

COLEGIO DE POSTGRADUADOS



INSTITUCION DE ENSEANZA E INVESTIGACION EN CIENCIAS AGRICOLAS

CAMPUS MONTECILLO

POSTGRADO DE RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENETICA

Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a *Septoria tritici blotch* mediante mapeo de QTL

Benjamín Asael Martínez Cisneros

T E S I S

PRESENTADA COMO REQUISITO PARCIAL

PARA OBTENER EL GRADO DE:

MAESTRO EN CIENCIAS

MONTECILLO, TEXCOCO, EDO. DE MEXICO

2015


La presente tesis titulada: **"Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch mediante de mapeo de QTL"** realizada por el alumno: **Benjamín Asael Martínez Cisneros** bajo la dirección del Consejo Particular indicado, ha sido aprobada por el mismo y aceptada como requisito parcial para obtener el grado de:

MAESTRO EN CIENCIAS
RECURSOS GENÉTICOS Y PRODUCTIVIDAD

GENETICA

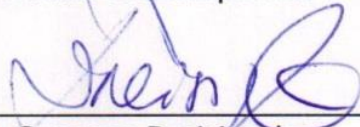
CONSEJO PARTICULAR

CONSEJERO



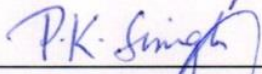
Dr. Serafín Cruz Izquierdo

DIRECTOR DE TESIS



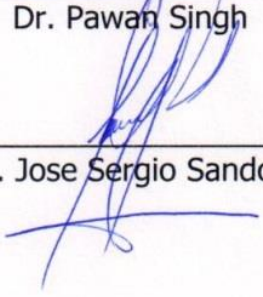
Dra. Susanne Dreisigacker

ASESOR



Dr. Pawan Singh

ASESOR



Dr. Jose Sergio Sandoval Islas

Montecillo, Texcoco, Estado de México, Febrero 2015

Agradecimientos

Primeramente le doy gracias a Dios por permitirme realizar esta investigación y terminar esta etapa de mi vida.

Gracias a todas las personas que participaron en la realización de esta investigación, en especial a mi consejo particular: Dr. Serafín Cruz Izquierdo, Dra. Susanne Dreisigacker, Dr. Pawan Singh, Dr. Jose Sergio Sandoval Islas, gracias por su disponibilidad y orientación.

También agradezco, al personal de los laboratorios de Mejoramiento Molecular de Trigo, Sanidad de Semillas del CIMMYT por apoyarme para realizar esta investigación.

Sin olvidarme de mis familiares y amigos que siempre me han apoyado en cada una de mis actividades profesionales, agradezco en especial a mis Padres, a mi esposa Elizabeth por su apoyo en esta etapa de mi vida.

Este trabajo tiene una dedicatoria especial para Sarai como agradecimiento por su presencia en mi vida.

Contenido

Resumen	1
Summary	2
Introducción General	3
Planteamiento del problema	3
Objetivos	6
Objetivo general.....	6
Objetivos específicos.....	6
Hipótesis	7
Antecedentes	8
Septoria tritici blotch.....	8
Marcadores moleculares y QTL.....	9
Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR).....	11
Polimorfismos de un solo nucleótido (<i>Single Nucleotide Polymorphism</i> , SNP)	12
Construcción de mapas de ligamiento.....	14
El análisis de QTL.....	15
Líneas recombinantes puras (<i>Recombinant Inbred Lines</i> , <i>RIL</i>).....	16
Selección asistida por marcadores	17
Selección Genómica	18
Capítulo I: Adult-Plant Resistance to Septoria tritici blotch in Hexaploid Spring Wheat*	20
Abstract	20
Introduction	22
Materials and methods	25

Plant materials	25
Inoculation procedures and disease assessment	25
Field trials	26
DNA isolation and selective genotyping.....	27
Phenotypic data analyses	30
Maps of linkage groups and QTL analyses.....	31
Results	32
Phenotypic evaluation.....	32
QTL analyses.....	36
Discussion	48
References	57
Conclusiones generales y discusión	65
Annex 1. Metodología para el Análisis Genotípico	71
Extracción de ADN de tejido liofilizado.....	71
Protocolo de PCR para amplificación de SSR	72
Preparación de geles de acrilamida para SSR	73
Protocolo de PCR para amplificación de SNP	74
Marcadores analizados en la población NASMA x RPB709.71/COC para su genotipo	76
Referencias Bibliográficas	78

Índice de Figuras (Introducción general)

Figura 1. Trigo inoculado con síntomas de la enfermedad que disminuyen de izquierda a derecha. http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Septoria.aspx	8
Figura 2. Picnidios que contienen las esporas asexuales. http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Septoria.aspx	8
Figura 3. Gel de acrilamida con productos de PCR de SSR.	12
Figura 4. Grafica con los resultados de amplificación de SNP.	14

List of Tables (Capitulo 1)

Table 1. Published molecular markers flanking assigned <i>Septoria tritici</i> blotch resistance genes used for screening of two RIL populations NASMA × IAS20*5/H567.71 and NASMA × RPB709.71/COC.....	29
Table 2. Mean and range of AUDPC for <i>Septoria tritici</i> blotch for the susceptible parent NASMA and resistant parents IAS20*5/H567.71 RPB709.71/COC and derived RIL populations in four environments.	35
Table 3. Estimates of variance components and heritability for AUDPC of <i>Septoria tritici</i> blotch of two RIL populations NASMA × IAS20*5/H567.71 and NASMA × RPB709.71/COC in four environments (location-year combinations).....	35
Table 4. Summary of resistance QTL for <i>Septoria tritici</i> blotch consistent across at least three out of four environments.	39
Table 5. Sequences of SSR and SNP markers linked to QTL for <i>Septoria tritici</i> blotch resistance.	42

List of Figures (Capítulo 1)

- Figure 1.** Histogram of AUDPC for Septoria tritici blotch averaged across four environments of the NASMA × IAS20*5/H567.71 and NASMA × RPB709.71/COC RIL populations. The mean values for the parents are indicated by arrows. 34
- Figure 2.** LOD curves of QTL on chromosomes 1BS and 5AL in NASMA × IAS20*5/H567.71 for Septoria tritici blotch. Different colors represent different locations. 38
- Figure 3.** LOD curves of QTL on chromosomes 3BS, 5AL and 7AS in NASMA × RPB709.71/COC for Septoria tritici blotch. Different colors represent different locations. 41
- Figure 4.** Boxplots of RILs of the NASMA × IAS20*5/H567.71 population grouped by the genotypes of the flanking markers of two across environment consistent QTL associated with Septoria tritici blotch resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent ‘NASMA’ or the resistant (RR) parent IAS20*5/H567.71’, * represents the mean. 44
- Figure 5.** Boxplots of RILs of the NASMA × RPB709.71/COC population grouped by the genotypes of the flanking markers of three consistent QTL associated with Septoria tritici blotch resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent ‘NASMA’ or the resistant (RR) parent ‘RPB709.71/COC’, * represents the mean. 45
- Figure 6.** Interaction plots of RILs of the NASMA × IAS20*5/H567.71 population grouped by the genotypes of the flanking markers of two across environment consistent QTL associated with Septoria tritici blotch resistance. The marker code

indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent 'NASMA' or the resistant (RR) parent 'IAS20*5/H567.71'. Each line type represents a different environment..... 46

Figure 7. Interaction plots of RILs of the NASMA × RPB709.71/COC population grouped by the genotypes of the flanking markers for the QTL *QStb.cim.3BL* and *QStb.cim.5AL-2* associated with *Septoria tritici* blotch resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent 'NASMA' or the resistant (RR) parent 'RPB709.71/COC'. Each line type represents a different environment..... 46

Figure 8. Interaction plots of RILs of the NASMA × RPB709.71/COC population grouped by the genotypes of the flanking markers for the QTL *QStb.cim.3BL* and *QStb.cim.7AS* associated with *Septoria tritici* blotch resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent 'NASMA' or the resistant (RR) parent 'RPB709.71/COC'. Each line type represents a different environment..... 47

Figure 9. Interaction plots of RILs of the NASMA × RPB709.71/COC population grouped by the genotypes of the flanking markers for the QTL *QStb.cim.5AL-2* and *QStb.cim.7AS* associated with *Septoria tritici* blotch resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent 'NASMA' or the resistant (RR) parent 'RPB709.71/COC'. Each line type represents a different environment..... 47

Figure 10. Comparison of the current and previous linkage maps. A. 1BS linkage group from the current study. B. Linkage map and estimated gene locations

adapted from Liu *et al.* (2013). *StbWW2451*, *StbWW2499*, *StbWW1842* (Raman *et al.* 2009). *Stb11a* (Chartrain *et al.* 2005b). *Stb11b* (Tabib Ghaffary *et al.* 2012). ... 51

Figure 11. Comparison of the current and previous linkage maps. A 7AS linkage group from the current study. B Linkage map from Goodwin *et al.* (2015). C. Consensus map from Sommers *et al.* 2004. 54

Resumen

La enfermedad *Septoria tritici blotch* ocasionada por *Zymoseptoria tritici* es una de las principales enfermedades del trigo y puede causar grandes pérdidas en el rendimiento de su producción mundial. El control de la enfermedad ha sido una tarea ardua que incluye distintas técnicas, pero la resistencia genética del huésped es un elemento fundamental para su control eficaz.

En la presente investigación se identificaron los marcadores moleculares ligados a la resistencia a *Septoria tritici blotch* mediante el mapeo de QTL de una población con 193 líneas recombinantes puras. Los padres de la población son una línea con origen en Marruecos llamada NASMA susceptible y una línea con origen en CIMMYT llamada RPB709.71/COC resistente a la enfermedad.

Utilizando los marcadores moleculares de Secuencias Simples Repetidas y los Polimorfismos de un Solo Nucleótido se identificaron tres QTL en los cromosomas; 3 BL, 5 AL y 7 AS, ligados a la resistencia a *Septoria tritici blotch* en la fase adulta estables en cuatro ambientes de campo; en Toluca y en el Rancho Bóximo, Jiquipilco, en el Estado de México en los ciclos de evaluación 2010 y 2011.

Estos resultados son de gran importancia debido a que la mayoría de las investigaciones para la resistencia a la enfermedad se realizan en la fase de plántula en invernadero y se conoce poco de la resistencia en la fase adulta en campo.

Palabras clave: *Zymoseptoria tritici*, Resistencia Genética, Trigo, QTL.

Summary

Septoria tritici blotch disease caused by *Zymoseptoria tritici* is one of the major diseases of wheat and can cause large losses in yield of its global production. The disease control has been an arduous task involving different techniques, but the genetic resistance of the host is a key element for effective control.

In this project we identified molecular markers linked to resistance to *Septoria tritici* blotch by QTL mapping using a population of 193 recombinant inbred lines. The parents of the population were a susceptible line from Morocco called NASMA and a disease resistant line from CIMMYT called RPB709.71/COC.

Using the molecular marker technologies, Simple Sequence Repeats and Single Nucleotide Polymorphisms we found three QTL on chromosomes 3BL, 5AL and 7AS linked to resistance to *Septoria tritici* blotch in the adult-plant stage consistent across four different field environments in Toluca and in Bóximo, Jiquipilco, in the State of Mexico in 2010 and 2011.

These results are of great importance because previous research for this disease resistance was mainly performed at the seedling stage in the greenhouse. Little is known about the resistance at adult-plant stage in the field.

