



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

**Mapeo fino de genes de resistencia a roya de la hoja provenientes de una
variedad de trigo con resistencia durable a esta enfermedad**

Tesis presentada para optar al título de Doctora de la Universidad de Buenos Aires
en el área Ciencias Biológicas

Lic. María Fernanda Pergolesi

Director de tesis: Ing. Agr. Francisco Sacco
Directora asistente: Dra. María José Diéguez
Consejero de Estudios: Dr. Horacio Esteban Hopp

Lugar de trabajo: Instituto de Genética “Ewald A. Favret” – CICVyA - INTA Castelar
Buenos Aires, 14 de febrero de 2025

Resumen

El objetivo general del presente trabajo fue desarrollar mapas genéticos de alta resolución para dos genes de resistencia a roya de la hoja de trigo, identificados en la variedad con resistencia durable Sinvalocho MA (SV). Uno de los genes detectados es el *Lr3* de resistencia desde plántula (ASR) y el otro el *LrSV2* de expresión en planta adulta (APR) con un efecto significativo en la resistencia observada a campo.

Un mapa de alta resolución permite definir un intervalo genético lo suficientemente reducido para identificar un bajo número de genes codificantes que deberán ser posteriormente validados como responsables del fenotipo estudiado (clonado posicional).

Se logró posicionar al gen *Lr3*, localizado en el cromosoma 6BL, en un intervalo de 6,9 cM y al gen *LrSV2*, ubicado en el cromosoma 3BS, en un intervalo de 0,04 cM. Estos intervalos corresponden a 2 Mb y 748 kb respectivamente en la variedad Chinese Spring (CS), donde se han anotado con alta confianza 57 y 40 genes respectivamente.

Mediante tratamientos mutagénicos con EMS (etilo metano sulfonato) sobre semillas de SV, se obtuvieron hasta el momento, 3 mutantes susceptibles a la raza que identifica al *LrSV2* en planta adulta, que serán de utilidad para validar potenciales genes candidatos.

La disponibilidad de mapas de alta resolución es un insumo fundamental para el clonado posicional de genes. La información acerca de las secuencias génicas permite la introducción eficiente de los mismos en cultivares elite, tanto mediante retrocruzamientos asistidos por marcadores desarrollados a partir de su secuencia, como por transgénesis o edición génica.

La utilización de genes de resistencia es una herramienta muy eficaz para el control de enfermedades y además mejora la sustentabilidad del cultivo, ya que contribuye a reducir el uso de agroquímicos. Asimismo, un mejor conocimiento de las bases moleculares de la interacción planta-patógeno puede contribuir a desarrollar nuevas y más eficientes metodologías para el control de enfermedades de origen fúngico en cereales.

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

Summary

Fine mapping of leaf rust resistance genes from a wheat variety with durable resistance to this disease

The main objective of the present work was to develop high resolution genetic maps for two leaf rust resistance genes, identified in the wheat durable resistant variety Sinvalocho MA (SV). One of the genes detected is the ASR *Lr3* gene, and the other APR *LrSV2* gene. This last gene showed a significant effect on field leaf rust resistance.

A high-resolution map allows defining a small genetic interval that contains a low number of coding genes, that must subsequently be validated as responsible for the observed phenotype (positional cloning).

Lr3 gene, located on a telomeric region of chromosome 6BL, was mapped in a 6,9 cM interval. *LrSV2* gene, located on a subtelomeric region of chromosome 3BS, was mapped in a 0.04 cM interval. These intervals are equivalent to 2 Mb and 748 Kb, respectively, in CS wheat, where 57 and 40 high confidence genes were annotated, respectively.

Through mutagenic treatments with EMS (ethyl methane sulfonate) on SV seeds, 3 M3 susceptible mutant plants to the race that identifies *LrSV2* in adult plants were obtained to date, which will be useful to validate potential candidate genes.

The availability of high-resolution maps is a fundamental input for positional gene cloning. Information about gene sequences allows their efficient introduction into elite cultivars, both through backcrosses assisted by markers developed from their sequence, as well as by transgenesis or gene editing.

The use of resistance genes is a very effective tool for disease control, and improves the sustainability of the crop, since it contributes to reducing the use of agrochemicals. Likewise, a better knowledge of the molecular bases of the plant-pathogen interaction can contribute to developing new and more efficient methodologies for the control of fungal diseases in cereals.

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

ÍNDICE

1. RESUMEN	2
2. SUMMARY	3
3. INTRODUCCIÓN	5
4. OBJETIVO	27
5. HIPÓTESIS	27
6. MATERIALES Y MÉTODOS	28
• Material vegetal	28
• Infección con roya de la hoja	28
• Extracción y cuantificación de ADN	30
• AFLPs	32
• SSRs, ISBPs, STSs y STMs	35
• SNPs	37
• SCARs	37
• Resolución y visualización de los productos de PCR	38
• Análisis de datos y mapeo genético	39
• Mutagénesis	40
7. RESULTADOS	42
• <i>Lr3</i>	45
• <i>LrSV2</i>	53
a) Mapeo	53
b) Mutagénesis	60
c) Cruzamientos	63
8. DISCUSIÓN	67
9. BIBLIOGRAFÍA	80
10. ANEXOS	97
• Lista de abreviaturas	97
• Tablas	100

INTRODUCCIÓN

Los mapas finos o de alta resolución resultan un insumo básico para realizar estudios genéticos detallados de regiones específicas del genoma. En este tipo de mapas las distancias genéticas basadas en los porcentajes de recombinación que se expresan en centimorgans (cM) son representativas de las distancias físicas en kilobases (kb). La densidad y resolución de los mapas genéticos depende del número de marcadores, el tamaño de la población analizada, considerándose mapas saturados cuando los marcadores se distribuyen a intervalos no mayores de 15-20 cM (Strachan y Read, 1999). Estos mapas resultan útiles para identificar marcadores fuertemente asociados a genes de interés. 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, Saintenac *et al* 2009, 2011).

La disponibilidad de estos mapas permite el aislamiento y clonado de genes basándose en su posición en el mapa (map-based cloning). Esta técnica consiste en el genotipado de una población con un número elevado de individuos segregantes para la identificación de aquellos con eventos de recombinación cercanos al gen responsable del carácter de interés para lo cual es necesario contar con abundantes marcadores moleculares polimórficos en la región. En trigo se pudieron construir mapas de alta resolución analizando entre 2600 y 9000 productos de meiosis de las regiones que involucran a los genes *Lr34*, *LrN3B*, *Sr2*, *VRN1*, *Yr30*, *Yr36* entre otros (Krattinger *et al* 2009, Wang *et al* 2024a, Mago *et al* 2011, Yan *et al* 2003, Wang *et al* 2024b, Fu *et al* 2009). Esto permite definir con alta confianza un intervalo físico de secuencia lo suficientemente reducido como para contener un número bajo de genes (Feuillet *et al* 2003; Yan *et al* 2003; Huang *et al* 2003; Cloutier *et al* 2007; Krattinger *et al* 2009, Fu *et al* 2009). Esta estrategia se utilizó con éxito para el clonado basado en la posición en el mapa de los genes de resistencia a la roya de la hoja *Lr1*, *Lr10*, *Lr21* y *Lr34* en los que se definieron intervalos de 0.8, 0.13, 1.7 y 0.15 cM, respectivamente (Cloutier S *et al* 2007, Feuillet C *et al* 2003, Huang *et al* 2003, Krattinger *et al* 2009).

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.

En los pasos finales de un clonado posicional, basado en la posición en un mapa físico, es necesario utilizar una biblioteca genómica de la variedad o línea donde fue identificado el gen de interés, ya que genotecas de BACs (Bacterial Artificial Chromosomes) de otras líneas podrían no contener secuencias homologas al gen. La construcción y organización de genotecas de BACs es laborioso y costoso, sobre todo a partir de organismos con genomas grandes y complejos como el trigo. Sin embargo, es posible dirigir el foco a la región genómica de interés en el genotipo específico y rápidamente 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).

Por otro lado, la identificación de mutantes que pierdan el fenotipo permite testear la expresión y cambios en la secuencia de los genes candidatos (Periyannan *et al* 2013, Lombardo L *et al* 2017, Li G *et al* 2019, Walkowiak *et al* 2020). La identificación de la secuencia de ADN responsable de un fenotipo de interés permitiría su introducción en cultivares élite a través de transgénesis, la edición génica de alelos susceptibles o su introgresión por métodos convencionales utilizando marcadores desarrollados en base a la secuencia, aumentando así la eficiencia de la MAS (Marker Assisted Selection o Selección Asistida por Marcadores).

El conocimiento de los productos génicos subyacentes responsables de fenotipos de interés, como por ejemplo resistencias a royas, no solo brinda información acerca de las bases moleculares de la interacción planta-patógeno sino que 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 y sustentables (Lowe *et al* 2011).

El trigo, *Triticum aestivum*, es una monocotiledónea perteneciente a la familia de las gramíneas. Es una especie autógena, alohexaploide formada por los genomas homeólogos A, B y D (AABBDD, $2n=6x=42$) resultante de eventos de hibridación que

probablemente ocurrieron varias veces y de manera independiente. El genoma AABB del antiguamente cultivado *T. dicoccum* – trigo farro o emmer – proviene de hibridaciones entre *T. monococcum* y un grupo de especies del género *Aegilops spp.* denominado “sitopsis”, mientras que el genoma DD deriva de *T. tauschii* – también llamado *A. tauschii* (Dubcovsky y Dvorak 2007).

Si bien *T. aestivum* presenta un genoma complejo, su comportamiento es diploide, lo que resulta una ventaja operativa en cuanto a la manipulación de las poblaciones experimentales desarrolladas para estudios genéticos, sumado a la plasticidad genómica que caracteriza a este tipo de especies (Dubcovsky y Dvorak 2007).

En 2005 se creó el IWGSC (International Wheat Genome Sequencing Consortium) con el objeto de secuenciar este genoma. Este proyecto se planteó inicialmente cromosoma por cromosoma debido al gran tamaño del genoma. Los cromosomas fueron aislados por citometría de flujo y debido a su mayor tamaño, el primero fue el 3B. El desarrollo de una biblioteca de BACs de este cromosoma (Safar *et al* 2004) permitió generar aproximadamente 19.400 secuencias de extremos de BACs (BES) para el desarrollo de marcadores específicos de este cromosoma (Paux *et al* 2006). Luego se desarrolló un mapa físico (Paux *et al* 2008; Rustenholz *et al* 2011) y varios de los contigs que lo componían fueron secuenciados completamente (Choulet *et al* 2010). La primera secuencia de todo el genoma, 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).

Al momento, se han publicado 17 genomas de diferentes variedades de trigo (Walkowiak *et al* 2020, https://plants.ensembl.org/Triticum_aestivum/Info/Cultivars?db=core)

Para trigo hexaploide, el 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 (Bennet MD and Smith JB 1976, Zhu *et al* 2021). Esta característica representa además un desafío para el clonado posicional de genes. Por otro lado, la distribución de estas secuencias repetitivas no es al azar, sino que la densidad génica varía entre 1/87-184 kb (Gill KS *et al* 1996 a, b; 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.

Sin embargo, se han reportado regiones con alta densidad génica (un gen por cada 4-5 kb) y la comparación de la composición génica de *loci* ortólogos en trigo, cebada y arroz mostraron que la alta densidad de genes es conservada en *loci* sinténicos de grandes y pequeños genomas de gramíneas (Feuillet C and Keller B, 1999). Esta característica de las regiones ricas en genes permite que el genoma de trigo sea adecuado para realizar manipulaciones moleculares similares a las que se realizan en arroz, cuyo genoma es considerado como modelo para el estudio de las gramíneas (Faris JD *et al* 2000).

La presencia de zonas de secuencias repetitivas permitió el desarrollo de marcadores moleculares denominados ISBPs (Insertion Site-Based Polymorphisms) que 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 Citosina x Timina (CxT), permitiendo su conversión en marcadores codominantes mediante la búsqueda de SNPs (single nucleotide polymorphism) (Paux *et al* 2006, 2010). Por su parte, 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).

A partir del proyecto de secuenciación del genoma de trigo, se anotaron 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).

El trigo es uno de los cereales más cultivados en el mundo, con una producción mundial estimada en la campaña 2022/23 a un récord de 779,6 millones de toneladas métricas (MMT), ligeramente más que en 2021/22 <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. 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 5.900.000 ha de siembra, siendo Buenos Aires la provincia donde se informó mayor superficie sembrada para trigo, representando 43,47%. En el segundo y tercer lugar están las provincias de Santa Fe y Córdoba con 16,85% y 14,00%, respectivamente. Entre las tres provincias representan el 74,31% de la superficie sembrada total (SISA –Sistema de Información Simplificada Agrícola– Informe de trigo 2022-2023).

Durante el periodo 2021-2022, la producción en Argentina fue de 22 millones de toneladas, con un rinde promedio de 34 qq/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. En la campaña 2022/23 se sembraron 6,1 MHa de trigo en Argentina, la superficie más baja desde la campaña 2017/18. En términos regionales, las mayores caídas interanuales del área se registraron en el NOA, Centro-Norte de Córdoba, Santa Fe y Sur de Córdoba, donde la falta de humedad superficial durante la ventana de siembra dificultó el avance de la misma. Por otro lado, el rinde promedio nacional fue de 22,8 qq/Ha, mostrando una caída de 34,5% en comparación al ciclo previo; esta disminución se debió principalmente a la ausencia de precipitaciones sobre gran parte del área agrícola y a las mermas generadas por las heladas registradas.

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 más afectan a esta última pueden mencionarse las enfermedades de origen fúngico como las

royas, siendo la roya de la hoja una de las más importantes, con un gran impacto en la producción a nivel mundial (Samborski 1985, Huerta-Espino *et al* 2011, Kolmer *et al* 2013).

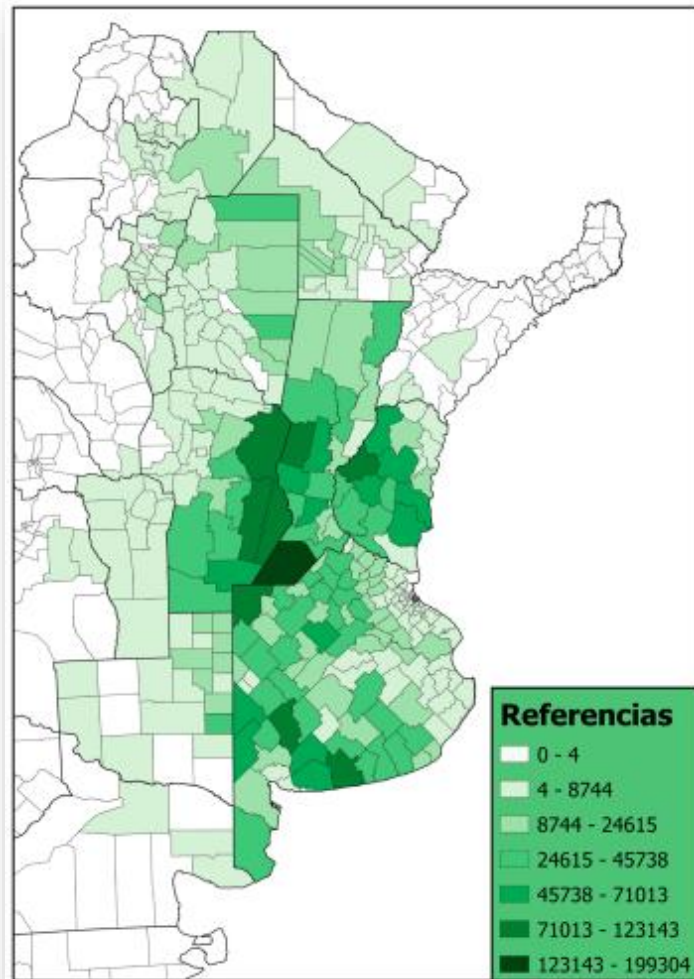


Figura 1: Distribución geográfica de la superficie informada de siembra de trigo, en hectáreas y por departamentos, durante la campaña 2022/23 (SISA – Informe de trigo 2022-2023).

En Argentina, aunque en los últimos años la incidencia de la Roya Amarilla causada por *Puccinia striiformis* causó pérdidas económicas importantes, las enfermedades fúngicas de mayor importancia que afectan los tejidos foliares son la Roya de la Hoja causada por *Puccinia triticina*, la Mancha Amarilla causada por *Drechslera tritici-repentis* y la Mancha de la Hoja o Septoriosis causada por *Septoria tritici*; mientras que la Fusariosis de la Espiga causada por *Fusarium graminearum* es la enfermedad más importante que afecta los granos (Rozo Ortega *et al* 2020, <https://blog.sima.ag/2023/top-3-de->

La roya de la hoja es una enfermedad endémica en nuestro país cuyos efectos perjudiciales sobre plantas de trigo se traducen en pérdida de rendimiento tanto por un menor número de granos por espiga como por un menor tamaño de los mismos y, en ataques muy severos, en una disminución de la calidad nutricional pudiendo afectar también la calidad de los granos, particularmente en años con condiciones ambientales de temperatura y humedad 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 si bien afecta el área verde fotosintética de toda la planta, resulta particularmente importante en la hoja bandera, la cual es la última que se forma antes de la espiga y es la mayor fuente de nutrientes para el llenado de los granos (McMullen y Rasmussen 2002). Es un hongo heteroico (requiere un segundo hospedante 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 las uredosporas, al depositarse sobre la epidermis de las láminas de las hojas y encontrar condiciones de temperatura y humedad adecuadas, germinan dentro de las 24 horas post-inoculación emitiendo un tubo germinativo que penetra por los estomas y que forma los apresorios (Figura 3).

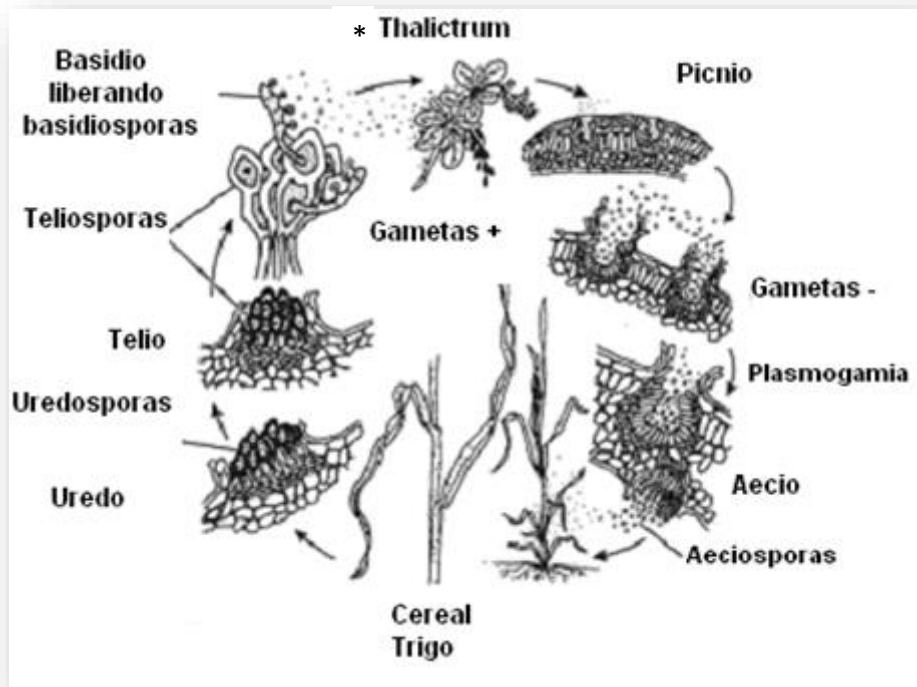


Figura 2: ciclo biológico de *Puccinia triticina*. *El huésped alternativo de *P. triticina* es *Thalicttrum speciosissimum*

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 (uredos) características (Figura 4), portadoras de uredosporas unicelulares de unos 20µm, que pueden propagarse a través del viento con suma facilidad y a grandes distancias y reinician el proceso de infección, originando epifitias si hay grandes superficies sembradas con variedades susceptibles (Bolton *et al* 2008).

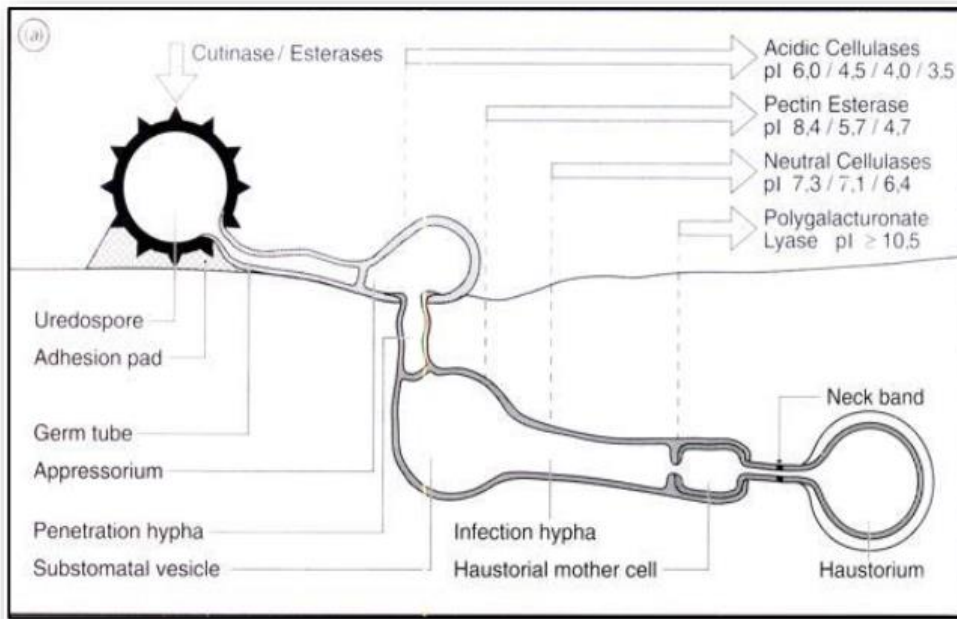


Figura 3: Esquema de las estructuras infectivas generadas por *P. triticina* sobre *T. aestivum* (Mendgen 1996).

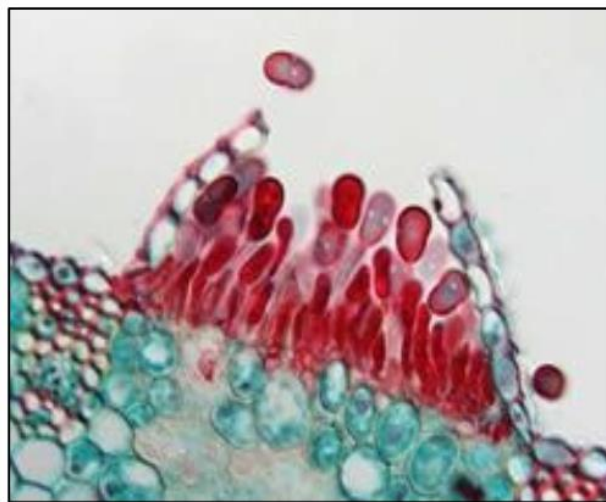


Figura 4: Vista microscópica de un uredo (1,5mm) y uredosporas (20µm). Departamento de Botánica, Universidad de Wisconsin.

Si el ataque en la hoja bandera, que constituye la principal fuente de fotosintatos para el llenado de los granos, es muy intenso, el hongo compite fuertemente por estos fotosintatos

provocando un daño considerable en el rendimiento (Mc Mullen *et al* 2002) (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 infectivos 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 *et al* 2008).



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

En Argentina se han encontrado numerosas variantes patogénicas, lo que sugiere 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). Esto se suma a la enorme cantidad de inóculo que produce, fácilmente diseminable por el viento en grandes superficies (Ingala *et al*, 2003). Las 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 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.

En un estudio detallado sobre los daños causados por la roya del tallo y de la hoja durante el período 1949-1958 (Rodríguez Amieva *et al* 1961) se estimó que la roya de la hoja produjo una disminución promedio del 5% en el rendimiento. En un trabajo más reciente elaborado por la Dirección Nacional Asistente de Investigación del INTA (Macagno *et al* 1993) se estableció que la roya de la hoja es un factor limitante muy importante en las regiones trigueras III y II norte y medianamente importante en las regiones trigueras I y II sur que actualmente corresponden a las regiones 1, 2 sur, 7 y 2 norte, 3, 4, 6, 17 respectivamente del nuevo mapa de las Subregiones trigueras de Argentina (Figura 6). En el mismo trabajo estimaron un daño debido a roya de la hoja del 5 al 10% en la producción de trigo con un valor económico como mínimo de 100 millones de dólares anuales (Kolmer 1996).

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. Estas consisten principalmente en defensas físicas o químicas preformadas como paredes celulares gruesas, enzimas antimicrobianas presentes en la superficie foliar, topografía de la superficie de las hojas incluyendo la morfología de los estomas y metabolitos secundarios (Heath *et al* 2009). 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).

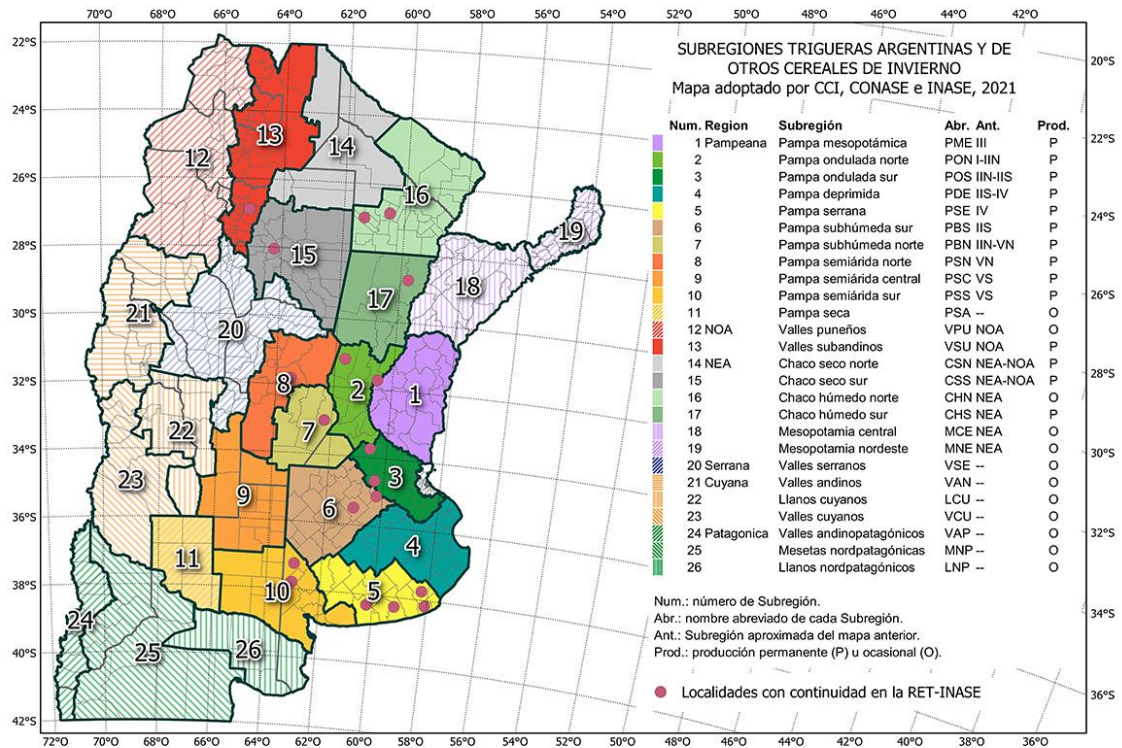


Figura 6: Mapa de las Subregiones trigueras de Argentina y de otros cereales de invierno (Abbate 2021).

En contraposición a estos factores de virulencia, las plantas han desarrollado un segundo nivel de resistencia mediante proteínas R, con dominios de unión a nucleótido (NBS, nucleotide binding site) y dominios ricos en leucina (LRR, leucine rich repeat) que son capaces de reconocer de forma directa o indirecta a los efectores, activando la denominada Inmunidad inducida por efectores (ETI, effector-triggered immunity). El resultado de este mecanismo es la activación de la Respuesta Hipersensible (HR, hypersensitive response).

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 7).

