta de la resistencia conferida por *Lr12*. En este caso, se podría postular que *Lr27* es un modificador genético requerido para la expresión de *Lr12* en plántula. *Lr27* por sí solo no confiere niveles detectables de APR (Singh *et al.* 1999).

En cuanto a la posición del gen *Lr12* en el 4BL, éste sería proximal a *LrcSV2*. En el mapa genético realizado por Singh y Bowden (2011) basado en 230 familias F3, el gen *Lr12* está flanqueado por los microsatélites gwm149 y gwm251. Este mapa es de baja a media resolución, por lo que no permite establecer inequívocamente la posición del

gen con respecto a la de los marcadores mencionados. En el mapa desarrollado en este trabajo en base a la población de 100 RILs, el gen *LrcSV2* se posicionó distal a un *cluster* de tres marcadores compuesto por los dos descriptos como flanqueantes de *Lr12* y *gwm375*. Sin embargo, posteriormente se realizó un mapa de alta resolución en base a más de 2000 individuos F2, por lo que la posición aquí establecida para el gen *LrcSV2* resulta más confiable.

No puede descartarse la posibilidad de que un mapeo de alta resolución para el gen *Lr12*, conduzca a posiciones coincidentes entre ambos genes. Alternativamente, dada la tendencia a la agrupación observada en *loci* de genes de resistencia (Michelmore y Meyers 1998, Leister 2004), tampoco puede descartarse la posibilidad de que sean genes diferentes estrechamente ligados.

En lo que respecta a la comparación entre las posiciones de los genes *Lr27* y *LrSV2*, la disponibilidad de un mapa físico del cromosoma 3B (Paux *et al.* 2008), junto con el elevado número de marcadores que se pudieron desarrollar luego de su secuenciación en CS (Choulet *et al.* 2010, 2014) permitieron el mapeo de alta resolución de ambos genes utilizando 1340 y 3404 F2s, respectivamente. En estos mapas, el gen *Lr27* fue ubicado en un intervalo correspondiente a 570kb en CS, entre los marcadores DOX_1 proximal y RKO_1 distal (Mago *et al.* 2011, 2014), mientras que *LrSV2* lo hizo en un intervalo de 748kb entre los marcadores *cfp5311* y *cfb5060* que incluye los marcadores del intervalo del *Lr27* (Diéguez *et al.* 2021).

Los genes que conforman al sistema *Lr27+Lr31* fueron mapeados en posiciones cromosómicas similares, en 3BS y 4BL respectivamente, a los genes *LrSV2+LrcSV2* descriptos en SV. Una diferencia entre estos dos sistemas es que aquellas variedades portadoras del sistema *LrSV2+LrcSV2* presentan resistencia en el estadio de planta adulta, siendo susceptibles al estadio de plántula. Por el contrario, las variedades portadoras de los genes *Lr27+Lr31*, son resistentes desde el estadio de plántula (McIntosh *et al.* 1995).

La raza Ca02G1R de *P. triticina*, empleada para identificar el sistema *LrSV2+LrcSV2* en planta adulta, también resulto avirulenta en las plántulas portadoras de *Lr27+Lr31*

(Ingala *et al.* 2012). Por otro lado, SV es susceptible al estadio de plántula a una raza australiana avirulenta en cultivares con *Lr27+Lr31* (Mago, comunicación personal).

Si bien el hecho de que existan dos sistemas genéticos complementarios vinculados en las mismas regiones cromosómicas en el trigo puede ser llamativo, el origen de cada uno de los miembros del sistema complementario podría ser explicado por la duplicación y la divergencia. De hecho, varios *loci* de resistencia a la roya de trigo fueron reportados como series alélicas o genes estrechamente ligados, incluidos los genes *Lr2*, *Lr3*, *Lr14* y *Lr22* (McIntosh *et al.* 1995). También fueron descritos *loci* complejos para resistencia a enfermedades en maíz, cebada, lino y lechuga (Michelmore y Meyers 1998, Shamrai 2003, Leister 2004). Es interesante mencionar que dos QTL mayores para resistencia a roya estriada (*P. striiformis*) fueron identificados en las mismas regiones del 3BS y 4BL que los sistemas *Lr27+Lr31* y *LrSV2+LrcSV2*. Las líneas que contienen a ambos QTL presentan una severidad del 6% en la infección, mientras que las que tienen solo uno de ellos presentan un 38-45% y las que no poseen ninguno un 69% (Subramanian *et al.* 2015). Otra interacción observada entre genes en las mismas regiones del 3BS y el 4BL son los genes complementarios *lm1* y *lm2*, que producen lesiones del tipo HR en ausencia del patógeno (Yao *et al.* 2009)

Teniendo en cuenta las reacciones específicas que presentan los genes de resistencia a royas, la utilización de diferentes patotipos cumple un rol fundamental para identificarlos. Sin embargo, hay que tener en cuenta los efectos epispásticos que pueden ocultar el número de genes involucrados en la expresión de esta. Estas particularidades en las interacciones hospedante-patógeno deben ser consideradas al momento de planear experimentos para dilucidar las bases genéticas de variedades resistentes a partir de cruzamientos biparentales. Debe tenerse en cuenta también que nuevos genes de resistencia podrían ser identificados, solo si hay razas con los genes de avirulencia correspondientes. Esta premisa también aplica para el caso de variedades comúnmente utilizadas como padres susceptibles en el desarrollo de las poblaciones de mapeo.

En trigo, la búsqueda de marcadores moleculares en regiones específicas del genoma puede realizarse mediante distintas metodologías, entre las cuales puede citarse la utilización de líneas con deleciones, las cuales permiten ubicarlos físicamente en los cromosomas (Sourdille *et al.* 2004, Diéguez *et al.* 2006). Una alternativa es el uso de la metodología de BSA (Michelmore *et al.* 1991). En este trabajo, los marcadores FSs34, FSs35, gpw311, gpw4388, gpw4412, gpw7390, wmc652, wmc657 y wmc692 se asociaron a la resistencia al ser evaluados en 12 RILs (6 resistentes y 6 susceptibles) y formaron un grupo de ligamiento con la misma al analizar el total de la población de 100 RILs. Esto demuestra que el número de individuos que compone cada *bulk* es adecuado para hallar marcadores ligados al carácter en estudio con una alta probabilidad.

Los marcadores que se incorporaron al mapa de ligamiento mejoraron su resolución, dado que se obtuvo un mapa con una distancia promedio entre marcadores de 2,3cM en comparación con los 3,5cM del previo disponible (Ferella 2013) y permitieron delimitar al gen *LrcSV2* en un intervalo de 1cM, correspondiente a 23Mb en la secuencia de la variedad de referencia CS (RefSeq v2.1).

En el trigo, se ha observado una correlación positiva entre las regiones terminales ricas en genes y la frecuencia de recombinación (Gill *et al.* 1996, Saintenac *et al.* 2008). Todos los marcadores que componen los *clusters* que delimitan al gen *LrcSV2* fueron mapeados en el bin de deleción 4BL1-0.86-1.00, que comprende el 14% de la región terminal del brazo largo del cromosoma 4B. Esta región fue reportada como un área propensa para la duplicación y evolución de genes (See *et al.* 2006). En las regiones cromosómicas de alta recombinación los mapas genéticos son más representativos de las distancias físicas reales (descriptas como número de bases), lo que facilita la búsqueda de genes candidato en comparación con las regiones más proximales al centrómero.

En el mapa de baja resolución obtenido en base a la población de 100 RILs (figura 14) el orden de los marcadores es coincidente con el reportado por varios autores en diferentes mapas del cromosoma 4BL (Röder *et al.* 1998, Somers *et al.* 2004, Quarrie *et al.* 2005, William *et al.* 2006, Bansal *et al.* 2008, Lu *et al.* 2014, Hu *et al.* 2022). Sin

embargo, estos mapas son de baja resolución, por lo que no se descarta la ocurrencia de imprecisiones en el orden de los marcadores. Este mapa obtenido en base a la población de RILs permitió identificar marcadores flanqueantes codominantes robustos. Los SSR FSs34 y gpw4388, definieron un intervalo de 1cM a partir del cual se inició el mapeo de alta resolución.

Para esta tarea, es fundamental la disponibilidad de un número importante de marcadores moleculares, como así también el desarrollo de poblaciones de mapeo adecuadas, que permitan el análisis de una elevada cantidad de individuos. El desarrollo de una población de RILs, presenta como ventaja la creación de líneas con distintos puntos de recombinación, las cuales pueden conservarse de manera indefinida, pero su creación requiere de un laborioso proceso de sucesivas generaciones de autofecundación. Por esta razón se prefirió desarrollar una población F2, obtenida por autofecundación de la F1, lo cual permitió generar un gran número de individuos segregantes en un corto periodo de tiempo.

Para el desarrollo del mapa de alta resolución se analizaron 2152 individuos F2 derivados del cruzamiento de SV x P. El análisis en etapas permitió identificar en cada una de ellas marcadores flanqueantes. Dichos marcadores fueron codominantes, con productos de amplificación fácilmente distinguibles y progresivamente más cercanos, siendo utilizados en la detección de recombinantes en la etapa siguiente. Una estrategia semejante fue utilizada en el mapeo de alta resolución del gen *LrSV2* (Diéguez *et al.* 2011, 2014, 2021). Los diferentes marcadores moleculares utilizados fueron diseñados aprovechando los recursos genómicos públicos disponibles, como los *contigs* del mapa físico del cromosoma 4B o la secuencia genómica completa del cultivar de referencia CS (Choulet *et al.* 2010, IWGSC 2018).

Los marcadores ISBPs están basados en elementos transponibles, los cuales están altamente metilados, conduciendo a un aumento de la frecuencia de mutaciones debido a que por desaminación de la metilcitosina, se produce timina, la cual no es reconocida como una base extraña que debe ser removida (Clarck *et al.* 2005, Rabinowicz *et al.* 2005). En base al análisis de 157 ISBPs en 8 líneas, Paux *et al.* (2010) establecieron una frecuencia de SNPs de 1 cada 99pb. En este trabajo, se detectaron

SNPs solo en 2 de los 11 ISBPs analizados (1/1498pb). Dado que *LrcSV2* se encuentra en el bin terminal del cromosoma, se espera que la zona este siendo activamente expresada, lo que implicaría bajos niveles de metilación. De hecho, en regiones codificantes se observó un rango de 1/203pb a 1/540pb (Somers *et al.* 2003, Ravel *et al.* 2006, 2007).

CS inicialmente denominado Chinese White, fue creado por el *Plant Breeding Institute* en Cambridge, Inglaterra (Sears 1988). Poco después fue introducido en Argentina y pudo haber sido utilizado en programas de mejoramiento a través del cultivar 38MA, que proviene del cruzamiento de Barleta x Chino, un cultivar proveniente de China que posiblemente haya sido Chinese Spring (Dyck 1991). La variedad SV proviene del cruce de Klein Sin Rival x 38MA, por lo tanto, SV puede haber heredado esta región cromosómica desde 38MA. En esta variedad CS se reportó la presencia del gen *Lr31*, idéntico o estrechamente ligado a *Lr12*. El orden de los marcadores propuesto en el mapa de alta resolución, basado en la secuencia de CS, resultó coherente con el genotipo observado en los recombinantes, y no se encontró evidencia de rearrreglos.