Keywords: *Zymoseptoria tritici*, Genetic Resistance, Wheat, QTL.

Introducción General

Planteamiento del problema

El trigo (*Triticum aestivum* L., $2n = 6x = 42$) es una de las principales fuentes de alimentación en el mundo. Es el cultivo más antiguo y el que más se cultiva desde 10,000-8,000 a.C. (Luo *et al.*, 2007). El trigo es un producto clave para combatir el hambre en el mundo y se debe garantizar una producción suficiente para alimentar a la población mundial que aumentará en un 50 % y alcanzará los 9 mil millones de habitantes en el año 2050 (FAO, 2010). Se prevé que haya una disminución considerable en la producción anual de trigo a causa de las distintas enfermedades que atacan al trigo (USDA, 2010).

La enfermedad Septoria tritici blotch (STB) ocasionada por el ascomiceto *Zymoseptoria tritici* causa gran impacto en la producción del trigo para el consumo humano. STB es la enfermedad más recurrente e importante del trigo en Europa occidental, una de las mayores zonas de producción de trigo, también es una de las principales enfermedades en América, Asia central y occidental y particularmente en los cultivos de trigo duro en el norte de África. STB puede causar pérdidas en el rendimiento que suelen oscilar entre el 10-15 %, pero en condiciones climáticas favorables para la enfermedad las pérdidas en el rendimiento pueden superar el 50 % en lugares en donde la agricultura es de bajos insumos y donde el manejo de la enfermedad suele ser deficiente (Duveiller *et al.*, 2007). El control de STB incluye la rotación de cultivos, labranza del suelo, aplicación de fungicidas y el cultivo de variedades resistentes (Risser *et al.*, 2011).

STB es el principal objetivo de la industria agroquímica en Europa occidental (Jorgensen, 2008), pero las aplicaciones de fungicidas no siempre son oportunas, razonables ambientalmente o viables económicamente (Paveley *et al.*, 1997) y algunos fungicidas, incluyendo las estrobilurinas, ya no son eficaces contra STB debido a las mutaciones en la población altamente variable del patógeno (Torriani *et al.*, 2009). Por lo tanto, la resistencia genética del huésped es un elemento importante en las estrategias eficaces del control de la enfermedad para la producción comercial de trigo (Tabib-Ghaffary *et al.*, 2012).

El análisis de la población de trigo de trigo harinero de primavera de la presente investigación permitirá encontrar nuevos elementos de resistencia genética a STB. Se buscarán en la población los locus de carácter cuantitativo (*Quantitative Trait loci*, QTL) que estén ligados a la resistencia a STB en campo, esto debido a que la mayoría de los genes reportados que han sido efectivos contra la enfermedad han sido mapeados en invernadero en la fase de plántula y no han sido totalmente probados en el campo.

El objetivo de la presente investigación es identificar los marcadores moleculares ligados a la resistencia a STB mediante el mapeo de QTL de una población con 193 líneas recombinantes puras (RIL). Los padres de la población son una línea con origen en Marruecos llamada NASMA y una línea con origen en CIMMYT (Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo) llamada RPB709.71/COC. Se ha observado que la línea NASMA es susceptible y que la línea RPB709.71/COC es resistente a STB.

“Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch mediante mapeo de QTL”

Benjamín Asael Martínez Cisneros

Para lograr este objetivo se realizara el análisis fenotípico de la población en campo para la resistencia a STB, en Toluca y en el Rancho Bóximo, Jiquipilco, en el Estado de México en donde la enfermedad se encuentra presente de manera natural. También se realizara el análisis genotípico de la población utilizando marcadores moleculares tales como las Secuencias Simples Repetidas o microsatélites (*Simple Sequence Repeats*, SSR) y los Polimorfismos de un Solo Nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism*, SNP) polimórficos relacionados a la resistencia a la enfermedad. De igual manera se realizaran pruebas con los marcadores ligados a los genes ya reportados de resistencia a STB. Finalmente se realizara el análisis de los datos fenotípicos y genotípicos para la obtención del mapa de QTL.

Objetivos

Objetivo general

Identificar los marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch por medio de mapeo de QTL.

Objetivos específicos

- 1) Realizar la extracción de ADN de la población de mapeo.
- 2) Realizar la caracterización de los padres de la población de mapeo con marcadores moleculares (SNPs, SSRs y marcadores reportados ligados a genes de resistencia a STB).
- 3) Realizar la caracterización de la población de mapeo con los marcadores polimórficos encontrados entre los padres.
- 4) Realizar el mapa de ligamiento para la población de mapeo.
- 5) Analizar los datos fenotípicos ligados a la resistencia de STB en campo.
- 6) Realizar el análisis de mapeo de QTL con los datos fenotípicos y genotípicos de la población.

Hipótesis

La enfermedad STB ocasionada por *Zymoseptoria tritici* es una de las principales enfermedades del trigo y puede causar grandes pérdidas en el rendimiento de su producción mundial. El control de la enfermedad ha sido una tarea ardua que incluye distintas técnicas, pero la resistencia genética del huésped es un elemento fundamental para su control eficaz. La segregación entre la población de mapeo de la presente investigación permitirá encontrar nuevos QTL ligados a la resistencia a STB en campo, debido a que la mayoría de los genes reportados que han sido efectivos fueron mapeados en invernadero en la fase de plántula y no han sido totalmente probados en campo.

Antecedentes

Septoria tritici blotch

Los síntomas iniciales de STB son pequeñas manchas cloróticas que aparecen en las hojas de las plántulas. A medida que las plantas crecen las lesiones (Figura 1) se tornan de color marrón claro y desarrollan cuerpos fructíferos de color oscuro (Figura 2). Las lesiones en las hojas maduras son largas, estrechas y delimitadas por las venas de la hoja, pero también pueden ser de forma irregular o elíptica en las plántulas o en las hojas jóvenes.



Figura 1. Trigo inoculado con síntomas de la enfermedad que disminuyen de izquierda a derecha.

<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Septoria.aspx>.

La infección por *Zymoseptoria tritici* se inicia por ascosporas transportadas en el aire y por el agua que dispersa los conidios contenidos sobre los residuos de la cosecha de la temporada anterior. La infección primaria ocurre poco después de que las plántulas emergen. Los tubos germinales de ascosporas son atraídos a



Figura 2. Picnidios que contienen las esporas asexuales.

<http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Septoria.aspx>.

las estomas, a través de los cuales penetran a la cavidad sub-estomática ya sea directamente o después de la producción de una estructura similar a un apresorio

(cojín de infección). Durante varios días, las hifas crecen intercelularmente con un pequeño aumento en la biomasa. Tras el cambio de crecimiento biotrófico a necrotrófico, las células de la planta se colapsan, se forman lesiones y se identifican por pequeñas manchas de color amarillo. Las lesiones se expanden, principalmente en la dirección de las nervaduras de las hojas para formar manchas necróticas largas y estrechas. Se desarrollan picnidios alrededor de los estomas de la planta en las áreas necróticas de las lesiones que exudan a los conidios. Estas esporas son diseminadas por la lluvia en las hojas de la misma planta o en sus cercanías. El patógeno sobrevive de manera libre principalmente como pseudotecios, pero también como picnidios sobre los desechos de los cultivos (Ponomarenko *et al.*, 2011).

Marcadores moleculares y QTL

En la actualidad es posible detectar y localizar rasgos agrícolas importantes, tales como el rendimiento, la calidad y la resistencia a enfermedades, que son controlados por muchos genes y se conocen como rasgos cuantitativos (rasgos poligénicos), mediante el análisis en conjunto de la segregación genotípica para marcadores específicos y de los valores fenotípicos de los individuos o las líneas específicas. Las regiones de los genomas que contienen genes asociados a un rasgo cuantitativo particular se conocen como QTL (Collard *et al.*, 2005).

Los marcadores genéticos representan las diferencias genéticas entre los organismos individuales o especies. Los marcadores genéticos se pueden encontrar a distintas distancias de los genes que controlan el rasgo de interés; en

la medida que se encuentren más cerca del gen objetivo mayor será el efecto para la selección sobre el fenotipo de dicho rasgo. Todos los marcadores genéticos ocupan posiciones genómicas específicas dentro de los cromosomas (genes) llamadas locus (Collard *et al.*, 2005).

Hay tres principales tipos de marcadores genéticos: (1) morfológicos: marcadores que son rasgos fenotípicos o caracteres; (2) bioquímicos: variantes alélicas de enzimas llamadas isoenzimas; (3) moleculares: revelan sitios de variación en la secuencia de ADN (Jones *et al.*, 1997).

Los marcadores moleculares son los más ampliamente utilizados debido a su abundancia. Surgen a partir de los diferentes tipos de mutaciones en el ADN, tales como mutaciones de sustitución (mutaciones puntuales), de reordenamientos (inserciones o deleciones) o de errores en la replicación de ADN (Paterson, 1996). A diferencia de los marcadores morfológicos y bioquímicos, los marcadores moleculares son prácticamente ilimitados en número y no son afectados por factores ambientales y/o la etapa de desarrollo de la planta (Winter & Kahl, 1995). Los marcadores moleculares que se utilizan para la construcción de mapas de ligamiento, tienen otras aplicaciones en los cultivos como la evaluación del nivel de la diversidad genética dentro del germoplasma y la identidad de variedades cultivadas (Jahufer *et al.*, 2003).

Los marcadores moleculares se pueden dividir en tres clases basándose en el método de su detección: (1) hibridación; (2) Reacción en Cadena de la Polimerasa (*Polymerase Chain Reaction*, PCR) y (3) Secuenciación (Gupta *et al.*, 1999). Los

marcadores moleculares pueden revelar diferencias genéticas que se pueden visualizar mediante electroforesis, o con sondas radiactivas o colorimétricas. Los marcadores moleculares que revelan diferencias entre individuos se denominan marcadores polimórficos, mientras que los marcadores que no discriminan entre los genotipos se denominan marcadores monomórficos. Los marcadores polimórficos también pueden ser descritos como codominantes o dominantes. Esta descripción se basa en que los marcadores pueden discriminar entre homocigotos y heterocigotos. Los marcadores codominantes muestran diferencias en el tamaño, mientras que los marcadores dominantes pueden estar presentes o ausentes (Collard *et al.*, 2005). Las dos tecnologías de marcadores moleculares más importantes en los últimos años son los SSRs y los SNPs (Dreisigacker, 2012).

Microsatélites o secuencias simples repetidas (SSR)

Los SSR son secuencias repetidas en tándem (uno detrás de otro) dispersas a través del genoma (Grist *et al.*, 1993). Esas secuencias tándem repetidas consisten de 1 a 6 pb de longitud que se repiten varias veces. Los SSRs pueden ser amplificados mediante PCR utilizando iniciadores que flanquean a estas regiones (Figura 3). Las repeticiones en tándem son resistentes a cambios genómicos durante la replicación celular, etapa en la que se genera un alto grado de polimorfismo. Se ha observado que hay una buena relación entre el número de repeticiones simples y el número de alelos detectados. Así que cuanto mayor sea el número de repeticiones en los SSRs del ADN, mayor será el número de

polimorfismos detectados a través de la población. Por lo tanto, los SSRs forman un sistema ideal de marcadores genéticos, debido a que detectan simultáneamente múltiples alelos, se pueden crear patrones de bandeo en locus complejos y se ha mejorado la eficacia del sistema de marcaje. Otras características destacadas que tienen los SSRs es que tienen herencia codominante y están distribuidos de manera uniforme a través del genoma (Dreisigacker, 2012).