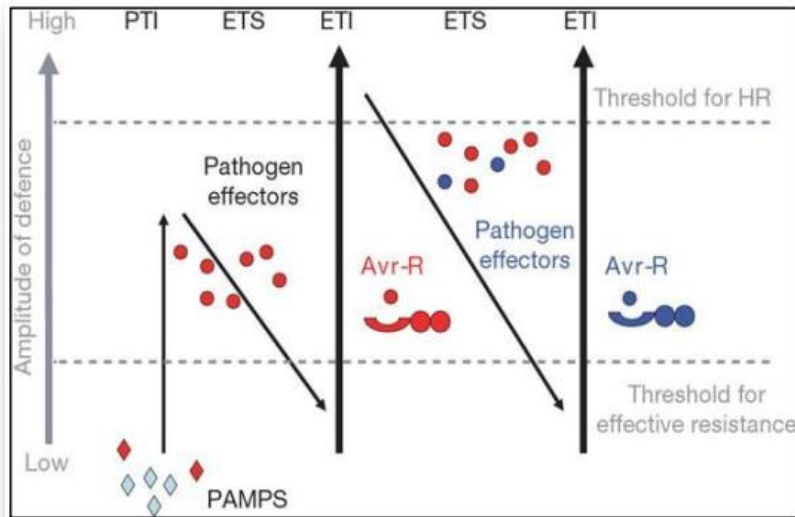


Figura 7: Modelo de respuesta en Zig-zag (Jones y Dangl 2006).

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 término HR fue acuñado por primera vez por 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 8) (Balint *et al* 2019). Asimismo, Stakman desarrolló una escala discreta para los distintos tipos de infección para la roya del tallo, considerando intervalos de la respuesta continua que observaba en las infecciones con distintas razas del patógeno y variedades de trigo.

En el caso de la roya de la hoja, el nivel de respuesta al patógeno también varía de forma continua. Mains y Jackson (1926) desarrollaron una escala discreta similar a la propuesta por Stakman para roya del tallo, 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 9 y Tabla 1).



Figura 8: Flecks. Pequeños puntos necróticos en el tejido de *T. aestivum* en respuesta a la infección por *P. triticina*, resultado de la activación de la respuesta hipersensible (HR).

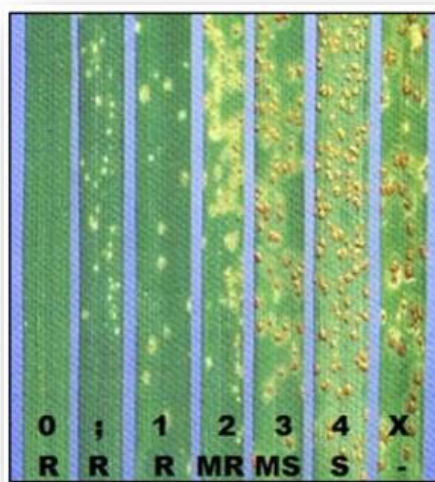


Figura 9: Escala de Mains y Jackson, donde se establecen distintos grados de resistencia o susceptibilidad de acuerdo con el tipo de respuesta del huésped. R: Resistente; MR: Moderadamente Resistente; MS: Moderadamente Susceptible; S: Susceptible (McIntosh *et al* 1995)

	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.

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

Las bases genéticas de la interacción hospedante-patógeno han sido bien caracterizadas a partir de los estudios realizados por Flor (1956) en roya del lino. Los experimentos realizados por este autor sobre herencia de la virulencia en el patógeno y de la resistencia en el hospedante, permitieron establecer el determinismo genético de este tipo de enfermedades, conduciendo a la teoría de la relación 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). La relación gen a gen fue confirmada en la interacción trigo-roya de la hoja a partir de los estudios genéticos realizados por Samborski y Dyck (1968).

Favret (1971) propuso una adaptación de la teoría de Flor donde sugirió que la correspondencia entre el número de genes involucrados en la interacción es diferente en el huésped con respecto al patógeno. Propuso que por cada alelo para reacción existe un *locus* para patogenicidad, que puede estar en estado virulento o avirulento.

	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).

La sanidad de los cultivos frente a los hongos patógenos ha sido siempre uno de los principales objetivos del mejoramiento. El control de estas enfermedades puede realizarse mediante prácticas culturales y por medio de fungicidas. Este último implicaría un gasto adicional para el productor y un posible impacto ambiental. Por este motivo, la utilización de genes de resistencia es una de las formas más económicas y sustentables para el control de esta enfermedad. (Pink 2002, Ellis *et al* 2014). Sin embargo, la alta variabilidad usualmente observada en las poblaciones de roya de la hoja requiere de la identificación, evaluación e incorporación constante de nuevos genes de resistencia en los programas 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 desde plántula o en todos los estadios son aquellos cuya expresión comienza en la primera hoja y se mantiene durante todo el ciclo de vida de la planta. Los genes de resistencia en planta adulta 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 a gen descrito por Flor (1956), mientras que los genes no-específicos otorgan resistencia frente a todas las razas testeadas de patógeno. Además, algunos de los genes no-específicos son efectivos contra varios patógenos. Existen también los denominados genes slow rusting que están asociados a un incremento en el tiempo entre la infección y la esporulación (periodos latentes más prolongados) y a una menor producción y menor tamaño de uredos (Caldwell 1968).

Las bases genéticas de la resistencia APR han sido poco estudiadas debido fundamentalmente a las dificultades de tipo operativo para evaluar y caracterizar genes de resistencia que se expresan en planta adulta.

Hasta la fecha, se han confirmado y catalogado más de 80 de estos *Lrs* 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). La mayoría de estos genes *Lr* confieren resistencia raza-específica y en general expresan la respuesta hipersensible (McIntosh *et al* 1995). También se han descrito numerosos *loci* con efectos cuantitativos en la resistencia a royas (Poligenes o QTL, *quantitative trait loci*) (Pinto Da Silva *et al* 2018).

Varios genes de resistencia han sido clonados en trigo, incluyendo doce de resistencia a roya de la hoja: los ASR *Lr1* (Cloutier *et al* 2007), *Lr9/58* (Wang *et al* 2023), *Lr10* (Feuillet *et al* 2003), *Lr14a* (Kolodziej *et al* 2021), *Lr21* (Huang *et al* 2003), *Lr42* (Lin *et al* 2022), *Lr47* (Li *et al* 2023) y *Lr/Yr548* (Sharon *et al* 2023) 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) que 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.

En general, las nuevas variedades comerciales muestran buenos niveles de resistencia al inicio de su comercialización. Sin embargo, a lo largo de los años y al ser utilizadas extensivamente en agricultura se tornan susceptibles como consecuencia de la aparición de nuevas razas del patógeno. En Argentina se pueden mencionar como ejemplos a las variedades Klein Don Enrique (portadora del gen *Lr26*) y ProINTA Gaucho (portadora del gen *Lr19*) que pocos años después de su comercializadas se tornaron susceptibles. Varios ejemplos similares a nivel mundial son citados en la literatura. (Kolmer 1996; McIntosh y col. 1995; Samborski 1985). Si bien existe una gran variabilidad patogénica, algunas variedades comúnmente conocidas como portadoras de resistencia durable se comportan como resistentes por largos períodos de tiempo aún luego de alcanzar una gran difusión en el cultivo (Johnson 1981). Algunos autores apoyan la idea que solamente la presencia de algunos genes de expresión en planta adulta como por ejemplo el *Lr34*, son suficientes para determinar este tipo de resistencia (Roelfs AP, 1988). Otros autores consideran la hipótesis de que la resistencia durable está determinada por los efectos aditivos e interacciones originadas por la acumulación de genes de resistencia de expresión tanto en plántula como en planta adulta y la posible presencia de poligenes o QTLs. (Favret *et al* 1983; Sawhney *et al* 1989; Ingala *et al* 2012). 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 estos a través de marcadores moleculares ligados permite la selección asistida por marcadores (MAS), 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 de 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 siglo 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).

En particular, Sinvalocho MA fue usada como dadora de resistencia a la roya de la hoja en varios cruzamientos y como variedad diferencial local en estudios de roya de la hoja por más de 50 años (Sacco *et al* 1995). Un estudio detallado sobre la resistencia observada en esta variedad permitió identificar un gen de resistencia recesivo ASR, alelo del gen *Lr3* en el cromosoma 6BL (Haggag *et al*, 1973, Suárez y Favret 1983, Suárez y Favret 1984, Sacco *et al* 1992, Diéguez *et al* 2006) y dos genes APR dominantes *LrSV1* en el 2DS y *LrSV2* en el 3BS (Ingala *et al* 2005, 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). La presencia del *Lr3* no mostro efectos significativos sobre el número de pústulas. Los tres genes son raza-especifica, mostrando una respuesta hipersensible típica al ataque del patógeno. Los dos genes APR no son efectivos en el estadio de plántula donde Sinvalocho MA es susceptible a ambas razas de roya, pero en el estadio de planta adulta confieren un grado de resistencia comparable a los genes *Lr* de plántula. Este comportamiento es similar a los genes APR *Lr12* (Singh and Bowden 2011) y *Lr22a* (Hiebert *et al* 2007) pero contrasta con el gen *Lr34* que es raza-no específica, brinda resistencia parcial a roya de la hoja, roya estriada (*Puccinia striiformis*) y oídio (*Blumeria*

graminis f. sp. tritici) y está asociado con un crecimiento reducido de hifas intercelulares, pero no con una respuesta hipersensible o formación de papila (Rubiales y Niks 1995).

Durante el análisis de una población F2 derivada del cruzamiento del RIL46 (R46, línea endocriada derivada de SV x G6 y portadora del gen *LrSV2*) por la variedad comercial susceptible Relmó Siriri (Si) se detectó la presencia de un cuarto gen de resistencia a la roya de la hoja en el cromosoma 4BL, al cual se lo denominó *LrcSV2* (Diéguez *et al* 2018). Este gen forma un sistema complementario con el *LrSV2*, ya que es necesaria la presencia de alelos dominantes en ambos para la determinación de la resistencia a roya de la hoja en planta adulta. Este gen no fue detectado en el cruzamiento SV x G6 debido a que está presente en ambos parentales, resaltando la importancia del estudio de los genes individuales en distintos cruzamientos (Dieguez *et al* 2018). El gen *Lr3* confiere resistencia recesiva a la raza argentina 66 de *Puccinia triticina* (Sacco *et al* 1995; 1998). Mediante el empleo de líneas con deleciones, se mapeó físicamente en el 5% distal del cromosoma 6BL, junto con 22 marcadores de AFLP (del inglés “Amplified Fragment Length Polymorphisms”: polimorfismo del largo de los fragmentos amplificados, Vos *et al* 1995) y se construyó un mapa de ligamiento de baja resolución (60 RILs) de esta región con 8 AFLPs, 7 de los cuales mapearon a una distancia de 0,9 cM (Diéguez *et al* 2006). *LrSV2* confiere resistencia a la raza Ca02G1R y fue mapeado en la región subtelomérica del cromosoma 3BS donde ningún otro gen de resistencia a roya de la hoja de planta adulta fue reportado (Ingala *et al* 2005). Usando una población de 91 RILs del cruzamiento entre Sinvalocho MA y Gama6, el microsatélite gwm533 (Roder *et al* 1998) fue mapeado ligado completamente al gen *LrSV2* y el marcador más cercano fue el AFLP P31/M37150 a 0,6 cM proximal (Ingala *et al* 2012). En esta región del cromosoma 3BS, se mapearon varios genes de resistencia a patógenos: el gen *Sr2* de resistencia durable a la roya del tallo en planta adulta causada por *Puccinia graminis f. sp. Tritici*, el ASR *Lr27* y resistencia a oídio (Kota *et al* 2006; Mago *et al* 2011) y *Qfhs.ndsu-3BS*, un QTL importante para la resistencia a *Fusarium gramineum* (Liu *et al* 2006, Li *et al* 2019). Una característica de los genes de resistencia a patógenos es que suelen encontrarse agrupados en clusters (McIntosh *et al* 1995, Michelmore *et al* 1991).

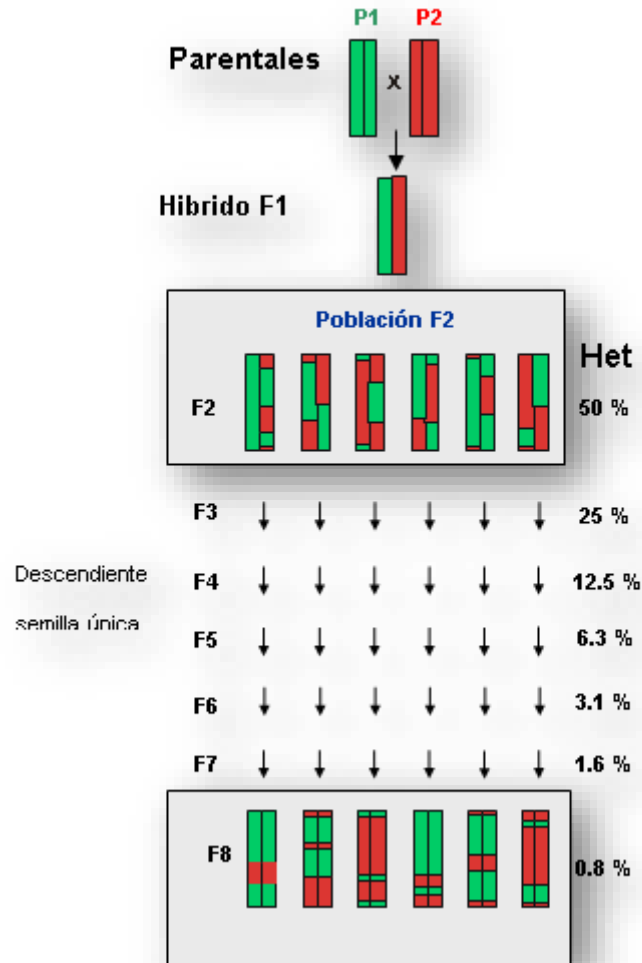
Para la elaboración de mapas genéticos mediante el análisis de ligamiento es necesario el desarrollo de una población segregante para una o más características de interés. Las ventajas y desventajas que las diferentes poblaciones segregantes presentan en los

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, que 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 8va generación de autofecundación (Figura 10). 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.

El clonado de los genes de resistencia la roya de la hoja de trigo presentes en el cultivar Sinvalocho MA permitiría su introducción en cultivares elite tanto mediante retrocruzadas asistidas por marcadores funcionales 100% ligados al gen de interés desarrollados a partir de su secuencia como por otras metodologías, como la transgénesis y la edición génica de alelos susceptibles. Además, también brindaría información acerca de las bases moleculares de la interacción planta-patógeno, de la resistencia específica en plántula, planta adulta y de la resistencia durable, lo que permitirá desarrollar métodos más eficaces para la protección de los cultivos (Lowe *et al* 2011). A su vez, dada la abundante información de secuencia que se está generando debido al desarrollo y la disminución de costos de las técnicas de NGS (Next Generation Sequencing o Técnicas de Secuenciación de Siguiete Generación) permitiría la identificación de genes de resistencia en otras especies por homología.

El rescate de los genes responsables de la resistencia durable observada en las variedades tradicionales de trigo evita su potencial pérdida que podría ocurrir como consecuencia de que éstas ya no son utilizadas en los planes de mejoramiento. El uso de estos genes de resistencia 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 con el consiguiente beneficio, económico y social.



LÍNEA RECOMBINANTE HOMOCIGOTA

Figura 10: Esquema de formación de Líneas Recombinantes Homocigotas

OBJETIVO

Desarrollar mapas genéticos de alta resolución para dos genes de resistencia a roya de la hoja de trigo identificados en la variedad con resistencia durable Sinvalocho MA. Uno corresponde al gen *Lr3* de resistencia desde plántula (ASR) y el otro al gen *LrSV2* de resistencia en planta adulta (APR) con efecto significativo en la resistencia observada a campo.

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.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal

La variedad argentina de trigo Sinvalocho MA, portadora del gen *Lr3* de resistencia desde plántula o ASR y del gen *LrSV2* de resistencia en planta adulta o APR fue cruzada con la línea experimental susceptible G6. A partir de este cruzamiento se obtuvo una población de 202 RILs F8 mediante la metodología de SSD (del inglés Single Seed Descendant, descendiente de semilla única) donde a partir de una población F2 cada individuo aportó un único descendiente a la siguiente generación. También se obtuvo una población F2 de varios miles de individuos a partir de semillas F1 en macetas de 5L y ensobrando las espigas durante el estadio previo a antesis para asegurar su autofecundación.

Las plantas fueron crecidas en invernáculo con temperaturas entre 15 y 25°C con fotoperíodo de 14 h de luz en macetas de 1 litro, 5 plantas por maceta (Figura 11).



Figura 11: Plantas F2 del cruzamiento de SV x G6 en invernáculo (izq.). Plantas F1 cubiertas con sobres para garantizar su autofecundación (der.).

Infección con Roya

Las inoculaciones se realizaron pulverizando las plantas con una suspensión de 20 mg de urediosporos en 50 ml de agua con una gota de Tween 20 para disminuir la tensión superficial. Luego de la inoculación, las plantas se mantuvieron en cámara húmeda con humedad relativa del 100% durante 16 horas y posteriormente, fueron colocadas en

invernáculo a una temperatura entre 15 y 25°C con fotoperíodo de 14 h de luz (Figura 12).

Para la evaluación del gen *Lr3* se inocularon en la etapa de plántula (1era-2da hoja) con la raza 66 de *P. triticina* (DBBS, de acuerdo con el sistema de clasificación norteamericano de Long y Kolmer, 1989) que da una reacción incompatible en todos los estadios en presencia del gen *Lr3*. En el caso del *LrSV2*, se inocularon en la etapa de hoja bandera con la raza Ca02G1R de *P. triticina* (MBGJ, de acuerdo con el sistema de clasificación norteamericano de Long y Kolmer, 1989) que da una reacción incompatible sólo en las etapas finales del desarrollo (hoja bandera, bandera -1) en presencia del gen *LrSV2*.



Figura 12: Proceso de inoculación artificial de plantas de *T. aestivum* con *P. triticina*. Cámara de pulverización

La resistencia o susceptibilidad a la infección se evaluó visualmente a los 14-21 días post-inoculación. La determinación del fenotipo de resistencia/susceptibilidad a roya se realizó por comparación con los testigos SV y G6 y aplicando una escala cualitativa que va desde S (susceptible) a R (resistente) pasando por grados intermedios de resistencia como MS

(Moderadamente susceptible) y MR (moderadamente resistente), tomando como referencia la escala de Mains y Jackson (Figura 9-introducción).

Para el análisis de los resultados fenotípicos se agrupó dicotómicamente a los individuos categorizados como R o MR como resistentes y a los que presentaban fenotipos S o MS como susceptibles. Se realizó una prueba de bondad de ajuste utilizando el estadístico χ^2 (con un grado de libertad y $\alpha = 0.05$).

Extracción y cuantificación de ADN

Se extrajo ADN total de hojas frescas o de tejido liofilizado.

Protocolo de extracción:

1. El tejido vegetal cortado (100-300 mg aproximadamente) se congeló en Nitrógeno (N_2) líquido dentro de tubos Eppendorf de 2 ml que contenían arena estéril. Se molió este tejido congelado y cortado utilizando varillas de vidrio esmeriladas. Alternativamente se deshidrató en un desecador en presencia de Sílica gel por 10-14 días y se molió agregando 2 bolitas de acero inoxidable de 3 mm de diámetro en cada tubo, con un “Tissue Lyser” (Qiagen) (Frecuencia: 30/s Tiempo: 10 minutos) (Figura 13).
2. Se agregó al tejido molido 800 μ l del buffer de extracción a 65°C (100 μ l Tris-HCl 1M pH 7,5; 140 μ l NaCl 5 M; 100 μ l EDTA 0,5 M pH 8 y 360 μ l de H_2O bidestilada), 100 μ l de CTAB (Bromuro de Cetiltrimetilamonio) 10% con agitación y 200 μ l de SDS 10% con inversión.
3. Se incubó 60 minutos a 65°C en horno con agitación suave y continua.
4. Se llevó a temperatura ambiente y luego se le agregó 1 volumen (900 μ l) de cloroformo:isoamílico (24:1), se agitó por inversión 5 minutos y se centrifugó 10 minutos a 12000 RPM.
5. Se trasvaso la fase acuosa a otro tubo, y en algunos casos se repitió el agregado de 900 μ l de cloroformo:isoamílico (24:1). Se agitó por inversión 5 minutos y se centrifugó 10 minutos a 12000 rpm a temperatura ambiente.
6. El sobrenadante obtenido se incubó con 5 μ l de RNasa (10 μ g/ μ l) por al menos 60 minutos a 37°C.

7. Se trasvasó la fase acuosa y se agregó un 60 % del volumen (510 μ l) de isopropanol frío (4°C), se lo mezcló por inversión unos minutos y se centrifugó 10 minutos a 14000 RPM a temperatura ambiente.
8. Al pellet resultante, se le agregó 1 ml de alcohol 70% y se dejó reposar por unos minutos a temperatura ambiente.
9. Se centrifugó 10 minutos, 14000 RPM, se retiró el alcohol y se dejó secar.
10. Se resuspendió el ADN en 50 μ l de H₂O de grado HPLC.

Para la evaluación de calidad del ADN extraído, se realizó electroforesis en gel de agarosa 0.8% en buffer TBE 1X (0.89mM Tris), 0.89 mM Ácido Bórico y 20 mM EDTA pH8.0 con agregado de 150 ng/ml de Bromuro de Etidio (10 mg/ml) a 3,5 Volts/cm constantes durante aproximadamente 120 minutos. Las muestras sembradas correspondieron a diluciones 1/10 del ADN resuspendido en H₂O y fueron visualizadas por fluorescencia del bromuro de etidio con luz UV en un equipo White/UV Transiluminator (Life Sciences). La cuantificación se realizó con un espectrofotómetro modelo ND-1000, NanoDrop®.



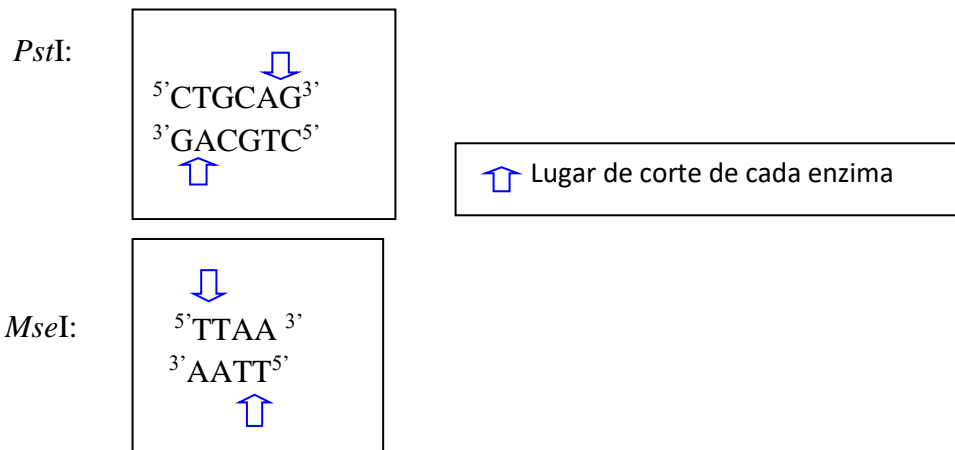
Figura 13: Desecador de vacío (izq.) Tissue Lyser (der).

AFLPs

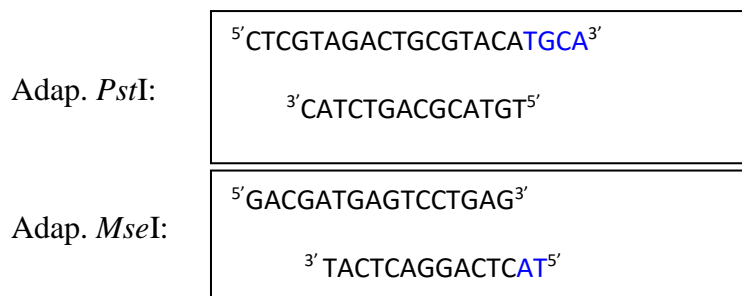
A 750 ng de ADN se lo digirió y ligó a los adaptadores simultáneamente en un volumen total de 20 µl con:

3 unidades de *Pst*I, 1.5 u de *Mse*I, 0.4 u de T4 DNA ligasa, 0.2mM ATP- adenosín trifosfato-, 75 nM de adaptador *Pst*I y 750 nM de adaptador *Mse*I en buffer RL (10mM Tris- HAc pH 7.5, 10mM MgAc, 50mM KAc, 5mM DTT, 50 ng/µl BSA) por aproximadamente 18 horas a 37°C.

Secuencias de corte de las enzimas de restricción utilizadas en la digestión del ADN:



Secuencias de los adaptadores de *Pst*I y de *Mse*I utilizados en la ligación:



La amplificación consta de dos etapas:

1. Preamplificación selectiva (PCR+1)

Se realizó la preamplificación en un volumen final de 25 µl con 1.2mM de MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 3 ng/µl de cada primers P01 o P02 y M01 o M02 y 1 unidad de Sequencing grade *Taq* DNA Polimerasa (Promega) en sequencing buffer (50mM Tris-HCl pH9.0 – 2mM MgCl₂) usando 3 µl de la mezcla de ligación como templado.

El ciclado térmico para la preamplificación consistió en:

2 minutos a 94°C

30 ciclos de:

- 30 segundos a 94°C
- 30 segundos a 60°C
- 1 minutos a 72°C

10 minutos a 72°C

En la preamplificación se utilizan primers con un nucleótido selectivo adicional a la secuencia de los adaptadores (marcado en rojo) y por lo tanto existen cuatro posibles primers de preamplificación para cada adaptador.

Se utilizaron los siguientes primers:

Para el adaptador *Pst*I:

P01: 5'GACTGCGTACATGCAGA^{3'}

P02: 5'GACTGCGTACATGCAGC^{3'}

Para el adaptador *Mse*I:

M01: 5'GATGAGTCCTGAGTAA^{3'}

M02: 5'GATGAGTCCTGAGTAA^{3'}

2. Amplificación selectiva (PCR+3)

Los productos de la preamplificación se diluyeron 1:3 con H₂O de grado HPLC y se utilizaron 2 µl como templado para esta reacción en un volumen total de 22 µl que además contenía 1.6mM de MgCl₂, 0.2mM dNTPs, 1,4 ng/µl de cada “primer” y 1 unidad de *Taq* DNA polimerasa (Invitrogen) en buffer (20mM Tris-HCl pH8.0 50mM KCl).

El ciclado fue el siguiente:

2 minutos a 94°C

13 ciclos de:

- 30 segundos a 94°C
- 30 segundos a 65°C
- 1 minutos a 72°C

25 ciclos de:

- 30 segundos a 94°C
- 30 segundos a 56°C
- 1 minutos a 72°C

10 minutos a 72°C

En la amplificación, se utilizan primers con tres nucleótidos selectivos adicionados en el extremo 3' de la secuencia del adaptador: el que se utilizó en la preamplificación (marcado en rojo) y otros dos que surgen de todas las combinaciones posibles de los cuatro nucleótidos - A C G T- (marcados en azul) (Tabla 3). De este modo, para cada “primer” de la preamplificación es posible utilizar 16 primers de amplificación diferentes y por lo tanto existen 256 combinaciones distintas de pares de primers producto de la combinación de los 16 primers de *Pst*I y los 16 primers de *Mse*I para cada par de primers utilizados en la preamplificación.

primers *Pst*I 5'GACTGCGTACATGCAGXXX3'

primers *Mse*I 5'GATGAGTCCTGAGTAAXXX3'

Serie 01	Primer	Serie 02	Primer
AAA	31	CAA	47
AAC	32	CAC	48
AAG	33	CAG	49
AAT	34	CAT	50
ACA	35	CCA	51
ACC	36	CCC	52
ACG	37	CCG	53
ACT	38	CCT	54
AGA	39	CGA	55
AGC	40	CGC	56
AGG	41	CGG	57
AGT	42	CGT	58
ATA	43	CTA	59
ATC	44	CTC	60
ATG	45	CTG	61
ATT	46	CTT	62

Tabla 3: Lista de bases selectivas de los primers utilizados para la amplificación.

SSRs, ISBPs, STSs y STMs

Las reacciones de PCR se realizaron en un volumen de 20 μ l con 50-100 ng de ADN molde, 1.5 mM MgCl₂, 0.16 μ M dNTPs, 0.4 μ M de cada primer (SSR-ISBP) y 0.08 μ M de cada primer (STS-STM) 0.032 unidades/ μ l de Taq DNA polimerasa (Inbio Highway o Life Technologies) en buffer (2mM Tris-HCl pH8.0 5mM KCl).

El ciclado térmico se realizó en equipos Mastercycler Gradient 5331 (Eppendorf) y TProfessional Basic (Biometra) con temperatura de hibridación de primers fija (50°, 55°, 60° o 65°C) según la puesta a punto de cada primer.