La disponibilidad de un mapa de alta resolución que defina un intervalo físico razonable para la búsqueda de genes candidatos, es uno de los requisitos para el clonado posicional. Esta estrategia se utilizó con éxito para el clonado basado en mapas de los genes *Lr1*, *Lr10*, *Lr21* y *Lr34* en los que se definieron intervalos de 0,8, 0,13, 1,7 y 0,15cM, respectivamente (Cloutier *et al.* 2007, Feuillet *et al.* 2003, Huang *et al.* 2003 y Krattinger *et al.* 2009). Estos autores utilizaron marcadores desarrollados a partir de ancestros de trigo o especies afines (Huang *et al.* 2003, Krattinger *et al.* 2009, Stein *et al.* 2000, Ling *et al.* 2003). Recientemente, algunos métodos alternativos como MutRenSeq (Steuernagel *et al.* 2016), TACCA (Thind *et al.* 2017) y MutChromSeq (Sánchez Martín *et al.* 2016) han sido utilizados para el clonado de genes de resistencia en trigo.

El intervalo que contiene al gen *LrcSV2* definido en este trabajo está comprendido entre los marcadores FSs135 y Fsp16. Estos se ubican a una distancia de 1,57Mb en la

secuencia de CS, la cual contiene 16 genes de alta confiabilidad (*high confidence*), y 15 de baja confiabilidad (*low confidence*) (*TraesCS4B03G0779700LC-TraesCS4B03G0782700*).

(https://urgi.versailles.inrae.fr/jbrowseiwgsc/gmod_jbrowse/?data=myData%2FIWGS_C_RefSeq_v2.1&loc=Chr4B%3A580736903..583480902&tracks=DNA%2CHighConfidenceGenesv2.1%2CLowConfidenceGenesv2.1&highlight=&highlight=Chr4B%3A581276000..582927999).

Dentro de los genes de alta confiabilidad, *TraesCS4B03G0780000*, *TraesCS4B03G0780100* y *TraesCS4B03G0780200* tienen dominios asociados a proteínas TIFY, una familia de proteínas involucradas en la respuesta de las plantas a diversos factores de estrés, incluyendo la resistencia a patógenos, mientras que el gen *TraesCS4B03G0781500* es un probable receptor LRR, un dominio frecuentemente encontrado en genes de resistencia.

Otro de los genes de alta confiabilidad es *TraesCS4B03G0782200*, el cual presenta dominios que se corresponden con un transportador ABC, similar a los identificados en el gen *Lr34*, clonado por Krattinger *et al.* (2009). En este trabajo se analizó un marcador SNP encontrado dentro de la secuencia de este gen, el cual cosegrega con la resistencia. En un análisis preliminar de RNAseq se observó una muy baja expresión del mismo en hoja bandera de SV. Sin embargo, el número de lecturas total de dicho ensayo fue aproximadamente 12 millones, un número que resulta bajo en comparación con las 30 millones que suelen considerarse óptimas para este tipo de análisis, por lo cual no se descarta la posibilidad de que *TraesCS4B03G0782200* sea *LrcSV2*. Otro factor que podría explicar este bajo número de lecturas mapeadas al gen es que el ensayo se realizó sobre muestras de SV no inoculadas con roya de la hoja, por lo que, si el gen es inducible, no se estaría expresando hasta no entrar en contacto con el patógeno, como es el caso del *Lr34* (Krattinger *et al.* 2009, Szychala *et al.* 2023). Por último, el gen *TraesCS4B03G0781200LC* descrito como de baja confiabilidad, presenta semejanza con proteínas RGA (*resistance gene analogs*).

Si bien estos genes son posibles candidatos, existe la posibilidad de que la secuencia correspondiente a *LrcSV2* no esté presente en la secuencia de CS, o de que

existan variaciones en el orden de los marcadores y/o la secuencia de bases en el intervalo blanco. Resulta entonces fundamental disponer de una biblioteca genómica del parental resistente SV para poder obtener la secuencia del intervalo definido por los marcadores FSs135 y FSp16. La construcción y organización de bibliotecas de BACs es laboriosa y costosa, especialmente de organismos con genomas grandes y complejos como el trigo. Sin embargo, es posible dirigir el foco a la región genómica de interés y aislar clones de BACs que abarquen el intervalo blanco utilizando la estrategia de genotecas de BACs no ordenadas, evitando así el tiempo y costo de la organización de los clones en microplacas (Isidore *et al.* 2005) Actualmente se dispone de una genoteca no ordenada de BACs de SV, la cual fue desarrollada en colaboración con el CNRGV del INRAE – Toulouse (Francia) y el laboratorio de Royas de los Cereales del CSIRO Agriculture and Food (Australia) (Marande *et al.* 2012).

Durante el proceso de mapeo realizado a lo largo de este trabajo, se encontraron suficientes marcadores moleculares polimórficos y se analizó un número significativo de individuos recombinantes que permitió localizar de manera confiable el intervalo que incluye al *LrcSV2*.

Los marcadores FSp8, ABC2 y FSs124 fueron establecidos como cosegregantes de la resistencia a la roya de la hoja. La distancia entre FSs135 y FSp8 es de 625kb, y entre ABC2 y FSp16 es de 334kb, en la secuencia de CS. El diseño de nuevos marcadores polimórficos en estas regiones y su genotipado en los recombinantes podría reducir aún más el intervalo, disminuyendo el número de genes anotados dentro del mismo, haciendo más eficiente el proceso de identificación de posibles candidatos. Estos 5 marcadores también podrían ser utilizados de manera confiable en los procesos de introgresión y selección del gen *LrcSV2* en variedades elite, así como también en su apilado con otros genes de resistencia.

El uso de genes de resistencia, particularmente de aquellos provenientes de variedades con resistencia durable a roya de la hoja, contribuye no solo a un control más eficiente de la enfermedad, sino también a un manejo más sustentable del cultivo de trigo, ya que reduce el uso de funguicidas y mejora la competitividad, en un marco

de cambio climático que podría favorecer las enfermedades fúngicas (Miedaner *et al.* 2021).

7. CONCLUSIONES

✓ Se logró delimitar al gen *LrcSV2* en un intervalo entre los marcadores FSs135 y FSp16, los cuales fueron diseñados con herramientas bioinformáticas en este trabajo, utilizando la secuencia disponible de la variedad Chinese Spring. Este intervalo corresponde a 1,57Mb en dicha variedad (RefSeq v2.1). Este tamaño es abordable para análisis bioinformático de su secuencia, primer paso en la postulación de posibles genes candidatos.

✓ Estos resultados abren el camino a investigaciones para la validación de los posibles genes candidatos, a través de comparación con genes previamente descritos, análisis de mutantes, cruzamientos, o técnicas como silenciamiento o edición génica. La clonación y caracterización completa del gen de interés profundizará la comprensión de los mecanismos de resistencia.

✓ Desde un punto de vista práctico, contar con marcadores moleculares robustos y asociados al carácter de interés facilita su introgresión y el seguimiento del mismo en poblaciones segregantes.

8. BIBLIOGRAFÍA

Altschul, S. F., Madden, T. L., Schäffer, A. A., Zhang, J., Zhang, Z., Miller, W., Lipman, D. J. (1997). Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*, 25(17), 3389–3402.

Antonelli EF (1983) Principal pathogens affecting the production of wheat in Argentina. Cereal breeding and production symposium, Special Report 718, Oregon State University, Argentina 7–12 November 1983, pp 377–396

Assefa, S., Fehrmann, H. (2000). Resistance to wheat leaf rust in *Aegilops tauschii* Coss. and inheritance of resistance in hexaploid wheat. *Genetic Resources and Crop Evolution* 47, 135–140. <https://doi.org/10.1023/A:1008770226330>

Bai, D. Knott, D.R. (1992). Suppression of rust resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.) by D-genome chromosomes. *Genome*. 35(2): 276-282. <https://doi.org/10.1139/g92-043>

Balint-Kurti, P. (2019). The plant hypersensitive response: concepts, control and consequences. *Molecular Plant Pathology*, 20: 1163-1178. <https://doi.org/10.1111/mpp.12821>

Bansal, U. K., Hayden, M. J., Venkata, B. P., Khanna, R., Saini, R. G., Bariana, H. S. (2008). Genetic mapping of adult plant leaf rust resistance genes *Lr48* and *Lr49* in common wheat. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 117(3), 307–312. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0775-6>

Bariana, H. S., Babu, P., Forrest, K. L., Park, R. F., Bansal, U. K. (2022). Discovery of the New Leaf Rust Resistance Gene *Lr82* in Wheat: Molecular Mapping and Marker Development. *Genes*, 13(6), 964. <https://doi.org/10.3390/genes13060964>

Bokore, F. E., Knox, R. E., Hiebert, C. W., Cuthbert, R. D., DePauw, R. M., Meyer, B., N'Diaye, A., Pozniak, C. J., McCallum, B. D. (2022). A Combination of Leaf Rust Resistance Genes, Including *Lr34* and *Lr46*, Is the Key to the Durable Resistance of the Canadian Wheat Cultivar, Carberry. *Frontiers in plant science*, 12, 775383. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.775383>

Bolton, M.D., Kolmer, J.A. and Garvin, D.F. (2008), Wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Molecular Plant Pathology*, 9: 563-575. <https://doi.org/10.1111/j.1364-3703.2008.00487.x>

Bowden RL. (2000). Wheat Leaf Rust. Kansas State University. Internet publication.

Brenchley, R., Spannagl, M., Pfeifer, M., Barker, G. L., D'Amore, R., Allen, A. M., McKenzie, N., Kramer, M., Kerhornou, A., Bolser, D., Kay, S., Waite, D., Trick, M., Bancroft, I., Gu, Y.,

- Huo, N., Luo, M. C., Sehgal, S., Gill, B., Kianian, S., Hall, N. (2012). Analysis of the bread wheat genome using whole-genome shotgun sequencing. *Nature*, 491(7426), 705–710. <https://doi.org/10.1038/nature11650>
- Burt, C., Hollins, T. W., Nicholson, P. (2011). Identification of a QTL conferring seedling and adult plant resistance to eyespot on chromosome 5A of Cappelle Desprez. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 122(1), 119–128. <https://doi.org/10.1007/s00122-010-1427-1>
- Cavanagh, C., Morell, M., Mackay, I., Powell, W. (2008). From mutations to MAGIC: resources for gene discovery, validation and delivery in crop plants. *Current opinion in plant biology*, 11(2), 215–221. <https://doi.org/10.1016/j.pbi.2008.01.002>
- Chen, X., Moore, M., Milus, E. A., Long, D. L., Line, R. F., Marshall, D., Jackson, L. (2002). Wheat Stripe Rust Epidemics and Races of *Puccinia striiformis* f. sp. tritici in the United States in 2000. *Plant disease*, 86(1), 39–46. <https://doi.org/10.1094/PDIS.2002.86.1.39>
- Choulet, F., Wicker, T., Rustenholz, C., Paux, E., Salse, J., Leroy, P., Feuillet, C. (2010). Megabase level sequencing reveals contrasted organization and evolution patterns of the wheat gene and transposable element spaces. *The Plant Cell*, 22(6), 1686–1701.
- Choulet, F., Alberti, A., Theil, S., Glover, N., Barbe, V., Daron, J., Feuillet, C. (2014). Structural and functional partitioning of bread wheat chromosome 3B. *Science*, 345(6194), 1249721.
- Clark, R. M., Tavaré, S., Doebley, J. (2005). Estimating a Nucleotide Substitution Rate for Maize from Polymorphism at a Major Domestication Locus. *Molecular Biology and Evolution*, 22(11), 2304–2312.
- Clavijo, B. J., Venturini, L., Schudoma, C., Accinelli, G. G., Kaithakottil, G., Wright, J., (2017). An improved assembly and annotation of the allohexaploid wheat genome identifies complete families of agronomic genes and provides genomic evidence for chromosomal translocations. *Genome Res.* 27, 885–896. doi: 10.1101/gr.217117.116
- Cloutier, S., McCallum, B. D., Loutre, C., Banks, T. W., Wicker, T., Feuillet, C., Keller, B., Jordan, M. C. (2007). Leaf rust resistance gene *Lr1*, isolated from bread wheat (*Triticum aestivum* L.) is a member of the large *psr567* gene family. *Plant molecular biology*, 65(1-2), 93–106. <https://doi.org/10.1007/s11103-007-9201-8>
- Darino MA. (2015). Estudio de las resistencias a roya común del maíz y a la roya del trigo. Tesis Doctoral.
- Darino, M. A., Dieguez, M. J., Singh, D., Ingala, L. R., Pergolesi, M. F., Park, R. F., Sacco, F. (2015). Detection and location of *Lr11* and other leaf rust resistance genes in the durably resistant wheat cultivar Buck Poncho. *Euphytica*, 206, 135–147.