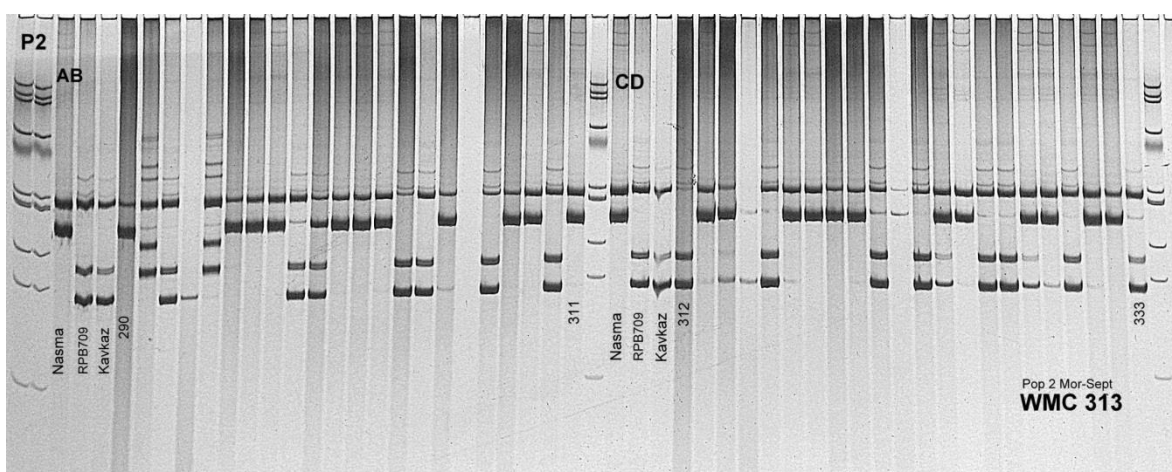


Figura 3. Gel de acrilamida con productos de PCR de SSR.

Polimorfismos de un solo nucleótido (*Single Nucleotide Polymorphism, SNP*)

Un SNP es una mutación única de un par de base en un locus específico, generalmente formado por dos alelos. Los SNP han sido propuestos como marcadores debido a que se conservan evolutivamente. Las tecnologías clave para el diseño de SNP's incluyen métodos basados en hibridación, métodos basados en enzimas (amplificación por PCR de alguna secuencia objetivo) y otros

métodos de post-amplificación basados en las propiedades físicas del ADN, como el de la conformación de ADN de cadena sencilla. Además, se han diseñadas diversas plataformas y programas de software para obtener un alto rendimiento en el análisis genotípico de SNP utilizando distintas técnicas como la electroforesis, la fluorescencia, los microarreglos, la espectrofotometría de masas o mediante el uso perlas (Dreisigacker, 2012). La plataforma KASP es un método relativamente fácil de implementar en un programa de mejoramiento utilizando SNP's. El método KASP (*KBiosciences Competitive Allele-Specific PCR genotyping system*) consiste en una etapa inicial de PCR, en donde un iniciador específico para cada alelo se une a su región complementaria en la posición del SNP. El iniciador *reverse* también se une a la cadena complementaria del alelo y se realiza la PCR. En la mezcla de reacción están presentes dos oligonucleótidos marcados con un fluorocromo distinto para cada uno, que son complementarios a las secuencias de los iniciadores específicos para los alelos, están unidos a un extintor para no producir ninguna señal fluorescente. Después de amplificación, uno de los oligos marcados con un fluorocromo, se une al alelo amplificado correspondiente y se genera la señal fluorescente. Si el genotipo en un determinado SNP es homocigótico, sólo una u otra de las señales fluorescentes será producida. Si el individuo es heterocigótico, se producirán las distintas señales fluorescentes de los oligos marcados específicos para cada alelo (Figura 4) (www.kbioscience.co.uk/reagents/KASP.html).

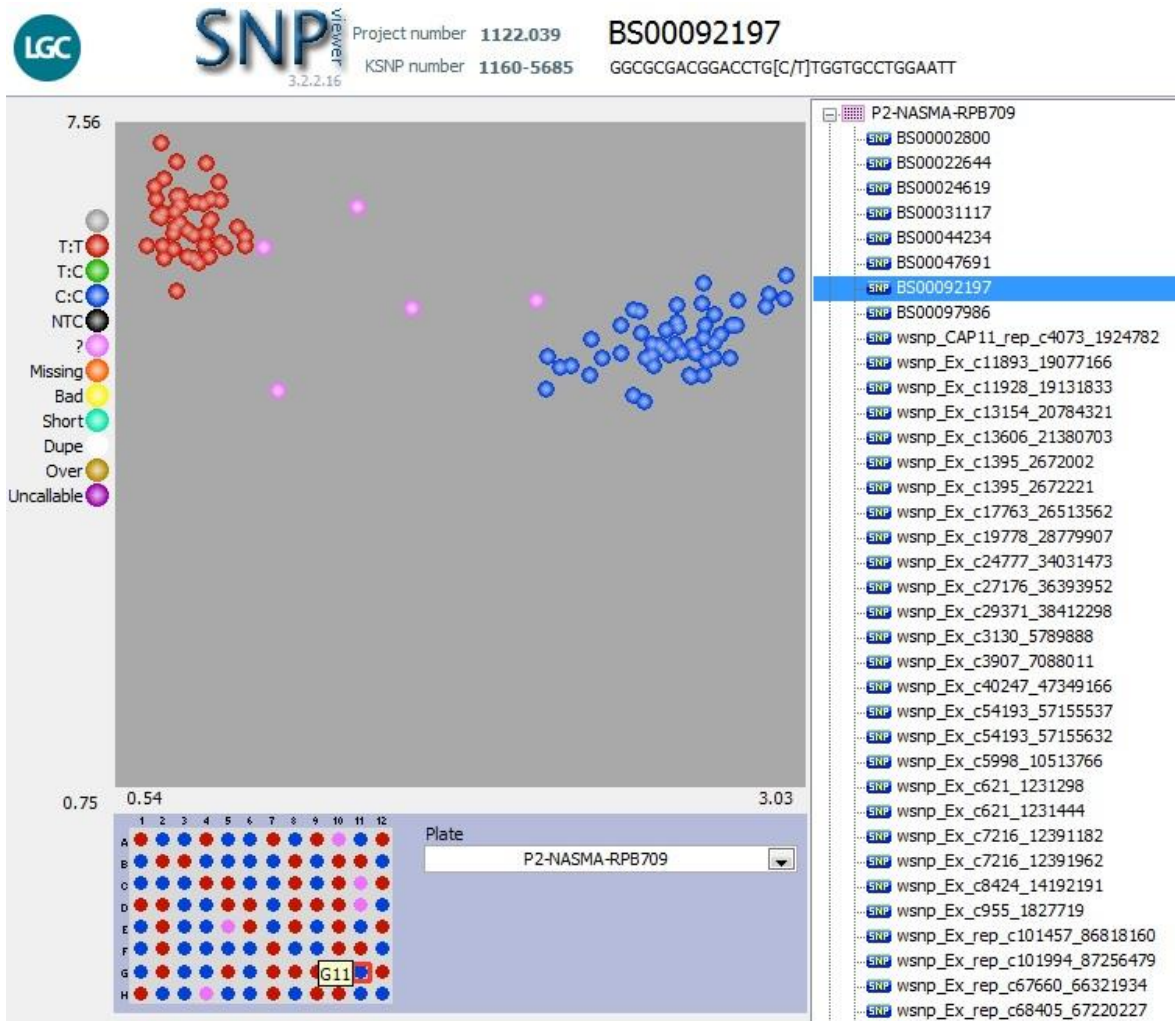


Figura 4. Grafica con los resultados de amplificación de SNP.

Construcción de mapas de ligamiento

Uno de los principales usos de los marcadores moleculares en la investigación agrícola ha sido la construcción de mapas de ligamiento para las diversas especies de cultivos. Mediante el análisis de QTL los mapas de ligamiento se utilizan para la identificación de regiones cromosómicas que contienen genes que controlan rasgos de interés. El proceso de construcción de mapas de ligamiento y

el análisis de QTL para identificar regiones genómicas asociadas con rasgos, se conoce como mapeo de QTL (Mohan *et al.*, 1997). Los marcadores moleculares que están estrechamente relacionados con genes agrónomicamente importantes se pueden usar como herramientas moleculares para la Selección Asistida por Marcadores moleculares (*Marker Assisted Selection*, MAS) en los cultivos de plantas (Ribaut & Hoisington, 1998).

Los mapas de ligamiento indican la posición y las distancias genéticas relativas entre los marcadores a lo largo de los cromosomas. En una población segregante existe una mezcla de genotipos parentales y recombinantes. La frecuencia de los genotipos recombinantes puede usarse para calcular fracciones de recombinación, que pueden utilizarse para inferir la distancia genética entre los marcadores. El mapeo de funciones se utiliza para convertir las fracciones de recombinación en las unidades de mapeo llamadas *centiMorgans* (cM). Los mapas de ligamiento se construyen a partir del análisis de muchos marcadores segregantes. Los tres principales pasos de la construcción mapa de ligamiento son: (1) la producción de una población de mapeo, (2) la identificación del polimorfismo y (3) el análisis de ligamiento de los marcadores (Collard *et al.*, 2005).

El análisis de QTL

El análisis de QTL se basa en el principio de detección de una asociación entre el fenotipo y el genotipo de los marcadores. Los marcadores moleculares se utilizan para dividir la población de mapeo en diferentes grupos genotípicos basados en la presencia o ausencia de un locus del marcador en particular y para determinar si

existen diferencias significativas entre los grupos con respecto a la característica que se está midiendo (Young, 1996). Una diferencia significativa entre las medias fenotípicas de los grupos (sean 2 o 3), dependiendo del sistema del marcador y del tipo de población, indica que el locus del marcador que se está utilizando para dividir la población de mapeo está ligado a un QTL que controla el rasgo (Collard *et al.*, 2005).

Se pueden detectar asociaciones entre los marcadores moleculares y los rasgos de interés analizados en varias formas. La forma más simple es la “Prueba de t” en donde se comparan los promedios del rasgo de interés en los grupos de alelos observados por cada marcador molecular. El método más reciente es el método *Composite Interval Mapping* (CIM) que combina el mapeo por intervalos; en donde se analizan simultáneamente pares de marcadores, en lugar de un solo marcador, a lo largo del cromosoma; con la regresión lineal e incluye más marcadores adyacentes a los marcadores ligados en el modelo estadístico (Collard *et al.*, 2005). Este método va a ser utilizado en la presente investigación mediante el programa IciMapping en donde el mapeo de QTL se realiza en tres pasos de construcción: el agrupamiento inicial (*Grouping*), el ordenamiento (*Ordering*) y el posicionamiento (*Rippling*) final de los marcadores ligados a lo largo de los cromosomas.

Líneas recombinantes puras (*Recombinant Inbred Lines, RIL*)

Las líneas recombinantes puras son poblaciones que frecuentemente se usan para el mapeo de QTL. El principio de las líneas recombinantes puras es que dos

líneas puras se cruzan y los híbridos se entrecruzan para producir una progenie F_2 . La progenie F_2 se auto-fecunda para establecer las líneas puras a través de repetidos entrecruzamientos entre las progenies. Los genomas de cada una de estas líneas son un mosaico de regiones cromosómicas homocigotas de las dos líneas puras progenitoras. Las líneas de la progenie se analizan para obtener los genotipos y fenotipos que difieren entre la progenie y los dos progenitores. Debido a que cada línea recombinante pura es casi homocígota, su genotipo es reproducible y la variación genética individual se reduce al mínimo. Además, una vez que una línea ha sido analizada genotípicamente, puede ser evaluada varias veces y en distintas condiciones ambientales (Crow, 2007).