SSRs- STSs:

3 min 94°

35 ciclos de:

- 30 seg 94°
- 30 seg 50-55-60°C
- 1 min 72°

10 min 72°

ISBPs:

3 min 94°

7 ciclos de:

- 30 seg 95°C
- 30 seg 62°C descendiendo un grado en cada ciclo
- 30 seg 72°C

31 ciclos de:

- 30 seg 95°C
- 30 seg 55°
- 30 seg 72°C

10 min 72°

STMs:

3 min 94°

1 ciclo de:

- 60 seg 92°
- 60 seg 62°
- 30 seg 72°

7 ciclos de:

- 60 seg 92
- 60 seg 62° disminuyendo un grado en cada ciclo
- 30 seg 72°

39 ciclos de:

- 60 seg 92°
- 60 seg 62°
- 30 seg 72°

10 min 72°

SNPs

Las reacciones de amplificación se realizaron por sextuplicado, para garantizar volumen suficiente para los siguientes pasos. 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).

Las muestras fueron cuantificadas mediante un espectrofotómetro modelo ND-1000, NanoDrop® y enviadas para su secuenciación capilar al servicio UGB de INTA Castelar <https://inta.gob.ar/servicios/secuenciacion-de-acidos-nucleicos-adn-por-electroforesis-capilar> utilizando cada uno de los primers usados 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).

SCARs

Las bandas de AFLP polimórficas se reamplificaron con los primers correspondientes (Vos *et al* 1995) utilizando como templado un taco del gel rehidratado teñido con plata del tamaño de la punta del tip de una pipeta. Las reacciones de amplificación se realizaron por sextuplicado, para garantizar volumen suficiente para los siguientes pasos. 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 el kit “UltraClean GelSpin” (MoBio), siguiendo el protocolo indicado por el fabricante.

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>

Los primers de los marcadores SCAR (sequence characterized amplified region) se diseñaron con el software Primer3 (Rozen y Skaletsky 2000). La PCR se realizó usando 100 ng de templado de ADN genómico en un volumen de 20 μ l con 100 nM de cada primer, 0,2 mM dNTPs, 1,5 mM MgCl₂ y 0,8 unidades de Taq DNA polimerasa (Life Technologies). Las condiciones de ciclado fueron 40 ciclos de 30 s a 95 °C, 30 s a 60 °C y 1 min a 72 °C.

Resolución y visualización de los productos de PCR

Los marcadores ISBPs y SCARs se visualizaron en geles de agarosa 2% con bromuro de etidio (BrEt) (10 μ g/ml). A cada muestra se le agregó 3 μ l de buffer de siembra Cresol Red y se incluyó un marcador de peso molecular (100bp Life Technologies). 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).

Los productos de la amplificación de los AFLPs y SSRs se sometieron a electroforesis en geles de poliacrilamida 5% (Acri:bis 19:1) desnaturalizantes 7M urea (0,89mM tris, 0,89mM ácido bórico y 20mM EDTA pH8.0) y se agregaron los catalizadores Temed (1 μ l/ml de gel) y Persulfato de amonio 25% en agua (1 μ l/ml de gel)..

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 950 μ l de alcohol, 5 μ l de ácido acético y 3 μ l 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 400 μ l 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.

A cada muestra se le agregó 15 µl de loading buffer (10mM NaOH- hidróxido de sodio-, 0.05% Azul de Bromofenol, 0.05% Xylene Cyanol y 95%(v/v) de Formamida desionizada) y se desnaturalizó a 95°C por 5 minutos. Se sembraron 7 µl de muestra en cada posición del gel y la electroforesis se realizó con buffer TBE 0.5X aproximadamente 90 minutos a 60 Watts constantes. Se incluyó un marcador de peso molecular (25bp Life Technologies).

Los productos de AFLP se visualizaron por tinción con Nitrato de Plata (AgNO_3)/carbonato de sodio (Na_2CO_3), de acuerdo con el siguiente procedimiento:

1. Se fijó el gel por al menos 20 minutos en Ácido acético 10% (0,05% ac. acético y 10% etanol en agua bidestilada).
2. Se incubó por al menos 12 minutos en 200ml de solución de AgNO_3 (15mg/ml de agua bidestilada) a la que se le agregó 300µl de formaldehído.
3. Se agitó en 30 g/l de Na_2CO_3 frío, con 0.06% de formaldehído y 0.002% de tiosulfato de sodio hasta ver las bandas.
4. Se detuvo la tinción por agitación con Ácido Acético al 10% por 10 minutos.
5. Por último, se realizó un lavado con agua corriente durante 10 minutos y se dejó secar.

El resto de los marcadores se visualizaron por tinción con $\text{AgNO}_3/\text{NaOH}$ según Benbouza *et al* 2006. En este protocolo se reemplaza únicamente el paso 3 por los siguientes dos pasos:

1. Se lavó 15 segundos en agua bidestilada.
2. Se reveló en 400ml de solución de NaOH (15g/L de agua bidestilada) a la que se le agregó 800µl formaldehído hasta ver las bandas.

Análisis de datos y mapeo genético.

La asociación entre aquellos marcadores moleculares que resultaron polimórficos con el carácter fenotípico de reacción a roya se realizó mediante BSA “bulk segregant analysis” (Michelmore *et al* 1991).

Los análisis de ligamiento y las distancias genéticas se calcularon utilizando 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 (G6) fueron denominados “0”. En los casos que el marcador fue heterocigota se lo codificó “H”

Se utilizó el software MAPMAKER versión 3.0 (Lander E *et al*, 1987) donde los grupos de ligamiento se determinaron con un LOD mínimo de 3.0 y una distancia máxima de 50 cM. Cuando aumentó significativamente el volumen de datos se utilizó el software Carthagene (De Givry *et al* 2005) con un LOD mínimo de 3,0 y una distancia máxima de 30 cM. Los mapas fueron elaborados con el software Map-Chart (Voorrips 2002).

Mutagénesis

A partir de plantas de la variedad Sinvalocho, crecidas en macetas de 5 litros, se cosecharon aproximadamente 10,000 semillas, provenientes de espigas ensobradas para asegurar la autofecundación de las mismas. Se evaluó el poder germinativo de estas semillas, en cajas de Petri con papel secante humedecido en agua (Figura 14).



Figura 14: Evaluación del poder germinativo de las semillas de SV.

Se realizaron 3 ensayos de dosimetrías con 5 tratamientos cada uno. En cada tratamiento se evaluaron 50 semillas en erlenmeyers de 50 ml con 15 ml de la dilución de EMS (metanosulfonato de etilo). Se mantuvieron por 18 h en agitación en agitador orbital Sontec a 180 rpm y 20°C. Posteriormente, los grupos de semillas se lavaron 3 veces para eliminar restos del mutágeno.

Las semillas M1 se sembraron en invernáculo en macetas de 1 litro (5 semillas por maceta). Se taparon las espigas para obtener la progenie M2 por autofecundación.

La M2 de cada individuo M1, se sembró por separado en invernáculo en 1 o 2 macetas de 1 litro con 6 semillas por maceta (Figura 15). Estas plantas se inocularon con la raza Ca02G1R al estadio de planta adulta, utilizando SV y G6 como controles.

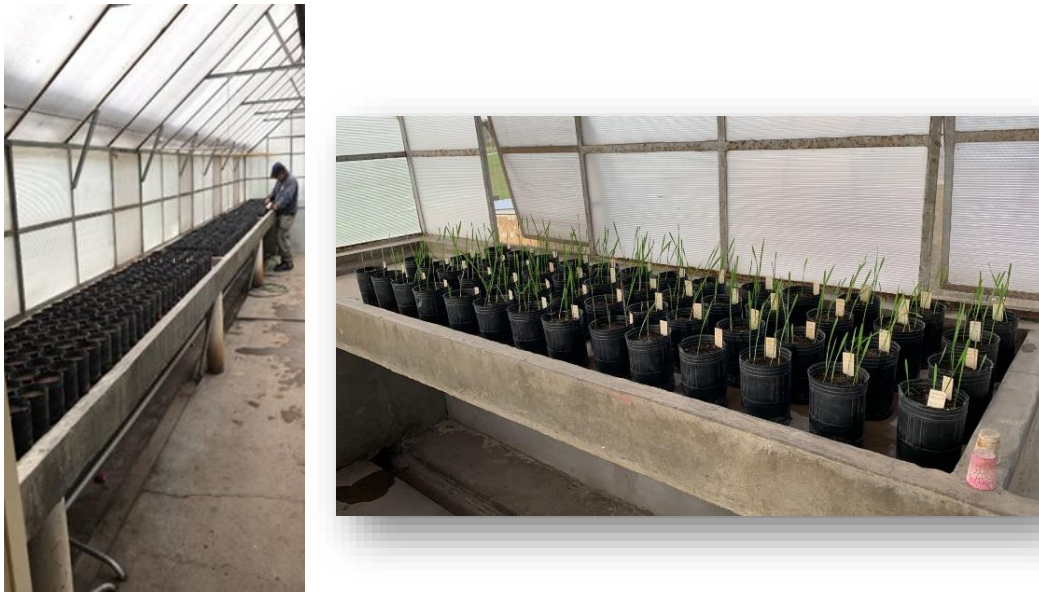


Figura 15: Siembra en invernáculo de las semillas M2 en macetas de 1 litro.

RESULTADOS

A partir del cruzamiento entre Sinvaloch MA, variedad portadora de los genes de resistencia ASR *Lr3* y APR *LrSV2* y una línea de fenotipo contrastante G6, se obtuvo una población F2 de varios miles de individuos. Los individuos de esta población fueron infectados al estadio de plántula con la raza 66 de *P. triticina* y con la raza Ca02G1R en el estadio de planta adulta. Estas razas habían sido usadas previamente en un trabajo donde se identificaron a los genes *Lr3* y *LrSV2*, respectivamente, en una población de RILs derivada del mismo cruzamiento (Ingala *et al* 2012).

El análisis fenotípico en plántula ajustó a la proporción resistentes:susceptibles de 1:3 esperada para un gen recesivo ($p > 0.2$). Por otra parte, en planta adulta la relación resistentes:susceptibles no ajustó a la proporción 3:1 esperada para un gen dominante ($p < 0.001$) sino que hubo un exceso de plantas resistentes (ver Discusión). Tabla R1.

Población de mapeo	Raza	Gen detectado	Reacción a roya			Relación esperada	P
			R	S	S/D		
F ₂ (plántula)	66	<i>Lr3</i>	1757	5117	37	1:3	> 0,2
F ₂ (pl. adulta)	Ca02G1R	<i>LrSV2</i>	6332	1586	229	3:1	< 0,001

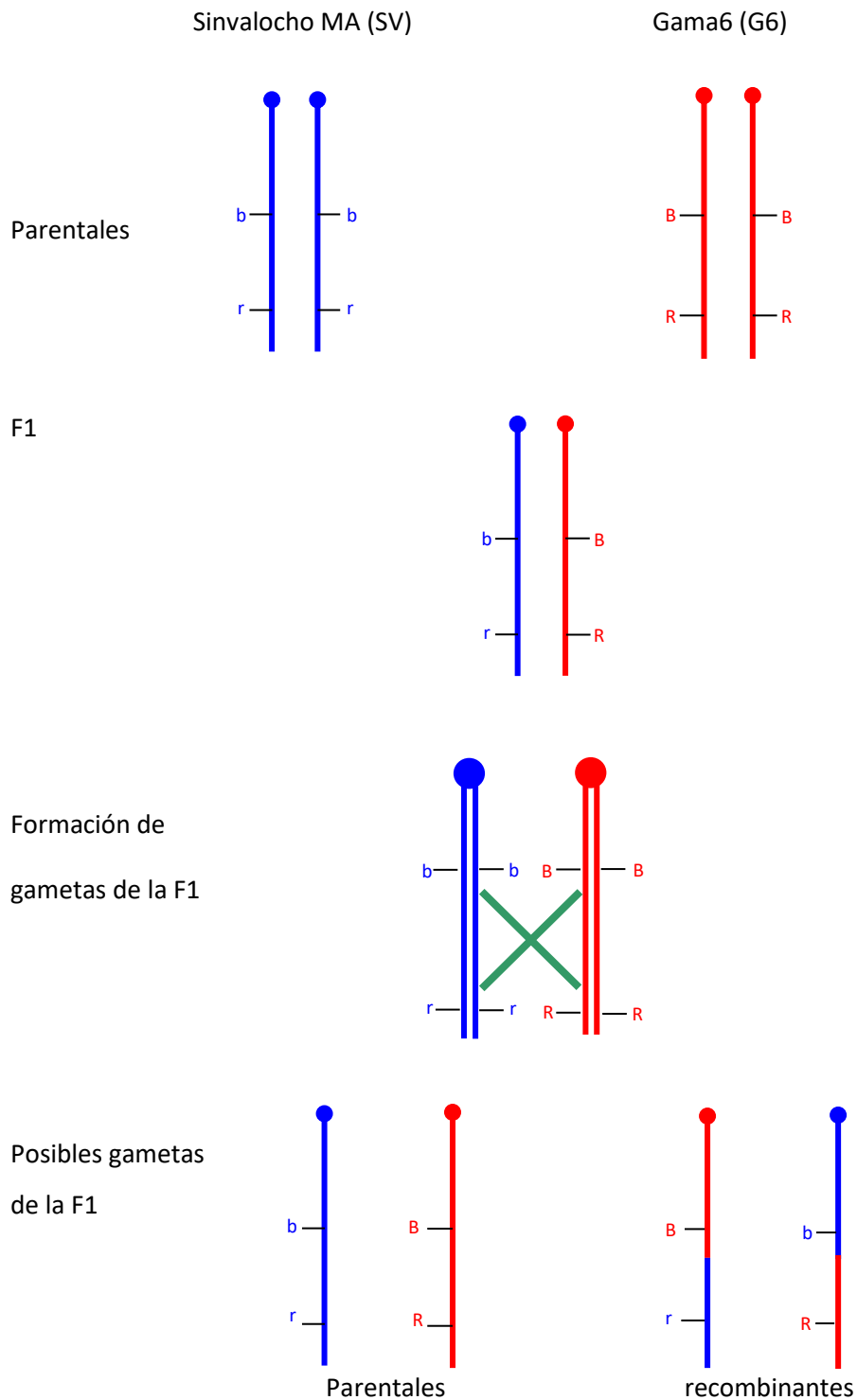
Tabla R1: Segregación de la reacción a las razas de *P. triticina* en una población F2 del cruzamiento SV x G6. R resistente, S susceptible y S/D sin dato por fenotipo dudoso

Inicialmente, con el objetivo de identificar marcadores moleculares asociados a ambos genes, se utilizaron AFLPs debido a su abundancia, robustez y porque son marcadores anónimos (no es necesario conocimiento previo de la secuencia).

Dentro de la población F2 se identificaron los individuos resistentes al estadio de plántula frente a la raza 66 de *P. triticina*, ya que este fenotipo permite inferir inequívocamente el genotipo homocigota para el gen *Lr3* (resistencia recesiva). Posteriormente, en la misma población, se identificaron las plantas susceptibles a la raza Ca02G1R en planta adulta, que son homocigotas recesivas para el gen *LrSV2* (resistencia dominante). Dentro de cada una de estas dos subpoblaciones, los individuos recombinantes resultan fácilmente

identificables ya que presentan alelos del padre de fenotipo opuesto en los marcadores ligados al gen de resistencia. Para este tipo de análisis, con marcadores dominantes como los AFLPs, sólo aquellos en fase de repulsión con la resistencia resultan útiles para el gen recesivo *Lr3* y aquellos en fase de acoplamiento con la resistencia serán útiles para el gen dominante *LrSV2*. (Figura R1 a y b, respectivamente)

a)



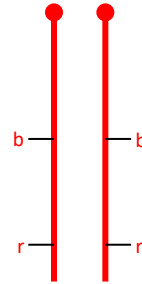
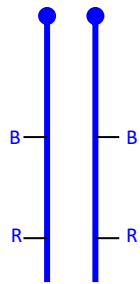
	br	Br	BR	bR
br	bbr	Bbrr	BbRr	bbRr
Br	Bbrr	BBrr*	BBRr	BbRr
BR	BbRr	BBRr	BBRR	BbRR
bR	bbRr	BbRr	BbRR	bbRR

b)

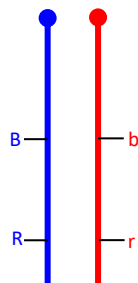
Sinvalocho MA (SV)

Gama6 (G6)

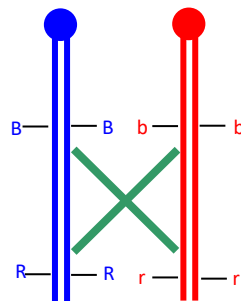
Parentales

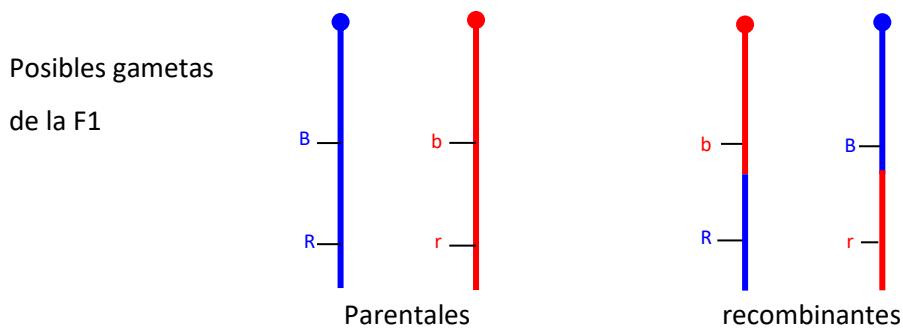


F1



Formación de gametas de la F1





	BR	bR	br	Br
BR	BBRR	BbRR	BbRr	BBRr
bR	BbRR	bbRR	bbRr	BbRr
br	BbRr	bbRr	bbrr	Bbrr
Br	BBRr	BbRr	Bbrr	BBrr*

Figura R1: Formación de gametas de la F1 del cruzamiento entre SV y G6 y tabla con la formación de todos los genotipos posibles en la F2. a) gen *Lr3* b) gen *LrSV2*. En fondo naranja se señala el cuarto homocigota recesivo de fenotipo resistente y susceptible para cada gen respectivamente. * unión de dos gametas recombinantes.

Los marcadores de AFLP se designaron de acuerdo a los primers usados (primer PstI/primer MseI) y el número de pares de base estimado a partir de la comparación con la movilidad de marcadores de peso molecular conocido corridos en el mismo gel.

Lr3

La asociación de bandas de AFLPs con el gen *Lr3* se evaluó mediante la metodología de BSA utilizando 14 RILs resistentes y 14 susceptibles seleccionados a partir de una población de (60) RILs F7 del mismo cruzamiento. Inicialmente, se compararon los parentales y dos pools de 6 RILs resistentes y 6 susceptibles (PR y PS, respectivamente, Figura R2). Si se observaba asociación en repulsión con la resistencia (banda presente en el pool susceptible y parental susceptible G6 y ausente en el pool resistente y parental resistente SV, Figura 3 flecha roja), se evaluaba en 4 RILs resistentes y 4 susceptibles

adicionales en forma individual (Figura R3) y si la asociación continuaba, se analizaba en otros 4 RILs resistentes y 4 susceptibles.

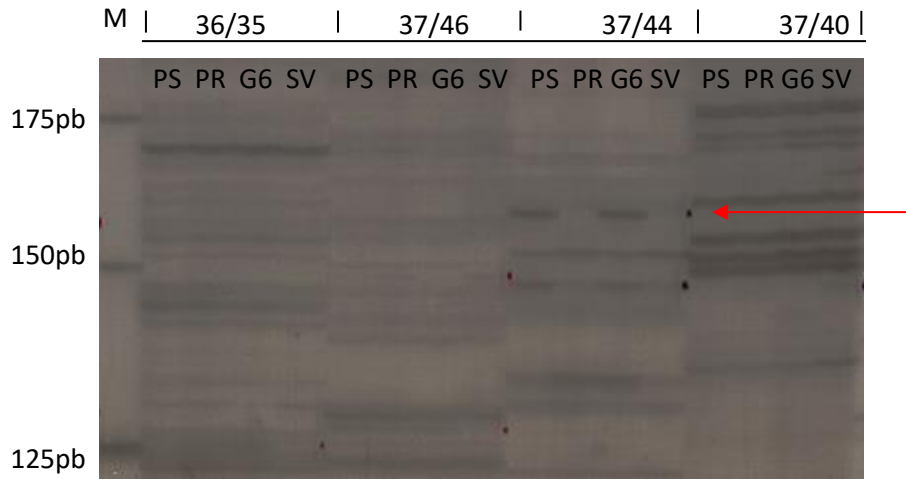


Figura R2: Búsqueda de marcadores moleculares en repulsión con la resistencia. Patrón de bandas de AFLP, en un gel de poliacrilamida 5% desnaturizante teñido con nitrato de plata. M: marcador de peso molecular conocido en bases, SV: Sinvalocho MA. G6: Gama 6, PR: pool resistente, PS: pool susceptible. La flecha indica la banda polimórfica en repulsión con la resistencia para la combinación de primers P37/M44.

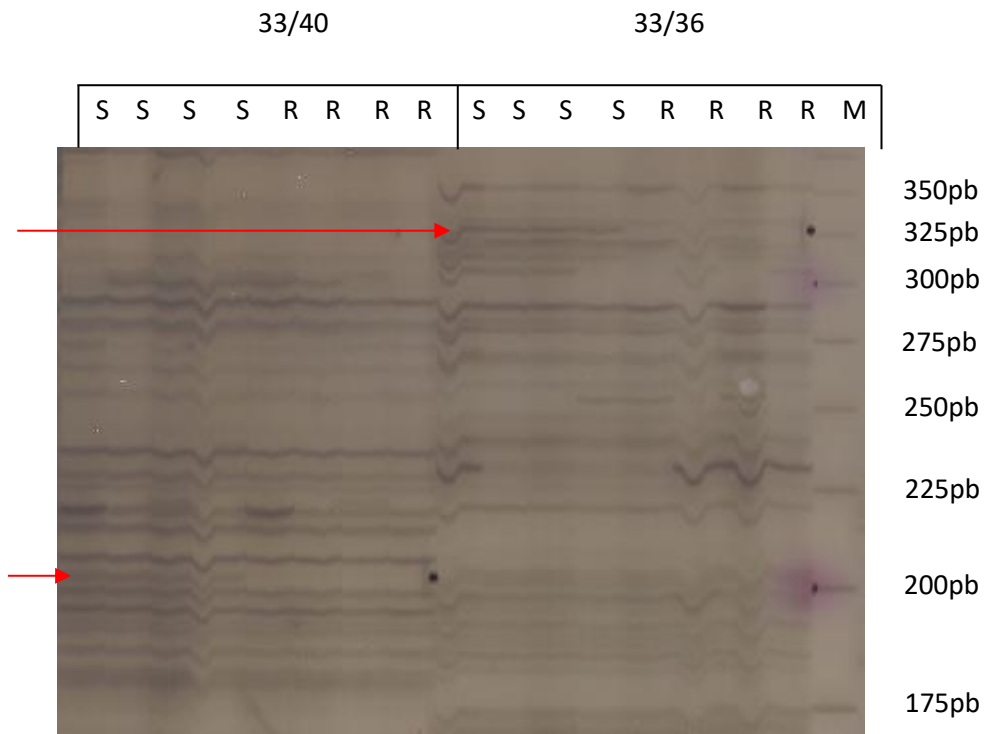


Figura R3: Análisis individual de los marcadores encontrados en nuevos individuos resistentes y susceptibles. Patrón de bandas de AFLP en un gel de poliacrilamida 5% desnaturizante teñido con nitrato de plata. M: marcador de peso molecular conocido en bases, R: individuos resistentes, S: individuos susceptibles. Las flechas indican las bandas polimórficas en repulsión con la resistencia.

Se evaluaron 578 combinaciones de primers de las series P01/M01, P01/M02 y P02/M02 y se encontraron 20 marcadores AFLPs asociados en repulsión con el alelo de resistencia del gen *Lr3* (Tabla R2).

	Primers (PstI/MseI)	Tamaño (bp)
Serie 01/01 (PstI/MseI)	32/31	120
	33/36	325
	33/40	200
	37/44	160
	40/31	125
	40/35	120
	40/42	450
	43/40	200
	45/43	135
46/42	310	
Serie 02/02 (PstI/MseI)	47/47	245
	47/60	150
	50/49	140
	51/50	200
	51/57	225
	52/62	210
	54/50	135
	55/54	240
	59/54	155
Serie 01/02 (PstI/MseI)	35/49	190

Tabla R2: Listado de primers de AFLP polimórficos de cada una de las series analizadas asociados en repulsión con el alelo de resistencia del gen *Lr3*.

Se realizó un primer análisis de seis de estos veinte marcadores AFLP asociados en repulsión con la resistencia, elegidos por su mejor resolución en el gel, en 195 individuos resistentes de la población F2 del cruzamiento SV x G6. El marcador 55/54₂₄₀ mostró

segregación independiente. Los AFLPs 33/36₃₂₅, 37/44₁₆₀, 40/31₁₂₅ y 46/42₃₁₀ formaron un cluster a 0,5 cM del *Lr3* ya que se observaron los mismos dos recombinantes entre estos y el gen *Lr3* (individuos 59 y 131). Para el marcador 40/35₁₂₀ se detectaron estos dos individuos recombinantes y 31 recombinantes adicionales, posicionandolo a 8,3 cM del cluster (Tabla A1-anexo).

El marcador 46/42₃₁₀ había sido ubicado previamente proximal al *Lr3* (Diéguez *et al* 2006), lo que permitió establecer el ordenamiento más probable de los marcadores y el gen *Lr3* en el cromosoma 6BL (Figura R4a).

Los individuos 59 y 131 también resultaron recombinantes entre el gen *Lr3* y los catorce marcadores de AFLP restantes. Por lo tanto, para esta población de análisis, dichos marcadores no se hallarían a menor distancia del gen *Lr3* que el cluster formado por los AFLPs 33/36₃₂₅, 37/44₁₆₀, 40/31₁₂₅ y 46/42₃₁₀.

En la prueba de progenie de los recombinantes 59 y 131 se espera que todos sean fenotipo resistente. En cuanto a la banda del marcador de AFLP se espera que segregue, ya que no se consideró la posibilidad de la unión de dos gametas recombinantes cuya probabilidad es extremadamente baja ($2,63E-5$).

De las 9 plantas F3 del individuo 131 fueron resistentes a roya, pero sólo siete presentaron la banda del marcador 37/44₁₆₀, confirmando la homocigosis para el gen *Lr3* y la heterocigosis para el marcador ($p > 0.8$). Por otro lado, los 6 individuos de la progenie F3 del individuo 59 fueron resistentes lo que permitió confirmar la homocigosis para el *Lr3*. Sin embargo, debido al bajo número de individuos analizados, todos mostraron banda con el marcador 37/44₁₆₀, por lo que no pudo confirmarse la heterocigosis para la misma.

Dentro del cluster de cuatro marcadores a 0,5 cM del *Lr3*, los marcadores 33/36₃₂₅ y 46/42₃₁₀ mostraban mejor resolución y fueron elegidos para analizar 958 individuos F2 adicionales, totalizando 1153 individuos F2 resistentes (homocigotas recesivos para el gen *Lr3*). Ambos marcadores detectaron los mismos 34 individuos recombinantes, ubicandose a una distancia de 1,5 cM del gen (Figura R4b).