- De Givry, S., Bouchez, M., Chabrier, P., Milan, D., Schiex, T. (2005). CARHTA GENE: multipopulation integrated genetic and radiation hybrid mapping. *Bioinformatics*, 21(8), 1703-1704.
- Dyck PL. (1991). Genetics of adult-plant leaf rust resistance in “Chinese Spring” and “Sturdy” wheat. *Crop Sci* 31:309–311
- Dieguez, M. J., Pergolesi, M. F., Velásquez, S. M., Ingala, L., López, M., Darino, M., Sacco, F. (2014). Fine mapping of *LrSV2*, a race-specific adult plant leaf rust resistance gene on wheat chromosome 3BS. *Theoretical and applied genetics*, 127, 1133-1141.
- Diéguez, M. J., Altieri, E., Ingala, L. R., Perera, E., Sacco, F., & Naranjo, T. (2006). Physical and genetic mapping of amplified fragment length polymorphisms and the leaf rust resistance *Lr3* gene on chromosome 6BL of wheat. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 112(2), 251–257. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-0122-0>
- Diéguez, M. J., Petignat, C., Ferella, L., Fiorentino, G., Silva, M., Dabove, M. A., Rosero Yañez, G. I., López, M., Pergolesi, M. F., Ingala, L., Cuyeu, A. R., & Sacco, F. (2018). Mapping a gene on wheat chromosome 4BL involved in a complementary interaction with adult plant leaf rust resistance gene *LrSV2*. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 131(11), 2333–2344. <https://doi.org/10.1007/s00122-018-3155-x>
- Diéguez, M. J., López, M., Altieri, E., Pergolesi, M. F., Dabove, M. A., Cuyeu, A. R., Justus, N., Kandus, M., Ingala, L., & Sacco, F. (2021). Characterization and Use in Wheat Breeding of Leaf Rust Resistance Genes from Durable Varieties. *Biology*, 10(11), 1168. <https://doi.org/10.3390/biology10111168>
- Driscoll, C. J., Jensen, N. F. (1964). Characteristics of Leaf Rust Resistance Transferred from Rye to Wheat 1. *Crop Science*, 4(4), 372-374.
- Dubcovsky J, Dvorak J. (2007). Genome plasticity a key factor in the success of polyploid wheat under domestication [published correction appears in *Science*. 2007 Oct 19;318(5849):393]. *Science*. 2007;316(5833):1862-1866. doi:10.1126/science.1143986
- Stakman, E. C. (1915). Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J Agric Res*, 4, 193-200.
- Ellis, J. G., Lagudah, E. S., Spielmeier, W., Dodds, P. N. (2014). The past, present and future of breeding rust resistant wheat. *Frontiers in plant science*, 5, 641. <https://doi.org/10.3389/fpls.2014.00641>

- Favret EA, Saione, HA y Franzone PM. (1983). New approaches in breeding for disease resistance. Cereal breeding and production Symp. Argentina Special Report 718. Oregon State University
- Ferella, L. (2013). Análisis genético de la resistencia a roya de la hoja del Trigo en el cruzamiento de Sinvalocho MA por Purple Straw. Tesis de Licenciatura. UM.
- Feuillet, C., Keller, B. (1999). High gene density is conserved at syntenic loci of small and large grass genomes. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 96(14), 8265–8270. <https://doi.org/10.1073/pnas.96.14.8265>
- Feuillet, C., Travella, S., Stein, N., Albar, L., Nublat, A., Keller, B. (2003). Map-based isolation of the leaf rust disease resistance gene Lr10 from the hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 100(25), 15253–15258. <https://doi.org/10.1073/pnas.2435133100>
- Flor, H. H. (1956). Mutations in flax rust induced by ultraviolet radiation. Science, 124(3227), 888-889.
- Favret, E.A., Saione, H.A., Franzone, P.M. (1983). New approaches in breeding for disease resistance. In Proceedings of the Cereal Breeding and Production Symposium, Special Report 718, Oregon State University, Marcos Juarez, Argentina, 7–12 November 1983; pp. 397–411.
- Galich, M., Galich, A. N. (1996). Enfermedades del trigo en el área sur de Córdoba y Santa Fe. Experiencias en control químico. Pág. 83-98. I Jornada de Control Químico de enfermedades de trigo en sistemas de manejo para alta productividad. INTA-CIMMYT, Argentina.
- Germán, S., Barcellos, A., Chaves, M., Kohli, M., Campos, P., De Viedma, L. (2007). The situation of common wheat rusts in the Southern Cone of America and perspectives for control. Australian Journal of Agricultural Research, 58(6), 620-630.
- Gill, K. S., Gill, B. S., Endo, T. R. (1993). A chromosome region-specific mapping strategy reveals gene-rich telomeric ends in wheat. Chromosoma, 102(6), 374-381.
- Gill, K. S., Gill, B. S., Endo, T. R., Boyko, E. V. (1996). Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. Genetics, 143(2), 1001-1012.
- Gill, K. S., Gill, B. S., Endo, T. R., Taylor, T. (1996). Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. Genetics, 144(4), 1883-1891.

- Haggag, M. E. A., Samborski, D. J., & Dyck, P. L. (1973). Genetics of pathogenicity in three races of leaf rust on four wheat varieties. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 15(1), 73-82.
- Hamada, H., Petrino, M. G., Kakunaga, T. (1982). A novel repeated element with Z-DNA-forming potential is widely found in evolutionarily diverse eukaryotic genomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 79(21), 6465-6469.
- Herrera-Foessel, S. A., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Yuen, J., Djurle, A. (2005). New Genes for Leaf Rust Resistance in CIMMYT Durum Wheats. *Plant disease*, 89(8), 809–814. <https://doi.org/10.1094/PD-89-0809>
- Hewitt, T., Zhang, J., Huang, L., Upadhyaya, N., Li, J., Park, R., Hoxha, S., McIntosh, R., Lagudah, E., Zhang, P. (2021). Wheat leaf rust resistance gene *Lr13* is a specific Ne2 allele for hybrid necrosis. *Molecular plant*, 14(7), 1025–1028. <https://doi.org/10.1016/j.molp.2021.05.010>
- Hu, C., Wang, F., Feng, J., (2022). Identification and molecular mapping of YrBm for adult plant resistance to stripe rust in Chinese wheat landrace Baimangmai. *Theoretical and Applied Genetics*, 135(8), 2655-2664. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04139-3>
- Huang, L., Brooks, S. A., Li, W., Fellers, J. P., Trick, H. N., Gill, B. S. (2003). Map-based cloning of leaf rust resistance gene *Lr21* from the large and polyploid genome of bread wheat. *Genetics*, 164(2), 655–664. <https://doi.org/10.1093/genetics/164.2.655>
- Huerta-Espino, J., Singh, R. P., Germán, S., McCallum, B. D., Park, R. F., Chen, W. Q., Bhardwaj S.C., Goyeau, H. (2011). Global status of wheat leaf rust caused by *Puccinia triticina*. *Euphytica*, 179(1), 143–160. <https://doi.org/10.1007/S10681-011-0361-X>Hulbert 1997
- Hulbert, S., & Pumphrey, M. (2014). A time for more booms and fewer busts? Unraveling cereal–rust interactions. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 27(3), 207-214.
- Ingala, L., Saione, H., Formento, N., Sacco, F. (2003). Molecular and pathogenic variation in *Puccinia triticina* populations from Argentina. *Proceedings of the Tenth International Wheat Genetics Symposium*. Vol 3: 1154-1156.
- Ingala, L., López, M., Darino, M., Pergolesi, M. F., Diéguez, M. J., Sacco, F. (2012). Genetic analysis of leaf rust resistance genes and associated markers in the durable resistant wheat cultivar Sinvalocho MA. *Theoretical and Applied Genetics*, 124, 1305-1314.
- Ingala, L. (2008). Estudio de las bases genéticas de la resistencia durable a roya de la hoja en trigo. Tesis Doctoral. FCEN - UBA.

- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), Appels, R., Eversole, K., Stein, N., Feuillet, C., Keller, B., Singh, N. K. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361(6403), eaar7191.
- Isidore, E., Scherrer, B., Bellec, A., Budin, K., Faivre-Rampant, P., Waugh, R., Keller, B., Caboche, M., Feuillet, C., Chalhou, B. (2005). Direct targeting and rapid isolation of BAC clones spanning a defined chromosome region. *Funct Integr Genomics* 5, 97-103
- Johnson, R. (1981). Durable resistance: definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology*, 71(6), 567-568.
- Jin, Y., Szabo, L. J., Pretorius, Z. A., Singh, R. P., Ward, R., & Fetch, T., Jr (2008). Detection of Virulence to Resistance Gene *Sr24* within Race TTKS of *Puccinia graminis* f. sp. *tritici*. *Plant disease*, 92(6), 923-926. <https://doi.org/10.1094/PDIS-92-6-0923>
- Jones, J. D., Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323-329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Knott, D.R. (2000). Inheritance of Resistance to Stem Rust in Medea Durum Wheat and the Role of Suppressors. *Crop Sci.*, 40: 98-102. <https://doi.org/10.2135/cropsci2000.40198x>
- Kolmer, J. A. (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual review of phytopathology*, 34(1), 435-455.
- Kolmer, J.A. (2005). Tracking wheat rust on a continental scale. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8, 441-449
- Kolmer, J. A., Hanzalova, A., Goyeau, H., Bayles, R., & Morgounov, A. (2013). Genetic differentiation of the wheat leaf rust fungus *Puccinia triticina* in Europe. *Plant Pathology*, 62(1), 21-31.
- Kolmer, J. A., Bajgain, P., Rouse, M. N., Li, J., & Zhang, P. (2023). Mapping and characterization of the recessive leaf rust resistance gene *Lr83* on wheat chromosome arm 1DS. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 136(5), 115. <https://doi.org/10.1007/s00122-023-04361-7>
- Kolmer, J. A., Dyck, P. L. (1994). Gene expression in the *Triticum aestivum*-*Puccinia recondita* f.sp. *tritici* gene-for-gene system. *Phytopathology*, 84(4), 437-440. <https://doi.org/10.1094/Phyto-84-437>
- Kolmer, J. (2013). Leaf rust of wheat: pathogen biology, variation and host resistance. *Forests*, 4(1), 70-84.
- Kolodziej, M. C., Singla, J., Sánchez-Martín, J., Zbinden, H., Šimková, H., Karafiátová, M., Doležel, J., Gronnier, J., Poretti, M., Glauser, G., Zhu, W., Köster, P., Zipfel, C., Wicker, T.,