Selección asistida por marcadores

La selección asistida por marcadores puede incrementar la eficiencia y eficacia en el fitomejoramiento en comparación con los métodos convencionales de mejoramiento. Una vez que se han identificado los marcadores que están estrechamente ligados a genes de interés por medio de mapeo de QTL, antes de la evaluación de campo de un gran número de plantas, los mejoradores pueden utilizar alelos específicos del marcador molecular como una herramienta de diagnóstico para identificar las plantas que llevan los genes (Ribaut *et al.*, 1997).

Las ventajas del análisis MAS son las siguientes:

- Ahorro de tiempo por la sustitución de ensayos complejos de campo (que deben llevarse a cabo en determinados momentos del año o en lugares específicos, o que son técnicamente complicados) con pruebas moleculares.

- Reducción de la evaluación fenotípica asociada con los ensayos de campo y comprobación de los rasgos específicos en donde no es viable la evaluación fenotípica (por ejemplo, restricciones cuarentenarias pueden impedir que los patógenos sean utilizados para la selección).
- Independencia de los efectos ambientales.
- Selección de genotipos en estado de plántula.
- Piramideo de genes o la combinación de varios genes pirámide simultáneamente.
- Evitar la transferencia de genes indeseables o nocivos.
- La selección de rasgos definidos por alelos recesivos (Collard *et al.*, 2005).

Selección Genómica

Los programas tradicionales de mejoramiento de plantas principalmente están basadas en la evaluación de los fenotipos en distintos ambientes. La selección y la recombinación están basadas en los datos resultantes más el pedigrí, cuando está disponible. La selección asistida por marcadores utiliza marcadores moleculares en desequilibrio de ligamiento con QTL. La Selección Genómica es un nuevo enfoque para mejorar los caracteres cuantitativos en grandes poblaciones de mejoramiento de plantas que utiliza marcadores moleculares de todo el genoma. La predicción genómica combina datos de los marcadores con datos fenotípicos y pedigrí en un intento de aumentar la precisión de la predicción de la progenie y sus valores genotípicos.

En la práctica, la Selección Genómica se aplica en una población diferente a la población de referencia en la que se estimaron los efectos de marcador. La Selección Genómica utiliza dos tipos de conjuntos de datos: un conjunto de prueba y un conjunto de validación. El conjunto de prueba es la población de referencia en el que se estimaron los efectos de marcador; que contiene: (1) la información fenotípica de la evaluación del germoplasma de mejoramiento obtenida en distintas condiciones ambientales; (2) los resultados de análisis con marcadores moleculares; y (3) la información del pedigrí. Por lo tanto, se estiman los efectos del marcador basándose en el conjunto de prueba usando ciertos métodos estadísticos para incorporar esta información; el valor genómico de mejoramiento o valores genéticos de nuevos genotipos se predicen basándose únicamente en el efecto del marcador. El conjunto de validación contiene los candidatos de selección (derivados de la población de referencia) que se han genotipeado (pero no se han fenotipeado) y seleccionados con base en los efectos del marcador estimados en el conjunto de prueba.

La implementación de la Selección Genómica en los programas de mejoramiento debe ayudar a acelerar la ganancia genética resultando cultivos mejorados, de mayor rendimiento, ampliamente adaptados y con genotipos estables liberados en un tiempo mucho más rápido (<http://genomics.cimmyt.org/>).

Capítulo I: Adult-Plant Resistance to Septoria tritici blotch in Hexaploid

Spring Wheat*

** Scientific paper sent to the international journal “Theoretical and applied genetics” for publication after peer-review.*

Abstract

Septoria tritici blotch caused by the ascomycete fungus *Zymoseptoria tritici* presents a serious and consistent challenge to global wheat production. In particular the augmented use of soil management practices that leave large amounts of wheat stubble on the soil surface and global warming increases the chance of Septoria tritici blotch epidemics to emerge more frequently including in developing countries. Two recombinant inbred line populations developed from a cross between the susceptible Moroccan spring bread wheat variety ‘NASMA’ and the CIMMYT resistant lines, ‘IAS20*5/H567.71’ and ‘RPB709.71/COC’ were used to study the genetics and map adult-plant resistance to Septoria tritici blotch under field conditions in different environments. Resistance to Septoria tritici blotch in both populations was quantitative and overall, five across environment consistent resistance loci on chromosomes 1BS, 3AL, 5AL and 7AS were detected in the two populations. The QTL on chromosome 1BS and 7AS are likely to be allelic with the known Septoria tritici blotch genes *Stb3* and *Stb11*. All identified QTL were additive and explained between 4 and 27% of the phenotypic variation. Epistatic interaction was not observed. Low cost KASP assays were developed as flanking markers for all five QTL that will facilitate molecular breeding. Our study represents the first

“Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch
mediante mapeo de QTL”

Benjamín Asael Martínez Cisneros

mapping effort under field conditions utilizing two spring bread wheat resistant sources evaluated over multiple environments.

Introduction

Septoria tritici blotch caused by the ascomycete fungus *Zymoseptoria tritici* (Desm.) Quaedvlieg & Crous (anamorph: *Septoria tritici*, teleomorph: *Mycosphaerella graminicola*) is among the most economically important biotic factors limiting wheat production in several wheat growing areas. *Septoria tritici* blotch can be severe in certain spring wheat environments in the developing world, particularly in North and West Asia and North Africa and parts of South America (Duveiller *et al.* 2007; Nazari *et al.* 2010). Yield losses due to *Septoria tritici* blotch in disease-conductive climates can reach 35-50% through the reduction of photosynthetic area (Eyal *et al.* 1987). In Ethiopia, the largest wheat producer in Sub-Saharan Africa, 25-82% wheat production losses due to *Septoria* diseases have recently been reported with increasing disease prevalence in the major wheat growing areas (Bekele *et al.* 2011). In particular the augmented use of soil management practices that leave large amounts of wheat stubble and debris on the soil surface increase the chance of *Septoria tritici* blotch epidemics under favorable climatic conditions and are therefore expected to emerge more frequently in developing countries in the future. Due to global warming rising cost and environment deterioration of fungicide application and the emergence and prevalence of fungicide-resistant/insensitive strains of the causative pathogen (including to widely used strobilurins or demethylase inhibitors), resistance breeding provides one approach of controlling this disease (Siah *et al.* 2014; Cools *et al.* 2013).

The inheritance of resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat can either be qualitative, isolate-specific, depending on major genes or quantitative, isolate-nonspecific with polygenic inheritance (Goodwin 2012). Up to now, 18 major resistance loci (*Stb1* to *Stb18*) (Chartrain *et al.* 2009; Goodwin, 2012; Tabib Ghaffary *et al.* 2011, 2012) along with many quantitative genes with minor effects (Simon *et al.* 2012; Kelm *et al.* 2013; Risser *et al.* 2011; Kosellek *et al.* 2013) have been identified. Major resistance loci can be effective at seedling and adult-plant stage or just at seedling and adult-plant stage, respectively, depending on the gene (Arrainano *et al.* 2001, Kema *et al.* 1997). Given the high diversity and complex population structure within local populations of *Z. tritici* due to high gene flow within and between populations and frequent sexual reproduction, quantitative, isolate non-specific resistances at adult-plant stage is favored (Kema *et al.* 1996; McDonald *et al.* 1996). Nevertheless, little is known about the inheritance of adult-plant resistance to *Septoria tritici* blotch especially under field conditions over diverse wheat growing environments. In a DH population derived from a cross between European winter wheat lines Senat and Savannah tested in three different environments Eriksen *et al.* (2003) observed four QTL altogether explaining 62 to 77% of phenotypic variation. Risser *et al.* (2011) identified nine and six QTL for *Septoria tritici* blotch disease ratings over five and four environments explaining together 55 and 51% of phenotypic variation in two European winter wheat populations, respectively. Kosellek *et al.* (2013) mapped five QTL altogether explaining 20% of the phenotypic variance in the European winter wheat population Solitär × Mazurka tested in six environments. These studies suggest

“Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch
mediante mapeo de QTL”

Benjamín Asael Martínez Cisneros

that field resistance to *Septoria tritici* blotch is due less to major genes than to genetic factors conferring partial resistance. In this study, we developed two biparental recombinant inbred line (RIL) populations of spring bread wheat to analyze the inheritance of adult-plant resistance to *Septoria tritici* blotch by inoculation in field trials in four different environments.

Materials and methods

Note: For detailed information of the methodology used in this project see Annex 1.

Plant materials

A total of 200 and 193 F6:7 RILs were developed through single seed decent from a cross between the Moroccan spring bread wheat variety ‘NASMA’ and the two CIMMYT wheat lines ‘IAS20*5/H567.71’ and ‘RPB709.71/COC’, respectively. The variety “NASMA” with the pedigree ‘BT1149//Florence/AuroreC’ was bred by the “*Institute National de la Recherche Agronomique*” in Morocco in 1973 and has shown high susceptibility to *Septoria tritici* blotch. The CIMMYT lines IAS20*5/H567.71 and RPB709.71/COC were previously reported to have reduced *Septoria tritici* blotch severity at the CIMMYT experimental station in Toluca, State of Mexico, a location where *Septoria tritici* blotch is highly endemic (Jlibene *et al.* 1994). In addition, low pycnidial coverage two leaves below the flag leaf was observed in the cross IAS20*5/H567.71//CAR853/COC at four geographically different locations in Morocco inoculated with a group of 27 different isolates (Jlibene *et al.* 1995). Test entries were derived from F6 lines and tested after a seed multiplication as F7 bulks.

Inoculation procedures and disease assessment

The inoculum of *Septoria tritici* blotch was produced in the CIMMYT wheat pathology laboratory using a mixture of six aggressive strains: St1 (B1), St2 (P8), St5 (OT), St6 (KK), 64 (St 81.1) and 86 (St133.4) with a concentration of 1x10⁷ conidia/mL. These six isolates were selected from a larger Mexican collection based on their strong virulence to a set of wheat differentials at CIMMYT. The first

inoculation of the mapping population was conducted between 28 and 30 days after planting i.e. four to five leaf stage. The inoculation was continued every week with a total of three applications.

Field trials

The two RIL populations together with their parental lines were evaluated in four different environments (location–year combinations). Field trials were conducted at CIMMYT’s experimental stations in the State of Mexico, at Toluca (latitude 19°17’ N, longitude 99°40’ W, 2600 m above sea level), and Boximo (latitude 19°36’ N, longitude 99°41’ W, 2600 m above sea level) in 2010 and 2011. Both locations are characterized by monthly average temperatures of 12 to 17°C and yearly rainfalls of approximately 1000 mm which mostly occur during the wheat growing season. All entries were grown with two replications at each location adjacent to each other in a completely randomized design. Each entry was sown in sets of 2 m rows with 4 g kernels per row. Approximately four weeks after the last inoculation, disease severity was visually scored for each plot, using the double-digit scale (00–99) developed as a modification of Saari and Prescott’s severity scale for assessing wheat foliar diseases (Saari & Prescott 1975). The first digit (D1) indicates disease progress in canopy height from the ground level and the second digit (D2) refers to severity measured based on diseased leaf area. Both D1 and D2 were scored on a scale of 1 to 9. Disease evaluation was repeated three to four times at weekly intervals. For each evaluation, percentage disease severity was estimated based on the following formula:

$$\% \text{ severity} = (D1/9) \times (D2/9) \times 100$$

The area under disease progress curve (AUDPC) was subsequently calculated using the formula:

$$\text{AUDPC} = \sum_{i=1}^n \left[\left\{ \frac{Y_i + Y_{(i+1)}}{2} \right\} x (t_{(i+1)} - t_i) \right]$$

Where Y_i = Septoria tritici blotch severity at time t_i , $t_{(i+1)} - t_i$ = time interval (days) between two disease scores, n = number of times when Septoria tritici blotch was recorded. In addition to the disease scores, plant height was measured in cm at maturity from the ground to the ear tip in all location-year combinations except in Boximo 2011.