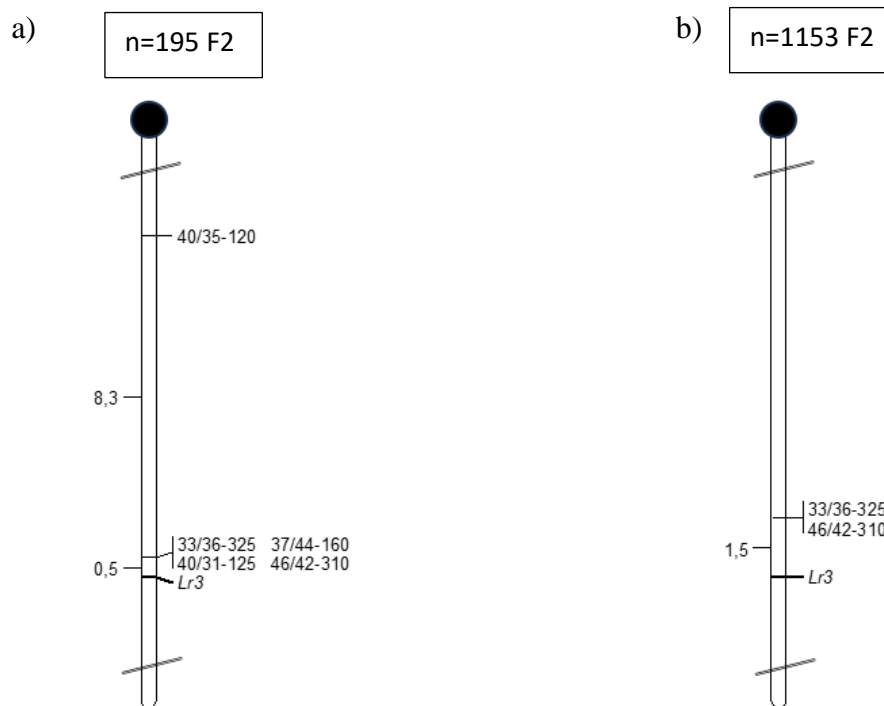


Figura R4: Mapa genético del locus *Lr3* en el extremo distal del cromosoma 6BL a) 195 F2s Resistentes SV x G6 b) 1153 F2s Resistentes SV x G6. El círculo negro indica el centrómero. Las distancias genéticas (cM) se muestran en el lateral izquierdo.

Se evaluaron entre 5 y 10 individuos de la generación F3 de cada uno de estos recombinantes y, según lo esperado, todos resultaron resistentes a la raza 66 en plántula, confirmando el genotipo homocigota recesivo del gen *Lr3* en dichos individuos F2. La segregación de la banda de AFLP no fue testada.

Con el objeto de incorporar más marcadores y poder hallar marcadores flanqueantes que delimiten un intervalo que incluya al gen *Lr3*, doce marcadores públicos reportados en la región distal del cromosoma 6BL (6 SSR, 1 STS y 5 STM) fueron evaluados en los parentales. Ocho de estos marcadores resultaron monomórficos y cuatro polimórficos de los cuales tres no mostraron asociación al *Lr3* mediante BSA utilizando pools de 6 líneas resistentes y 6 susceptibles de la población de RILs del cruzamiento de SV x G6. El marcador wmc417 que resulto asociado por BSA fue evaluado en la población de 60 RILs F8 y no se observó ligamiento al gen *Lr3* (Tabla R3).

<i>Marcador</i>	<i>tipo</i>	<i>SV (bp)</i>	<i>G6 (bp)</i>	<i>CS (bp)</i>	<i>asoc. BSA</i>	<i>Ligado</i>	
barc24	SSR	207	207	207			Song <i>et al</i> 2005
barc134	SSR	195/205	195/205	205			
barc178	SSR	266	266	266			
gwm219	SSR	200	200	200			Röder <i>et al</i> 1998
mwg2053	STS	1350	1350				Khlestkina EK <i>et al</i> 2004
stm520	STM	90	90	90			Hayden <i>et al</i> 2006
stm545	STM	105	--	95	NO		
stm548	STM	290	300	300	NO		
stm562	STM	235	245	245	NO		
stm596	STM	175	175	175			
wmc152	SSR	270	270	270			Somers <i>et al</i> 2004
wmc417	SSR	165	155	165	SI	NO	

Tabla R3: Lista de los 12 marcadores testados por BSA. En rojo se indican los marcadores polimórficos.

Treinta y un marcadores SSR adicionales reportados en la region distal del 6BL (Tabla R4) fueron analizados en busca de polimorfismo entre los parentales y 5 resultaron polimórficos.

La línea C16, es una línea derivada de SV que posee una micro deleción en el extremo distal del cromosoma 6BL, región que involucra al gen *Lr3* (Dieguez *et al* 2003). Cuando los 5 marcadores polimórficos hallados fueron testados en esta línea, estos se encontraban presentes, lo que indica que los marcadores no se encuentran en el bin de deleción terminal donde mapea el gen (bin I, Dieguez *et al* 2006).

Con el objeto de obtener marcadores metodológicamente más sencillos que los AFLPs, 15 de las 22 bandas de AFLP del bin I (9 presentes en ambos parentales y 6 dominantes SV) y la banda del marcador AFLP 46/42₃₁₀ ligado en repulsión con la resistencia (dominante en G6, Dieguez *et al* 2006) pudieron ser reamplificadas a partir del gel y secuenciadas. No se observaron SNPs en las nueve bandas presentes en ambos parentales y se diseñaron primers para desarrollar marcadores de tipo SCAR sobre las 6 bandas dominantes SV y la banda dominante G6. El marcador SCAR34/32 derivado de una banda dominante SV y el marcador SCAR46/42 derivado de la banda dominante G6 resultaron polimórficos, dominante SV y dominante G6, respectivamente.

<i>marcador</i>	<i>SV (bp)</i>	<i>G6 (bp)</i>	<i>C16 (bp)</i>	
barc79	150	152	150	Song <i>et al</i> 2005
barc107	200	200	200	
barc127	200	190	200	
barc146	230	230	230	
barc198	130/180	130/180	130/180	
barc223	103	103	103	
gpw5130	125	125	125	Sourdille <i>et al</i> 2004
gpw7262	180	180	180	
wmc103	300	300	300	
wmc104	150	150	150	
wmc179	230	230	230	
wmc341	125	--	125	
wmc397	160	165	160	
wmc473	230	230	230	
wmc539	300	300	300	
wmc621	130	130	130	
wmc726	180	180	180	
wmc748	135	135	135	
wmc786	200	200	200	
wms58	100	100	100	Röder <i>et al</i> 1998
wms88	130	140	130	
wms219	180	180	180	
wms273	210	210	210	
wms518	160/180	160/180	160/180	
wms626	100	100	100	
wms771	80	80	80	
wms887	400	400	400	
wms889	180	180	180	
wms907	130	130	130	
wms940	100	100	100	
wms1076	125	125	125	

Tabla R4: Lista de 31 marcadores microsatélites testeados en línea con delección C16. En rojo se indican los marcadores polimórficos.

A pesar de que no se pudo desarrollar un marcador SCAR a partir de la secuencia de la banda del marcador 36/39₁₇₅ que había mapeado distal al *Lr3* (Dieguez *et al* 2003), esta fue utilizada para buscar secuencias homologas en contigs del cromosoma 6BL de la

variedad CS de la base de datos local del centro The Genome Analysis Centre (TGAC, hoy Earlham Institute <https://www.earlham.ac.uk/>). Se identificó un contig de secuencia de 3262 pb y sobre esta se diseñó un marcador tipo ISBP (fsp1) que resultó dominante SV.

Los dos marcadores dominantes SV no eran útiles en la población F2 resistente. El marcador SCAR46/42 dominante G6 podría haber sido utilizado en esta población, pero al tratarse de una única banda, una falla en la amplificación podría ser erróneamente genotipada como ausencia de banda. Por ello se decidió utilizar una población de 202 RILs del cruzamiento de SV x G6. Esta fue genotipada con estos tres marcadores (SCAR34/32, SCAR46/42 y fsp1) e inoculada en el estadio de plántula con la raza 66 de *Puccinia triticina*. Los tres marcadores segregaron 1:1 para presencia: ausencia de banda, como se espera para un *locus* único en una población de RILs. En el mapa de ligamiento el marcador SCAR46/42₁₇₀ se ubicó a 4,0 cM proximal del gen *Lr3* y los marcadores SCAR34/32₉₅ y fsp1 se encuentran distales del *Lr3* a 2,9 y 8,7 cM respectivamente (Figura R5). De esta manera el gen *Lr3* quedó delimitado en un intervalo de 6,9 cM flanqueado por dos marcadores tipo SCAR, metodológicamente más sencillos que los marcadores de AFLPs. Este intervalo corresponde aproximadamente a 2 Mb en la variedad CS. En este intervalo se han anotado con alta confianza 57 genes en la variedad CS (Tabla A4-anexo), entre los que se encuentran numerosos genes *NLR* y también kinasas. <http://wheatomics.sdau.edu.cn/>

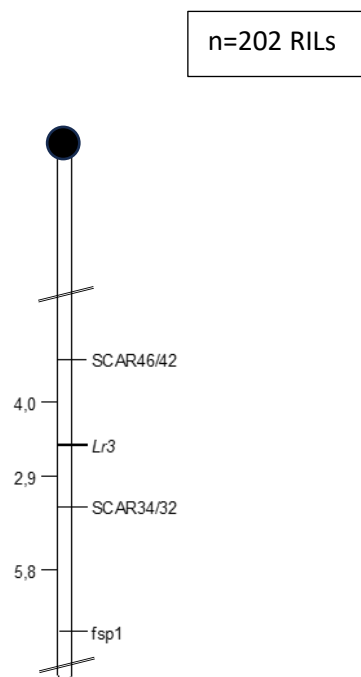


Figura R5: Mapa genético del *locus Lr3* en el extremo distal del cromosoma 6BL en 202 RILs SV x G6. El círculo negro indica el centrómero. Las distancias genéticas (cM) se muestran en el lateral izquierdo.

LrSV2

a- Mapeo

La búsqueda de marcadores de AFLP ligados en acoplamiento a la resistencia debida al gen *LrSV2* también se realizó mediante el análisis de bloques segregantes (BSA) evaluándose 405 combinaciones de primers de AFLP de las series P01/M01 y P02/M02. Cada bloque estaba compuesto por un pool de seis RILs susceptibles y seis RILs resistentes del cruzamiento entre SV y G6 (Ingala *et al* 2012). Las bandas presentes sólo en el parental resistente y en el pool resistente fueron probadas en 16 RILs adicionales de la misma población (ocho resistentes y ocho susceptibles).

Se encontraron cinco bandas de AFLP presentes en el parental resistente y en el pool resistente y en los ocho RILs resistentes adicionales y no en el pool susceptible y en los ocho RILs susceptibles adicionales. Con el fin de identificar los marcadores más cercanos, se realizó un análisis progresivo.

En primer lugar, se pusieron a prueba estos 5 AFLPs, junto con el marcador 31/37₁₅₀ que fue identificado anteriormente como el AFLP más cercano (Ingala *et al* 2012), en 89

individuos F2 susceptibles. Uno de ellos, el 40/42₃₂₅, no estaba presente en ninguna de estos individuos F2 sugiriendo un completo ligamiento con *LrSV2* mientras que los marcadores 31/37₁₅₀, 32/36₂₄₀, 34/44₃₃₀ y 46/45₂₇₅ estaban presentes solo en un individuo F2 susceptible (un recombinante). El marcador 31/42₁₀₀ estaba presente en este individuo y en uno adicional, posicionándolo más alejado del *LrSV2* (dos recombinantes).

En un segundo paso, el marcador de AFLP completamente asociado 40/42₃₂₅ y los dos marcadores que mostraban mejor resolución entre los cuatro que tenían un único recombinante con *LrSV2* (31/37₁₅₀ y 32/36₂₄₀) se probaron en 254 plantas susceptibles adicionales (343 en total). Además, estos individuos se genotiparon con el marcador SSR gwm533 previamente identificado como ligado al *LrSV2* (Ingala *et al* 2012).

Con el objeto de incorporar más marcadores, 55 marcadores adicionales reportados en la región subtelerómica del cromosoma 3BS fueron testeados en las líneas parentales. Veinte de ellos resultaron polimórficos y seis fueron seleccionados debido a su codominancia, diferencia alélica y la calidad de producto amplificado para ser evaluados en los 343 individuos F2 (Tabla R5).

En el mapa genético resultante, el AFLP 40/42₃₂₅ y el SSR cfb5010 cosegregaron con el gen *LrSV2*. Los marcadores flanqueantes más cercanos fueron cfb3417 a 1,2 cM distal y el cluster stm560tgag, stm559tgag y gwm533 a 0,4 cM proximal al gen *LrSV2* (Figura R6a).

Con el objeto de aumentar la resolución del mapa genético, se genotiparon los marcadores flanqueantes cfb3417, stm560tgag, stm559tgag, gwm533 y el marcador cosegregante cfb5010 en 965 individuos F2 susceptible adicionales (totalizando 1.308 Individuos F2, 2616 gametas, tabla R5). En este mapa de alta resolución, cfb3417 mapeó 1 cM distal a *LrSV2*, cfb5010 cosegregó con el gen y el grupo de marcadores formado por stm559tgag, stm560tgag y gwm533 mapeó a 0,3 cM proximal del mismo (Figura R6b).

Para obtener marcadores adicionales ligados al *locus LrSV2*, se aprovechó la información derivada del mapa físico del cromosoma 3B de la variedad Chinese Spring disponible en ese momento (Paux *et al* 2008; Rustenholz *et al* 2011). En este mapa, el marcador cfb3417 mapeaba en un contig de 820 kb mientras que el marcador gwm533 estaba en otro contig de 1.442 kb en el bin de delección 3BS8 - 0.78 - 0.87. Estos contigs estaban separados por dos contigs adicionales de 980 y 1552 kb (Paux *et al* 2008; Rustenholz *et al* 2011) lo que sugería que, si no existían grandes inserciones/delecciones en SV, el intervalo del *LrSV2* definido podría abarcar alrededor de 4,8 Mb. Treinta marcadores SSR adicionales

diseñados a partir de la secuencia de los clones de BACs de una genoteca del Chinese Spring que abarcan este intervalo físico (Choulet *et al* 2010) se evaluaron en busca de polimorfismo entre las líneas parentales, seleccionándose 8 marcadores (Tabla R6).

No amplificación	No polimórficos	Polimórficos	
		Dominante	Codominante
cfp40	barc102	barc75	cfb3417
cfp63	cfb3296	cfp68	cfb5010
cfp183	cfb3530	cfp140	stm559 _{tgag}
cfp1788	cfb4002	cfp3132	stm560 _{tgag}
cfp3061	cfb5038	cfp3484	stm598 _{tcac}
cfp3131	cfp37	stm538 _{acag}	sts32
mag1166	cfp41	sts142	sts49
mag2095	cfp42	sts138	sts55
mag3597	cfp54		sts189
stm22 _{tcac}	cfp55		wmc529
sts206	cfp132		wmc505
wmc69.1	cfp182		wms4181
wmc27.2	cfp1410		
	cfp3062		
	gpw7757		
	mag501		
	mag1367		
	stm742 _{tgag}		
	sts15		
	sts89		
	wmc11		
	wmc78		

Tabla R5: Resultado de la evaluación de polimorfismo de 55 marcadores moleculares testeados en las líneas parentales SV (R) y G6 (S). Los marcadores en fondo gris fueron seleccionados para el mapa fino por su codominancia, diferencia alélica y calidad del producto amplificado. Wms (Röder *et al* 1998), barc (Song *et al* 2005), wmc (Somers *et al* 2004), gpw (Sourdille *et al* 2004) y cfb (Paux *et al* 2006) son microsatelites. Cfp son ISBP (Insertion Site Based Polymorphism) (Paux *et al* 2006). Los sts (Single Tagged Site) son marcadores desarrollados a partir de ESTs (Expressed Sequence Tags) de trigo (Liu *et al* 2003). Los stm (Single Tagged Microsatellites) son marcadores derivados de microsatelites (Hayden *et al* 2006). Mag501 es un microsatelite derivado de un EST- y mag1166, 1367, 2095 y 3597 son marcadores desarrollados a partir de ESTs (Expressed Sequence Tags) de trigo (Xue *et al* 2008).

Además, se desarrolló un marcador SCAR a partir del marcador cosegregante de AFLP 40/42₃₂₅. La secuencia de la banda de AFLP fue homóloga a la posición 6.251793-6.251577 en el cromosoma 6B de CS V2.1. Los primers diseñados en esta secuencia

amplifican la banda esperada de 220 pb sólo en la línea parental resistente SV (SCAR40/42, Figura R7).

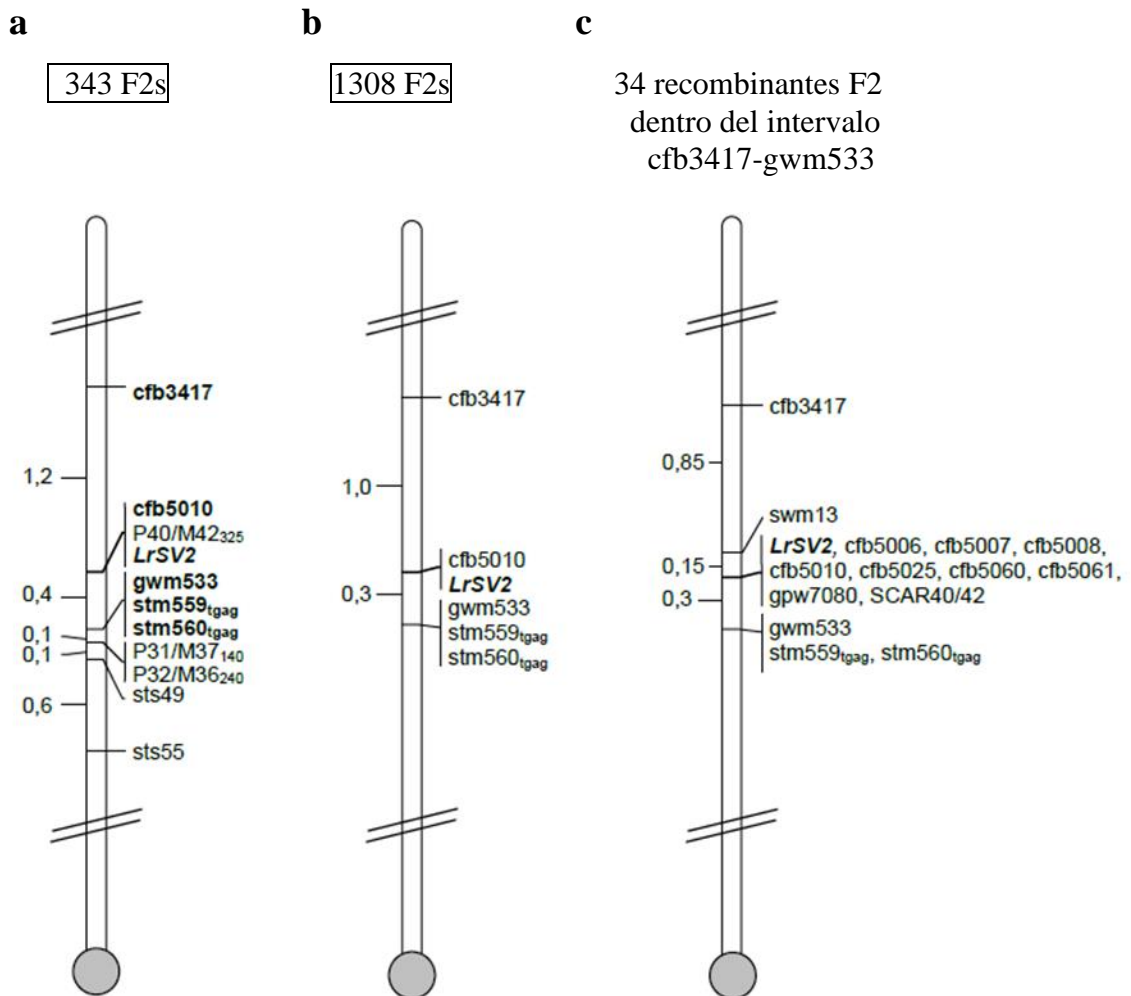


Figura R6: mapa genético del *locus* *LrSV2* en el extremo distal del cromosoma 3BS. **a** 343 F2s SV x G6. Los marcadores en negrita se analizaron en el total de la población de 1308 individuos. **b** 1308 F2s SV x G6. **c** Idem **b** con la adición de los marcadores derivados de las secuencias de los BACs testeados en los individuos recombinantes dentro del intervalo entre los marcadores *cfb3417* y *gwm533*. El círculo gris indica el centrómero. Las distancias genéticas (cM) se muestran en el lateral izquierdo. Las secuencias de los primers utilizados en estos mapas se describen en la Tabla A2 del anexo.

Estos marcadores fueron utilizados para genotipar los 34 recombinantes F2s identificados dentro del intervalo de interés (27 recombinantes entre *cfb3417* y *LrSV2* y 7 entre este último y el clúster que incluye a *gwm533*). Todos cosegregaron con el gen *LrSV2* y *cfb5010* mientras que el microsatélite *swm13* mapeó distal a 0,15 cM (Figura R6c), acotando el intervalo blanco. El total de eventos de recombinación detectados entre los marcadores flanqueantes *swm13* y *gwm533* fue 11, 4 recombinantes entre *swm13* y *LrSV2* y 7 entre *LrSV2* y el clúster de *gwm533*.

No amplification	Not polymorphic	Polymorphic		
		Dominant SV	Dominant G6	Codominant
cfb5000	cfb5001	cfb5008	cfb5011	cfb5006
cfb5002	cfb5016	cfb5025	cfb5013	cfb5007
cfb5009	cfb5022	gpw7080	cfb5015	cfb5060
cfb5012	cfb5024		cfb5019	cfb5061
cfb5014	cfb5056		cfb5023	swm13
cfb5021	cfb5058			
cfb5026	cfb5062			
cfb5057	cfb5063			
cfb5059				

Tabla R6: Resultados de la evaluación de polimorfismo de 30 marcadores moleculares testeados en las líneas parentales SV (R) y G6 (S). Los marcadores en fondo gris fueron seleccionados para ser testeados en los 34 recombinantes entre cfb3417 y el cluster gwm533 encontrados en la población de 1308 individuos F2s.

Se realizó prueba de progenie para la resistencia a la raza Ca02G1R a los 11 recombinantes F2 identificados entre swm13 y el clúster incluyendo gwm533. Todas las progenies F3 fueron susceptibles a roya en planta adulta y solo uno de los marcadores flanqueantes (swm13 o gwm533) segregó dentro de cada progenie F3. Por lo tanto, estos 11 individuos F2 eran homocigotas susceptibles para el gen *LrSV2* y heterocigotas para sólo uno de los marcadores flanqueantes (figura R8).

Estos resultados permiten concluir que el gen *LrSV2* está localizado en un intervalo genético de 0,45 cM entre los microsatélites flanqueantes swm13 y gwm533.

```

1  AGCCACACCCTCACCAGTGTGTCAGTGTGTGTGTCGTCTCCCAAACACAAAACATCATCTT
   SCAR40/42F
61  GGTAAGATAAGATGATGGTCACGATGGTGCCTGGCAGAACACGTAGGTGGGTGAGGTACC

121 TTCGGAAGTGCACGTCAATGATGCCCGCATTGCGAAGCTCGTCGTTGCGGCCGTCCTCGG

181 CCATGGCTCCAAAGGGTGTGCCGCTGAGGTGCGAAGTGGTAGGGAGAGACTGGATAGTAGT
   SCAR40/42R
241 TCATGTCCGTGATGATAACCGTCTCCGGCACACCGGAGCATGCAGGATGATCTGACT

```

Figura R7: Secuencia de la banda de AFLP P40/M42₁₂₅. Se subrayan los primers diseñados para amplificar SCAR40/42.

Con el objetivo de aumentar la resolución del mapa, los marcadores flanqueantes swm13 y gwm533 fueron utilizados para evaluar 2095 individuos F2 adicionales. Se identificaron 27 recombinantes adicionales. En resumen, en 3403 F2s, se identificaron 38 recombinantes entre estos marcadores.

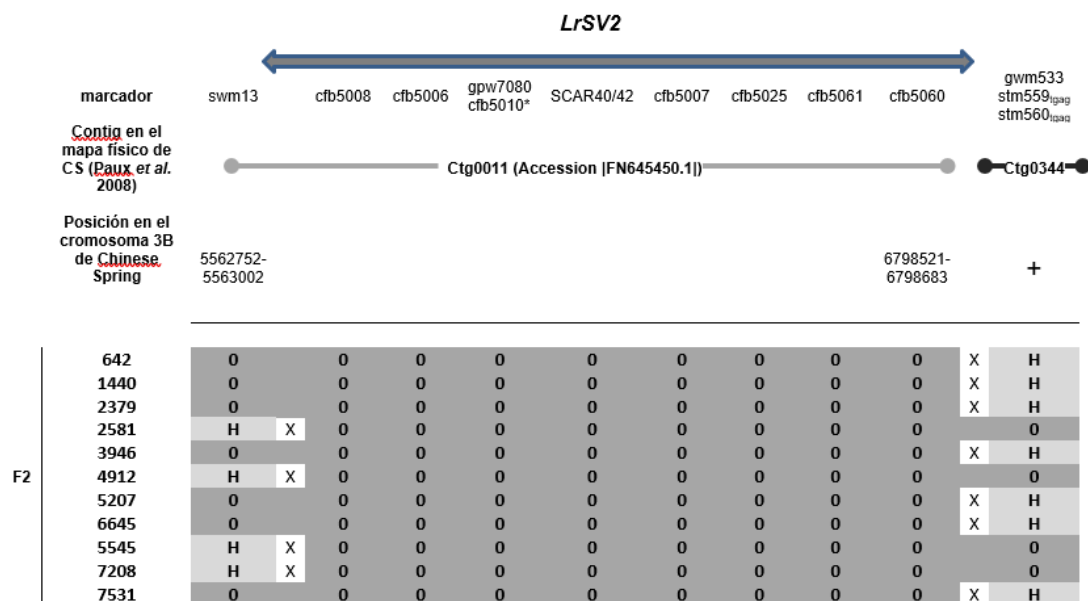


Figura R8: Matriz grafica de los genotipos de los 11 recombinantes F2 encontrados entre swm13 y gwm533. Debajo del marcador swm13 y cfb5060 se muestra su posición física en el cromosoma de Chinese Spring IWGSC RefSeq v2.1. + el marcador gwm533 no mapea en esta pseudomolécula, y fue posicionado de acuerdo con el contig344 (Paux *et al* 2008). El entrecruzamiento está marcado por una "x". **0**: genotipo susceptible G6, **H**: heterocigota. * Posición aproximada.