- Krattinger, S. G., Keller, B. (2021). A membrane-bound ankyrin repeat protein confers race-specific leaf rust disease resistance in wheat. *Nature communications*, 12(1), 956. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-20777-x>
- Kota, R., Spielmeyer, W., McIntosh, R. A., & Lagudah, E. S. (2006). Fine genetic mapping fails to dissociate durable stem rust resistance gene *Sr2* from pseudo-black chaff in common wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 112, 492-499.
- Krattinger, S. G., Lagudah, E. S., Spielmeyer, W., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., McFadden, H., Bossolini, E., Selter, L. L., Keller, B. (2009). A putative ABC transporter confers durable resistance to multiple fungal pathogens in wheat. *Science (New York, N.Y.)*, 323(5919), 1360–1363. <https://doi.org/10.1126/science.1166453>
- Kumar, K., Jan, I., Saripalli, G., Sharma, P. K., Mir, R. R., Balyan, H. S., Gupta, P. K. (2022). An update on resistance genes and their use in the development of leaf rust resistant cultivars in wheat. *Frontiers in Genetics*, 13, 816057.
- Leister, D. (2004). Tandem and segmental gene duplication and recombination in the evolution of plant disease resistance genes. *Trends in genetics*, 20(3), 116-122.
- Lin, G., Chen, H., Tian, B., Sehgal, S. K., Singh, L., Xie, J., Rawat, N., Juliana, P., Singh, N., Shrestha, S., Wilson, D. L., Shult, H., Lee, H., Schoen, A. W., Tiwari, V. K., Singh, R. P., Guttieri, M. J., Trick, H. N., Poland, J., Bowden, R. L., Liu, S. (2022). Cloning of the broadly effective wheat leaf rust resistance gene *Lr42* transferred from *Aegilops tauschii*. *Nature communications*, 13(1), 3044. <https://doi.org/10.1038/s41467-022-30784-9>
- Long, D., Kolmer, J. (1989) A North American system of nomenclature for *Puccinia recondita* f. sp. *tritici*. *Phytopathology*, 79, 525–529
- Lowe, I., Cantu, D., & Dubcovsky, J. (2011). Durable resistance to the wheat rusts: Integrating systems biology and traditional phenotype-based research methods to guide the deployment of resistance genes. *Euphytica: Netherlands journal of plant breeding*, 179(1), 69–79. <https://doi.org/10.1007/s10681-010-0311-z>
- Lu, Y., Wang, M., Chen, X., See, D., Chao, S., Jing, J. (2014). Mapping of *Yr62* and a small-effect QTL for high-temperature adult-plant resistance to stripe rust in spring wheat PI 192252. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 127(6), 1449–1459. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2312-0>
- Mago, R., Tabe, L., Vautrin, S., Šimková, H., Kubaláková, M., Upadhyaya, N., Spielmeyer, W. (2014). Major haplotype divergence including multiple germin-like protein genes, at the wheat *Sr2* adult plant stem rust resistance locus. *BMC Plant Biology*, 14, 379. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0379-z>

- Mago, R., Tabe, L., McIntosh, R. A., Pretorius, Z., Kota, R., Paux, E., Spielmeier, W. (2011). A multiple resistance locus on chromosome arm 3BS in wheat confers resistance to stem rust (*Sr2*), leaf rust (*Lr27*) and powdery mildew. *Theoretical and applied genetics*, 123, 615-623.
- Mains, E. B., Jackson, H. S. (1926). Physiologic specialisation in the leaf rust of Wheat, *Puccinia triticina* Erikas. *Phytopathology*, 16(2).
- Marande, W., Vautrin, S., Bellec, A., Prat, E., Beydon, G., Pergolesi, M. F., Berges, H. (2012, June). Non-gridded BAC libraries to iso-late genomic regions involved in different cellular processes of interest in wheat varieties. In 22nd international Triticeae Mapping Initiative workshop, Fargo, USA.
- Martins, W. S., Lucas, D. C. S., de Souza Neves, K. F., Bertoli, D. J. (2009). WebSat-A web software for microsatellite marker development. *Bioinformation*, 3(6), 282
- McMullen, M., Rasmussen, J. B. (2002). Wheat Leaf Rust. North Dakota State University Extension Service. PP589.
- McCallum, B. D., Hiebert, C. W., Cloutier, S., Bakkeren, G., Rosa, S. B., Humphreys, D. G., Marais, G. F., McCartney C. A., Panwar, V., Rampitsch, C., Saville, B. J., Wang, X. (2016). A review of wheat leaf rust research and the development of resistant cultivars in Canada. *Canadian Journal of Plant Pathology*, 38(1), 1-18.
- McIntosh, R.A., Wellings, C.R., Park, R.F. (1995). *Wheat Rusts: An Atlas of Resistance Genes*. East Melbourne, Australia: CSIRO
- McIntosh, R. A., Dubcovsky, J., Rogers, W. J., Xia, X. C., Raupp, W. J. (2022). Catalogue of Gene Symbols for Wheat: 2022 Supplement. Annual Wheat Newsletter, Vol 68. https://wheat.pw.usda.gov/ggpages/awn/68/AWN_VOL_68.pdf
- Mendgen, K., Hahn, M., Deising, H. (1996). Morphogenesis and mechanisms of penetration by plant pathogenic fungi. *Annual review of phytopathology*, 34, 367–386. <https://doi.org/10.1146/annurev.phyto.34.1.367>
- Messmer, M. M., Seyfarth, R., Keller, M., Schachermayr, G., Winzeler, M., Zanetti, S., Keller, B. (2000). Genetic analysis of durable leaf rust resistance in winter wheat. *Theoretical and Applied Genetics*, 100, 419-431.
- Michelmore, R. W., Meyers, B. C. (1998). Clusters of resistance genes in plants evolve by divergent selection and a birth-and-death process. *Genome research*, 8(11), 1113-1130.
- Michelmore, R. W., Paran, I., Kesseli, R. (1991). Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: a rapid method to detect

markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proceedings of the national academy of sciences, 88(21), 9828-9832.

Miedaner, T., Juroszek, P. (2021). Climate change will influence disease resistance breeding in wheat in Northwestern Europe. Theoretical and Applied Genetics, 134, 1771–1785. <https://doi.org/10.1007/s00122-021-03807-0>

Moore, J. W., Herrera-Foessel, S., Lan, C., Schnippenkoetter, W., Ayliffe, M., Huerta-Espino, J., Lillemo, M., Viccars, L., Milne, R., Periyannan, S., Kong, X., Spielmeier, W., Talbot, M., Bariana, H., Patrick, J. W., Dodds, P., Singh, R., Lagudah, E. (2015). A recently evolved hexose transporter variant confers resistance to multiple pathogens in wheat. Nature genetics, 47(12), 1494–1498. <https://doi.org/10.1038/ng.3439>

Morgante, M., Olivieri, A. M. (1993). PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. The plant journal, 3(1), 175-182.

Naz, A. A., Kunert, A., Lind, V., Pillen, K., Léon, J. (2008). AB-QTL analysis in winter wheat: II. Genetic analysis of seedling and field resistance against leaf rust in a wheat advanced backcross population. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik, 116(8), 1095–1104. <https://doi.org/10.1007/s00122-008-0738-y>

Nelson, J.C., Singh, R.P., Autrique, J.E. and Sorrells, M.E. (1997). Mapping Genes Conferring and Suppressing Leaf Rust Resistance in Wheat. Crop Science, 37: 1928-1935
crops1997.0011183X003700060043x. <https://doi.org/10.2135/crops1997.0011183X003700060043x>

Park, R. F., McIntosh, R. A. (1994). Adult plant resistances to *Puccinia recondita* f. sp. *tritici* in wheat. New Zealand Journal of Crop and Horticultural Science, 22(2), 151-158.

Park, R. F., Wellings, C. R. (2012). Somatic hybridization in the Uredinales. Annual review of Phytopathology, 50, 219-239.

Paux, E., Sourdille, P., Salse, J., Saintenac, C., Choulet, F., Leroy, P., Feuillet, C. (2008). A physical map of the 1-gigabase bread wheat chromosome 3B. science, 322(5898), 101-104.

Paux, E., Roger, D., Badaeva, E., Gay, G., Bernard, M., Sourdille, P., Feuillet, C. (2006). Characterizing the composition and evolution of homoeologous genomes in hexaploid wheat through BAC-end sequencing on chromosome 3B. The Plant Journal, 48(3), 463-474.

Paux, E., Faure, S., Choulet, F., Roger, D., Gauthier, V., Martinant, J. P., Feuillet, C. (2010). Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome

saturation and marker-assisted selection in wheat. *Plant Biotechnology Journal*, 8(2), 196-210

Perez, B., Roelfs, A. P. (1989). Resistance to wheat leaf rust of land cultivars and their derivatives. *Phytopathology*, 79(1), 183.

Petignat, C. (2010). Mapeo de marcadores moleculares y de un gen de resistencia a roya de la hoja de expresión en planta adulta en la región subtelmérica del cromosoma 3BS de Trigo. IGEEAF. Tesis de licenciatura. FCEN – UBA.

Pink, D. A. (2002). Strategies using genes for non-durable disease resistance. *Euphytica*, 124, 227-236.

Pinto da Silva, G. B., Zanella, C. M., Martinelli, J. A., Chaves, M. S., Hiebert, C. W., McCallum, B. D., Boyd, L. A. (2018). Quantitative trait loci conferring leaf rust resistance in hexaploid wheat. *Phytopathology*, 108(12), 1344-1354.

Pretorius, Z. A., Roelfs, A. P. (1996). The role of *Lr10*, *Lr13*, and *Lr34* in the expression of adult-plant resistance to leaf rust in the wheat cultivar Era.

Quarrie, S. A., Steed, A., Calestani, C., Semikhodskii, A., Lebreton, C., Chinoy, C., Steele, N., Pljevljakusić, D., Waterman, E., Weyen, J., Schondelmaier, J., Habash, D. Z., Farmer, P., Saker, L., Clarkson, D. T., Abugalieva, A., Yessimbekova, M., Turuspekov, Y., Abugalieva, S., Tuberosa, R., Dodig, D. (2005). A high-density genetic map of hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.) from the cross Chinese Spring x SQ1 and its use to compare QTLs for grain yield across a range of environments. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 110(5), 865–880. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1902-7>

Rabinowicz, P. D., Citek, R., Budiman, M. A., Nunberg, A., Bedell, J. A., Lakey, N., O'Shaughnessy, A. L., Nascimento, L. U., McCombie, W. R., & Martienssen, R. A. (2005). Differential methylation of genes and repeats in land plants. *Genome Research*, 15, 1431-1440.