DNA isolation and selective genotyping

Eight to ten seeds of each F6:7 RIL were germinated for DNA extraction in the greenhouse. Genomic DNA was isolated from young seedling leaves according to CIMMYT laboratory protocols (<http://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/3221>). Selective genotyping was applied in both populations. DNA of the ten most resistant RILs based on disease assessment across environments was pooled in equal quantities to construct a resistant (R) bulk. Likewise, DNA from the ten most susceptible RILs was pooled to create a susceptible (S) bulk. The three parental lines (NASMA, IAS20*5/H567.71, and RPB709.71/COC) and four bulks were screened for polymorphism with SSR markers from diverse sources: (1) wheat microsatellite consortium (WMC) primers (Gupta *et al.* 2003); (2) Beltsville Agriculture Research Center (BARC) primers

(Song *et al.* 2002), (3) Gatersleben Wheat Microsatellite (GWM) primers (Roeder *et al.* 1998), and (4) Clermont Ferrand A- and D genome (CFA, CFD) primers (Sourdille *et al.* 2004; Guyomarc’h *et al.* 2002). Once polymorphisms were identified between the parents, the R and S bulks of each population and individuals of the two bulks then the entire RIL populations were screened for that marker. SSR marker screening also included flanking markers previously published to be associated with different STB loci (Table 1). The DNA of the parents and selective genotypes was furthermore sent for SNP genotyping to the USDA-ARS Small Grain Genotyping Center, Fargo, USA (<http://wheat.pw.usda.gov/GenotypingLabs>) for testing the Illumina iSelect 90K SNP Assay (Wang *et al.* 2014). SNP allele clustering and genotype calling was performed with the Genome Studio software v2011.1. The default clustering algorithm implemented in Genome Studio was used to identify assays that produced three distinct clusters corresponding to the AA, AB and BB genotypes expected for bi-allelic SNPs. For poorer cluster separation manual clustering was applied. For a subset of polymorphic SNP markers between parents and selective genotypes in each population, KASPar assays (LGC Genomics, Herts, UK) were utilized to genotype the corresponding RILs.

Table 1. Published molecular markers flanking assigned Septoria tritici blotch resistance genes used for screening of two RIL populations NASMA × IAS20*5/H567.71 and NASMA × RPB709.71/COC.

Marker name	Stb gene	Chr.	Germplasm Sources	Reference
<i>barc74</i>	<i>Stb1</i>	5BL	Bulgaria 88	Adhikari <i>et al.</i> 2004a
<i>gwm335</i>				
<i>barc008</i>	<i>Stb2</i>	1BS	Veranapolis	Liu <i>et al.</i> 2013
<i>wmc230</i>				
<i>wmc406</i>				
<i>wmc83</i>	<i>Stb3</i>	7AS	Israel 493	Goodwin <i>et al.</i> 2015
<i>gwm111</i>	<i>Stb4</i>	7DS	Tadinia	Adhikari <i>et al.</i> 2004b
<i>gwm44</i>	<i>Stb5</i>	7DS	Cs Synthetic 6x	Arraiano <i>et al.</i> 2001
<i>gwm369</i>	<i>Stb6</i>	3AS	Flame	Brading <i>et al.</i> 2002
<i>wmc313</i>	<i>Stb7</i>	4AL	Estanzuela Federal	McCartney <i>et al.</i> 2003
<i>wmc219</i>				
<i>gwm146</i>	<i>Stb8</i>	7BL	M-6 Synthetic W7984	Adhikari <i>et al.</i> 2003
<i>gwm577</i>				
<i>wmc317</i>	<i>Stb9</i>	6AS	Courtot	Chartrain <i>et al.</i> 2009
<i>gwm848</i>	<i>Stb10</i>	1D	Kavkaz-K4500 L.6.A.4	Chartrain <i>et al.</i> 2005a
<i>barc008</i>	<i>Stb11</i>	1BS	TE 9111	Chartrain <i>et al.</i> 2005b
<i>barc137</i>				
<i>wmc313</i>	<i>Stb12</i>	4AL	Kavkaz-K4500 L.6.A.4	Chartrain <i>et al.</i> 2005a
<i>wmc219</i>				
<i>wmc396</i>	<i>Stb13</i>	7B	Salamouni	http://wheat.pw.usda.gov/ggpages/awn/53/Textfile/Wgc.html
<i>wmc623</i>	<i>Stb14</i>	3B	Salamouni	
<i>wmc500</i>				
<i>wmc494</i>	<i>Stb16q</i>	3D	Cando/R143//Mexi'S'3/Ae. Tauschii	Tabib Ghaffary <i>et al.</i> 2012
<i>hbg247</i>	<i>Stb17</i>	5A	Cando/R143//Mexi'S'3/Ae. Tauschii	
<i>gpw5176</i>	<i>Stb18</i>	6DS	Balance	Tabib Ghaffary <i>et al.</i> 2011
<i>gpw3087</i>				

PCR amplification of the SSR markers was conducted in a 10-ml reaction mix, which contained 1x buffer (5X Green or Colorless GoTaq®Flexi, Promega, USA), 1.5 mM of MgCl₂, 0.2 mM of dNTPs, 0.25 μM of each oligonucleotide primers, 40

ng of DNA, and 0.25 unit of Taq polymerase (GoTaq®Flexi, Promega, USA, Cat. # M8295). PCR was performed in an ABI Geneamp 9700 PCR thermocycler (Applied Biosystems, USA). The samples were denatured at 94 °C for 2 min, followed by 35 cycles consisting of 94 °C for 30 s, 55 °C (or 60 °C) for 40 s, 72 °C for 1 min, with a final extension at 72 °C for 7 min. The amplified products were separated on 12% acrylamide gels (29:1), and silver staining was used for visualization (<http://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/3221>).

KASPar assays genotyping was partly conducted in-house and partly outsourced to LGC Genomics. In-house, the KASP assays were visualized with a PHERAstar FS microplate reader (BMG Labtech, Ortenberg, Germany) in a final volume of 5 µl containing 2x KASPV4.0 Mastermix (LGC Genomics) and 120 nM of each allele-specific primers and 300 nM of common primer. The following thermal profile was used for all PCR reactions: 15 min at 94°C, 11 cycles consisting of 94°C for 30 s, 65-57°C for 1 min, 72°C for 30 s, another 26 cycles consisting of 94°C for 30 s, 57°C for 1 min, 72°C for 30 s with a final extension at 72°C for 2 min (<http://repository.cimmyt.org/xmlui/handle/10883/3221>).

Phenotypic data analyses

Arithmetic means across replications for genotypes in each environment were used for analysis of variance (ANOVA). Estimation of variance components was performed using the lmer function in R (r-project.org/) with genotype and environments as random effects. Heritability (h^2) was calculated based on the formula $h^2 = \sigma_g^2 / (\sigma_g^2 + \sigma_{ge}^2/e + \sigma_{\epsilon}^2/re)$ (Allard 1960), where σ_g^2 , σ_{ge}^2 , and σ_{ϵ}^2

are the estimates of the genotypic variance, the genotype × environment interaction variance, and the error variance, and e and r are the numbers of environments and replications per environment, respectively. Pearson correlation coefficients among arithmetic means of traits in each environment were calculated.

Maps of linkage groups and QTL analyses

Genetic linkage groups were established with IciMapping 3.3 (Wang *et al* 2011; <https://www.integratedbreeding.net/supplementary-toolbox/genetic-mapping-and-qtl/icimapping>) using the ‘BIN’ tool to reduce the redundant markers. ‘Two Opt’ and ‘SARF’ were used for linkage criteria and algorithm, respectively, with the logarithm of odds (LOD) set at 3.0 for grouping. Inclusive composite interval mapping (ICIM) was carried out to detect the positions of QTL for AUDPC in each environment, respectively. LOD scores were calculated from 1,000 permutations for each trait to declare significant QTL at the $P = 0.05$ level. The percentages of phenotypic variance explained (PVE) by individual QTL and the additive effect at the LOD peaks were obtained through stepwise regression with IciMapping 3.3. In addition ICIM for digenic epistatic QTL was performed using the same parameters.

Results

Phenotypic evaluation

There was good Septoria tritici blotch disease development in all environments studied. Each field trial revealed differentiation of disease ratings between the parental lines ‘NASMA’, ‘IAS20*5/H567.71’ and ‘RPB709.71/COC’ and within the two RIL populations (Fig. 1). Higher disease severities were observed in 2011 than 2010 (Table 2). The resistant parent ‘RPB709.71/COC’ expressed superior disease resistance compared to line ‘IAS20*5/H567.71’ in 2010, but the reverse was monitored in 2011. The population mean of the derived RIL population NASMA × RPB709.71/COC was higher than of the NASMA × IAS20*5/H567.71 population in each environment (Table 2). Correlations between arithmetic means of disease ratings across environments and RIL populations ranged from 0.48 to 0.79 (data not shown). Correlations between disease ratings and plant height were negative and moderately low in each population with an overall range from -0.04 to -0.27.

Analysis of variance showed that in both populations year variability had the highest contribution reflecting the difference in disease pressure over the two years (Table 3). Second highest contribution was the variability between lines, followed by variability between locations. The contribution of interaction components (genotype × location and year) was minor (Table 3). Population NASMA × IAS20*5/H567.71 had a considerably smaller genotypic, environment and error variance. The mean heritability was moderately high for both populations, $h^2 = 0.77$

“Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch
mediante mapeo de QTL”

Benjamín Asael Martínez Cisneros

for population NASMA × IAS20*5/H567.71 and $h^2 = 0.71$ for population NASMA ×
RPB709.71/COC.