Por otro lado, se evaluó el polimorfismo de 27 marcadores moleculares reportados en el cromosoma 3BS distal y se desarrollaron 44 ISBPs nuevos mediante herramientas bioinformáticas utilizando los contigs de secuencia del cromosoma 3B de CS disponible. De estos 71 marcadores evaluados, 39 resultaron polimórficos entre los parentales (Tabla A1-anexo). Estos marcadores, junto con los 9 marcadores que cosegregaron con el gen *LrSV2* en el mapa de la Figura 1c, se utilizaron para determinar la posición del entrecruzamiento en los 38 recombinantes hallados entre los marcadores flanqueantes *swm13* y *gwm533*. Luego de la evaluación fenotípica de la progenie F3 de estos recombinantes mediante inoculación artificial en estadio de hoja bandera con la raza de roya Ca02G1R, que detecta la presencia del gen *LrSV2* en este cruzamiento, se deduce que el gen de resistencia *LrSV2* se encuentra dentro de un intervalo genético de 0.04 cM delimitado por los marcadores *cfp5311* y *cfb5060*. Estos marcadores definen un intervalo de 748 kb en la variedad CS (Figura R9). En este intervalo se han anotado con alta confianza 40 genes en la variedad CS (Tabla A5-anexo), entre los que se encuentran 4 kinasas y los genes *TFP* y *TPR* que resultaron necesarios para la resistencia a roya de la hoja (Wang *et al* 2024a) <http://wheatomics.sdau.edu.cn/>

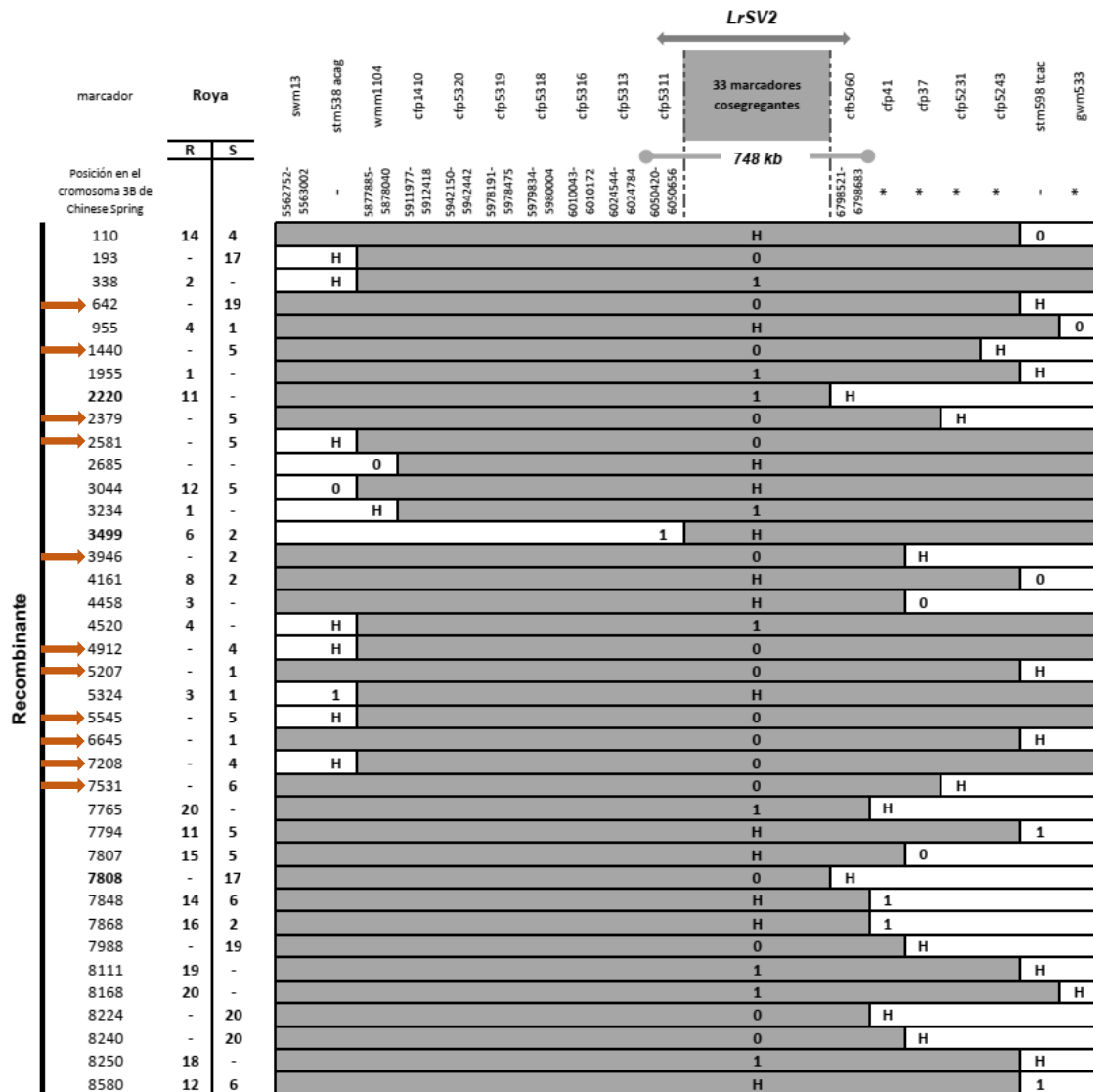


Figura R9: Tabla gráfica de genotipos de los 38 recombinantes F2 encontrados entre los marcadores swm13 y gw533. Se muestran las posiciones de los marcadores en el cromosoma 3B de Chinese Spring IWGSC RefSeq v2.1. * marcadores que no mapean en esta pseudomolécula, ordenados de acuerdo con el contig344 (Paux *et al* 2008). Los recombinantes para el mínimo intervalo que contienen al gen *LrSV2* se representan en negrita. **0** genotipo G6 (parental susceptible), **1** genotipo SV (parental resistente), **H** genotipo heterocigota. **Roya:** infecciones artificiales (F4 para el recombinante 642) con *P. triticina* raza Ca02G1R en planta adulta, **R** fenotipo resistente, **S** fenotipo susceptible. Las flechas rojas indican los 11 individuos recombinantes de la Figura 8. Las secuencias de los primers de los marcadores dentro del intervalo *LrSV2* (swm13-gwm533) se describen en la Tabla A3 (anexo).

b- Mutagénesis

Con el objeto de identificar mutantes susceptibles a la raza de roya Ca02G1R al estadio de planta adulta para la validación de posibles genes candidato para el *LrSV2*, se mutagenizaron semillas de SV con EMS. Este agente mutagénico produce mayormente mutaciones puntuales, lo que permite evitar deleciones que podrían involucrar a más de un gen candidato.

Se realizaron tres ensayos de dosimetría con distintas concentraciones del agente mutagénico buscando aquella dosis que produjese 50% de letalidad. En principio, se midió el porcentaje de germinación y se observó que este no disminuía aun con el tratamiento con 1% de EMS (Tabla R7).

	control	Dosis								
		0.2%	0.25%	0.3%	0.35%	0.6%	0.7%	0.8%	0.9%	1.0%
Dosimetría 1	90%	90%	96%	98%	98%	-	-	-	-	-
Dosimetría 2	100%	-	-	-	-	96%	100%	100%	-	-
Dosimetría 3	100%	-	-	-	-	-	100%	100%	88%	100%

Tabla R7: Porcentaje de germinación de cada dosimetría con las diferentes dosis de EMS

Sin embargo, en la tercera dosimetría se realizó una curva de tiempo de germinación y se pudo observar un retraso en la misma dependiente de la dosis a pesar de que luego de 2 semanas se lograba alcanzar el 100% de germinación (Tabla R8). Sin embargo, cuando se midió el porcentaje de fertilidad (plantas que alcanzan a formar espiga) se vio que el mismo fue afectado en forma proporcional a la dosis ya que la gran mayoría de las plantas tratadas con 0,9% y 1 % no continuaban su desarrollo más allá de la 3-4 hoja (Tabla R8). Con las dosis 0,7% y 0,8% se pudo observar que el crecimiento de las plantas era más lento (Figura R10). Finalmente, con la dosis de EMS 0,8% se observó un 44% de fertilidad y esta dosis fue elegida para desarrollar la población mutante M2.

Se sembraron en invernáculo las semillas M1 tratadas con 0,8% EMS y se cosechó su progenie M2 por espiga tapada.

Entre 6 y 12 semillas de cada familia M2 se sembraron en invernáculo junto a los parentales SV y G6 como controles de resistencia y susceptibilidad, respectivamente. En el estadio de planta adulta (5ta hoja) se inocularon artificialmente con la raza de roya Ca02G1R que identifica al gen *LrSV2* para detectar mutantes susceptibles.

De 849 familias M2, se identificaron 45 familias con una o dos plantas con algunas pústulas aisladas, potenciales candidatas susceptibles. Se obtuvo progenie M3 de 7 de estas plantas candidatas provenientes de seis familias M2.

Tratamiento	Semillas germinadas				Plantas con espiga	% fertilidad
	7 dps	8 dps	9 dps	14 dps		
Control	24	25	25	25	25	100
0.7%	1	13	22	25	18	72
0.8%	1	9	18	25	11	44
0.9%	0	1	1	22	3	14
1%	0	2	6	25	2	8

Tabla R8: Dosimetría 3 donde se indica la cantidad de semillas germinadas por tratamiento y % de fertilidad.

dps: días post siembra.

Esta progenie M3 fue sembrada e inoculada con la raza de roya Ca02G1R en el estadio de planta adulta. Tres candidatas provenientes de dos familias M2 fueron confirmadas ya que su progenie resulto toda susceptible (E315-S1/2 y E692-S).

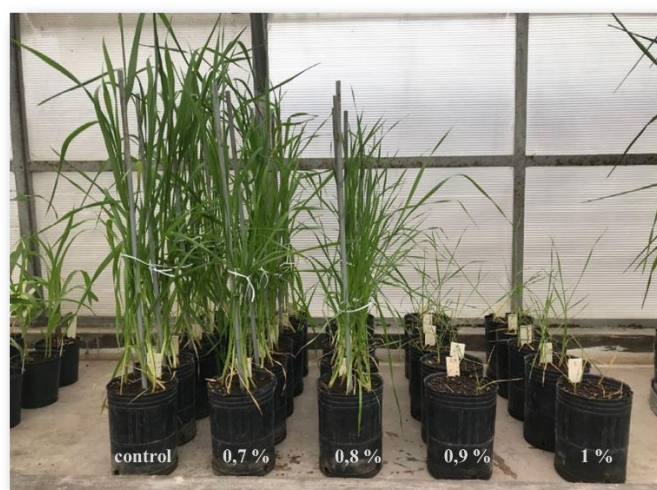


Figura R10: Dosimetría 3. Plantas tratadas con las dosis indicadas de EMS.

Semilla M2 hermana de las 39 plantas candidatas que no habían dado progenie se sembró e inoculó. En una de las familias se detectaron dos plantas susceptibles, una de las cuales dio una semilla M3 que originó una planta susceptible al ser inoculada en planta adulta. Dentro del pool de plantas resistentes de esta misma familia, se detectaron otras dos plantas susceptibles, confirmando la presencia de una mutación recesiva dentro de la familia.

En resumen, se pudieron identificar tres mutantes provenientes de al menos dos eventos independientes susceptibles a la raza Ca02G1R en planta adulta a partir del análisis de 849 familias M2 del cultivar SV mutagenizado con EMS. Estas mutantes serán útiles para la validación de genes postulados como responsables del fenotipo de resistencia.

c- Cruzamientos

La línea experimental G6 y la variedad P son susceptibles a la raza Ca02G1R al estadio de planta adulta, pero G6 porta un alelo funcional del *LrcSV2* en el 4BL y P es portadora de un alelo funcional del *LrSV2* en el 3BS (Dieguez *et al* 2018).

Con el objeto de evaluar la presencia de ambos genes en distintos germoplasmas se realizaron cruzamientos de diferentes variedades por G6 y P. La progenie F1 de todos los cruzamientos fue inoculada junto a las variedades parentales al estadio de plántula y planta adulta con la raza Ca02G1R (Tabla R9). Se testearon líneas diferenciales que son el producto de la introgresión en la variedad Thatcher (Tc) de genes de resistencia individuales que ya han sido identificados. También fueron testeados varios genotipos para los cuales existen protocolos de transformación genética para poder utilizarlos en la validación de genes candidato.

Por otro lado, la variedad CS que se mostró resistente al estadio de planta adulta, es también portadora del gen *Lr34* (McIntosh *et al* 1995, Kratinger *et al* 2009) y la línea diferencial Tc+*Lr34* muestra resistencia en planta adulta (Sacco, comunicación personal). Con el objeto de determinar si la resistencia observada en CS se debía a la presencia del *Lr34* en el 7DS, se testeó también la línea nulitetrasómica N7DT7B (nulisómica para 7D y tetrasómica para 7B).

La línea N7DT7B mostro un fenotipo susceptible en planta adulta, apoyando la hipótesis de que la resistencia observada en CS es debida a la presencia del *Lr34*.

La línea N7DT7B tampoco muestra resistencia al ser cruzada por G6 y P. Esto permite en principio descartar que CS posea alelos activos del *LrSV2* y del *LrcSV2*, respectivamente.

A su vez, considerando que CS es portadora del *Lr31*, el gen complementario del *Lr27* para ASR (McIntosh *et al* 1995), el hecho de que la F1 entre N7DT7B y P sea susceptible permite postular que el *Lr31* no actúa como complementario del alelo del *LrSV2* de P.

Variedad/cruzamiento	plántula	Planta adulta
SV	S	R
G6	S	S
P	S	S
G6 x P	S	R
CS	S	R
Tc+ <i>Lr34</i>	S	R
N7DT7B	S	S
N7DT7B x SV	S	R
N7DT7B x G6	S	S
N7DT7B x P	S	S
Tc	S	S
Tc x G6	S	R
Tc+ <i>Lr12</i>	S	R
Bobwhite	S	S
Bobwhite x G6	S	R
Bobwhite x P	S	S
Bobwhite 26	S	S
Bobwhite 26 x G6	S	R
Bobwhite 26 x P	S	S
Bobwhite 56	S	S
Bobwhite 56 x G6	S	R
Bobwhite 56 x P	S	S
ProINTA Federal	S	S
ProINTA Federal x G6	S	R
ProINTA Federal x P	S	S
Westonia	S	S
Westonia x G6	S	S
Westonia x P	S	S
Fielder	S	S
Fielder x G6	S	S
Fielder x P	S	S

tabla R9: Fenotipo de reacción a la raza Ca02G1R de los cultivares y cruzamientos indicados.

Por otro lado, si bien Tc es susceptible en planta adulta, al cruzarla por G6 se observa resistencia. Esto permite hipotetizar que Thatcher es portadora de un alelo activo del *LrSV2* que se complementa con el *LrcSV2* de G6. El hecho de que la línea Tc+*Lr12* también presente resistencia en planta adulta podría entonces explicarse por la presencia de un alelo activo del *LrSV2* en Tc que puede ser complementado por *Lr12*.

Esto mismo ocurre con las variedades Bobwhite, Bobwhite 26, Bobwhite 56 y ProINTA Federal que son genotipos utilizados para las transformaciones por biolística en nuestro instituto y que son susceptibles a Ca02G1R en planta adulta, pero presentan resistencia al ser cruzadas por G6. Sin embargo, las variedades Westonia y Fielder, utilizadas para transformación con *Agrobacterium*, son susceptibles y la F1 del cruzamiento por G6 y por P también es susceptible lo que permite postular que no portan ninguno de los genes del par complementario *LrSV2* y *LrcSV2*.

En resumen, el gen *Lr3* fue ubicado en un mapa de alta resolución de 1153 F2s a 1,5 cM de los marcadores AFLP 33/36₃₂₅ y 46/42₃₁₀. El desarrollo de marcadores SCAR a partir de uno de ellos y del marcador 34/32₁₉₀ que había sido ubicado previamente en el bin de delección terminal del cromosoma 6BL (Dieguez *et al* 2006) y de un marcador ISBP a partir del AFLP 36/39₁₇₅ que había mapeado distal al *Lr3* (Dieguez *et al* 2006), permitió la construcción de un mapa de mediana resolución (202 RILs) que delimita un intervalo genético de 6,9 cM conteniendo al gen *Lr3*. Este intervalo corresponde aproximadamente a 2Mb en la variedad CS.

En cuanto al gen *LrSV2*, el análisis de 3403 individuos F2 permitió definir un intervalo genético de 0.04 cM alrededor del gen que corresponden a 748 kb en la variedad CS.

Además, se aislaron mutantes susceptibles para la postulación de genes candidato para el *LrSV2* y se evaluó la presencia de este y de su gen complementario *LrcSV2* en el cromosoma 4BL (Dieguez *et al* 2018) en distintos germoplasmas utilizados en los protocolos de transformación genética con el objeto de poder realizar la validación mediante su introducción.

DISCUSIÓN

La disponibilidad de mapas genéticos a distintos niveles (genómico, cromosómico, región cromosómica, etc.) y los mapas físicos, permiten posicionar los genes y marcadores ligados a los mismos en los cromosomas. Esto facilita las tareas de introgresión de genes de interés, el seguimiento de estos en las poblaciones segregantes y el clonado posicional, entre otras. Los marcadores ideales son aquellos basados en la propia secuencia de los genes y, por lo tanto, es necesario conocerla para diseñarlos. Además, las Nuevas Técnicas de Mejoramiento (NBTs: New Breeding Techniques) permiten la edición de alelos susceptibles, para lo cual también es necesaria la identificación de la secuencia responsable del fenotipo.

Para realizar estos estudios genéticos detallados de regiones específicas del genoma, debería disponerse de mapas saturados de alta resolución o mapas finos. Este requiere del análisis de un número elevado de individuos en una población proveniente del cruzamiento entre una línea portadora de el o los gen/es de interés y una línea de fenotipo contrastante. En trigo estas poblaciones son generalmente de más de 2000 productos de meiosis. El empleo de una población F2 resulta adecuado para la confección de estos mapas ya que es metodológicamente sencilla de realizar y se pueden obtener miles de individuos en un corto período. Es posible también el uso de poblaciones de RILs para estos mapas, ya que presentan la ventaja de la perdurabilidad en el tiempo y la homocigocidad de sus líneas lo cual posibilita el mapeo de marcadores dominantes como los AFLPs y la evaluación fenotípica en diferentes localidades y años. Sin embargo, la confección de una población de RILs de miles de individuos resulta no solo mucho más compleja y laboriosa, sino que requiere de al menos ocho generaciones para alcanzar una homocigocidad teórica del 99.2%.

En este trabajo, se utilizó la misma población F2 del cruzamiento entre Sinvalocho MA, variedad portadora de los genes de resistencia ASR *Lr3* y APR *LrSV2* y una línea experimental de fenotipo contrastante Gama 6 para realizar los mapas finos de ambos genes. Esta población fue infectada al estadio de plántula y planta adulta con las razas de roya que habían sido utilizadas para identificar estos genes en una población de RILs derivada del mismo cruzamiento (Ingala *et al* 2012). En el análisis fenotípico de esta población F2 en plántula para el gen *Lr3* con la raza 66 de *P. triticina*, la relación

resistentes/susceptibles ajustó a la proporción 1:3 esperada para un gen recesivo ($p > 0.2$). Por otra parte, para el gen *LrSV2* en el análisis fenotípico en planta adulta con la raza Ca02G1R, la relación resistentes:susceptibles no ajustó a la proporción 3:1 esperada para un gen dominante ($p < 0.001$) sino que hubo un exceso de plantas resistentes (tabla R1). Esto último podría deberse a que probablemente al tratarse de plantas de mayor porte, el inoculo no alcanzó a todos los individuos en forma uniforme. Por lo tanto, varios individuos podrían haber escapado a la infección y haber sido clasificados erróneamente como resistentes. Por esta razón, se aplicó un criterio muy conservador y las plantas que no mostraban síntomas claros de infección o fenotipos anómalos se eliminaron del análisis.

La evaluación de reacción a roya en la población F2 se hizo identificando a los 94 granos F1 de los cuales provenían. Esto permitió eliminar del análisis a la progenie proveniente de un grano F1, ya que toda la progenie F2 obtenidos a partir de este individuo resultó susceptibles a la raza 66 en plántula. Sin embargo, en la evaluación del gen *LrSV2* en planta adulta de esta progenie segregó en proporción 3R:1S, por lo que se descarta una autofecundación. Esta observación podría deberse a una delección somática en uno de los homólogos del cromosoma 6BL que involucraría al gen *Lr3*, originando la susceptibilidad en toda la progenie (Sacco *et al* 1995).

La búsqueda de marcadores moleculares asociados a ambos genes se inició utilizando marcadores tipo AFLPs (Vos *et al* 1995). Dentro de los marcadores moleculares, la técnica de AFLPs es una herramienta muy efectiva para revelar polimorfismos debido a la gran cantidad de fragmentos que se resuelven por electroforesis (alrededor de 50 por combinación de primers). Estos marcadores no requieren de conocimiento previo de secuencia de ADN, pero, a diferencia de los RAPDs (Random Amplified Polymorphic DNA, Caetano-Anollés and Gresshoff. 1997), son muy robustos ya que involucran una restricción con enzimas específicas y para la amplificación se utilizan oligonucleótidos más largos y 100% homólogos a los adaptadores que se ligaron en los extremos, aumentando la especificidad de la reacción. Una desventaja es que esta técnica no permite la detección de individuos heterocigotas. Sin embargo, para resolver esta limitación, es posible utilizar una parte de la población F2 para buscar los potenciales recombinantes con marcadores dominantes, en particular si se trata de un solo gen con herencia mendeliana simple. Para ello, se seleccionan los individuos homocigotas recesivos para

cada uno de los genes donde es posible inferir inequívocamente el genotipo para el gen de resistencia a partir del fenotipo de reacción a roya.

Teniendo en cuenta que el gen *Lr3* confiere resistencia recesiva, se utilizó el cuarto homocigota recesivo de la F2 (resistente). Al utilizarse marcadores dominantes, fue necesario seleccionar aquellos en fase de repulsión con la resistencia de manera de poder identificar los potenciales recombinantes por presencia de bandas entre los homocigotas recesivos resistentes.

Los marcadores de AFLPs flanqueantes al gen *Lr3* hallados previamente mediante el empleo de líneas con deleciones (Diéguez MJ *et al* 2006) se encuentran en fase de acoplamiento con la resistencia por lo que no serían útiles para la estrategia planteada más arriba. Solo el marcador P46/M42₃₁₀ hallado en dicho trabajo pudo ser utilizado ya que provenía del parental susceptible y se encontraba en repulsión con la resistencia debida al gen *Lr3*.

Para el caso del *LrSV2* que confiere resistencia dominante, se utilizó el cuarto homocigota recesivo de la población F2 (susceptible). En este caso, al utilizarse marcadores dominantes, fue necesario seleccionar aquellos en fase de acoplamiento con la resistencia de manera de poder identificar los potenciales recombinantes por presencia de bandas entre los homocigotas recesivos susceptibles.

Los marcadores de AFLPs posicionados físicamente mediante el empleo de líneas con deleciones en el cromosoma 6BL habían mostrado una distribución heterogénea con una mayor cantidad en el extremo distal (Diéguez *et al* 2006) y se hipotetizó que esto podría estar relacionado con las enzimas de restricción utilizadas en la técnica de AFLPs, ya que algunas, como la *PstI* utilizada en este estudio, son sensibles a citosinas metiladas provocando una menor frecuencia de corte en determinadas regiones del ADN (Nelson y McClelland, 1988). Las regiones pericentroméricas de los cromosomas vegetales poseen una mayor frecuencia de citosinas metiladas (Boris F *et al* 2011), lo que explicaría que la enzima *PstI*, produzca una mayor cantidad de cortes en los extremos distales de los cromosomas, generando de esta manera un número mayor de marcadores en esas regiones, lo cual resulta ventajoso para el análisis propuesto debido a la posición distal de ambos genes.

Adicionalmente, la técnica de comparación de pools o análisis de bloques segregantes (Bulk Segregant Analysis, Michelmore *et al* 1991) permitió que en cuatro calles de

corrida electroforética se analizaran simultáneamente 50 *loci* para la búsqueda de marcadores ligados a los genes de interés. Para ello, se comparó la segregación de marcadores de AFLP generados a partir de pools de individuos homocigotas para cada alternativa del carácter de interés (RILs resistentes y susceptibles para cada gen identificado). Estos marcadores segregarán al azar cuando no estén asociados a la región genómica que determina el carácter. A medida que se localicen marcadores cercanos comenzarán a heredarse con un cierto grado de ligamiento, que será más intenso cuando no exista recombinación entre los mismos. Aquellos marcadores que resulten polimórficos y que estén exclusivamente en un grupo u otro estarán asociados al carácter de interés.

La experiencia en nuestro laboratorio nos permitió poner a punto esta metodología, llegándose a la conclusión que testando al menos 100 combinaciones de primers de AFLPs, se pueden detectar al menos entre 1 y 2 marcadores asociados a genes de interés en trigo. El análisis de BSA utilizando por lo menos 12 individuos de familias homocigotas resistentes y 12 familias homocigotas susceptibles para cada gen identificado permitió hallar marcadores moleculares (AFLPs y SSRs) ligados a los genes *Lr3*, *LrSV1* y *LrSV2* de resistencia a roya de la hoja en Sinvalocho (Ingala L *et al* 2005). Esta misma estrategia se utilizó para los genes *Lr3*, *Lr16*, *Lr17* y *LrBMP1* en Buck Manantial (Altieri *et al* 2008) y *Lr10*, *Lr11* y *LrBP3* en Buck Poncho (Darino *et al* 2015).

En el presente trabajo, mediante este tipo de análisis fue posible identificar 20 y 5 marcadores de AFLP ligados a los genes *Lr3* y *LrSV2*, respectivamente.

La generación F3 de cada uno de los recombinantes hallados en la población F2 utilizada para desarrollar el mapa fino del gen *Lr3* fue inoculada al estadio de plántula, y todos resultaron resistentes a la raza 66 en plántula, confirmando el genotipo homocigota recesivo de este gen en dichos individuos F2 recombinantes. La segregación de la banda del marcador 37/44₁₆₀ solo fue testada en los primeros 2 recombinantes hallados y para el recombinante 131 pudo confirmarse la heterocigosis ($p > 0.8$). En el caso del recombinante 59, el número de individuos de la progenie fue pequeño y esta puede ser la causa de que no se observaran individuos F3 sin la banda. Se debe tener en cuenta que el tamaño mínimo que debe tener la descendencia para tener una probabilidad del 95 % de detectar la heterocigosis es de 11 individuos y que, con el análisis de sólo 6 individuos, esta probabilidad baja al 82 %.

En el caso del gen *LrSV2*, se realizaron pruebas de progenie para las once plantas F2 recombinantes identificadas entre los marcadores flanqueantes *swm13* y *gwm533* (Figura R8). Todas las plantas de la progenie F3 fueron susceptibles a la roya y uno u otro marcador flanqueante (*swm13* o *gwm533*) mostraba segregación dentro de cada progenie F3. Por lo tanto, todas estas plantas F2 eran homocigotas susceptibles al gen *LrSV2* y heterocigotas para solo uno de los marcadores flanqueantes y, por lo tanto, eran verdaderas recombinantes. Se espera que estos recombinantes F2 sean producto de la unión entre una gameta recombinante y una parental ya que se descarta la posibilidad de unión de dos gametas recombinantes debido a la baja probabilidad de ocurrencia de cada una de ellas ($1.76E-5$). A su vez, la progenie F3 de los 27 recombinantes restantes identificados entre *swm13* y *gwm533* fue inoculada para determinar el genotipo del gen de resistencia en el individuo F2 y siempre se observó que el mismo coincidía con los marcadores presentes a uno u otro lado del punto de recombinación (Figura R9).

El análisis por etapas resulto muy ventajoso para eficientizar el uso de recursos. En el caso del *Lr3*, se inició con el análisis de 195 individuos F2 y se pudo descartar un marcador no ligado y detectar dos recombinantes sobre los que se evaluaron el resto de los marcadores. Como resultado, se identificó un cluster de 4 marcadores a 0.5 cM del gen. Dos de estos marcadores fueron seleccionados para confeccionar un mapa de alta resolución de más de 1000 individuos F2 segregantes y no pudieron resolverse.

Con el objeto de desarrollar marcadores metodológicamente más sencillos, las bandas de AFLP ligadas física o genéticamente al gen fueron reamplificadas a partir del gel y secuenciadas. No se observaron SNPs en las 9 bandas presentes en ambos parentales que pudieron ser reamplificadas pero se desarrollaron dos marcadores de tipo SCAR sobre una de las bandas presentes en SV (SCAR34/32) y la banda dominante gama6 (SCAR46/42). Los SCARs representan *loci* únicos, genéticamente definidos, que se identifican mediante amplificación por PCR usando primers específicos (Paran y Michelmore 1993). Estos marcadores pueden retener el comportamiento de segregación dominante del marcador que lo originó, o ser convertidos en marcadores codominantes (Weising *et al* 1995). Ambos SCAR resultaron polimórficos ya que solo se obtuvo amplificación en el parental donde estaba presente la banda de AFLP.

El marcador AFLP 36/39₁₇₅ había mapeado distal al *Lr3* (Dieguez *et al* 2006) y si bien no se pudo desarrollar un marcador SCAR a partir de la secuencia de la banda de este

marcador, la misma fue utilizada para buscar secuencias homologas en contigs del cromosoma 6BL de la variedad CS de la base de datos local del centro The Genome Analysis Centre (TGAC, hoy Earlham Institute <https://www.earlham.ac.uk/>). Se identifico un contig de secuencia de 3262 pb y sobre esta se diseñó un marcador tipo ISBP (Insertion Site-Based Polymorphisms) denominado fsp1 que resultó dominante SV.

Estos tres nuevos marcadores diseñados (SCAR46/42, SCAR34/32 y fsp1) fueron genotipados en una población de 202 RILs del cruzamiento de SV x G6 y se obtuvo un mapa de ligamiento donde el SCAR46/42 se ubicó a 4,0 cM proximal del gen *Lr3* y los marcadores SCAR34/32 y fsp1 se encuentran distales del *Lr3* a 2,9 y 8,7 cM respectivamente (Figura R5). El SCAR46/42 y el fsp1 derivan de dos AFLPs que mapeaban proximal y distalmente al *Lr3*, respectivamente, en una población de 60 RILs del mismo cruzamiento (Dieguez *et al* 2006). Por el contrario, el SCAR34/32 deriva de un AFLP que mapeaba proximal al gen en esta población. Sin embargo, es posible que estos resultados contrarios se deban al bajo número de individuos de la 1er población testada. El análisis de un mayor número de individuos arroja resultados más robustos.

De esta manera el gen *Lr3* quedó delimitado en un intervalo de 6,9 cM flanqueado por dos marcadores tipo SCAR, metodológicamente más sencillos que los marcadores de AFLPs. Este intervalo corresponde aproximadamente a 2 Mb en la variedad CS. En este intervalo se anotaron 57 genes, entre ellos numerosos genes con homología a genes de resistencia (Tabla A4-anexo). Esto podría deberse a que el *locus Lr3* es complejo que posee al menos tres alelos o genes estrechamente ligados que se diferencian por sus distintas respuestas a una colección de razas *P. triticina* (*Lr3a Lr3bg* y *Lr3ka*) (McIntosh *et al* 1995). En *T. durum* mapearon 2 genes de resistencia a la roya de la hoja en el cromosoma 6BL uno de los cuales se identificó como *Lr3* usando el marcador cosegregante xmwg798, previamente identificado (Herrera-Foessel S *et al* 2007).