Ravel, C., Praud, S., Murigneux, A., Canaguier, A., Sapet, F., Samson, D., Balfourier, F., Dufour, P., Chalhou, B., Brunel, D., Beckert, M., & Charmet, G. (2006). Single-nucleotide polymorphism frequency in a set of selected lines of bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genome*, 49(9), 1131-1139. <https://doi.org/10.1139/g06-067>

Ravel, C., Praud, S., Canaguier, A., Dufour, P., Giancola, S., Balfourier, F., Charmet, G. (2007). DNA sequence polymorphisms and their application to bread wheat quality. *Euphytica*, 158, 331-336.

- Röder, M. S., Korzun, V., Wendehake, K., Plaschke, J., Tixier, M. H., Leroy, P., Ganal, M. W. (1998). A microsatellite map of wheat. *Genetics*, 149(4), 2007–2023. <https://doi.org/10.1093/genetics/149.4.2007>
- Roelfs, A. P. (1988). Genetic control of phenotypes in wheat stem rust. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1), 351–367.
- Rosewarne, G. M., Li, Z. F., Singh, R. P., (2015). Different QTLs are associated with leaf rust resistance in wheat between China and Mexico. *Molecular Breeding*, 35, 127. <https://doi.org/10.1007/s11032-015-0317-2>
- Saari, E., Prescott, J.M. (1985) World Distribution in Relation to Economic Losses. *The Cereal Rusts*. Academic Press, INC. 1985 pp257–293.
- Sacco, F., Suárez, E. Y., Naranjo, T. (1998). Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr3* on chromosome 6B of Sinvalocho MA wheat. *Genome*. 41(5): 686–690. <https://doi.org/10.1139/g98-067>
- Sacco, F., Suárez, E. Y., Saione, H.A., Tanos, B. E. (2001). Dosage effect of *Lr3* gene in the *Triticum aestivum*–*Puccinia recondita* specific interaction. *J Phytopathol* 149:583–588
- Sacco, F., Tranquilli, G., Gorgoschidse, L., Suarez, E. (1992). Aminopeptidase B1: a centromere marker for chromosome 6B of wheat. *Genome*, 35(2), 261–263.
- Sacco, F., Favret, E. A., Suarez, E. Y., Solari, R. M., Saione, H. A. (1995). Spontaneous genetic variation for leaf rust reaction in Sinvalocho MA wheat. *Journal of Phytopathology*, 143(4), 251–255.
- Saintenac, C., Falque, M., Martin, O. C., Paux, E., Feuillet, C., & Sourdille, P. (2009). Detailed recombination studies along chromosome 3B provide new insights on crossover distribution in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Genetics*, 181(2), 393–403. <https://doi.org/10.1534/genetics.108.097469>
- Saione, H. A., Favret, E. A., Franzone, P. M., Sacco, F. (1993) Host genetic analysis by using *Puccinia recondita tritici* induced mutants for increased virulence. *J. Phytopathol.* 1993, 138, 225–232.
- Samborski, D. J. (1985). Wheat leaf rust. In 'Cereal rusts. Vol. I' .(Eds AP Roelfs, WR Bushnell) pp. 39–59.
- Sánchez-Martín, J., Steuernagel, B., Ghosh, S., Herren, G., Hurni, S., Adamski, N., Vrána, J., Kubaláková, M., Krattinger, S. G., Wicker, T., Doležel, J., Keller, B., Wulff, B. B. (2016). Rapid gene isolation in barley and wheat by mutant chromosome sequencing. *Genome biology*, 17(1), 221. <https://doi.org/10.1186/s13059-016-1082-1>

- Sawhney, R. N., Nayar, S. K., Sharma, J. B., Bedi, R. (1989). Mechanism of durable resistance: a new approach. *Theoretical and applied genetics*, 78, 229-232.
- Schnurbusch, T., Paillard, S., Schori, A., Messmer, M., Schachermayr, G., Winzeler, M., Keller, B. (2004). Dissection of quantitative and durable leaf rust resistance in Swiss winter wheat reveals a major resistance QTL in the Lr34 chromosomal region. *Theoretical and Applied Genetics*, 108, 477-484.
- Sears, E. R. (1952). Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma*. 1952;4(6):535-550. doi:10.1007/BF00325789
- Sears, E. R. (1954). The aneuploids of common wheat. University of Missouri, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station. *Phytopathology* 79:1183
- Sears, E. R. (1988). History of the Chinese Spring aneuploids. In *Proceedings of the Seventh International Wheat Genetics Symposium*/edited by TE Miller and RMD Koebner. Cambridge: Published by the Institute of Plant Science Research, Cambridge Laboratory, c1988.
- E. R. Sears. (2011). Genetics society of canada award of excellence lecture an induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*. 19(4): 585-593. <https://doi.org/10.1139/g77-063>
- See, D. R., Brooks, S., Nelson, J. C., Brown-Guedira, G., Friebe, B., Gill, B. S. (2006). Gene evolution at the ends of wheat chromosomes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 103(11), 4162-4167. <https://doi.org/10.1073/pnas.0508942102>
- Shamraï, S. N. (2003). Plant resistance genes: molecular and genetic organization, function and evolution. *Zhurnal Obshchei Biologii*, 64(3), 195-214.
- Singh, R. P., McIntosh, R. A. (1984). Complementary genes for reaction to *Puccinia recondita tritici* in *Triticum aestivum*. I. Genetic and linkage studies. *Canadian Journal of Genetics and Cytology*, 26(6), 723-735. <https://doi.org/10.1139/g84-115>
- Singh, R. P. McIntosh, R. A. (1999). Genetic relationship between the adult plant resistance gene *Lr12* and the complementary gene *Lr31* for seedling resistance to leaf rust in common wheat. *Plant pathology*, 48(5), 567-573.
- Singh, D., Simmonds, J., Park, R. F., Bariana, H. S., Snape, J. W. (2009). Inheritance and QTL mapping of leaf rust resistance in the European winter wheat cultivar 'Beaver' . *Euphytica*, 169, 253-261.

- Singh, A., Pallavi, J. K., Gupta, P., & Prabhu, K. V. (2012). Identification of microsatellite markers linked to leaf rust resistance gene *Lr25* in wheat. *Journal of applied genetics*, 53(1), 19–25. <https://doi.org/10.1007/s13353-011-0070-0>
- Singh, S., & Bowden, R. L. (2011). Molecular mapping of adult-plant race-specific leaf rust resistance gene *Lr12* in bread wheat. *Molecular Breeding*, 28, 137–142.
- SISA – Sistema de Información simplificado Agrícola – Informe de trigo 2021-2022 https://www.argentina.gob.ar/sites/default/files/if_sisa_trigo_21-22_vf.pdf
- Skylas, D. J., Mackintosh, J. A., Cordwell, S. J., Basseal, D. J., Walsh, B. J., Harry, J., Blumenthal, C., Copeland, L., Wrigley, C. W., Rathmell, W. (2000). Proteome approach to the characterization of protein composition in the developing and mature wheat grain endosperm. *Journal of Cereal Science* 32, 169–188
- Somers, D. J., Kirkpatrick, R., Moniwa, M., Walsh, A. (2003). Mining single-nucleotide polymorphisms from hexaploid wheat ESTs. *Genome*, 46(3), 431–437. <https://doi.org/10.1139/g03-027>
- Somers, D. J., Isaac, P., & Edwards, K. (2004). A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 109(6), 1105–1114. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1740-7>
- Somers, D. J., Isaac, P. (2004). SSRs from the wheat microsatellite consortium. Available at <wheat.pw.usda.gov/ggpages/SSR/WMC> Accessed on March, 10, 2010.
- Song, Q. J., Shi, J. R., Singh, S., Fickus, E. W., Costa, J. M., Lewis, J., Cregan, P. B. (2005). Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. *Theoretical and applied genetics*, 110, 550–560.
- Song, L., Wang, R., Yang, X., Zhang, A., & Liu, D. (2023). Molecular Markers and Their Applications in Marker-Assisted Selection (MAS) in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Agriculture*, 13(3), 642. MDPI AG. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.3390/agriculture13030642>
- Sourdille, P., Singh, S., Cadalen, T., Brown-Guedira, G. L., Gay, G., Qi, L., Gill, B. S., Dufour, P., Murigneux, A., Bernard, M. (2004). Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Functional & integrative genomics*, 4(1), 12–25. <https://doi.org/10.1007/s10142-004-0106-1>
- Spychała, J., Tomkowiak, A., Noweiska, A., Bobrowska, R., Bocianowski, J., Książkiewicz, M., Kwiatek, M. T. (2023). Expression Profiling of the Slow Rusting Resistance Genes

Lr34/Yr18 and *Lr67/Yr46* in Common Wheat (*Triticum aestivum* L.) and Associated miRNAs Patterns. *Genes*, 14(7), 1376.

Stakman, E. C. (1915). Relation between *Puccinia graminis* and plants highly resistant to its attack. *J Agric Res*, 4, 193-200.

Stein, N., Feuillet, C., Wicker, T., Schlagenhauf, E., Keller, B. (2000). Subgenome chromosome walking in wheat: a 450-kb physical contig in *Triticum monococcum* L. spans the *Lr10* resistance locus in hexaploid wheat (*Triticum aestivum* L.). *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 97(24), 13436-13441.

Steuernagel, B., Periyannan, S., Hernández-Pinzón, I. (2016). Rapid cloning of disease-resistance genes in plants using mutagenesis and sequence capture. *Nature Biotechnology*, 34(6), 652–655. <https://doi.org/10.1038/nbt.3543>

Strachan, T., Read, A. P. (1999). *Genética Molecular Humana*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.

Suárez, E. Y., Favret, E. A. (1984). Reaction to leaf rust of a sinvalocho wheat gene in hemizygous condition. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 92(4), 289-294.

Subramanian, N. K., Mason, R. E., Milus, E. A., Moon, D. E., Brown-Guedira, G. (2016). Characterization of two adult-plant stripe rust resistance genes on chromosomes 3BS and 4BL in soft red winter wheat. *Crop Science*, 56(1), 143-153.

Thind, A. K., Wicker, T., Šimková, H., Fossati, D., Moullet, O., Brabant, C., Vrána, J., Doležel, J., Krattinger, S. G. (2017). Rapid cloning of genes in hexaploid wheat using cultivar-specific long-range chromosome assembly. *Nature biotechnology*, 35(8), 793–796. <https://doi.org/10.1038/nbt.3877>

Voorrips, R. (2002). MapChart: software for the graphical presentation of linkage maps and QTLs. *Journal of heredity*, 93(1), 77-78.

Walkowiak, S., Gao, L., Monat, C., et al. (2020). Multiple wheat genomes reveal global variation in modern breeding. *Nature*, 588, 277–283. <https://doi.org/10.1038/s41586-020-2961-x>

Wan, Y., Poole R. L., Huttly, A. K. (2008). Transcriptome analysis of grain development in hexaploid wheat. *BMC Genomics* 9, 121.