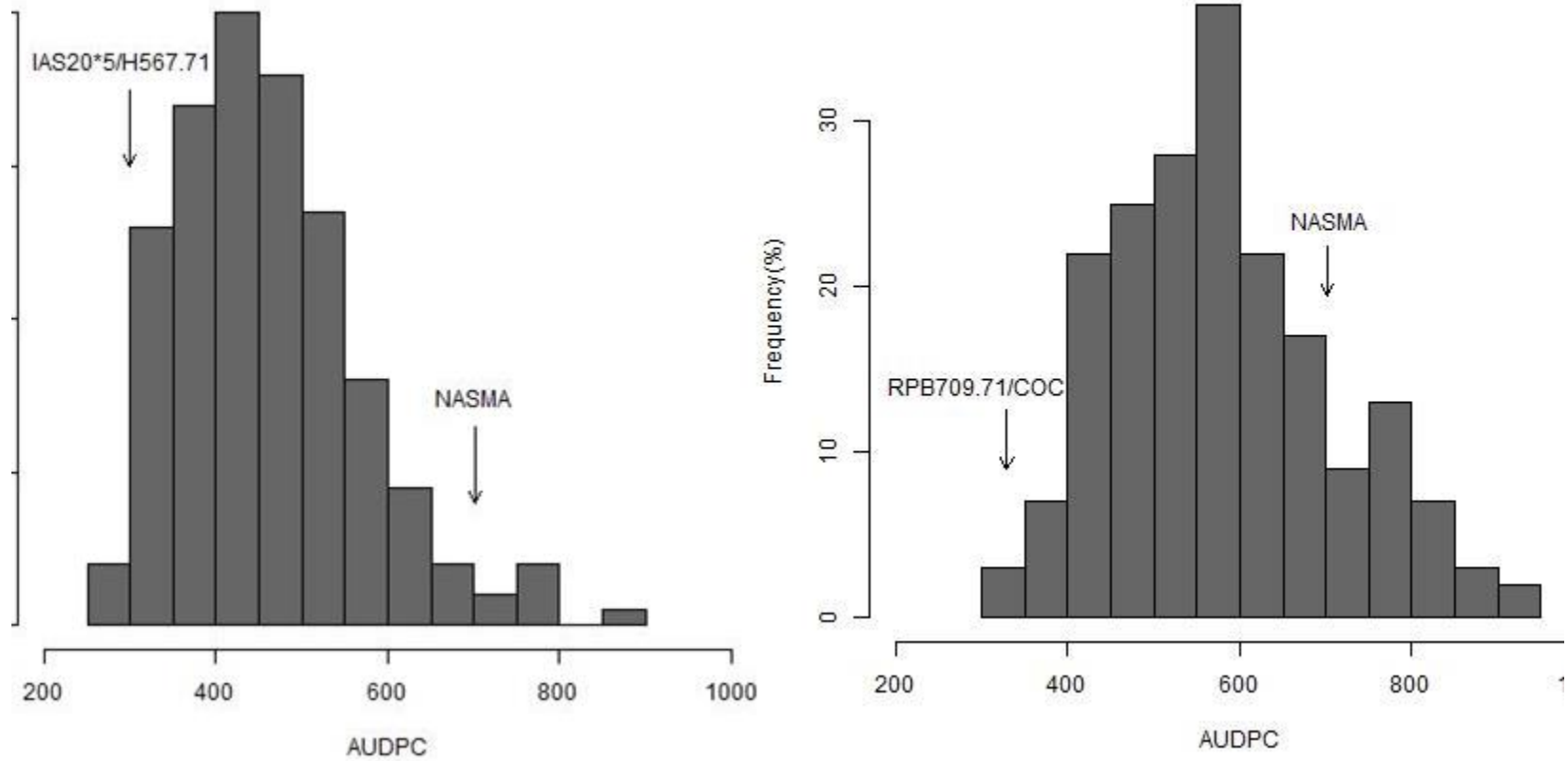


Figure 1. Histogram of AUDPC for *Septoria tritici blotch* averaged across four environments of the NASMA x IAS20*5/H567.71 and NASMA x RPB709.71/COC RIL populations. The mean values for the parents are indicated by arrows.

Table 2. Mean and range of AUDPC for Septoria tritici blotch for the susceptible parent NASMA and resistant parents IAS20*5/H567.71 RPB709.71/COC and derived RIL populations in four environments.

Location	Year	NASMA	IAS20*5/H567.71	RPB709.71/COC	Population	mean	Population	mean	Population	range	Population	range
					(NASMA	× (NASMA	× (NASMA	× (NASMA	× (NASMA	× (NASMA		
					IAS20*5/H567.71)	RPB709.71/COC)	IAS20*5/H567.71)	RPB709.71/COC)	IAS20*5/H567.71)	RPB709.71/COC)	IAS20*5/H567.71)	RPB709.71/COC)
Boximo	2010	445.1	250.6	188.0	271.9	329.8	112.3	713.0	155.6	587.7		
	2011	885.8	309.9	418.2	576.7	818.8	217.6	1330.6	388.0	1397.5		
Toluca	2010	650.3	304.6	267.9	367.8	424.3	242.0	650.3	259.3	734.6		
	2011	828.4	333.3	442.0	524.4	616.6	324.1	914.8	355.6	1023.5		

Table 3. Estimates of variance components and heritability for AUDPC of Septoria tritici blotch of two RIL populations NASMA × IAS20*5/H567.71 and NASMA × RPB709.71/COC in four environments (location-year combinations).

Population	Source of variation												
	Genotype		Year		Location		Genotype × Year		Genotype × Location		Residual		h^2 ^b
	DF ^a	Variance components	DF	Variance components	DF	Variance components	DF	Variance components	DF	Variance components	DF	Variance components	
NASMA × IAS20*5/H567.71	202	7638***	1	25950***	1	279***	202	200	202	0	203	8569	0.77
NASMA × RPB709.71/COC	192	9744***	1	57970***	1	1408***	192	0	192	0	192	16320	0.71

^aDF: degrees of freedom, ^b h^2 = heritability, *** indicates F test significant at P < 0.001.

QTL analyses

Among the SSR markers tested in selective genotyping, 65 markers in the NASMA × IAS20*5/H567.71 population and 43 in the NASMA × RPB709.71/COC population were polymorphic between the parents, contrasting bulks and their constituent lines and were subsequently utilized to evaluate the entire RIL populations. With the Illumina iSelect SNP assay we revealed 37386 (45.8 %) SNPs with distinct clusters. A total of 6,205 SNPs were polymorphic among the parents and bulks in the NASMA × IAS20*5/H567.71 population and 9,738 SNPs in the NASMA × RPB709.71/COC population. KASP assays for 26 and 35 SNPs that presented the highest contrast between selective bulks were subsequently used to genotype all lines in the two populations, NASMA × IAS20*5/H567.71 and NASMA × RPB709.71/COC, respectively.

QTL were declared significant at logarithm of odds (LOD) ≥ 2.5 . In regions where such loci were also detected, QTL with LOD ≥ 2.0 were taken into account. QTL analyses identified seven QTL for Septoria tritici blotch resistance in the NASMA × IAS20*5/H567.71 population of which two QTL were consistent across three of the four environments (Table 4). The QTL with the highest additive effect was located on chromosome 1BS spanning a 1.5 cM region and closely linked to markers *wmc230* and *Ku_c16938_25916260* (Table 4). The second QTL was mapped to a 7.6 cM centromeric region of chromosome 5AL flanked by the markers *Ex_rep_c68441_67261679* and *gwm186* (Table 4). The two QTL together explained on average 17% of the phenotypic variation. Resistance effects for both

“Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch
mediante mapeo de QTL”

Benjamín Asael Martínez Cisneros

QTL were derived from the resistant parent 'IAS20*5/H567.71'. Segregation distortion towards the resistant allele was observed for the first QTL. Digenic epistatic effects among the QTL were not detected. The LOD scores were plotted to illustrate the QTL (Fig. 2).

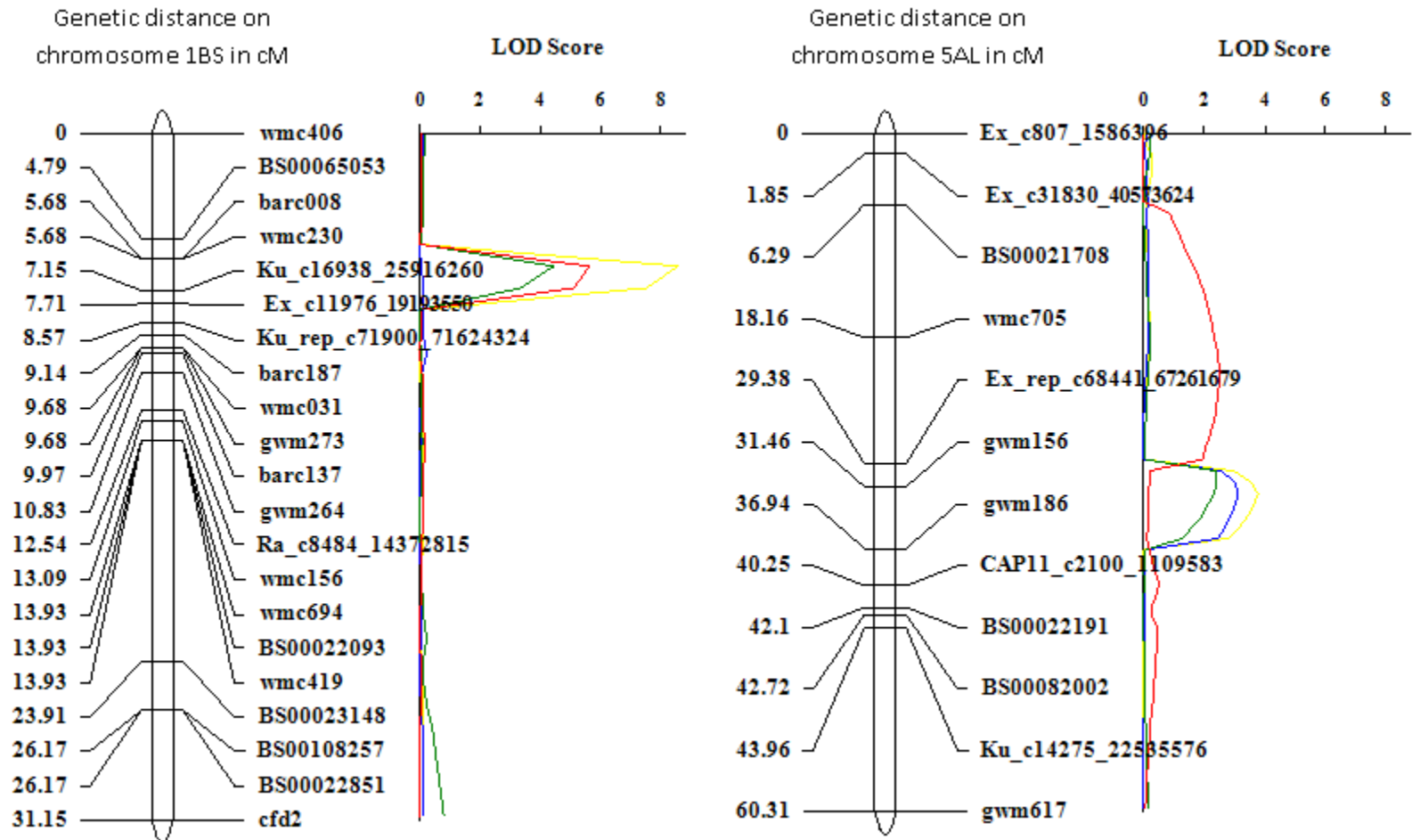


Figure 2. LOD curves of QTL on chromosomes 1BS and 5AL in NASMA × IAS20*5/H567.71 for *Septoria tritici blotch*. Different colors represent different locations.

Table 4. Summary of resistance QTL for Septoria tritici blotch consistent across at least three out of four environments.