El mapeo del *LrSV2* también se realizó por etapas ya que inicialmente en un mapa de mediana resolución de 343 individuos F2 se identificaron marcadores codominantes cercanos, robustos y confiables a ambos lados del gen (Figura R6a) y los marcadores más cercanos se evaluaron luego en un total de 1308 individuos F2.

La identificación de nuevos recombinantes dentro una región determinada del genoma puede llevarse a cabo si se dispone de un intervalo confiable flanqueado por marcadores robustos que permitan evaluar nuevos individuos en una población F2. A su vez, los

marcadores flanqueantes pueden ser reemplazados por otros más cercanos cuando se van identificando nuevos marcadores en el intervalo blanco (Dabove 2023). Analizando solo los 34 recombinantes entre los marcadores flanqueantes *cfb3417* y *gwm533* se pudo identificar al marcador *swm13* que permitió acotar en 0,85 cM el intervalo (Figura R6c) y reemplazo a *cfb3417* como marcador flanqueante proximal en el análisis de 2095 individuos F2 adicionales (Figura R9).

Finalmente, se identificaron 38 recombinantes entre *swm13* y *gwm533* y mediante la determinación del punto de recombinación en cada uno de ellos, el gen de resistencia *LrSV2* fue acotado dentro de un intervalo genético de 0.04 cM delimitado por los marcadores *cfp5311* y *cfb5060* que corresponden a 748 kb en la variedad CS. 40 genes con alta confianza fueron anotados dentro de este intervalo en CS. Esto contrasta con los 16 genes que fueron anotados en el intervalo de 1,57 Mb del 4BL donde mapea el gen *LrcSV2*, esto demuestra que existe mucha variabilidad en la densidad génica en trigo. El orden de los marcadores en el cromosoma 3B analizados en el cruzamiento Sinvalocho MA × Gama6 fue similar al de los mapas publicados construidos a partir de otros cruzamientos (Liu y Anderson 2003), al mapa físico de Chinese Spring (Paux *et al* 2008) y al reportado en la variedad Hope (Mago *et al* 2011, Dieguez *et al* 2011).

La disponibilidad de marcadores moleculares polimórficos es otro insumo imprescindible para el mapeo de alta resolución, aunque en trigo el bajo nivel de variabilidad en el germoplasma es bien conocido. En el presente trabajo, se comenzó con la utilización de marcadores anónimos como los AFLP, pero se aprovecharon los recursos genómicos públicos disponibles en cada punto temporal del desarrollo del presente trabajo: marcadores de bibliografía, marcadores de los contigs del mapa físico del cromosoma 3B del cultivar de referencia CS y desarrollo de nuevos marcadores a partir de la secuencia disponible (Choulet *et al* 2010) y finalmente la secuencia completa del genoma de esta variedad modelo de trigo (IWGSC 2018).

La secuenciación del genoma de trigo se inició con la construcción de genotecas de BACs de cromosomas aislados mediante citometría de flujo, su ordenamiento en mapas físicos y la secuenciación de cada BAC. El 3B es el más grande de los cromosomas de trigo y fue el primero en aislarse. Por ello, la disponibilidad de marcadores y de información de secuencia para desarrollarlos para este cromosoma hizo que el mapeo del gen *LrSV2*

avanzara mucho más rápido y se priorizo a la búsqueda de marcadores para el *Lr3*. Se construyó una biblioteca de BACs del cromosoma 3B (Safar *et al* 2004) y se generaron aproximadamente 19.400 secuencias de BES, que representan una longitud acumulada de casi 11 Mb, el 1,1 % de la longitud del cromosoma, lo que permitió el desarrollo de marcadores específicos del cromosoma (Paux *et al* 2006). Además, se puso a disposición un mapa físico del cromosoma 3B del trigo (Paux *et al* 2008; Rustenholz *et al* 2011) y varias megabases fueron secuenciadas por Choulet *et al* (2010) en un proyecto piloto de secuenciación destinado a obtener información sobre la composición de contigs de tamaño en Mb del cromosoma 3B.

A su vez, el acceso a los contigs de secuencia del cromosoma 6B de la base de datos local del centro The Genome Analysis Centre (TGAC, hoy Earlham Institute <https://www.earlham.ac.uk/>) también permitió el desarrollo de un marcador ISBP a partir de un contig homólogo al AFLP 36/39₁₇₅.

El gen *Lr3* fue ubicado en el bin distal del 6BL mediante el empleo de líneas con deleciones derivadas de Sinvalocho (Dieguez *et al* 2006) y el marcador flanqueante del *LrSV2* swm13 mapeó físicamente en el bin de deleción subtelo mérico (3BS8-0.78-0.87) del cromosoma 3BS en la variedad Chinese Spring (Saintenac *et al* 2009). Una característica importante de la organización del genoma del trigo es que la densidad génica y las tasas de recombinación aumentan con la distancia al centrómero, con tasas de recombinación medias que oscilan entre 0,06 y 0,87 cM/Mb para los intervalos proximal y distal, respectivamente (Gill *et al* 1993; Lukaszewski y Curtis 1993; Akhunov *et al* 2003). Un estudio detallado de la recombinación a lo largo del cromosoma 3B en los cruzamientos Chinese Spring × Renan y Chinese Spring × Courtot (Saintenac *et al* 2009) mostró que el bin de deleción 3BS8- 0,78-0,87 tiene la frecuencia de cruzamiento más alta dentro de este cromosoma, con un promedio de 0,85 cM/Mb. La distribución de eventos de cruzamiento puede no ser homogénea en todo el bin de deleción y, de hecho, se han informado zonas activas de recombinación en esta región (Saintenac *et al* 2011). Una posible causa de la reducción en la recombinación podría ser la presencia de grandes inserciones/deleciones entre las líneas parentales, ya que el genoma del trigo tiene una alta capacidad para tolerar reordenamientos debido a su poliploidía. De hecho, al secuenciar 357 kb de este contig, (Breen *et al* 2010) informaron que el cultivar Hope carece de un inserto de genoma de ADN mitocondrial de 51.666 pb que aún se encuentra

en Chinese Spring. Además, debe notarse que en nuestro trabajo la frecuencia de recombinación puede estar subestimada por algunos recombinantes putativos sin descendencia F3, en los que la segregación de la reacción a roya y marcadores no pudo confirmarse mediante pruebas de progenie y fueron eliminados de la población de mapeo. Esto introdujo un sesgo hacia un menor número de recombinantes, lo que posteriormente produjo distancias genéticas más cortas.

Al comparar los mapas genéticos del *locus LrSV2* construidos con 343 y 1.308 individuos F2, observamos distancias genéticas muy similares, lo que sugiere que los mapas de resolución baja o media son suficientes para definir un intervalo genético confiable que abarque el gen objetivo e identificar marcadores flanqueantes en una región con altas tasas de recombinación, como el bin 3BS8-0,78-0,87.

Una vez que se establece un intervalo confiable, los marcadores flanqueantes se pueden utilizar para genotipar una población más grande para identificar nuevos recombinantes dentro de la región. La genotipificación de marcadores adicionales dentro del intervalo resolvería todos los puntos de corte de recombinación hasta que el gen se restrinja a una pequeña región que permita el establecimiento de un contig físico de clones BAC que contengan los marcadores flanqueantes. El número de recombinantes que necesitarán genotiparse se correlaciona con la distancia genética entre los marcadores flanqueantes. Por lo tanto, la determinación de un intervalo genético pequeño y preciso es invaluable para la aceleración de un proyecto de clonado posicional. Cuanto más pequeño sea el intervalo blanco, menor será el esfuerzo de secuenciación y el número de ORFs (Open Reading Frames o marcos de lectura abiertos) candidatos a ser validados como responsables del fenotipo estudiado. Esta estrategia se llevó a cabo con éxito para el clonado posicional (basado en la posición en un mapa genético de los genes de resistencia a roya de la hoja *Lr1*, *Lr10*, *Lr21* y *Lr34* en los que se definieron intervalos de 0.8, 0.13, 1.7 y 0.15 cM, respectivamente (Cloutier *et al* 2007; Feuillet *et al* 2003; Huang *et al* 2003; Krattinger *et al* 2009). Estos autores utilizaron marcadores desarrollados a partir de ancestros del trigo o especies relacionadas (Stein *et al* 2000; Ling *et al* 2003; Huang *et al* 2003; Krattinger *et al* 2009). En el presente trabajo, pudimos desarrollar un mapa fino del gen *LrSV2* aprovechando la secuencia disponible de las secuencias del extremo BAC (Paux *et al* 2006, 2008) y de la secuencia completa de contigs del mapa físico del cromosoma 3B del cultivar de referencia Chinese Spring (Choulet *et al* 2010). El clonado de los genes *Lr34* y *Lr1* permitió estimar razones de distancia genética/física de 0,4 y 19

cM/Mb, respectivamente (Cloutier *et al* 2007; Krattinger *et al* 2009). Esta diferencia en la frecuencia de recombinación entre ambas regiones podría atribuirse a la distribución desigual de las zonas activas de recombinación que ocurren principalmente cerca o dentro de los genes (Saintenac *et al* 2011) e impide extrapolaciones más allá de los intervalos genéticos razonables que deberían definirse antes de un intento de clonado posicional en trigo.

Sin embargo, debe notarse que este no es el intervalo *LrSV2* completo y que Chinese Spring no porta *LrSV2* y, por lo tanto, será esencial obtener la secuencia del cultivar resistente Sinvalochi MA. La estrategia de clonación basada en mapas debe realizarse junto con una caracterización detallada del haplotipo de las regiones de la secuencia objetivo, ya que el reordenamiento puede haber ocurrido en *loci* homólogos entre diferentes variedades.

Los marcadores ISBP (Insertion Site-Based polymorphisms) permiten detectar polimorfismos de presencia/ausencia mediante electroforesis en gel. Sin embargo, el alto nivel de metilación de los elementos transponibles (TEs) conduce a un aumento en la frecuencia de mutación en sitios deaminados (Clark *et al* 2005, Rabinowicz *et al* 2005) resultando en una frecuencia de polimorfismos de un solo nucleótido (SNP) de uno cada 99 bases (Paux *et al* 2010). Por lo tanto, en los casos en los que el marcador ISBP se amplifica en ambos progenitores, aún es posible detectar SNPs mediante secuenciación o mediante análisis HRM (Paux *et al* 2010). Mediante la secuenciación de los marcadores cfp41 y cfp1410 (previamente reportados como no polimórficos en el cruzamiento SV × G6 por Diéguez *et al* 2014) y cfp5304, cfp5311, cfp5313, cfp5318, cfp5319, cfp5355 y cfp5358 en las líneas parentales SV y G6, encontramos polimorfismo de SNP con una frecuencia de aproximadamente 1/137 pb. Dada la abundancia de marcadores ISBP en el genoma del trigo, estos pueden mejorar el desarrollo de marcadores incluso en cruzamientos que no son muy polimórficos como SV × G6.

Además, algunos marcadores previamente reportados como no amplificados o no polimórficos en Diéguez *et al* 2014, resultaron polimórficos al ajustar las condiciones de PCR, como cfb5000, cfb5009, cfb5014, cfb5015, cfb5021, cfb5026 y cfp37.

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.

En el cruzamiento del RIL46 por Relmó Sirirí se demostró que para la expresión del gen *LrSV2* es necesaria la presencia de por lo menos una dosis del *LrcSV2*, ubicado en el cromosoma 4BL (Dieguez *et al* 2018). Ambos genes se comportan como dominantes con efectos complementarios, de forma similar a lo que ocurre con los genes de resistencia en plántula *Lr27* y *Lr31*.

El intervalo *LrSV2* definido aquí, delimitado por los marcadores *cfp5311* y *cfb5060*, se superpone con el *locus* de resistencia a la roya del tallo en planta adulta *Sr2* definido en el cromosoma 3BS (Mago *et al* 2014). En ciertos antecedentes, *Sr2* también está asociado con la resistencia a la roya de la hoja en plántula raza específica debido a *Lr27*, que está ligado al *Sr2* (Mago *et al* 2011,2014).

La raza Ca02G1R de *P. triticina* que se utilizó para identificar *LrSV2* en la etapa adulta también fue avirulenta en plántulas que portaban *Lr27 + 31* (Ingala *et al* 2012). Sin embargo, mientras que *Lr27 + 31* fue activo en el estadio de plántula, Sinvaloch MA se comportó como susceptible en este estadio y *LrSV2* no fue detectado hasta etapas de desarrollo posteriores como la hoja bandera, lo que respalda la hipótesis de que no son el mismo gen.

Otra característica común entre *LrSV2* y *Lr27* es la necesidad de un gen complementario en 4BL (Singh *et al* 1984, McIntoch *et al* 1995, Diéguez *et al* 2018). Aún está en discusión si el *Lr12* está estrechamente ligado al *Lr31* o son alelos de un mismo gen (Singh *et al* 1999, Singh y Bowden 2011). Considerando que *Lr31* es alélico o el mismo que *Lr12*, la posición de *Lr31* y *LrcSV2* en 4BL no es coincidente. El gen *LrcSV2*, que es complementario a *LrSV2*, ya fue mapeado dentro de un intervalo de 1.6 Mb distal a los marcadores flanqueantes del *Lr12* *gwm149* y *gwm251* (Dabove 2023).

Recientemente, un par de genes complementarios para resistencia a roya de la hoja fueron mapeados en los cromosomas 3BS y 4BL en la línea 4N0461 (Wang *et al* 2024a). Las posiciones cromosómicas de ambos genes coinciden con las reportadas para el gen *Lr31* (alélico o el mismo que el *Lr12*, Singh y Bowden *et al* 2011) y en mapas finos del *Lr27*, *LrSV2* y *LrcSV2* (Mago *et al* 2014, Diéguez *et al* 2021). Sin embargo, mientras la interacción *Lr27 + Lr31* provee resistencia desde plántula (Singh *et al* 1999), *LrN3B +*

LrN4B son efectivos a partir de la 6ta hoja (Wang *et al* 2024a) y *LrSV2* + *LrcSV2* en Sinvalocho MA se expresan completamente en hoja bandera (Diéguez *et al* 2018). Si bien podría tratarse del mismo par de genes complementarios, estas diferencias podrían sugerir que los genes involucrados son diferentes, que los efectos pueden estar influenciados por el background genético o que existen diferencias en la forma de interpretación de los fenotipos. Además, la resistencia conferida por *LrN3B* + *LrN4B* es más efectiva a altas temperaturas (30 °C), efecto que no fue reportado en los otros dos sistemas.

Sin embargo, es difícil sacar conclusiones de las relaciones entre estos genes debido a que los diferentes estudios generalmente se centran en un solo carácter y no se intentó estudiar todos los caracteres en una única población segregante porque las poblaciones existentes no eran aptas para tales estudios, o los diversos estudios no se pueden realizar en un solo laboratorio o país. Si estos genes son alelos de un mismo *locus*, son *loci* estrechamente ligados o son de amplio espectro, solo se puede determinar con precisión después de su clonado.

La obtención de mutantes susceptibles es un método ampliamente utilizado para corroborar que un gen está involucrado en un fenotipo. Dado que los genes *LrSV2* y *LrcSV2* actúan de forma complementaria, mutaciones en cualquiera de estos dos genes podrían resultar en un fenotipo susceptible. El análisis del cruzamiento de estas mutantes por las variedades G6 y P, portadoras de cada uno de los genes del par complementario, permitiría discernir entre estas dos posibilidades (Jankowicz-Cieslak y Till 2016, Sikora *et al* 2011, Yusuff *et al* 2016).

Sin embargo, para la confirmación de que un gen es responsable de la resistencia es necesario transformar una variedad que no porte este gen y observar reversión del fenotipo. En el caso de genes complementarios, es necesario comprobar que esta variedad posea el otro gen del par complementario. Para validar el gen *LrSV2*, se podría transformar el parental susceptibles G6, portador del gen *LrcSV2*. Sin embargo, esta línea no resultó adecuada para la regeneración a partir del cultivo *in vitro* (Pergolesi resultados no publicados).

Las variedades (Bobwhite, Bobwhite 26, Bobwhite 56, ProINTA Federal), utilizados en los protocolos de transformación biolísticas del IGEAF, no pueden ser utilizadas para validar al gen *LrSV2* debido a que poseen al menos un alelo activo del mismo ya que al ser cruzadas por G6, que aporta el *LrcSV2*, se observa resistencia. Westonia y Fielder

podrían ser utilizadas, pero sería necesario introducir también el gen complementario, por ejemplo, por cruzamientos con G6. Sin embargo, actualmente se han desarrollado protocolos que mejoran la eficiencia de regeneración de variedades recalcitrantes (Debernardi *et al* 2020).

Frecuentemente se considera que los genes APR son componentes importantes de la resistencia durable y, por lo tanto, cada vez más son requeridos por los mejoradores y agricultores. Sin embargo, su selección en los programas de mejoramiento es difícil debido a la presencia simultánea de genes ASR en las poblaciones segregantes, sus efectos relativamente pequeños en la respuesta a la enfermedad (resistencia parcial) y los efectos ambientales. Por estas razones, existe una fuerte demanda de marcadores genéticos para ayudar a la selección de genes APR. A menudo se asocia la resistencia en planta adulta con la inespecificidad frente a diferentes razas del patógeno e incluso con el reconocimiento de varios patógenos como ocurre con los genes *Lr34*, el *Yr36* de resistencia a roya amarilla (Fu *et al* 2009) y el *Sr2* de roya del tallo (Mago *et al* 2011). Sin embargo, el gen *LrSV2*, al igual que otros genes como por ejemplo *Lr12* y *LrSV1* (Singh y Bowden 2011, Ingala *et al* 2012), no es detectado en la fase de plántula, pero es raza-específico y muestra una típica respuesta de hipersensibilidad en el estadio de hoja bandera.

El uso de genes de resistencia, en particular de variedades que muestran resistencia duradera, reduce significativamente el uso de pesticidas, lo que es rentable y ambientalmente sostenible y constituye una contribución significativa para mejorar la competitividad de este cultivo, en un marco de cambio climático que podría favorecer las enfermedades fúngicas (Miedaner *et al* 2021).

BIBLIOGRAFÍA

- Abbate P, Miralles D, Ballesteros A. (2021). Nuevo mapa de subregiones trigo argentinas y de otros cereales invernales 2021. Documento PDF. INASE.
- Akhunov D, Goodyear AW, Geng S, Qi L, Echalié B *et al* (2003). The organization and rate of evolution of wheat genomes are correlated with recombination rates along chromosome arms. *Genome Res* 13: 753-763.
- Altieri E, McCallum B, Somers DJ, Sacco F. Inheritance and genetic mapping of leaf rust resistance genes in the wheat cultivar Buck Manantial. Proceedings of the 11th International Wheat Genetics Symposium – Brisbane, Australia (2008). Eds. Appels, Eastwood, Lagudah, Langridge, Mackay, McIntyre, and Sharp. Sydney: Sydney University Press, 2008
- 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
- 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>
- Bariana, HS, Babu P, Forrest KL, Park RF, Bansal UK. (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>
- Benbouza H, Jacquemin J-M, Baudoin J-P, Mergeai G (2006) Optimization of a reliable, fast, cheap and sensitive silver staining method to detect SSR markers in polyacrylamide gels. *Biotechnol Agron Soc environ* 10(2):77–81
- Bennett MD, Smith JB (1976). Nuclear DNA amounts in angiosperm. *Philos Trans R Soc Lond Ser Biol Sci* 274:227-274.
- Bokore FE, Knox RE, Hiebert CW, Cuthbert RD, DePauw RM, Meyer B, N'Diaye A, Pozniak CJ, McCallum BD. (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 MD, Kolmer JA and Garvin DF. (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>
- Boris F. Vanyushin, Vasili V. Ashapkin, DNA methylation in higher plants: Past, present and future, *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Regulatory Mechanisms*, Volume 1809, Issue 8, 2011, Pages 360-368
- Bowden RL. (2000). Wheat Leaf Rust. Kansas State University. Internet publication
- Breen J, li D, Dunn DS, Békés F, Kong X, Zhang J, Jia J, Wicker T, Mago r, Ma W, Bellgard M, Appels r (2010) Wheat betaexpansin (eXPB11) genes: identification of the expressed gene on chromosome 3BS carrying a pollen allergen domain. *BMC Plant Biol* 10:99–10
- Brenchley R, Spannagl M, Pfeifer M, Barker GL, D'Amore R, Allen AM, McKenzie N, Kramer M, Kerhornou A, Bolser D, Kay S, Waite D, Trick M, Bancroft I, Gu Y, Huo N, Luo MC, 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>
- Caetano-Anollés and Gresshoff. *DNA Markers: Protocols, Applications and Overviews*. Wiley-VCH. 1997
- Caldwell RM (1968) In: Finley K.W, Shepherd K.W(eds) *Breeding for general and/or specific plant disease resistance*. Proc. 3rd Int. Wheat Genetics Symp Aust Acad Sci, Canberra: Australia, pp 263–272
- 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 EA, Long DL, Line RF, 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.
- Clark RM, 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 BJ, Venturini L, Schudoma C, Accinelli GG, 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 BD, Loutre C, Banks TW, Wicker T, Feuillet C, Keller B, Jordan MC. (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>
 - Dabove MA (2023). Mapeo de alta resolución 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 Doctoral FCEN – UBA.
 - Darino MA, Dieguez MJ, Singh D, Ingala LR, Pergolesi MF, Park RF, 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
 - Debernardi JM, Tricoli DM, Ercoli MF, Hayta S, Ronald P, Palatnik JF, Dubcovsky J. A GRF-GIF chimeric protein improves the regeneration efficiency of transgenic plants. *Nat Biotechnol.* 2020 Nov;38(11):1274-1279. doi: 10.1038/s41587-020-0703-0. Epub 2020 Oct 12. PMID: 33046875; PMCID: PMC7642171.
 - 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.
 - Diéguez MJ, Ingala L, Perera E, Sacco F, Naranjo T. Physical mapping of AFLPs on chromosome 6BL of wheat, which includes the *Lr3* gene for leaf rust resistance. *Proceedings Tenth International Wheat Genetics Symposium - Paestum, Italia* (2003). 3: 937-939

- Diéguez MJ, Altieri E, Ingala, LR, 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 MJ, Pergolesi MF, Petignat C, Velásquez M, Ingala L, López M, Darino M, Choulet F, Paux E, Feuillet C, Sacco F. Towards positional cloning of *LrSV2*, a specific adult plant wheat leaf rust resistance gene identified in the durable resistant variety Sinvalocho MA. Oral presentation at the 21st International Triticeae Mapping Initiative Workshop (Mexico DF, Mexico). 2011
- Diéguez MJ, Pergolesi MF, Velasquez SM, Ingala L, López M, Darino M, Paux E, Feuillet C, Sacco F. Fine mapping of *LrSV2*, a race-specific adult plant leaf rust resistance gene on wheat chromosome 3BS. Theor. Appl. Genet. 2014, 127, 1133–1141.
- Diéguez MJ, Petignat C, Ferella L, Fiorentino G, Silva M, Dabove MA, Rosero Yañez GI, López M, Pergolesi MF, Ingala L, Cuyeu AR, & 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 MJ, López M, Altieri E, Pergolesi MF, Dabove MA, Cuyeu AR, 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>
- 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.
- Ellis JG, Lagudah ES, Spielmeier W, Dodds PN. (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>

- Faris JD, Haen KM, Gill BS. Saturation mapping of a gene-rich recombination hot spot region in wheat. *Genetics*. 2000 feb; 154(2):823-35. doi: 10.1093/genetics/154.2.823. PMID: 10655233; PMCID: PMC1460934.
- Favret EA (1971). The host-pathogen system and its genetic relationship. *Barley Genetics*, Vol. II, 457:71.
- Favret EA, Saione HA and y Franzone PM. (1983). New approaches in breeding for disease resistance. *Cereal breeding and production Symp. Argentina Special Report 718*. Oregon State University.
- 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, Nublát 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 HH (1956). The complementary genic systems in flax and flax rust. *Adv. Genet.* 8: 29-54.
- Fu D, Uauy C, Distel A, Blechl A, Epstein L, Chen X, Sela H, Fahima T and Dubcovsky J. 2009. A Kinase-START Gene Confers Temperature-Dependent Resistance to Wheat Stripe Rust. *Science* 323, 1357-1360
- Galich M, Galich AN. (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.
- German 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 KS, Gill BS, Endo TR (1993). A chromosome region-specific mapping strategy reveals gene-rich telomeric ends in wheat. *Chromosoma*, 102(6), 374-381.

- Gill KS, Gill BS, Endo TR and Boyko EV (1996a). Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 5 of wheat. *Genetics* 143:1001-1012.
- Gill KS, Gill BS, Endo TR and Boyko EV (1996b). Identification and high-density mapping of gene-rich regions in chromosome group 1 of wheat. *Genetics* 144:1883-1891.
- Haggag MEA, Samborski DJ and Dyck PL (1973). Genetics of pathogenicity in three races of leaf rust on four wheat varieties. *Can. J. Genet. Cytol.* 15,73:82.
- Hayden MJ, Kuchel H, Chalmers KJ (2004) Sequence tagged microsatellites for the Xgwm533 *locus* provide new diagnostic markers to select for the presence of stem rust resistance gene *Sr2* in bread wheat (*Triticum aestivum L.*). *Theor Appl Genet* 109:1641–1647. doi:10.1007/s00122-004-1787-5
- Hayden MJ, Stephenson P, Logojan AM, Khatkar D, Rogers C, Elsdon J, Koebner RMD, Snape JW, Sharp PJ. Development and genetic mapping of sequence-tagged microsatellites (STMs) in bread wheat (*Triticum aestivum L.*). *Theor. Appl. Genet.* 2006, 113, 1271–1281.
- Heath M. A personal perspective of the last 40 years of plant pathology: emerging themes, paradigm shifts and future promise. *Annual Plant Reviews* (2009) 34, 1-15 doi:10.1111/b.9781405175326.2009.00001.x
- Herrera-Foessel S, Singh RP, Huerta-Espino J, William M, Rosewarne G, Djurle A and Yuen J. Identification and Mapping of *Lr3* and a Linked Leaf Rust Resistance Gene in Durum Wheat. *Crop Science*, vol. 47, july–august 2007 doi: 10.2135/cropsci2006.10.0663
- 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>
- Hiebert CW, Thomas JB, Somer DJ, McCallum BD, Fox SL (2007) Microsatellite mapping of adult-plant leaf rust resistance gene *Lr22a* in wheat. *Theor Appl Genet* 115:877–884
- Huang L, Brooks SA, Li W, Fellers JP, Gill BS, Trick HN and Gill BS (2003). Map-Based Cloning of Leaf Rust Resistance Gene *Lr21* from the Large and Polyploid Genome of Bread Wheat. *Genetics* 164: 655-664.