Wang, Y., Abrouk, M., Gourdoups, S., Koo, D. H., Karafiátová, M., Molnár, I., Holušová, K., Doležel, J., Athiyannan, N., Cavalet-Giorsa, E., Jaremko, Ł., Poland, J., Krattinger, S. G. (2023). An unusual tandem kinase fusion protein confers leaf rust resistance in wheat. *Nature genetics*, 55(6), 914–920. <https://doi.org/10.1038/s41588-023-01401-2>

- William, H. M., Singh, R. P., Huerta-Espino, J., Palacios, G., Suenaga, K. (2006). Characterization of genetic loci conferring adult plant resistance to leaf rust and stripe rust in spring wheat. *Genome*, 49(8), 977–990. <https://doi.org/10.1139/g06-052>
- Xu, X., Kolmer, J., Li, G., Tan, C., Carver, B. F., Bian, R., Bernardo, A., Bai, G. (2022). Identification and characterization of the novel leaf rust resistance gene *Lr81* in wheat. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 135(8), 2725–2734. <https://doi.org/10.1007/s00122-022-04145-5>
- Yao, Q., Zhou, R., Fu, T., Wu, W., Zhu, Z., Li, A., & Jia, J. (2009). Characterization and mapping of complementary lesion-mimic genes *lm1* and *lm2* in common wheat. *TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik*, 119(6), 1005–1012. <https://doi.org/10.1007/s00122-009-1104-4>
- Zhang, P., Yin, G., Zhou, Y., Qi, A., Gao, F., Xia, X., He, Z., Li, Z., Liu, D. (2017). QTL Mapping of Adult-Plant Resistance to Leaf Rust in the Wheat Cross Zhou 8425B/Chinese Spring Using High-Density SNP Markers. *Frontiers in plant science*, 8, 793. <https://doi.org/10.3389/fpls.2017.00793>
- Zhu, T., Wang, L., Rimbart, H., Rodriguez, J.C., Deal, K.R., De Oliveira, R., Choulet, F., Keeble-Gagnère, G., Tibbits, J., Rogers, J., Eversole, K., Appels, R., Gu, Y.Q., Mascher, M., Dvorak, J. Luo, M. C. (2021). Optical maps refine the bread wheat *Triticum aestivum* cv. Chinese Spring genome assembly. *Plant J*, 107: 303-314. <https://doi.org/10.1111/tpj.15289>

9. ANEXOS I

9.1 Tabla de abreviaturas

ABC: *ATP binding cassette*. Casete de union a ATP.

APR: *adult plant resistance*. Resistencia en planta adulta.

ASR: *all stage resistance*. Resistencia en todos los estadios.

AUDPC: *area under the disease progress curve*. Area bajo la curva de progreso de la enfermedad.

Avr: *Avirulence*. Avirulencia.

barc: Beltsville Agricultural Research Center

BLAST: *basic local alignment search tool*.

BSA: *bulk segregant analysis*. Análisis de bloques segregantes.

cM: centimorgan

CTAB: Cetyltrimethylammonium Bromide.

DNTPs: Deoxynucleoside triphosphates

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

ETI: *effector-triggered immunity*. Inmunidad desencadenada por efectores.

ETS: *effector triggered susceptibility*. Susceptibilidad desencadenada por efectores.

gpw: GenoPlante Wheat,

gwm: Gatersleben Wheat Microsatellite

ha: hectárea

HCl: ácido clorhídrico

HPLC: *High-Performance Liquid Chromatography*. Cromatografía líquida de alta eficiencia.

HR: *hypersensitive response*. Respuesta hipersensible.

ISBPs: *insertion site-based polymorphisms*. Polimorfismo basado en el sitio de inserción.

IT: *infection type*. Tipo de infección.

IWGSQ: International Wheat Genome Sequencing Consortium

kb: kilobases

L: litro

LLR: *leucine rich repeat*. Repetición rica en leucine.

Lr: *leaf rust*. Roya de la hoja.

M: molar

MAS: *marker-assisted selection*. Selección asistida por marcadores.

mg: miligramo

MgCl₂: cloruro de magnesio

ml: mililitro

mm: milímetros

mm: milímetro

mM: milimolar

NaCl: cloruro de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

NBS: *nucleotide binding site*. Sitio de unión a nucleótidos.

ng: nanogramos

NLR: *nucleotide-binding domain and leucine-rich repeat*. Dominio de unión a nucleótidos y repetición rica en leucina.

p/v: peso en volumen

PAMPs: *pathogen-associated molecular patterns*. Patrones moleculares asociados a patógenos.

pb: pares de bases

PTI: *pattern-triggered immunity*. Inmunidad desencadenada por patrones.

qq/ha: quintales por hectárea

QTL: *quantitative trait loci*. Loci de caracteres cuantitativos.

R: *Resistance*. Resistencia.

RGA: *resistance gene analogs*. Análogos de genes de resistencia

rpm: revoluciones por minuto

SDS: Sodium Dodecyl Sulfate

SNPs: *single nucleotide polymorphism*. Polimorfismo de nucleotide simple.

SSD: *single seed descendant*. Descendiente de semilla único.

TBE: tris-borato-EDTA

TE: *transposable elements*. Elementos transponibles.

TH: Temperatura de hibridación

Tris: Tris(hidroximetil)aminometano

USD/t: dólares por tonelada

v/v: volumen en volumen

wmc: Wheat Microsatellite Consortium

µm: micrometro

9.2 Tablas de resultados

SSR	Repetición	Tamaño esperado en CS (pb)	Primer forward	Primer reverse	SV	P	Si	Cita
barc109					230	240	225	Song <i>et al.</i> 2005
Fss32	(GA)7	182	CCATAACAGCAGCACGAGAA	GAGGGTCCAGACTCCACAGA	Amplificación inespecífica			Diéguez <i>et al.</i> 2018
Fss33	(GCG)6	132	AAAACGGTCAGGACAAACAG	CCCCATCACCAACGTCAT	Amplificación inespecífica			Diéguez <i>et al.</i> 2018
Fss34	(CTT)23	228	TTCTGCTGGTCTTCTGCTA	CAAGCCTGACTGCGTTGTTA	225	215	225	Diéguez <i>et al.</i> 2018
Fss35	(TG)20	199	CTTTGCGGGAGTGAGTGAGT	GCCATCTATTTGGGAGCAGA	205	195	200	Diéguez <i>et al.</i> 2018
Fss55	(AC)9	207	CCAGCCAAACAAGACCTAAGC	GAACCCACCTCCCTTCCCTA	207	207	207	Diéguez <i>et al.</i> 2018
Fss56	(CT)6	222	CCTCTTGGTATGGTAGGCCA	TGGAGCCAAATGAAACATGA	222	222	222	Diéguez <i>et al.</i> 2018
Fss57	(TG)9	118	GTGAAAAGGCCAAGGAGTCTG	CATGAAATCCGCACACACA	118	118	118	Diéguez <i>et al.</i> 2018
gpw311					null	190	null	Sourdille <i>et al.</i> 2004
gpw2328					195	190	200	Sourdille <i>et al.</i> 2004
gpw3229					320	325	320	Sourdille <i>et al.</i> 2004
gpw4024					284	284	284	Sourdille <i>et al.</i> 2004
gpw4075					175	175	175	Sourdille <i>et al.</i> 2004
gpw4079					Amplificación inespecífica			Sourdille <i>et al.</i> 2004
gpw4388					240	245	230	Sourdille <i>et al.</i> 2004
gpw4412					130	152	NT	Sourdille <i>et al.</i> 2004
gpw5010					125	125	125	Sourdille <i>et al.</i> 2004
gpw7272					Amplificación inespecífica			Sourdille <i>et al.</i> 2004
gpw7390					115	125	115	Sourdille <i>et al.</i> 2004
gwm66					Amplificación inespecífica			Röder <i>et al.</i> 1998
gwm314					190	178	165	Röder <i>et al.</i> 1998
gwm538					150	145	NT	Röder <i>et al.</i> 1998
wmc652					155	165	160	Somers <i>et al.</i> 2004
wmc657					130	125	115	Somers <i>et al.</i> 2004
wmc692					126	120	124	Somers <i>et al.</i> 2004

Tabla A1: Test de polimorfismo de los microsatélites disponibles en bases de datos públicos (barc - gpw - gwm - wmc) y de diseño propio (FSs). Todos los marcadores amplifican con el programa SV2-55⁹. Se indica el tamaño en pares de bases (pb) de las variedades Sinvalocho (SV), Purple Straw (P), Chinese Spring (CS) y Relmó Siriri (Si).

	RIL1	RIL2	RIL4	RIL6	RIL7	RIL8	RIL9	RIL10	RIL11	RIL12	RIL15	RIL16	RIL17	RIL18	RIL20	RIL21	RIL22	RIL23	RIL25	RIL26
gwm368	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1
gwm107	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1
barc199	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	1	0	0	0	1	1	0	1	1
gwm513	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
gwm495	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
cfid283	1	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
FSs35	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
wmc657	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
gwm165	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
gwm192	1	0	1	1	0	0	1	0	0	0	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1
gpw4412	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
gwm251	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
gwm149	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
gwm375	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
FSs34	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
wmc692	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
gpw4388	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
cfid39	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
cfid22	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
barc163	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
wmc652	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
gpw7390	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
gpw311	1	0	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	1
gwm6	1	0	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	0	0	0	1	0	1	1	1
wmc349	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1

	RIL27	RIL28	RIL29	RIL30	RIL31	RIL32	RIL33	RIL34	RIL36	RIL37	RIL38	RIL39	RIL40	RIL41	RIL42	RIL43	RIL44	RIL45	RIL46	RIL48
gwm368	0	0	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	0	1	0	1	0	1	1	0
gwm107	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
barc199	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0
gwm513	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
gwm495	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
cfid283	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
FSs35	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
wmc657	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
gwm165	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
gwm192	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
gpw4412	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
gwm251	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
gwm149	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
gwm375	1	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	1	1
FSs34	0	1	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
wmc692	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
gpw4388	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
cfid39	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
cfid22	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
barc163	0	0	0	1	1	0	1	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
wmc652	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1
gpw7390	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
gpw311	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1
gwm6	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1
wmc349	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	1	1

	RIL50	RIL51	RIL52	RIL53	RIL54	RIL55	RIL56	RIL57	RIL58	RIL59	RIL60	RIL61	RIL62	RIL63	RIL64	RIL65	RIL66	RIL67	RIL68	RIL70
gwm368	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1
gwm107	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	0	1	1
barc199	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	1	0	1	0	1	0	0	0	1	1
gwm513	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gwm495	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
cfid283	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
FSs35	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
wmc657	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gwm165	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gwm192	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gpw4412	1	1	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gwm251	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gwm149	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gwm375	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
FSs34	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
wmc692	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gpw4388	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
cfid39	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
cfid22	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
barc163	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
wmc652	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gpw7390	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gpw311	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	1
gwm6	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1
wmc349	0	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1

Tabla A2: Genotipado de la población de 100 RILs. 0: alelo correspondiente a la variedad Purple Straw (P). 1: alelo correspondiente a la variedad Sinvalcho MA (SV). El orden de los marcadores fue asignado en base al mapa de ligamiento de la figura 15. Se indica con color rosado los marcadores del intervalo correspondiente a 23Mb.