QTL	Environment	Left Marker	Right Marker	LOD value	PVE (%) ^a	Additive effect
NASMA × IAS20*5/H567.71						
<i>QStb.cim-1BS</i>	Toluca 2010, Boximo 2010, 2011	<i>wmc230</i>	<i>Ku_c16938_25916260</i>	6.2	11.7	-40.3
<i>QStb.cim-5AL-1</i>	Toluca 2011, Boximo 2010, 2011	<i>Ex_rep_c68441_67261679</i>	<i>gwm186</i>	3.1	5.4	-28.8
NASMA × RPB709.71/COC						
<i>QStb.cim-3BL</i>	Toluca 2010, 2011, Boximo 2011	<i>Ex_c19778_28779907</i>	<i>wmc291</i>	12.2	22.7	-71.0
<i>QStb.cim-5AL-2</i>	Toluca 2010,2011, Boximo 2010, 2011	<i>Ex_c621_1231444</i>	<i>Ex_c5998_10513766</i>	10.3	18.5	-61.8
<i>QStb.cim-7AS</i>	Toluca 2010, 2011, Boximo 2010	<i>barc174</i>	<i>Ra_c2094_4066675</i>	3.0	5.1	-24.0

^aPVE, percent variance explained

In the NASMA × RPB709.71/COC population six QTL were detected by the ICIM analyses. Three QTL on chromosome 5AL, 3BL, and 7AS were consistent across three and four environments (Table 4). The highest additive effect QTL was on chromosome 3BL located within a 2.5 cM region and flanked by the SNP marker *Ex_c19778_28779907* and SSR marker *wmc291*. The QTL *QStb.cim.5AL-2* was the only QTL significant in all four environments. Flanked by the SNP markers *Ex_c621_1231444* and *Ex_c5998_10513766* at a genetic distance of 1.7 cM apart, the QTL was closely linked to *Vrn-A1*. The third QTL (*QStb.cim.7AS*) was of minor affect and mapped within a 3.3 cM region flanked by SNP markers *barc174* and *Ra_c2094_4066675*. The three QTL together explained 46.3 % of the phenotypic variance. Segregation distortion

towards the susceptible allele was observed for the QTL on chromosome 5AL. Similar to the first population, digenic epistatic effects among the QTL were not observed and resistance effects of QTL were derived from the resistant parent. The LOD scores were plotted to illustrate the QTL (Fig. 3). The sequences of SSR and SNP markers linked to QTL are given in Table 5.

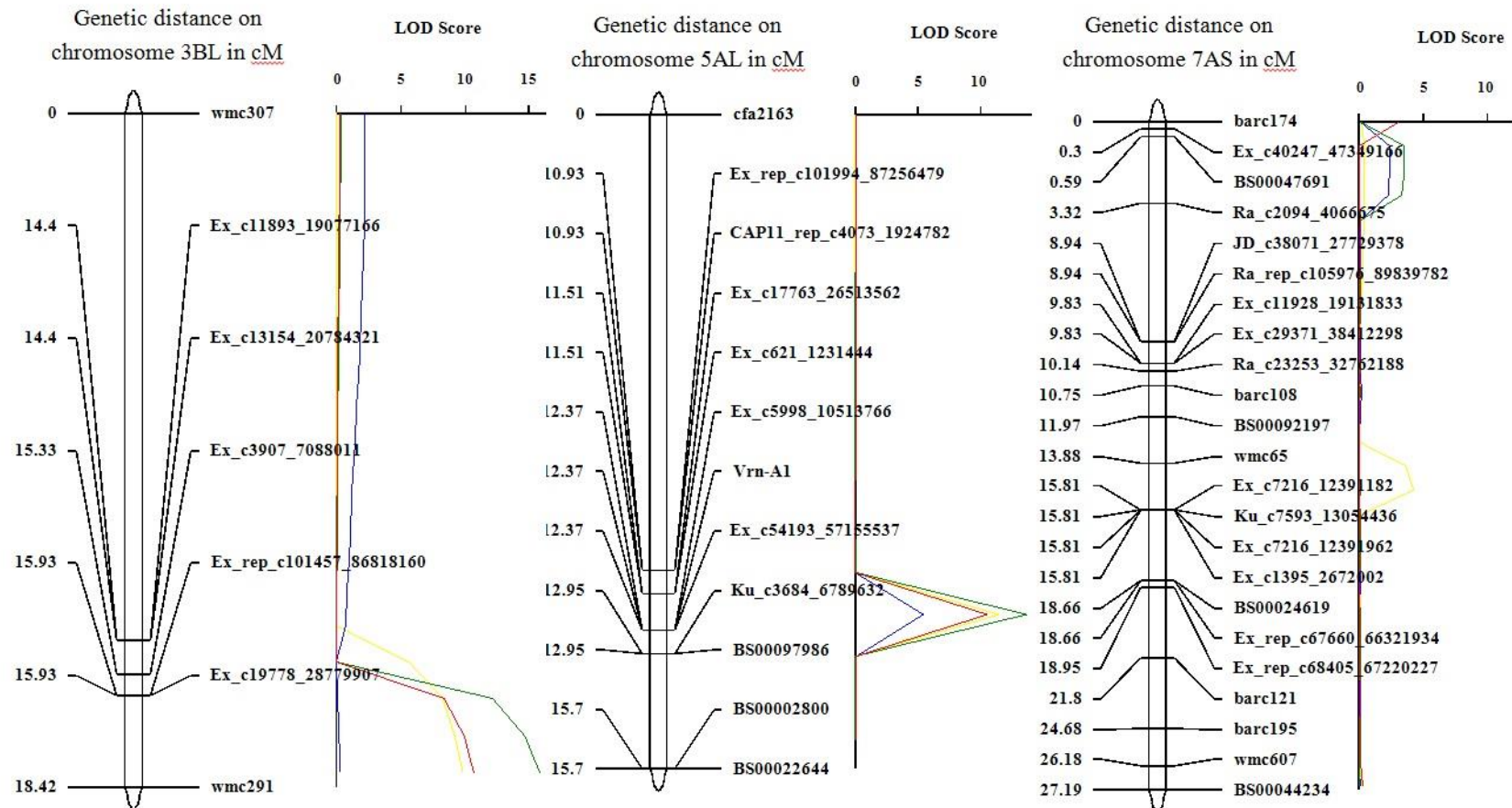


Figure 3. LOD curves of QTL on chromosomes 3BS, 5AL and 7AS in NASMA × RPB709.71/COC for *Septoria tritici blotch*. Different colors represent different locations.

Table 5. Sequences of SSR and SNP markers linked to QTL for Septoria tritici blotch resistance.

SSR marker name	Forward primer	Reverse primer	
<i>barc174</i>	TGGCATT TTTCTAGCACCAATACAT	GCGAACTGGACCAGCCTTCTATCTGTTC	
<i>gwm186</i>	GCAGAGCCTGGTTCAAAAAG	CGCCTCTAGCGAGAGCTATG	
<i>wmc230</i>	AGAAGCGAGCAGGTGTGTTTGA	CTGCTTCCTCCCACAACAGATG	
<i>wmc291</i>	TACCACGGGAAAGGAAACATCT	CACGTTGAAACACGGTGACTAT	
KASP assay name	Allele specific primer	Allele specific primer	Common primer
<i>Ex_c19778_28779907</i>	ACCGGCCTCTGTGACATCTCT	CCGGCCTCTGTGACATCTCC	AGGTTCGGTCCCTGATCAACCATTT
<i>Ex_c5998_10513766</i>	TTGAAGCCATATCAGTGTATCTCCTTT	ATTGAAGCCATATCAGTGTATCTCCTTC	GAGGGCGGTAAGATTGGAGCTT
<i>Ex_c621_1231444</i>	CGGTGAACCTCCTGATGAAGCT	GGTGAACCTCCTGATGAAGCC	CGCTTCCTTTGCTGGCCTCTCTT
<i>Ex_rep_c68441_67261679</i>	GAATATGATGATTATTCAGCCACGAAT	GAATATGATGATTATTCAGCCACGAAC	AAGACAAGAGCAGCAGATCGGCAAA
<i>Ku_c16938_25916260</i>	CAATTCTGCTCTCAGCAACCATTCT	AATTCTGCTCTCAGCAACCATTCC	GGAAATGCAGAGGGKATAGTGACTTAT
<i>Ra_c2094_4066675</i>	TGTTTGGGTCACTCCATTCAATCCATA	TTTGGGTCACTCCATTCAATCCATG	CCTTTCCACGCATTGATCCAAGTAA

Individual effects of the two and three consistent QTL per population are shown in Fig. 4 and 5. The total data set was divided into four and eight groups, each carrying different haplotypes of the major QTL. In the NASMA × IAS20*5/H567.71 population, the first group carrying the susceptible allele (SS) at both loci had a mean AUDPC value of 516.7. The second and third group carried the SS allele at the 1BS locus and the resistant (RR) allele at 5AL locus or vice versa. Mean AUDPC values decreased in both groups on average 16.6%. The fourth group carrying both RR alleles decreased AUDPC values by 23.9%.

In the NASMA × RPB709.71/COC population, similar effects were obtained by analyzing the three consistent QTL for their phenotypic effects (Fig. 5). The maximal difference between haplotypes having all three RR and SS alleles was an AUDPC value of 218.3 (33.2%). Between the groups including haplotypes carrying one or two RR alleles at the three loci the average difference was an AUDPC value of 82.2 (14%). For the haplotypes carrying two RR alleles, the haplotype with resistant alleles at the 3BL and 7AS QTL, revealed higher average AUDPC values were in comparison to the residual two haplotypes. Even so no significant digenic epistatic effects were estimated in the ICIM analyses, interaction plots (Fig. 6-9) indicate increased interaction between the 3BL and 7AS QTL in individual environments. The observed variation within the resistant subpopulations gives the possibility for further phenotypic selection in both wheat populations.