- Huerta-Espino J, Singh RP, Germán S, McCallum BD, Park RF, Chen WQ, Bhardwaj SC, 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 and 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, Saione H, Helguera M, Nisi M and Sacco F. (2005). Inheritance of adult plant resistance genes, and associated markers, from a durable resistant cultivar to leaf rust. *Abstracts of the Seventh International Wheat Conference*. 27 de noviembre al 2 de diciembre 2005. Mar del Plata. Argentina. Página 6.
- Ingala L. (2008). Estudio de las bases genéticas de la resistencia durable a roya de la hoja en trigo. Tesis Doctoral. FCEN - UBA.
- Ingala L, López M, Darino M, Pergolesi MF, Diéguez MJ, Sacco F (2012). Genetic analysis of leaf rust resistance genes and associated markers in the durable resistant wheat cultivar Sinvalocho MA. *Theoretical and Applied Genetics*, 124, 1305-1314.
- Isidore E, Scherrer B, Bellec A, Budin K, Faivre-Rampant P, Waugh R, Keller B, Caboche M, Feuillet C, Chalhoub B. (2005). Direct targeting and rapid isolation of BAC clones spanning a defined chromosome region. *Funct Integr Genomics* 5, 97-103
- International Wheat Genome Sequencing Consortium (IWGSC), Appels R, Eversole K, Stein N, Feuillet C, Keller B, Singh NK. (2018). Shifting the limits in wheat research and breeding using a fully annotated reference genome. *Science*, 361(6403), eaar7191.
- Jankowicz-Cieslak J, Till BJ. 2016. Chemical mutagenesis of seed and vegetatively propagated plants using EMS. *Curr. Protoc. Plant Biol.* 1:617-635. doi: 10.1002/cppb.20040

- Jin Y, Szabo LJ, Pretorius ZA, Singh RP, 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>
- Johnson R. Durable resistance: Definition of, genetic control, and attainment in plant breeding. *Phytopathology* 1981, 71, 567–568.
- Jones JD, Dangl JL. (2006). The plant immune system. *Nature*, 444(7117), 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Kolmer JA. (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual review of phytopathology*, 34(1), 435-455.
- Kolmer JA. (2005). Tracking wheat rust on a continental scale. *Curr. Opin. Plant Biol.* 8,441–449
- Kolmer JA. (1996). Genetics of resistance to wheat leaf rust. *Annual review of phytopathology*, 34(1), 435-455.
- Kolmer JA, 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 JA, Bajgain P, Rouse MN, 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>
- Kolodziej MC, 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 SG, 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 RA, & Lagudah ES. (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 SG, Lagudah ES, Spielmeier W, Singh RP, Huerta-Espino J, McFadden H, Bossolini E, Selter LL, 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 PK, Mir RR, Balyan HS, Gupta PK. (2022). An update on resistance genes and their use in the development of leaf rust resistant cultivars in wheat. *Frontiers in Genetics*, 13, 816057.
- Lander E, Green P, Abrahamson J, Barlow A, Daley M, Lincoln S and Newburg L (1987). MAPMAKER: an integrative computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1: 174-181.
- Li G, Zhou J, Jia H *et al* 2019. Mutation of a histidine-rich calcium-binding-protein gene in wheat confers resistance to *Fusarium* head blight. *Nat Genet* 51, 1106–1112 <https://doi.org/10.1038/s41588-019-0426-7>
- Li H, Hua L, Zhao S, Hao M, Song R, Pang S, Liu Y, Chen H, Zhang W, Shen T, Gou JY, Mao H, Wang G, Hao X, Li J, Song B, Lan C, Li Z, Deng XW, Dubcovsky J, Wang X, Chen S. Cloning of the wheat leaf rust resistance gene *Lr47* introgressed from *Aegilops speltoides*. *Nat Commun.* 2023 Sep 28;14(1):6072. doi: 10.1038/s41467-023-41833-2. PMID: 37770474; PMCID: PMC10539295.
- Lin G, Chen H, Tian B, Sehgal SK, Singh L, Xie J, Rawat N, Juliana P, Singh N, Shrestha S, Wilson DL, Shult H, Lee H, Schoen AW, Tiwari VK, Singh RP, Guttieri MJ, Trick HN, Poland J, Bowden RL, 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>
- Ling H-Q, Zhu Y, Keller B (2003) High-resolution mapping of the leaf rust disease resistance gene *Lr1* in wheat and characterization of BAC clones from the *Lr1* locus. *Theor Appl Genet* 106:875–882
- Liu S, Anderson JA. Targeted molecular mapping of a major wheat QTL for fusarium head blight resistance using wheat ESTs and synteny with rice. *Genome* 2003, 46, 817–823.

- Liu S, Zhang X, Pumphrey MO, Snack RW, Gill BS and Anderson JA. 2006. Complex microcolinearity among wheat, rice and barley revealed by fine mapping of the genomic region harbouring a major QTL for resistance to fusarium head blight in wheat. *Funct Integr genomics* 6: 83–89 (DOI 10.1007/s10142-005-0007-y)
- Lombardo L, Nisi MM, Salines N, Ghione CE and Helguera M. 2017. Identification of Novel High Molecular Weight Glutenin Subunit Mutants in Bread Wheat (*Triticum aestivum* L.). *Cytology and Genetics*, 2017, Vol. 51, No. 4, pp. 305–314. DOI: 10.3103/S0095452717040028
- Long D y 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>
- Lukaszewski AJ, Curtis CA (1993) Physical distribution of recombination in B-genome chromosomes of tetraploid wheat. *Theor Appl Genet* 86:121–127
- Macagno LF, Pizarro JB, Cordone GE (1993). Dirección Nacional de Planificación. Publicación Miscelánea N°4. INTA. Pág. 15-28.
- Mago R, Tabe L, McIntosh RA, 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.
- Mago R, Tabe L, Vautrin S, Šimková H, Kubaláková M, Upadhyaya N, Spielmeier 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>
- Mains EB, Jackson HS. (1926). Physiologic specialisation in the leaf rust of Wheat, *Puccinia triticina* Erikas. *Phytopathology*, 16(2).
- McCallum BD, Hiebert CW, Cloutier S, Bakkeren G, Rosa SB, Humphreys DG, Marais GF, McCartney CA, Panwar V, Rampitsch C, Saville BJ, 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 RA, Wellings CR, Park R (1995). Wheat Rusts, An Atlas of Resistance Genes. Kluwer Academic Publishers y CSIRO Australia.
- McIntosh RA, Dubcovsky J, Rogers WJ, Xia XC, Raupp WJ. (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
- McMullen M and Rasmussen J (2002). Wheat Leaf Rust. North Dakota State University Extension Service. PP589.
- 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 MM, 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 RW, Paran I and Kesseli RV (1991) Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. Proc. Natl. Acad. Sci. USA Vol. 88, pp. 9828-9832 Genetic.
- 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 JW, Herrera-Foessel S, Lan C, Schnippenkoetter W, Ayliffe M, HuertaEspino J, Lillemo M, Viccars L, Milne R, Periyannan S, Kong X, Spielmeier W, Talbot M, Bariana H, Patrick JW, 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>
- Nelson JC, Singh RP, Autrique JE, Sorrells ME (1997) Mapping genes conferring and suppressing leaf rust resistance in wheat. Crop Sci 37:1928–1935. <https://doi.org/10.2135/crops ci1997.0011183X003700060043x>
- Paran I, Michelmore RW. Development of reliable PCR-based markers linked to downy mildew resistance genes in lettuce. Theor Appl Genet. 1993 feb;85(8):985-93. doi: 10.1007/BF00215038. PMID: 24196149.

- Park RF, Wellings CR. (2012). Somatic hybridization in the Uredinales. Annual review of Phytopathology, 50, 219-239.
- 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, 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, Faure S, Choulet F, Roger D, Gauthier V, Martinant JP, Feuillet C. (2010). Insertion site-based polymorphism markers open new perspectives for genome.
- Perez B, Roelfs AP. (1989). Resistance to wheat leaf rust of land cultivars and their derivatives. Phytopathology, 79(1), 183
- Periyannan S, Moore J, Ayliffe M, Bansal U, Wang X, Huang L, Deal K, Luo M, Kong X, Bariana H, Mago R, McIntosh R, Dodds P, Dvorak J, Lagudah E. The gene *Sr33*, an ortholog of barley *Mla* genes, encodes resistance to wheat stem rust race Ug99. Science 2013 Aug 16;341(6147):786-8. doi:10.1126/science.1239028. Epub 2013 Jun 27. PMID: 23811228.
- Pink DAC (2002). Strategies using genes for non-durable resistance. Euphytica 1: 227-236.
- Pinto da Silva GB, Zanella CM, Martinelli JA, Chaves MS, Hiebert CW, McCallum BD, Boyd LA. (2018). Quantitative trait *loci* conferring leaf rust resistance in hexaploid wheat. Phytopathology, 108(12), 1344-1354.
- Pretorius ZA, Roelfs AP. (1996). The role of *Lr10*, *Lr13*, and *Lr34* in the expression of adult-plant resistance to leaf rust in the wheat cultivar Era. Plant Dis. Vol 80, Num 2, pp 199-202.
- Rabinowicz PD, Citek R, Budiman MA, Nunberg A, Bedell JA, Lakey N, O'Shaughnessy AL, Nascimento LU, McCombie WR & Martienssen RA. (2005). Differential methylation of genes and repeats in land plants. Genome Research, 15, 1431-1440.

- Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier MH, 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>
- Rodríguez Amieva PJ, Tessi JL, Frecha JH y Vallega J (1961). Estimación de los daños producidos en la Argentina por las royas del tallo y de la hoja durante el período 1949-1958. *Robigo* 12: 18-22.
- Roelfs AP. (1988). Genetic control of phenotypes in wheat stem rust. *Annual Review of Phytopathology*, 26(1), 351-367.
- Rozen S, Skaletsky HJ (2000) Primer3 on the WWW for general users and for biologist programmers. In: Krawetz S, Misener S (eds) *Bioinformatics methods and protocols: methods in molecular biology*. Humana Press, Totowa, pp 365–386
- Rozo Ortega GP, Fleitas MC, Schierenbeck M, Gerard GS, Castro AAC, Lo Valvo PJ, Serrago RA, Simón MR, Miralles DJ. (2020) Enfermedades foliares y su impacto en el rendimiento y calidad comercial e industrial del trigo. *Cultivos Invernales 2020*. Red de Innovadores.
- Rubiales D, Niks RE (1995) Characterization of *Lr34*, a major gene conferring nonhypersensitive resistance to wheat leaf rust. *Plant Dis* 79:1208–1212
- Rustenholz C, Choulet F, Laugier C, Safar J, Simkova H, Dolezel J, Magni F, Scalabrin S, Cattonaro F, Vautrin S, Bellec A, Berges H, Feuillet C, Paux E (2011) A 3000-*loci* transcription map of chromosome 3B unravels the structural and functional features of gene islands in hexaploid wheat. *Plant Physiol* 157:1596–1608
- Saari E, Prescott JM. (1985) World Distribution in Relation to Economic Losses. *The Cereal Rusts*. Academic Press, INC. 1985 pp257-293.
- Sacco F, Tranquilli G, GorgoschidseL, Suarez E. (1992). Aminopeptidase B1: a centromere marker for chromosome 6B of wheat. *Genome*, 35(2), 261-263
- Sacco F, Favret EA, Suárez EY, Solari RM and Saione HA (1995). Spontaneous genetic variation for leaf rust reaction in Sinvalocho MA wheat. *J. Phytopathology* 143: 251-255.
- Sacco F, Suárez EY and Naranjo T (1998). Mapping of the leaf rust resistance gene *Lr3* on chromosome 6B of Sinvalocho MA wheat. *Genome* 41: 686-690.

- Safar J, Bartos J, Janda J *et al* (2004) Dissecting large and complex genomes: flow sorting and BAC cloning of individual chromosomes from bread wheat. *Plant J.* 39:960–968
- Saintenac C, Falque M, Martin O, 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* 181:393–403
- Saintenac C, Faure S, Fremay A, Choulet F, Fravel C, Paux e, Balfourier F, Feuillet C, Sourdille P (2011) Variation in crossover rates across a 3-Mb contig of bread wheat (*Triticum aestivum*) reveals the presence of a meiotic recombination hotspot. *Chromosoma* 120:185–198. doi:10.1007/s00412-010-0302-9
- Samborski DJ and Dyck PL (1968). Inheritance of virulence in wheat leaf rust on the standard differential wheat varieties. *Can J. Genet. Cytol.* 10: 24-32.
- Samborski D J. (1985). Wheat leaf rust. In ‘Cereal rusts. Vol. I’. (Eds AP Roel s, WR Bushnell) pp. 39–59.
- Sawhney RN, Nayar SK, Sharma JB, 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 ER. (1952). Misdivision of univalents in common wheat. *Chromosoma.* 1952;4(6):535-550. doi:10.1007/BF00325789
- Sears ER. (1954). The aneuploids of common wheat. University of Missouri, College of Agriculture, Agricultural Experiment Station. *Phytopathology* 79:1183
- Sears ER. (1977). Induced mutant with homoeologous pairing in common wheat. *Can. J. Genet. Cytol.*, 19: 585-593.
- Sharon A, Sharma D, Avni R, *et al* A single NLR gene confers resistance to leaf and stripe rust in wheat. [Preprint] Research Square; 2023. DOI: 10.21203/rs.3.rs-3146908/v1.
- Sikora P, Chawade A, Larsson M, Olsson J, and Olsson O Mutagenesis as a Tool in Plant Genetics, Functional Genomics, and Breeding International Journal of Plant Genomics Volume 2011, Article ID 314829, doi:10.1155/2011/314829

- Singh RP, McIntosh RA. (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 RP, McIntosh RA. (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 S & Bowden RL. (2011). Molecular mapping of adult-plant race-specific leaf rust resistance gene *Lr12* in bread wheat. Molecular Breeding, 28, 137-142.
- Skylas DJ, Mackintosh JA, Cordwell SJ, Basseal DJ, Walsh BJ, Harry J, Blumenthal C, Copeland L, Wrigley CW, 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 DJ, Isaac P, Edwards K (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 109:1105–1114
- Song QJ, Shi JR, Singh S, Fickus W, Costa JM, Lewis J, Gill BS, Ward R and Cregan PB (2005). Development and mapping of microsatellite (SSR) markers in wheat. Theor Appl Genet (2005) 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 GL, Gay G, Qi L, Gill BS, Dufour P, Murigneux A, Bernard M. (2004). Microsatellite-based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). Functional & integrative genomics, 4(1), 12–25.
<https://doi.org/10.1007/s10142-004-0106-1>
- Stakman EC. (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.

- Strachan T y Read AP (1999) *Genética Molecular Humana*. Ediciones Omega, S.A., Barcelona.
- Suárez EY and Favret EA (1983). Reaction to Leaf Rust of “Sinvalocho” Wheat Gene in Hemizygous Condition. *Z P lanzenzüchtg.* 92, 289:294.
- Suárez EY, Favret EA. (1984). Reaction to leaf rust of a sinvalocho wheat gene in hemizygous condition. *Zeitschrift für Pflanzenzüchtung*, 92(4), 289-294.
- Thind AK, Wicker T, Šimková H, Fossati D, Moullet O, Brabant C, Vrána J, Doležel J Krattinger SG. (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.
- Vos P, Hogers R, Bleeker M, Reijans M, Van de Lee T, Hornes M, Frijters A, Peleman J, Kuiper M and Zabeau M (1995). A LP: a new technique for DNA fingerprinting. *Nucleic Acid Research* 23: 4407-4414.
- 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 RL, Huttly AK. (2008). Transcriptome analysis of grain development in hexaploid wheat. *BMC Genomics* 9, 121.
- Wang Y, Abrouk M, Gourdoupsis S, Koo DH, Karafiátová M, Molnár I, Holušová K, Doležel J, Athiyannan N, Cavalet-Giorsa E, Jaremko Ł, Poland J, Krattinger SG. (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>
- Wang W, Li H, Qiu L, Wang H, Pan W, Yang Z, Wei W, Liu N, Sun J, Hu Z, Ma J, Ni Z, Li Y, Sun Q, Xie C. Fine-mapping of *LrN3B* on wheat chromosome arm 3BS, one of the two complementary genes for adult-plant leaf rust resistance. *Theor Appl Genet.* 2024a Aug 13;137(9):203. doi: 10.1007/s00122-024-04706-w. PMID: 39134836.
- Wang X, Xiang M, Li H, Li X, Mu K, Huang S, Zhang Y, Cheng X, Yang S, Yuan X, Singh RP, Bhavani S, Zeng Q, Wu J, Kang Z, Liu S, Han D. High-density mapping of durable and broad-spectrum stripe rust resistance gene *Yr30* in wheat.

Theor Appl Genet. 2024b Jun 8;137(7):152. doi: 10.1007/s00122-024-04654-5. PMID: 38850423.

- Weising K, Nybom H, Wolff K, Meyer W. 1995. DNA fingerprinting in plants and fungi. Boca Ratón, US, CRC. 322 Theor Appl Genet. 1993 Feb;85(8):985-93. doi: 10.1007/BF00215038.
- Xu X, Kolmer J, Li G, Tan C, Carver BF, 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>
- Xue S, Zhang Z, Lin F (2008) A high-density intervarietal map of the wheat genome enriched with markers derived from expressed sequence tags. Theor Appl Genet 117:181–189
- Yan L, Floukoianov A, Tranquilli G, Helguera M, Fahima T, Dubcovsky J (2003) Positional cloning of the wheat vernalization gene *VRN1*. Proc natl Acad Sci 100(10):6263–6268
- Yusuff Oladosu, Mohd Y. Rafii, Norhani Abdullah, Ghazali Hussin, Asfaliza Ramli, Harun A. Rahim, Gous Miah & Magaji Usman (2016) Principle and application of plant mutagenesis in crop improvement: a review, Biotechnology & Biotechnological Equipment, 30:1, 1-16, DOI: 10.1080/13102818.2015.1087333
- Zhu T, Wang L, Rimbart H, Rodriguez JC, Deal KR, De Oliveira R, Choulet F, Keeble-Gagnère G, Tibbits J, Rogers J, Eversole K, Appels R, Gu YQ, Mascher M, Dvorak J, Luo MC. (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>

ANEXOS

Lista de abreviaturas

A: adenina

ABC: ATP binding cassette. Casete de unión a ATP.

AFLP: Amplified Fragment Length Polymorphisms. Polimorfismo del largo de los fragmentos amplificados.

AgNO₃: Nitrato de plata

ANK: anquirinas

APR: adult plant resistance. Resistencia en planta adulta.

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

ATP: adenosín trifosfato

Avr: Avirulence. Avirulencia.

barc: Beltsville Agricultural Research Center

BAC: Bacterial Artificial Chromosome. Cromosomas Artificiales Bacterianos.

BES: BAC-ends sequencing. Secuencias de extremos de BACs.

BrEt: Bromuro de etidio

BSA: bulk segregant analysis. Análisis de bloques segregantes.

C: citosina

cM: centimorgan

CS: Chinese Spring

CTAB: Cetyltrimethylammonium Bromide.

DNTPs: Deoxynucleoside triphosphates

EDTA: Ethylenediaminetetraacetic Acid

EMS: metanosulfonato de etilo

EST: Expressed Sequence Tags

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

ETS: effector triggered susceptibility. Susceptibilidad desencadenada por efectores.

G: guanina

G6: Gama6

gpw: GenoPlante Wheat

gwm: Gatersleben Wheat Microsatellite

H: heterocigota

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.

IWGSC: International Wheat Genome Sequencing Consortium

kb: kilobases

KCl: Cloruro de potasio

LLR: leucine rich repeat. Repetición rica en leucina.

Lr: leaf rust. Roya de la hoja

M: molar

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

MHa: millones de hectáreas.

MgCl₂: cloruro de magnesio

mM: milimolar

MMT: millones de toneladas métricas

MR: Moderadamente resistente

MS: Moderadamente susceptible

NaCl: cloruro de sodio

Na₂CO₃: Carbonato de sodio

NaOH: hidróxido de sodio

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

NEA: Nordeste Argentino. Conformada por las provincias de Chaco, Corrientes, Formosa y Misiones.

NGS: Next Generation Sequencing o Técnicas de Secuenciación de Siguiete Generación

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

NOA: Noroeste Argentino. Reúne las provincias de Catamarca, Jujuy, Tucumán, Salta y Santiago del Estero.

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

pb: pares de bases
Pm: powdery mildew
PTI: pattern-triggered immunity. Inmunidad desencadenada por patrones.
qq/ha: quintales por hectárea
QTL: quantitative trait *loci*. *loci* de caracteres cuantitativos.
R: Resistance. Resistencia.
RILs: Recombinant Inbred lines.
RPM: revoluciones por minuto
S: Susceptible
SCAR: Sequence Characterized Amplified Region
SDS: Sodium Dodecyl Sulfate
SISA: Sistema de Información Simplificada Agrícola.
SNPs: single nucleotide polymorphism. Polimorfismo de nucleótido simple.
Sr: Stem rust. Roya del tallo.
SSD: single seed descendant. Descendiente de semilla único.
SSR: simple sequence repetitions
STM: Single Tagged Microsatellites
STS: Sequence Tagged Site
SV: Sinvalocho MA
T: timina
TBE: tris-borato-EDTA
TE: transposable elements. Elementos transponibles.
TGAC: The Genome Analysis Centre
Tris: Tris(hidroximetil)aminometano
USD/t: dólares por tonelada
v/v: volumen en volumen
wmc: Wheat Microsatellite Consortium
Yr: Yellow rust. Roya amarilla.
µm: micrometro

Tabla A1: Genotipado de los 195 individuos F2 Resistentes. 1: presencia de banda; 0: ausencia de banda; -: sin dato.
En rojo se indican los individuos recombinantes.

F2 R	Serie P01/M01				
	33/36 ₃₂₅	37/44 ₁₆₀	40/31 ₁₂₅	40/35 ₁₂₀	46/42 ₃₁₀
1	0	-	0	0	0
2	0	-	0	0	0
3	0	-	0	0	0
4	0	-	0	1	0
5	0	-	0	0	0
6	0	-	0	0	0
7	0	-	0	0	0
8	0	-	0	0	0
9	0	-	0	0	0
10	0	-	0	0	0
11	0	0	0	1	0
12	0	-	0	0	0
13	0	-	0	0	0
14	0	-	0	0	0
15	0	-	0	1	0
16	-	0	0	1	0
17	0	-	0	0	0
18	0	-	0	0	0
19	0	-	0	1	0
20	0	-	0	0	0
21	0	-	0	0	0
22	0	0	0	0	-
23	0	0	0	1	0
24	0	0	0	0	0
25	0	0	0	0	0
26	0	0	0	0	0
27	0	0	0	0	0
28	0	0	0	0	0
29	0	0	0	0	0
30	0	0	0	0	-
31	0	0	0	0	-
32	0	0	0	0	-
33	0	0	0	1	0
34	0	0	0	0	0
35	0	0	0	-	0
36	0	0	0	-	0
37	0	0	0	0	0
38	0	0	0	0	0
39	0	0	0	0	0
40	0	0	0	0	0
41	0	0	0	0	0
42	0	0	0	0	0
43	-	-	0	1	0
44	-	0	0	0	0
45	-	-	0	0	0
46	-	-	0	-	0
47	-	-	0	-	0
48	-	-	0	0	0
49	0	0	0	1	0
50	0	0	0	0	0
51	0	0	0	0	0
52	0	0	0	0	0
53	0	0	0	0	0

F2 R	33/36₃₂₅	37/44₁₆₀	40/31₁₂₅	40/35₁₂₀	46/42₃₁₀
54	0	0	0	0	0
55	0	0	0	0	0
56	-	0	0	0	0
57	0	0	0	0	0
58	0	0	0	0	0
59	1	1	1	1	1
60	0	0	0	1	0
61	0	0	0	0	0
62	0	0	0	0	0
63	0	0	0	0	0
64	0	0	0	0	0
65	-	0	0	1	0
66	0	0	0	0	-
67	0	0	0	0	-
68	0	0	0	0	0
69	0	0	0	1	0
70	0	0	0	0	0
71	0	0	0	0	0
72	0	0	0	0	0
73	0	0	0	0	0
74	0	0	0	0	0
75	0	0	0	0	0
76	0	0	0	1	0
77	0	0	0	0	-
78	0	0	0	0	0
79	0	0	0	0	0
80	0	0	0	0	0
81	0	0	0	0	0
82	0	0	0	1	0
83	-	0	0	0	0
84	0	0	0	0	0
85	0	0	0	1	0
86	0	0	0	0	0
87	0	-	0	1	0
88	0	0	0	0	0
89	0	0	0	0	0
90	0	0	0	0	0
91	0	0	0	0	0
92	0	0	0	0	0
93	0	0	0	0	0
94	0	0	0	0	0
95	0	0	0	0	0
96	0	0	0	0	0
97	0	0	0	0	0
98	0	0	0	1	0
99	0	0	0	0	0
100	0	0	0	0	0
101	0	-	0	0	-
102	0	0	0	0	0
103	0	0	0	0	0
104	0	0	0	0	0
105	0	0	0	0	0
106	0	0	0	0	-
107	0	0	0	0	0
108	0	0	0	0	0
109	0	0	0	0	0
110	0	0	0	1	-

F2 R	33/36₃₂₅	37/44₁₆₀	40/31₁₂₅	40/35₁₂₀	46/42₃₁₀
111	0	0	0	1	-
112	0	0	0	0	-
113	0	0	0	0	-
114	0	0	0	0	0
115	0	0	0	0	0
116	0	0	0	0	0
117	0	0	0	0	-
118	0	0	0	0	0
119	0	0	0	1	0
120	0	0	0	0	0
121	0	0	0	0	0
122	0	0	0	0	0
123	0	0	0	0	0
124	0	0	0	1	0
125	0	0	0	0	-
126	0	0	0	1	0
127	0	0	0	0	0
128	0	0	0	0	0
129	-	0	0	0	0
130	0	0	0	0	0
131	1	1	1	1	1
132	0	0	0	0	0
133	0	0	0	0	0
134	0	0	0	0	0
135	0	0	0	0	0
136	0	0	0	0	-
137	0	0	0	0	-
138	0	0	0	0	0
139	0	0	0	0	0
140	0	0	0	1	0
141	0	0	0	0	0
142	0	0	0	0	0
143	0	0	0	0	0
144	0	0	0	0	0
145	0	0	0	1	0
146	0	0	0	0	0
147	0	0	0	0	0
148	0	-	-	-	-
149	0	0	0	0	0
150	0	0	0	0	0
151	0	0	0	0	0
152	0	0	0	0	0
153	0	0	0	0	-
154	0	0	0	1	0
155	0	0	0	0	0
156	0	0	0	0	-
157	0	0	0	0	0
158	0	0	0	0	0
159	0	0	0	0	0
160	0	0	0	0	0
161	0	0	0	0	0
162	0	0	0	0	-
163	0	0	0	1	0
164	0	0	0	0	-
165	0	0	0	0	0
166	0	0	0	0	0
167	0	0	0	1	0

F2 R	33/36₃₂₅	37/44₁₆₀	40/31₁₂₅	40/35₁₂₀	46/42₃₁₀
168	0	0	0	0	-
169	0	0	0	1	0
170	0	0	0	0	0
171	0	0	0	1	0
172	0	0	0	0	0
173	0	0	0	0	0
174	0	0	0	0	0
175	0	0	0	0	0
176	0	0	0	0	0
177	0	0	0	0	0
178	0	0	0	1	0
179	0	0	0	0	0
180	-	0	0	0	0
181	0	-	0	0	0
182	0	0	0	0	0
183	0	0	0	0	0
184	0	0	0	0	0
185	0	0	0	0	0
186	0	0	0	1	0
187	0	0	0	0	0
188	-	0	0	0	0
189	-	0	0	0	0
190	0	0	0	0	0
191	0	0	0	0	-
192		0	0	0	-
193	0	-	0	0	0
194	0	-	0	0	0
195	0	-	0	0	0

Tabla A2: Primers de los marcadores utilizados para desarrollar los mapas de la Figura R6.

Marker	Forward primer	Reverse primer	Reference
cfb3417	TTGTTAAGGCGAGACATTGG	GATACACAGAGGGCGGAG	
cfb5006	ATCGGCGAGAAGTCACGG	GAGTGGAGGTGGGTGGAG	
cfb5007	CATCCGATCCAATTTGTGGAG	CCGGTGAATAGTTGTCTTG	
cfb5008	GTCTTGGGTCAATCCGTTTG	TGTGTGTGTGTGGGGG	
cfb5010	ACAACGACGGGAGAGGGG	AAGGAGGCGGCGGAAGAG	P. Sourdille Comunicación personal
cfb5025	GGTATGCAGGTCTTGAATG	GCCTTTGAAATTAAGTCAACCC	
cfb5060	GGACCCTTAGCTTTGATGATG	GTGCCAACAAAACATGCAG	
cfb5061	ACTAGACCCTTGCTAAAGCC	ACTCACTGCCAACTGCTC	
gpw7080	ATGCCAACCAGACATCACAG	CAAAACCTACAGCTCCCTCG	
gwm533	AAGGCGAATCAAACGGAATA	GTTGCTTTAGGGGAAAAGCC	Röder <i>et al</i> 1998
SCAR40/42	CCACACCACTCACCAGTGTC	CCTACCACTTCGACCTCAGC	Este trabajo
stm559 _{tgag}	AAGGCGAATCAAACGGAATA	TGTGTGTGTGTGTGAGAGAGAG	Hayden <i>et al</i> 2004
stm560 _{tgag}	GGAGGGAACTATCAAAATATGCTGGT	TGTGTGTGTGTGTGAGAGAGAG	Hayden <i>et al</i> 2006
sts49	ATTGCGAAGAACACCCTCAC	ACGTCTCAGCACCGAGTTC	
sts55	CGGCAACAACAACAACCA	ATGAGGCTCCCAACTCCAC	Liu <i>et al</i> 2003
swm13	TCGAAGAGCTAGCTATGGAC	CCAGGACGAATTCGTACAAC	B. Keller Comunicación personal

Tabla A3: Secuencia de primers de los marcadores dentro del intervalo *LrSV2* (swm13-gwm533). Se indica el largo (en bp) del producto amplificado en Sinvalochi (SV) y Gama 6 (G6). Los marcadores polimórficos están en negrita. * SNP: Single nucleotide polymorphisms. • marcadores cosegregantes (en adición con cfb5006/5007/5008/5010/5025/5061, gpw7080 y SCAR40/42 de Diéguez *et al* 2014).