	RIL71	RIL73	RIL74	RIL75	RIL78	RIL79	RIL80	RIL81	RIL83	RIL84	RIL86	RIL90	RIL91	RIL92	RIL93	RIL95	RIL98	RIL99	RIL100	RIL101
gwm368	1	0		1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
gwm107	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
barc199	1	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	1
gwm513	0	0	0	1	1	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
gwm495	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
cfid283	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
FsS35	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
wmc657	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
gwm165	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
gwm192	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
gpw4412	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0	1	1	1	0
gwm251	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
gwm149	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
gwm375	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	1	1	0	1	1	1	0
FsS34	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
wmc692	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
gpw4388	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
cfid39	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
cfid22	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
barc163	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
wmc652	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
gpw7390	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
gpw311	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	1	1	1	0
gwm6	0	0	0	1	1	1	1	0	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0
wmc349	0	0	1	1	1	1	1	0	1	1	1	1	1	0	0	0	0	1	1	0

	RIL103	RIL104	RIL105	RIL106	RIL107	RIL108	RIL109	RIL110	RIL111	RIL112	RIL113	RIL114	RIL115	RIL116	RIL118	RIL119	RIL120	RIL122	RIL123	RIL124
gwm368	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	1
gwm107	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0
barc199	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	1	0
gwm513	1	0	1	0	0	1	1	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
gwm495	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
cfid283	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
FsS35	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
wmc657	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
gwm165	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
gwm192	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
gpw4412	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	1	0	0	1	0	0	1	0	0
gwm251	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
gwm149	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	0	0
gwm375	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
FsS34	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
wmc692	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	0	0
gpw4388	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
cfid39	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
cfid22	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
barc163	1	0	1	0	0	1	0	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
wmc652	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
gpw7390	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	1	0	0	0	1	0	0	1	1	0
gpw311	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
gwm6	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0
wmc349	1	0	0	0	0	1	1	1	1	1	0	1	0	0	1	0	0	1	1	0

Tabla A2: Genotipado de la población de 100 RILs. 0: alelo correspondiente a la variedad Purple Straw (P). 1: alelo correspondiente a la variedad Sinvalcho MA (SV). El orden de los marcadores fue asignado en base al mapa de ligamiento de la figura 15. Se indica con color rosado los marcadores del intervalo correspondiente a 23Mb.

SSR	Repetición	Tamaño esperado en CS (pb)	Primer forward	Primer reverse	SV	P	CS	Si	Programa de amplificación
Fss88	(GA)16	234	TGATTTCCCTTTCTCCGATG	ACGCAACATCTCCAGTGTCT	230	232	NT	234	SV2-55º
Fss89	(CCT)5+(GGA)4	238	GCTTGGATTTGGGAGTCGT	AGCCGGAGAAGAAGTCTCTG	230	230	NT	230	SV2-55º
Fss90	(CT)27	247	CGCAGTTCTTAATCCAACA	TCCAGGAGAAAACAATGGA	240	240	NT	NT	SV2-55º
Fss91	(GA)23	212	CACAGCCACATCACTTTCC	ATGACCGTAATTATGGCGCT	225	210	NT	220	SV2-55º
Fss92	(TC)9	154	TGATGTGCTGCTTCTGCTTC	AACCTGCGTGTCTCTCTG	150	150	NT	150	SV2-55º
Fss93	(AC)10	245	CCACACATGCCGATGATAAA	GTCAGCAATCAATCCCCAAC	245	245	NT	245	SV2-55º
Fss94	(CTT)4	173	CGAACCAAAACCAAAACCAAAAC	GAAGAGAAGGGAGGGGAATGC	260	260	NT	260	SV2-55º
Fss95	(TG)28	174	AGCAATGGGATGTCTGTTTC	CCCATCTATGAATGGCGAC	160	170	160	172	SV2-60º
Fss97	(AT)34	249	ACGCCATCGACTAATCACT	TCCGTTACCCTTCACAAAGC	290	290	249	NT	SV2-55º
Fss98	(AT)35	232	GTTTCATGCTAACGTACATCCAA	GACAACTCTGCTTCCCTCT	225	225	232	NT	SV2-55º
Fss99	(AT)30	247	GGCCTAAAATCCCCAATTC	AATTTGTGTGTGTCTCTCTCTGT	250	240	247	NT	SV2-55º
Fss100	(AT)31	209	ATCGCCATTGTTTTCTTTGG	TGATTTGACCCGACGTCTTA	Amplification inespecifica				*
Fss101	(TA)41	247	TAGGAGGCGAGGGTAACAGA	ATTGATTTGCGGGACAGAAC	260 a 230	245 a 225	247	NT	SV2-60º
Fss102	(TG)20	292	ATAAAATACGGACATGAGGG	AAAGCTCTTATATTGACTCTCTCC	Amplification inespecifica				*
Fss103	(AGT)39	233	CTGCAGAACAAAGGAGAAAGC	AGCGACATAAGGCGGTACAG	232	228	232	NT	SV2-60º
Fss104	(ATT)29	141	CTTCCCAACACTTCCAAAG	CAGGTAATAGGGATGCCCGAG	140	140	140	NT	SV2-55º
Fss105	(TA)30	199	GTTCCCGTGGCAAGCTATTGT	CACCGATAAAGGCTCCCAAGA	210	223	199	235	SV2-60º
Fss106	(GA)22	227	TCCCGCATATACACAGTTGC	GTTCCCGGTGTTTCTCTCAA	224	218	227	222	SV2-65º
Fss107	(AGA)25	213	CGGTCTAATGGAACACATTTCA	TCTTCTCTCTCTCTCTCTCTC	190	190	190	186	*
Fss108	(GA)22	248	GCTCGGGATACATCAAGATCA	TAGCCAGCAAAAACCTCTCG	Amplification inespecifica				*
Fss109	(CT)36	212	ACTACTGCTGGGTTTCATGCC	CGGAGGATTGACCACGTT	~220	~215	212	NT	SV2-55º
Fss110	(TTC)41	234	CAATATACACCGAGAGGGAA	GCTGTCTCCCATAGAGAAATG	Amplification inespecifica				*

Tabla A3: Test de polimorfismo de los microsatélites diseñados dentro del intervalo que contiene al gen LrcSV2. Se indica el tamaño en pares de bases (pb) de las variedades Sinvaloch (SV), Purple Straw (P), Chinese Spring (CS) y Relmó Siriri (Si). NT: no testado.

SSR	Repetición	Tamaño esperado en CS (pb)	Primer forward	Primer reverse	SV	P	CS	Si	Programa de amplificación	
F5s111	(AC)23	236	AGTCCCGTGTGATGGATGT	GGTGCAACGCTCTTGTC	245	245	236	NT	SV-55 [®]	
F5s122	(TC)27	135	ACTTGCATCCATGATAGGGC	ACACGAGAGCGGAGAGAGC	185	180	133	193	SV2-50 [®]	
F5s123	(AT)23	149	GGGGTATCCTCTGTTCCT	AAGAAAAGGAACCCACC	Amplification inespecifica					*
F5s124	(TTG)20	203	AGGCAAGCTGACTGAAAAGC	TGCTGTGCTGTTGTTTG	260	273	270	270	SV2-60 [®]	
F5s125	(AT)31	202	CACTTTGTGGGGTGGTC	TGCTCCAAAAGTATTCACC	Amplification inespecifica					*
F5s126	(TCT)19	227	CCAAAGACATGCACACCATC	GCCGTCTCCACAGAAAAT	Amplification inespecifica					*
F5s127	(AT)21	206	TCGATGACTTAACCGACGTG	CCTCTGATGCCCTTCTCCA	207	205	200	220	SV2-60 [®]	
F5s128	(TC)19	210	GAGGGCTTACATCAACCA	CCCAACAACACACACACAAA	210	215	210	208	SV2-50 [®]	
F5s129	(AT)20	201	ACGGCCAGTAGTCTCAAAAT	CTAATTGGGGATGATGGGTG	175	175	175	175	SV2-60 [®]	
F5s130	(ATT)18	222	CCACACCACATGATTTTC	ITCACCAGAAGTACAAAGCAC	222	222	222	222	SV2-50 [®]	
F5s131	(AG)20	228	GTTGGATGGCACAACACATC	TGCACGCCCAATAGTTAAGA	235	250	235	230	SV2-55 [®]	
F5s132	(AG)19	182	TGAGGGCTAGAGCCGATA	ATGCTTTCCTCGTCTGATT	180	170	185	190	SV2-50 [®]	
F5s133	(AT)22	247	TCATCACTCCATGTCCGAT	CAAAACCCTAGAGAAGCAGCG	247	247	247	247	SV2-60 [®]	
F5s134	(TC)30	144	CTGGTCGCCTGTTATTCCTT	TGAATGTCAAAAATGGCTGGA	135	170	135	170	SV2-55 [®]	
F5s135	(AAG)19	233	GCCTCTCTGCTTTGTCGC	GCAAATAGCTCACATCTCCAG	230	225	230	225	SV2-55 [®]	
F5s136	(TA)19	250	TGTTGATTTGGTTGCTTCC	GCTGACAAGGATGCAGAGAA	250	270	240	255	SV2-60 [®]	
F5s145	(AT)15	290	GTTGAGCTTCTGTATAAAAGGG	GATCTGAGGAACCCGATGAGG	Amplification inespecifica					*
F5s146	(AT)15	201	TCACACACACACACACACAC	TGCCACCACAAAAGTTGAAA	Amplification inespecifica					*
F5s147	(AC)20	205	ACGCACACACACACACACAG	GCTGCTCATGTACTGCTGCT	200	200	NT	NT	SV2-60 [®]	
F5s148	(AT)31	243	CCATTGCCTCATCTCCATTT	CACCCACTTAATAGCCACGG	235	225	235	NT	SV2-60 [®]	
F5s149	(AT)20	242	TGGACGCCACCTCATCATA	TGGGAAGGATTTTTCGTC	210	210	210	NT	SV2-55 [®]	
F5s150	(TC)19	213	CCTATTTCGACACCCTGCC	GCAAAGCTCGTGGTACATCA	220	218	220	NT	SV2-65 [®]	

Tabla A3: Test de polimorfismo de los microsatélites diseñados dentro del intervalo que contiene al gen LrcSV2. Se indica el tamaño en pares de bases (pb) de las variedades Sinvalocho (SV), Purple Straw (P), Chinese Spring (CS) y Relmó Siriri (Si). NT: no testeado.

Marcador	Tamaño del amplicón en CS (pb)	Polimorfismo	Primer forward	Primer reverse	Posición del amplicón en Ref.Seq.21
ABC1	861pb	No polimorfico	AAGCAGGAGCAGCACCTTGCAC	CCCTTTACTTAGGAGATCCTG	582528626 - 582529486
ABC2	972pb	CXT en posición 613	ACACTTTGCCATATCTATGG	CAGGTTCAAGTTGTACAGGATG	582527979 - 582528950
FSp4	266pb	No polimorfico	TGGGCTGTACGTTGTGAA	GTCGGACCGGTCGAATGTAA	581437125 - 581437390
FSp5	298pb	No polimorfico	TAGGCCCGCATTACAGTAG	CATGCAACGAGTACACAGCAG	581554916 - 581555213
FSp6	257pb	Amplificación inespecífica	AGGTATCTCTGGGCCACTC	TCCTTGGCTCCCTTGTGTC	581660257 - 581660513
FSp7	292pb	Amplificación inespecífica	CACCAACTACTCTCCGCC	CCTGGATCTCCTGTGCACTC	581787769 - 581788060
FSp8	293pb	AxG en posición 57	TCTTGAGCACTGCGTTGGAT	TGTGCGCATCTACAAAGGT	581913558 - 581913850
FSp9	285pb	No polimorfico	AATCAAGTCAACCCATCA	GCCAAGGAGTGACCTCTTCC	582059994 - 582060278
FSp10	261pb	No polimorfico	TGCAAGAACTCGGAGTGTC	TCTCCGATTGTTTCAGCA	582186049 - 582186309
FSp11	250pb	No polimorfico	GCTAATGCTCCGCTTTCGG	ATGGCTCTGAACCTTGCCCTC	582280453 - 582280702
FSp12	264pb	No polimorfico	CTGAGGGCGGAACTTGCTTA	TGCCTTAGGGCATAATTTCCA	582406672 - 582406935
FSp13	295pb	No polimorfico	CTCATAGCCAGCGGATCAC	TGGAGGTGTGTTCCCTTGA	582525618 - 582525912
FSp14	269pb	No polimorfico	CCAGAGCCAGACGAGGTTTT	CGTTCGGTACTTGGATCGGT	582651807 - 582652075
FSp15	253pb	No polimorfico	CCAGAGGCAATCCACCACAT	GGCCCGATGACTCTCTTCTG	582727568 - 582727820
FSp16	262pb	AxG en posición 26	AGCCATCTGCCGGTTAACA	GATCGACCTTGTCCACAGCA	582861978 - 582862239
FSp17	294pb	Amplificación inespecífica	AGCCAATATGGGCATCCAGG	ATACTAATGGCGCACCCGAG	583054415 - 583054708
FSp18	251pb	Amplificación inespecífica	TGTGGGGCCAAAGACAAAAC	GACCGTCTGAGGCTCTTCCG	583128278 - 583128528

Tabla A4: Test de polimorfismo de los marcadores SNPs ABC (Mago, comunicación personal) y de diseño propio dentro del intervalo que contiene al gen LrcSV2. Se indica el polimorfismo de Purple Straw (P) con respecto a Sinvalcho (SV).

RefSeq v2.1		p19	p146	p168	p210	p302	p327	p478	p528	p537	p690	p740	p746
567669678 - 567669825	FSs95							0	1	0			
578524333 - 578524560	FSs34	1	0	0	0	0	0	0	1	0		1	0
579365941 - 579366075	FSs122	1	0	0	0	0	0	0	1	0	1	1	0
580394110 - 580394253	FSs134	1	0	0	0		1	1	1	0	1	1	0
581288651 - 581288883	FSs135	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	0
581913558 - 581913850	FSp8	1	0	0	0	1	1	1	0	1		1	1
582411372 - 582411571	FSs124	1	0	0	0	1	1	1	0	1		1	1
582527979 - 582528950	ABC2	1		0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
582861978 - 582862239	FSp16	1	0	0	0	1	1	1	0	1		1	1
583148752 - 583149000	FSs99	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
584386274 - 584386514	FSs148	1	0	0	0	1	1	1	0	1		1	1
585235413 - 585235659	FSs101	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
587387066 - 587387298	FSs103	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
588106759 - 588106971	FSs150	1	0	0	0		1	1	0	1		1	1
589095026 - 589095231	FSs127	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
589452477 - 589452675	FSs105	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	1	1
590311020 - 590311229	FSs128	1	0	0	0	1	1		0	1	1	0	1
590628353 - 590628579	FSs106	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
591516393 - 591516642	FSs136	1	0	0	0	1	1					0	1
591611295 - 591611424	wmc692	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1		1
592184048 - 592184274	FSs131	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
593303688 - 593303869	FSs132	1	0	0	0	1	1	1	0	1	1	0	1
594248389 - 594248600	FSs109	1	0	0	0	1	1		0		0		1
601172842 - 601173082	gpw4388	0	1	1	1	1	1		0	1	0		
609430512 - 609430688	FSs91	0		1	1	1	1	1			0	0	1

RefSeq v2.1		p860	p966	p1022	p1058	p1060	p1093	p1099	p1387	p1944	p2010	p2088
567669678 - 567669825	FSs95	0	0	1		0	0	1				
578524333 - 578524560	FSs34	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1
579365941 - 579366075	FSs122	0	0	1	0	0	0	1	1	1	0	1
580394110 - 580394253	FSs134	1		1	0	0	1	1	1	1		1
581288651 - 581288883	FSs135	1	0	1	0	0	1	1	1	1	0	1
581913558 - 581913850	FSp8	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1
582411372 - 582411571	FSs124	1	0	1	0	0	1	1	1	0	1	1
582527979 - 582528950	ABC2		0	1	0					0	1	
582861978 - 582862239	FSp16	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
583148752 - 583149000	FSs99	1	1	1	0	0	1	1	1	0	1	
584386274 - 584386514	FSs148		1	1	0	0	1	1	1	0	1	1
585235413 - 585235659	FSs101	1		1	0	0	1	1	1	0	1	1
587387066 - 587387298	FSs103	1	1	0	1	0	1	1	1	0	0	0
588106759 - 588106971	FSs150	1	1	0	1	0	1	1	0			0
589095026 - 589095231	FSs127	1		0	1	0	1	1	0	0	1	0
589452477 - 589452675	FSs105	1	1	0	1	1	1				1	0
590311020 - 590311229	FSs128	1	1	0	1	1	1	1	0	0		0
590628353 - 590628579	FSs106	1	1	0	1	1	1	1	0	0		0
591516393 - 591516642	FSs136	1	1		1							
591611295 - 591611424	wmc692	1	1		1	1		1	0	0	1	0
592184048 - 592184274	FSs131	1	1	0	1	1	1	0	0	0	1	0
593303688 - 593303869	FSs132	1	1	0	1	1		0	0		1	0
594248389 - 594248600	FSs109		1				1	0	0	0	1	0
601172842 - 601173082	gpw4388		1	0			1					
609430512 - 609430688	FSs91	1			1	1		0	0	0	1	0

Tabla A5: Genotipado de las líneas derivadas de los individuos recombinantes encontrados dentro de la población F2 provenientes del cruzamiento SV x P. 0: alelo correspondiente a la variedad Purple Straw (P). 1: alelo correspondiente a la variedad Sinvalocho MA (SV). Se indica la posición del amplicón en la secuencia de CS (RefSeq v2.1). Se indica con color rosado los marcadores flanqueantes del intervalo correspondiente a 23Mb y en amarillo el correspondiente a 1.57Mb.

Recombinante	p19	p146	p168	p210	p302	p327	p478	p528
PA 2015		S (2++34)	S (22++3)					
PA 2016	R (0;1)		S (2+2++)	S (0;1+2-)	R (0;)	R (0;)		
PA 2017	R (11+2)	S (2++3)	S (2++3)	S (2++3)	R (0;11+)	R (0;)		
PA 2018	R (22+)	S (2++3)	S (2++3)	S (22++3)	R (22+)	R (0;1)		
PA 2019					R	R	R	S
PA 2022	R (22+)	S (2++3)	S (2++3)	S (2++3)	R	R (0;)	R	S (2++3)
Fenotipo	R	S	S	S	R	R	R	S

Recombinante	p537	p690	p740	p746	p860	p966	p1022	p1058
PA 2015								
PA 2016								
PA 2017								
PA 2018		R (0;)	R (0;1)	R (0;1)				
PA 2019	R		R	R	R	S	R	S
PA 2022	R (0;)	R (0;)	R	R	R (11+)	S (2++3)	R (0;)	S (2++3)
Fenotipo	R	R	R	R	R	S	R	S

Recombinante	p1060	p1093	p1099	p1387	p1944	p2010	p2088
PA 2015							
PA 2016							
PA 2017							
PA 2018							
PA 2019		R	R				
PA 2022	S	R	R (0;)	R (0;)	S (2++3)	S (2++3)	R (0;)
Fenotipo	S	R	R	R	S	R	R

Tabla A6: Fenotipado de reacción a la roya de la hoja de las líneas recombinantes derivadas del cruzamiento SV x P. PA: planta adulta R: resistente, S: susceptible. Entre paréntesis se indica el tipo de infección según la escala de Mains y Jackson (1926).

RefSeq v2.1		RIL28	RIL123	s283	Si	M39	M48	H3B
567669678 - 567669825	FSs95	1	0	1				
578524333 - 578524560	FSs34	1	0	NP	NP	-	-	1
579365941 - 579366075	FSs122	1	0			-	-	1
580394110 - 580394253	FSs134	0		2	2	-	-	1
581288651 - 581288883	FSs135	0		2	2	-	-	1
581913558 - 581913850	FSp8			2				
582411372 - 582411571	FSs124	0	0	2	2	-	-	1
582527979 - 582528950	ABC2	0	0	2	NP			
582861978 - 582862239	FSp16							
583148752 - 583149000	FSs99	0	0			-	-	1
584386274 - 584386514	FSs148						-	
585235413 - 585235659	FSs101	0	0			-	1	1
587387066 - 587387298	FSs103	0	0			-	1	1
588106759 - 588106971	FSs150							
589095026 - 589095231	FSs127	0				-	1	1
589452477 - 589452675	FSs105	0	0	2	2			1
590311020 - 590311229	FSs128	0	0	2	2	-	1	1
590628353 - 590628579	FSs106	0	0	2	2	-	1	1
591516393 - 591516642	FSs136	0		2	2			
591611295 - 592184275	wmc692	0	0	2	2	-	1	1
592184048 - 592184275	FSs131	0	0	2	2	-	1	1
593303688 - 593303869	FSs132	0	1	2	2	-	1	1
594248389 - 594248600	FSs109	0	1				1	1
601172842 - 601173082	gpw4388	0	1	2		-	1	1
609430512 - 609430688	FSs91	0	1	2				

Tabla A7: Genotipado de las líneas derivadas de diferentes poblaciones de mapeo. 0: alelo correspondiente a la variedad Purple Straw (P). 1: alelo correspondiente a la variedad Sinvalcho MA (SV). 2: alelo correspondiente a la variedad Relmó Siriri (Si). NP: no polimórfico. Se indica la posición del amplicón en la secuencia de CS (RefSeq v2.1). Se indica con color rosado los marcadores flanqueantes del intervalo correspondiente a 23Mb y en amarillo el correspondiente a 1.57Mb.

	RIL28	RIL123	s283	M39	M48	H3B
PA 2015	S (2++3)	S (22++)				
PA 2016	S (1+22++)	S (0;11+)				
PA 2017	S (2++3)					
PA 2018	S (2++34)	S (2++34)				
PA 2019			S	S	MS-S	R
PA 2022						
Fenotipo	S	S	S	S	S	R

Tabla A8: Fenotipado de reacción a la roya de la hoja de las líneas derivadas de diferentes poblaciones de mapeo. PA: planta adulta R: resistente, MS: moderadamente susceptible. S: susceptible. Entre paréntesis se indica el tipo de infección según la escala de Mains y Jackson (1926).