	<i>primer Forward</i>	<i>primer Reverse</i>	SV	G6	<i>Tipo de marcador</i>
cfb5000 •	ATCCCCATCCCTCCCTCCC	AGTCATTCATCCCCTTGCC	-	251	SSR
cfb5009 •	TCCCTCAACCCGTCGCTC	TTCTTCCTCCCGCTTCTGTG	139	141	SSR
cfb5011 •	TGCAGCTACTCTATTACTCCTC	AGCACAAGCAAAGCAGAAAG	-	224	SSR
cfb5013 •	TTTTGAAGGCTTGGAGCAC	ATATTACACACACCGACACAC	-	259	SSR
cfb5014 •	CGTCCACTCCATTTACAGCAC	TGGAGCAGGGAGAGGAGG	-	234	SSR
cfb5015 •	TGGCCCATGCTGGCCTAC	GCGAAGCACAATGCGAATGAC	259	268	SSR
cfb5018 •	CGACGGAGGGGAATTTAGTAG	GCACAAAGAGAAGAGGGCAG	-	307	SSR
cfb5019 •	ATGCTCGTCTACTCCCC	GTTACACACCCACACAACC	-	310	SSR
cfb5021 •	GCGCTAGATTTTTTCAGTGACC	CACAAATATCATAGTGCCCTCC	347	351	SSR
cfb5023 •	TCAATCCTCCCTCCATCAAC	GGCAGAAGAAACGGAAGC	-	225	SSR
cfb5026 •	CTGGAATGTGTGCTGAAAATC	GCCTTTGAAATTAAGTCAACCC	306	-	SSR
cfp37	ATGATCTTGCGTGTGCGTAG	TGACAAATTCCTCGCAGCAAC	170	-	ISBP
cfp41	CATGCTCGTCATCGAGTAGG	GGCACTGCTGATAGCCTC	290*	290*	ISBP-derived SNP
cfp1410	GGAAGGTGAGGCATGATCCAAAG	CCCCTGCGGGAGTGAG	442*	442*	ISBP-derived SNP
cfp5200	TTCACACGGCTTGTCTTGTC	AAAAGCGTCTCGATCACTACTC	189	189	ISBP
cfp5205	AGTGCTGTGCTGTGCTGTTT	GTACTCGTCCGCTTCACTCC	300	300	ISBP
cfp5207	TTGGAATTTCCGGTTACAT	GAGGCTCACTAGGGACATGG	219	219	ISBP
cfp5208	CCGCTTAGCGATCTACAAGG	GGTTTTGATATCTGTCCCCG	222	222	ISBP
cfp5209	AGGCAATCGATGGTGGTTAC	AAAAATCGCCTATTCACCCC	266	266	ISBP
cfp5222 •	TTTGCTTCATCACCCCTTCC	GAACCGTTTGCATGAAAAAT	-	271	ISBP
cfp5223	GCAAACAGAAAAAGGCAAGC	ACAATTCTAGCATGGATAATAAAACA	266	266	ISBP
cfp5224	GCGATGGTCTTTTCCTACCA	AACCGGCACTATTGTGCTTC	217	217	ISBP
cfp5226	TGTTGACTACCTCATCCCC	TTGCCTGGATCCATCAAAAT	219	219	ISBP
cfp5227	ACCCCTCGTGTCTTTGTGTCC	CGGTAAACGGGAGTTGCATA	210	210	ISBP
cfp5229	CGGGATCACATCATTAGTTGAA	TCGGTCCATAGAGTCCCAAC	256	256	ISBP
cfp5231	TAGTGGCAGTAACCGTGGTG	TTAACTTTCCGGTTTGCCTG	-	244	ISBP
cfp5236	AATAAACACCGAGGGGAGG	ATGCGAAAAACTCTGATGGG	241	241	ISBP
cfp5237	TCATATCACGGGGTTTGGAT	ATGTAACCGGCACTACAGGG	127	127	ISBP
cfp5241	CAGCCCTACATTGGTGAAC	CATAATTCACCTCGACCGCCT	237	237	ISBP
cfp5243	CGACGAGCACTTTACCATCA	ACTAACCGAGGTGATGTGGC	-	203	ISBP
cfp5254	CATCGTCCAGATGCAGAGG	CCACCCAACAAATGTGTCAA	137	137	ISBP
cfp5263	ACAATAAGGGCACGACAAGG	ATATGGCAAGCAATCCAAGG	178	178	ISBP
cfp5300 •	GGCTTGAAGCTTTGAACCAG	TCCTCCATTTTCAAATAAGTGTCTC	178	-	ISBP
cfp5301 •	TCCCTCTGTCTCAAAATAAGTGTC	CCAATATCAGGAGTGC GGTT	190	-	ISBP

cfp5302	CATCCTGACTTCCTGAGCGT	TGAAGAAAGAGAGGCATGTGG	271	271	ISBP
cfp5304 •	TAACCATAGGCACACACCGA	GCCCTCACATGATAAGCCAT	185*	185*	ISBP-derived SNP
cfp5306	TTCTGTCAACGGCTTGTCTG	TCAAAAACGCTCTTATATATG	124	124	ISBP
cfp5308 •	TTTATCCCAGCAAAGCATCC	GCGGAGCAAATGAGTGAAT	-	233	ISBP
cfp5310	TTGAGGGACAAGGTTTTTCG	GCCTACCCTTCAATTTTCGTG	119	119	ISBP
cfp5311	ACATCAACCGCGTTGTCATA	GAACCCAGCAAATCCTCTGA	237*	237*	ISBP-derived SNP
cfp5313	GATCAGGGGGACCAATTTTT	CGGTTACAGAACCGGGACTA	241*	241*	ISBP-derived SNP
cfp5314	TGTGACACAAACCGGGACTA	TGCGTGCTTTGGTAAGTGTC	286	286	ISBP
cfp5315	TTCTTTCTTGGGGTTTTCCCT	GTTTGGGCGACGAGTAATGT	116	116	ISBP
cfp5316	AACAACCCCCCTCGAGTCT	AGGGGCGAATCTGAGTAGGT	-	130	ISBP
cfp5318	GCCTGCTCAATTTCTTGGAG	CGCCCCGTACATATGAGCTTT	171*	171*	ISBP-derived SNP
cfp5319	CAACATCACTGCCTGGAATG	AACATGCACACCCACATCTC	285*	285*	ISBP-derived SNP
cfp5320	AGCCGGCATATCATCTTGAG	GATAATCTAAGACAAGAATTTGGAA	-	293	ISBP
cfp5324	TAAGTTGCAGGATGGCACAA	GAGGGGCCTTATAAACCCAA	259	259	ISBP
cfp5328	TTATGTGCGGGTTCAACGTA	CGTTTTCTGTAGCCAACTACACC	225	225	ISBP
cfp5331	GCGTTTTCCGTCTGTTTACC	GGCGGACTAGCAACTCAAAC	144	144	ISBP
cfp5335	CGACGCATGGCTAGACTACA	TGATCTAAACGCTCGCTCTT	156	156	ISBP
cfp5338	GAATCAAGGCAACCCTTCAA	GGACGAAGGGAGTACGTGTT	172	172	ISBP
cfp5341	GTGGTTCGTAGATGGCAGGT	CCGCTTAGCGATCTACAAGG	268	268	ISBP
cfp5342	GGGTGCATGTATCAGGCTTT	CGCTGAGATGAGATGAACCA	290	290	ISBP
cfp5352	TCATGAACCGGGACTAAAGG	CGCTGTGGGAGTAAGAGGAG	135	135	ISBP
cfp5354	CGGACTACCAACGGAGACAT	GCGAGTTCCAAGTGATGAT	254	254	ISBP
cfp5355 •	CAGGAAGCATCGAACACTGA	AAAATCGCCTATTTACCCCC	243*	243*	ISBP-derived SNP
cfp5358 •	CGGATTGACATATGACGCTG	TCCCTCCGTCCTAAATTTTTATT	237*	237*	ISBP-derived SNP
CoA •	TATGCACATGAATTGAAACACAC	ACAATTTCTGATTCAGGATACG	-	800	EST
csSr2RK •	AACCAACAAGGTACACATCTCTG	TATTCTACCAATGGTTGCAACTTC	300	-	EST
D10F-C5 •	ACTGAGTTGGCCCATCGAAC	ACCGAACGGAATCTTCCAGA	200	-	EST
DOX_1 •	AGGAGGCCCCAGAATGATTT	GCTCCGTCACTCTCCTTCGT	700	1100	EST
ger9-csSr2 •	CAAGGGTTGCTAGGATTGGAAAAAC	AGATAACTCTTATGATCTTACATTTTTCTG	350	-	PCR-CAPS
NBS	AGTTCACCGCAGTACTGTAGG	CCATGATCACGTCGGTTTTAGG	509	509	EST
nw1821 •	-----	-----	259	252	SSR
Sr2 CAPS •	AGTTTAGTCCATCAATAATTTGTG	CTGTGGCCATGTATGGATATACTT	850	-	PCR-CAPS
stm538acag	ATCATGTGATCTCCTTGACG	ACACACACACACAGAGAGAG	85	80	stm
stm598tcac	GTTGCTTTAGGGGAAAAGCC	TCTCTCTCTCTCACACACAC	75	70	stm
sts69	AAGGAACGCTGATCCAAATG	TATGACCTCGCTCATTTGTCG	216	216	sts
sts92	CGACGACGTAGATCCAGATG	TGCTCATGATCGTCATCTCC	322	322	sts
wmm1104	TTCTTGAGGATACCGCGTTT	GCATCTGGCGTCTTTGTCT	184	175	SSR

Tabla A4: genes anotados en CS dentro del intervalo que mapea al gen *Lr3*. <http://wheatomics.sdau.edu.cn/>

Chrom	Start	END	Gene03G	Gene02G	Strand	Function description	Domain
chr6B	724.443604Mb	724.444932Mb	TraesCS6B03G1276500	TraesCS6B02G461700	+	Disease resistance protein (NBS-LRR class) family	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	724.469958Mb	724.473412Mb	TraesCS6B03G1276900	TraesCS6B02G461800	+	Ankyrin repeat-containing protein	PF00023: Ankyrin repeat; PF13857: Ankyrin repeats (many copies); PF13962: Domain of unknown function
chr6B	724.545863Mb	724.550236Mb	TraesCS6B03G1277200	TraesCS6B02G461900	+	NBS-LRR disease resistance protein-like protein	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	724.612659Mb	724.616902Mb	TraesCS6B03G1277400	TraesCS6B02G462000	+	Disease resistance protein (NBS-LRR class) family	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	724.837587Mb	724.838681Mb	TraesCS6B03G1277800	TraesCS6B02G462100	+	Transcription factor, putative	PF03634: TCP family transcription factor
chr6B	724.858752Mb	724.859015Mb	TraesCS6B03G1278100	TraesCS6B02G462200	-	vesicle-associated protein 1-4	null
chr6B	724.979824Mb	724.983717Mb	TraesCS6B03G1278500	TraesCS6B02G462300	+	Peroxidase	PF00141: Peroxidase
chr6B	725.010754Mb	725.012458Mb	TraesCS6B03G1278700	TraesCS6B02G462400	-	Gibberellin-regulated family protein	PF02704: Gibberellin regulated protein
chr6B	725.013067Mb	725.017067Mb	TraesCS6B03G1278800	TraesCS6B02G462500	-	4-hydroxybenzoate octaprenyltransferase	PF01040: UbiA prenyltransferase family
chr6B	725.019087Mb	725.022746Mb	TraesCS6B03G1278900	TraesCS6B02G462600	-	Receptor-kinase, putative	PF08263: Leucine rich repeat N-terminal domain; PF00560: Leucine Rich Repeat; PF00069: Protein kinase domain
chr6B	725.059009Mb	725.063346Mb	TraesCS6B03G1279100	TraesCS6B02G462700	-	Replication protein A 32 kDa subunit	PF08784: Replication protein A C terminal
chr6B	725.069703Mb	725.070466Mb	TraesCS6B03G1279200	TraesCS6B02G462800	+	Ripening-related protein	null
chr6B	725.076586Mb	725.079686Mb	TraesCS6B03G1279300	TraesCS6B02G462900	-	Tyrosine--tRNA ligase	PF00579: tRNA synthetases class I (W and Y)

Chrom	Start	END	Gene03G	Gene02G	Strand	Function description	Domain
chr6B	725.085912Mb	725.091668Mb	TraesCS6B03G1279500	TraesCS6B02G463000	-	Calcium-dependent lipid-binding (CaLB domain) family protein	PF00168: C2 domain
chr6B	725.105213Mb	725.10889Mb	TraesCS6B03G1279600	TraesCS6B02G463100	-	UDP-N-acetylmuramyl-tripeptide synthetase	null
chr6B	725.138959Mb	725.139896Mb	TraesCS6B03G1279800	TraesCS6B02G463200	+	F-box protein	PF00646: F-box domain
chr6B	725.142767Mb	725.143114Mb	TraesCS6B03G1279900	TraesCS6B02G463300	-	Glutamate--tRNA ligase	null
chr6B	725.152148Mb	725.152696Mb	TraesCS6B03G1280400	TraesCS6B02G463400	-	Disease resistance protein RPM1	null
chr6B	725.157802Mb	725.161326Mb	TraesCS6B03G1280700	TraesCS6B02G463500	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.192449Mb	725.197705Mb	TraesCS6B03G1280800	TraesCS6B02G463600	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.228183Mb	725.23155Mb	TraesCS6B03G1281100	TraesCS6B02G463700	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.231771Mb	725.232581Mb	TraesCS6B03G1281200	TraesCS6B02G463800	-	Disease resistance protein (NBS-LRR class) family	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.23961Mb	725.242111Mb	TraesCS6B03G1281400	TraesCS6B02G463900	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.262747Mb	725.266682Mb	TraesCS6B03G1281700	TraesCS6B02G464000	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.310637Mb	725.311227Mb	TraesCS6B03G1282200	TraesCS6B02G464100	-	Disease resistance protein RPM1	null
chr6B	725.319657Mb	725.332245Mb	TraesCS6B03G1282400	TraesCS6B02G464200	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.343784Mb	725.349187Mb	TraesCS6B03G1282500	TraesCS6B02G464300	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.353797Mb	725.359046Mb	TraesCS6B03G1282600	TraesCS6B02G464400	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.360585Mb	725.37799Mb	TraesCS6B03G1282700	TraesCS6B02G464500	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.368467Mb	725.36921Mb	TraesCS6B03G1282800	TraesCS6B02G464600	-	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 6	PF00499: NADH-ubiquinone/plastoquinone oxidoreductase chain 6

Chrom	Start	END	Gene03G	Gene02G	Strand	Function description	Domain
chr6B	725.370178Mb	725.370414Mb	TraesCS6B03G1283000	TraesCS6B02G464700	+	Ephrin type-A receptor 1	null
chr6B	725.387312Mb	725.393056Mb	TraesCS6B03G1283200	TraesCS6B02G464800	-	12-oxophytodienoate reductase-like protein	PF00724: NADH:flavin oxidoreductase / NADH oxidase family
chr6B	725.48328Mb	725.488712Mb	TraesCS6B03G1283600	TraesCS6B02G464900	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.585934Mb	725.588275Mb	TraesCS6B03G1284200	TraesCS6B02G465000	-	Disease resistance protein (NBS-LRR class) family	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.599181Mb	725.606994Mb	TraesCS6B03G1284300	TraesCS6B02G465100	-	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.623051Mb	725.628904Mb	TraesCS6B03G1284400	TraesCS6B02G465200	-	Kinesin-like protein	null
chr6B	725.633957Mb	725.637669Mb	TraesCS6B03G1284500	TraesCS6B02G465300	+	AP-5 complex subunit beta-1	null
chr6B	725.64088Mb	725.641719Mb	TraesCS6B03G1284700	TraesCS6B02G465400	+	transmembrane protein, putative (DUF594)	PF13968: Domain of unknown function (DUF4220)
chr6B	725.642311Mb	725.642958Mb	TraesCS6B03G1284800	TraesCS6B02G465500	+	transmembrane protein, putative (DUF594)	PF04578: Protein of unknown function, DUF594
chr6B	725.675171Mb	725.687816Mb	TraesCS6B03G1285300	TraesCS6B02G465600	+	Protein kinase family protein	PF00069: Protein kinase domain
chr6B	725.724108Mb	725.728955Mb	TraesCS6B03G1285700	TraesCS6B02G465700	+	receptor kinase 1	PF00069: Protein kinase domain; PF14299: Phloem protein 2
chr6B	725.738169Mb	725.745567Mb	TraesCS6B03G1285800	TraesCS6B02G465800	+	Disease resistance protein RPM1	PF00931: NB-ARC domain
chr6B	725.802374Mb	725.803697Mb	TraesCS6B03G1286500	TraesCS6B02G465900	+	BTB/POZ domain containing protein	PF00917: MATH domain; PF00651: BTB/POZ domain
chr6B	725.823635Mb	725.854014Mb	TraesCS6B03G1286800	TraesCS6B02G466000	+	receptor kinase 2	PF00069: Protein kinase domain
chr6B	725.876207Mb	725.878018Mb	TraesCS6B03G1287100	TraesCS6B02G466100	-	transmembrane protein, putative (DUF247)	PF03140: Plant protein of unknown function

Chrom	Start	END	Gene03G	Gene02G	Strand	Function description	Domain
chr6B	725.924436Mb	725.92729Mb	TraesCS6B03G1287600	TraesCS6B02G473900	+	3-ketoacyl-CoA synthase	PF08392: FAE1/Type III polyketide synthase-like protein; PF08541: 3-Oxoacyl-[acyl-carrier-protein (ACP)] synthase III C terminal
chr6B	726.073028Mb	726.073558Mb	TraesCS6B03G1288000	TraesCS6B02G473800	-	Thaumatococcus-like protein	PF00314: Thaumatococcus family
chr6B	726.182677Mb	726.18327Mb	TraesCS6B03G1288700	TraesCS6B02G473700	+	Methylthioribose-1-phosphate isomerase	null
chr6B	726.264614Mb	726.265168Mb	TraesCS6B03G1289300	TraesCS6B02G473600	+	multidrug resistance-associated protein 3	null
chr6B	726.32484Mb	726.328576Mb	TraesCS6B03G1289800	TraesCS6B02G473400	-	heparan-alpha-glucosaminide N-acetyltransferase-like protein (DUF1624)	PF11267: Domain of unknown function (DUF3067)
chr6B	726.324843Mb	726.326468Mb	TraesCS6B03G1289900	TraesCS6B02G473500	+	Pentatricopeptide repeat-containing protein	PF01535: PPR repeat; PF13812: Pentatricopeptide repeat domain; PF12854: PPR repeat
chr6B	726.358135Mb	726.358761Mb	TraesCS6B03G1290200	TraesCS6B02G473300	-	Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor superfamily protein	null
chr6B	726.372041Mb	726.372613Mb	TraesCS6B03G1290400	TraesCS6B02G473200	-	Pectinesterase inhibitor	PF04043: Plant invertase/pectin methylesterase inhibitor
chr6B	726.373545Mb	726.374276Mb	TraesCS6B03G1290500	TraesCS6B02G473100	-	F-box protein family	PF08268: F-box associated domain
chr6B	726.376579Mb	726.382225Mb	TraesCS6B03G1290600	TraesCS6B02G473000	-	Mitochondrial intermediate peptidase	PF01432: Peptidase family M3
chr6B	726.387585Mb	726.395774Mb	TraesCS6B03G1290700	TraesCS6B02G472900	-	integral membrane metal-binding family protein (DUF2296)	null
chr6B	726.425976Mb	726.428317Mb	TraesCS6B03G1291000	TraesCS6B02G472800	+	Calcium uniporter protein, mitochondrial	null

Tabla A5: genes anotados en CS dentro del intervalo que mapea al gen *LrSV2*. En verde los genes *TFP* y *TPR* (Wang *et al* 2024a) <http://wheatomics.sdau.edu.cn/>

Chrom	Start	END	Gene03G v2.1	Gene02G v1.1	Strand	Function description	Domain
chr3B	6.063054Mb	6.064845Mb	TraesCS3B03G0022700	TraesCS3B02G013100	+	Glycosyltransferase	PF00201: UDP-glucuronosyl and UDP-glucosyl transferase
chr3B	6.073695Mb	6.077105Mb	TraesCS3B03G0022800	TraesCS3B02G013200	+	Dephospho-CoA kinase, putative, expressed	PF01121: Dephospho-CoA kinase
chr3B	6.077386Mb	6.080144Mb	TraesCS3B03G0022900	TraesCS3B02G013300	-	TPX2 (Targeting protein for Xklp2) family protein	PF06886: Targeting protein for Xklp2 (TPX2)
chr3B	6.125716Mb	6.126018Mb	TraesCS3B03G0023400	TraesCS3B02G013400	+	NADH dehydrogenase subunit 4L	PF00420: NADH-ubiquinone/plastoquinone oxidoreductase chain 4L
chr3B	6.128967Mb	6.129555Mb	TraesCS3B03G0023700	TraesCS3B02G013500	-	30S ribosomal protein S7, chloroplastic	PF00177: Ribosomal protein S7p/S5e
chr3B	6.129008Mb	6.129558Mb	TraesCS3B03G0023800	TraesCSU02G158100	-	30S ribosomal protein S7, chloroplastic	PF00177: Ribosomal protein S7p/S5e
chr3B	6.134186Mb	6.134377Mb	TraesCS3B03G0024300	TraesCS3B02G013600	-	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	null
chr3B	6.134186Mb	6.134377Mb	TraesCS3B03G0024400	TraesCSU02G158000	-	Aspartyl/glutamyl-tRNA(Asn/Gln) amidotransferase subunit B	null
chr3B	6.134991Mb	6.135455Mb	TraesCS3B03G0024500	TraesCS3B02G013700	-	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	PF00346: Respiratory-chain NADH dehydrogenase, 49 Kd subunit
chr3B	6.134991Mb	6.135455Mb	TraesCS3B03G0024600	TraesCSU02G157900	-	NADH-quinone oxidoreductase subunit D	PF00346: Respiratory-chain NADH dehydrogenase, 49 Kd subunit
chr3B	6.157129Mb	6.157991Mb	TraesCS3B03G0025400	TraesCSU02G180100	+	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	PF00146: NADH dehydrogenase
chr3B	6.157134Mb	6.157991Mb	TraesCS3B03G0025500	TraesCSU02G173300	+	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	PF00146: NADH dehydrogenase
chr3B	6.157505Mb	6.157991Mb	TraesCS3B03G0025600	TraesCS3B02G013800	+	NADH-ubiquinone oxidoreductase chain 1	PF00146: NADH dehydrogenase
chr3B	6.167831Mb	6.168413Mb	TraesCS3B03G0025900	TraesCS3B02G013900	+	Zinc finger and BTB domain-containing protein 17	null
chr3B	6.167845Mb	6.16853Mb	TraesCS3B03G0026000	TraesCSU02G219200	+	Zinc finger and BTB domain-containing protein 17	null
chr3B	6.210118Mb	6.210479Mb	TraesCS3B03G0026300	TraesCS3B02G014000	+	cyclic nucleotide-gated channel 12	null
chr3B	6.220771Mb	6.222888Mb	TraesCS3B03G0026700	TraesCS3B02G014100	-	Flavin-containing monooxygenase	PF07992: Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase

Chrom	Start	END	Gene03G v2.1	Gene02G v1.1	Strand	Function description	Domain
chr3B	6.220941Mb	6.222881Mb	TraesCS3B03G0026800	TraesCSU02G045200	-	Flavin-containing monooxygenase	PF07992: Pyridine nucleotide-disulphide oxidoreductase
chr3B	6.239266Mb	6.239636Mb	TraesCS3B03G0026900	TraesCS3B02G014200	+	5-methyltetrahydropteroyltriglutamate--homocysteine methyltransferase	null
chr3B	6.242148Mb	6.243598Mb	TraesCS3B03G0027000	TraesCS3B02G014300	+	Expansin protein	PF03330: Lytic transglycolase; PF01357: Pollen allergen
chr3B	6.25094Mb	6.252156Mb	TraesCS3B03G0027100	TraesCS3B02G014400	+	Expansin protein	PF03330: Lytic transglycolase; PF01357: Pollen allergen
chr3B	6.302591Mb	6.303316Mb	TraesCS3B03G0027300	TraesCS3B02G014500	-	Fasciclin-like arabinogalactan, putative, expressed	null
chr3B	6.305961Mb	6.306274Mb	TraesCS3B03G0027400	TraesCS3B02G014600	+	Murein hydrolase activator NlpD	null
chr3B	6.344582Mb	6.345667Mb	TraesCS3B03G0027600	TraesCS3B02G014700	-	Glycerol-3-phosphate acyltransferase	null
chr3B	6.35875Mb	6.366458Mb	TraesCS3B03G0027700	TraesCS3B02G014800 TFP	+	Transducin family protein / WD-40 repeat family protein	null
chr3B	6.375001Mb	6.378109Mb	TraesCS3B03G0028100	TraesCS3B02G014900 TPR	-	Tetratricopeptide repeat protein, tpr, putative	PF13432: Tetratricopeptide repeat
chr3B	6.41869Mb	6.42806Mb	TraesCS3B03G0028200	TraesCS3B02G015000	+	Coatomer subunit beta'-1	PF00400: WD domain, G-beta repeat
chr3B	6.423173Mb	6.427989Mb	TraesCS3B03G0028300	TraesCSU02G189400	+	Coatomer subunit beta'-1	PF00400: WD domain, G-beta repeat
chr3B	6.432085Mb	6.434317Mb	TraesCS3B03G0028500	TraesCS3B02G015100	-	Pentatricopeptide repeat-containing protein	PF13812: Pentatricopeptide repeat domain; PF13041: PPR repeat family; PF12854: PPR repeat
chr3B	6.461524Mb	6.462461Mb	TraesCS3B03G0028600	TraesCS3B02G015200	+	Flowering <i>locus</i> T-like protein, putative	PF01161: Phosphatidylethanolamine-binding protein
chr3B	6.503456Mb	6.505642Mb	TraesCS3B03G0029000	TraesCS3B02G015300	-	Pentatricopeptide repeat-containing protein	PF13041: PPR repeat family; PF01535: PPR repeat; PF13812: Pentatricopeptide repeat domain
chr3B	6.5143Mb	6.520754Mb	TraesCS3B03G0029100	TraesCS3B02G015500	+	Receptor kinase, putative, expressed	PF13947: Wall-associated receptor kinase galacturonan-binding; PF00069: Protein kinase domain
chr3B	6.514905Mb	6.517931Mb	TraesCS3B03G0029200	TraesCS3B02G015400	-	Receptor kinase	PF00069: Protein kinase domain
chr3B	6.530621Mb	6.531791Mb	TraesCS3B03G0029300	TraesCS3B02G015600	+	Flowering <i>locus</i> T-like protein, putative	PF01161: Phosphatidylethanolamine-binding protein
chr3B	6.593184Mb	6.594729Mb	TraesCS3B03G0029700	TraesCS3B02G015700	+	Flowering <i>locus</i> T-like protein, putative	PF01161: Phosphatidylethanolamine-binding protein

Chrom	Start	END	Gene03G v2.1	Gene02G v1.1	Strand	Function description	Domain
chr3B	6.659713Mb	6.660813Mb	TraesCS3B03G0029800	TraesCS3B02G015800	+	Flowering <i>locus</i> T-like protein	PF01161: Phosphatidylethanolamine-binding protein
chr3B	6.671564Mb	6.673567Mb	TraesCS3B03G0029900	TraesCS3B02G015900	+	pre-mRNA 3' end processing protein WDR33	null
chr3B	6.68149Mb	6.685614Mb	TraesCS3B03G0030000	TraesCS3B02G016000	+	Fatty acyl-CoA reductase	PF07993: Male sterility protein; PF03015: Male sterility protein
chr3B	6.764757Mb	6.776638Mb	TraesCS3B03G0030300	TraesCS3B02G016100	-	Protein kinase superfamily protein	null
chr3B	6.792313Mb	6.794111Mb	TraesCS3B03G0030900	TraesCS3B02G016300	-	Receptor kinase	PF00069: Protein kinase domain