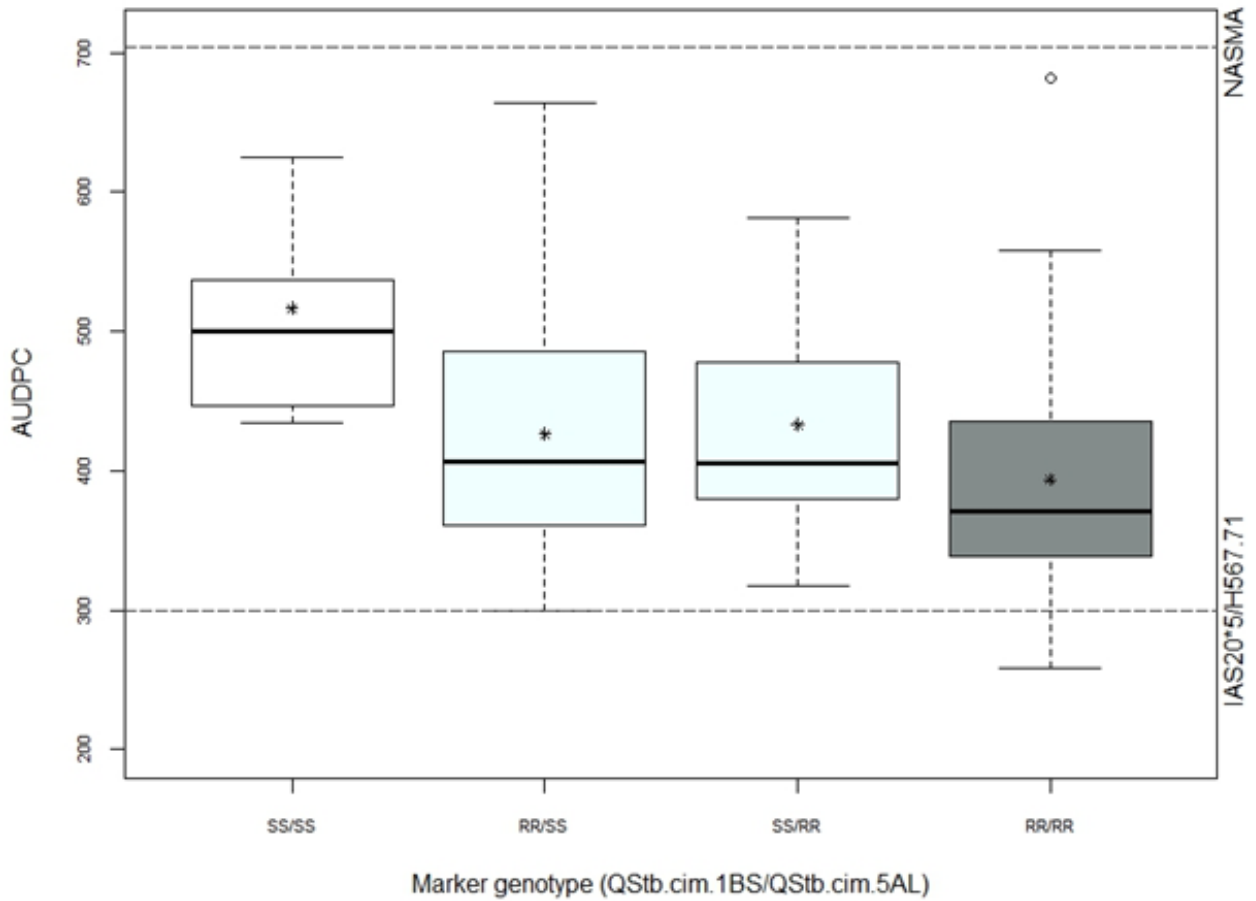


Figure 4. Boxplots of RILs of the NASMA × IAS20*5/H567.71 population grouped by the genotypes of the flanking markers of two across environment consistent QTL associated with Septoria tritici blotch resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent ‘NASMA’ or the resistant (RR) parent IAS20*5/H567.71’, * represents the mean.

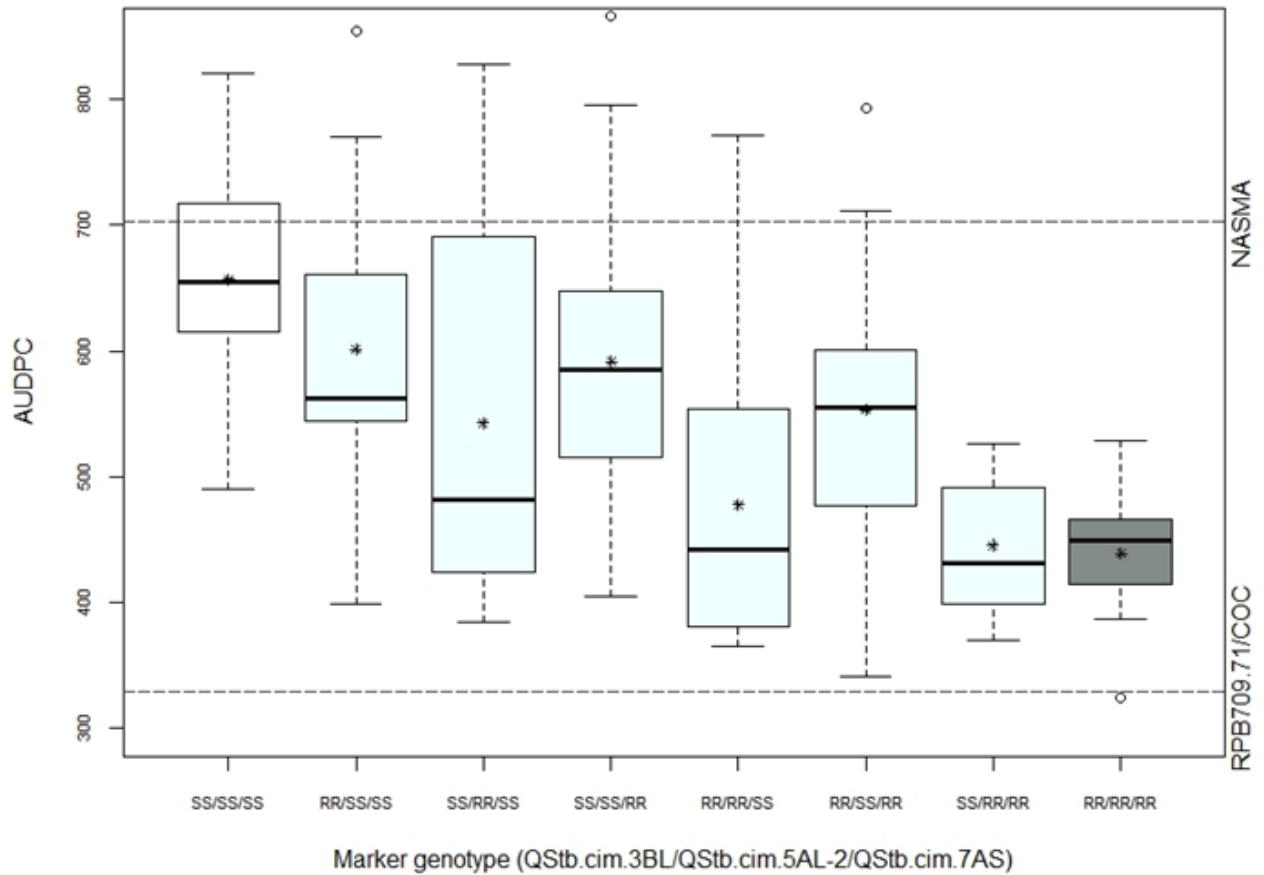


Figure 5. Boxplots of RILs of the NASMA × RPB709.71/COC population grouped by the genotypes of the flanking markers of three consistent QTL associated with *Septoria tritici blotch* resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent ‘NASMA’ or the resistant (RR) parent ‘RPB709.71/COC’, * represents the mean.

“Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch mediante mapeo de QTL”

Benjamín Asael Martínez Cisneros

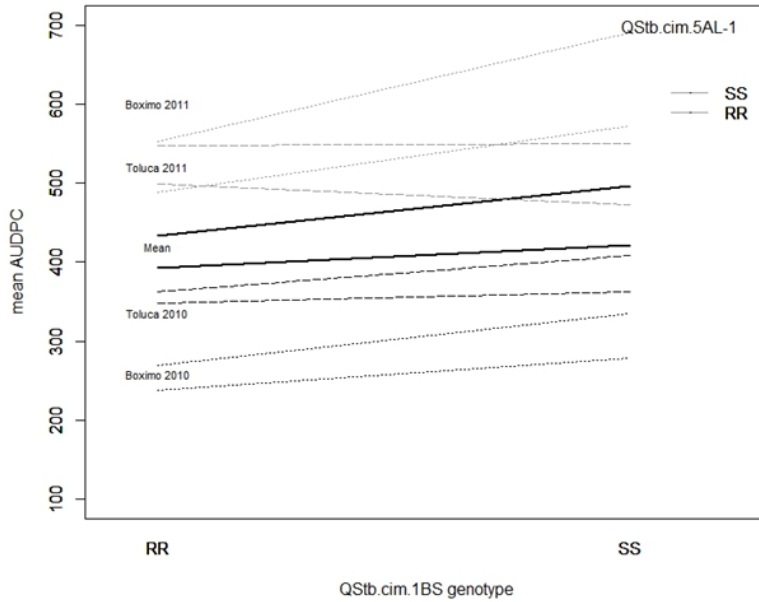


Figure 6. Interaction plots of RILs of the NASMA × IAS20*5/H567.71 population grouped by the genotypes of the flanking markers of two across environment consistent QTL associated with Septoria tritici blotch resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent ‘NASMA’ or the resistant (RR) parent ‘IAS20*5/H567.71’. Each line type represents a different environment.

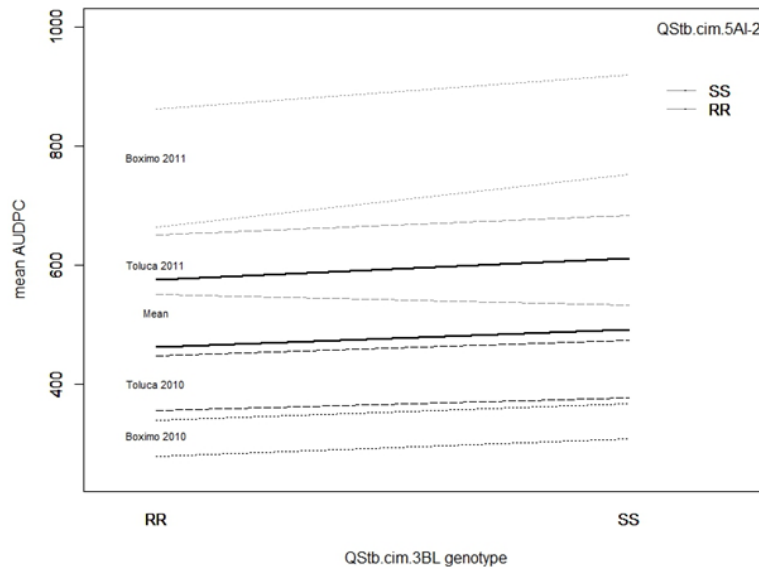


Figure 7. Interaction plots of RILs of the NASMA × RPB709.71/COC population grouped by the genotypes of the flanking markers for the QTL *QStb.cim.3BL* and *QStb.cim.5AL-2* associated with Septoria tritici blotch resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent ‘NASMA’ or the resistant (RR) parent ‘RPB709.71/COC’. Each line type represents a different environment.

“Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch mediante mapeo de QTL”

Benjamín Asael Martínez Cisneros

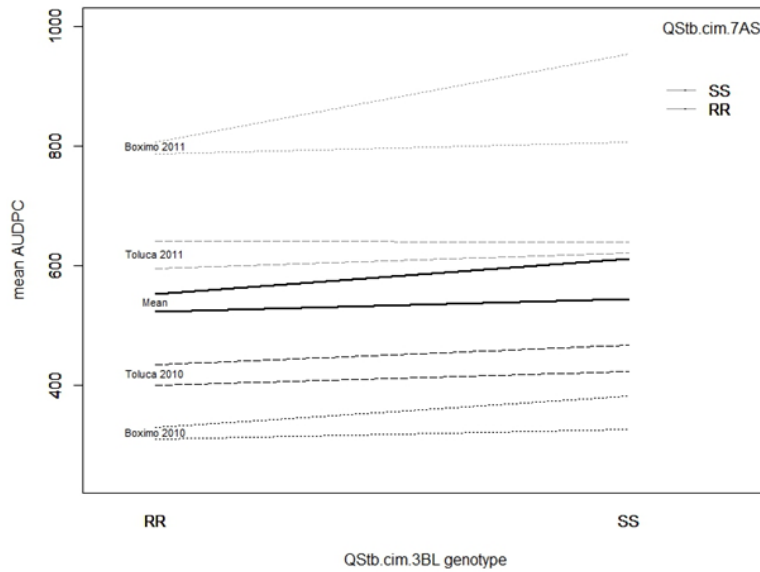


Figure 8. Interaction plots of RILs of the NASMA × RPB709.71/COC population grouped by the genotypes of the flanking markers for the QTL *QStb.cim.3BL* and *QStb.cim.7AS* associated with Septoria tritici blotch resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent ‘NASMA’ or the resistant (RR) parent ‘RPB709.71/COC’. Each line type represents a different environment.

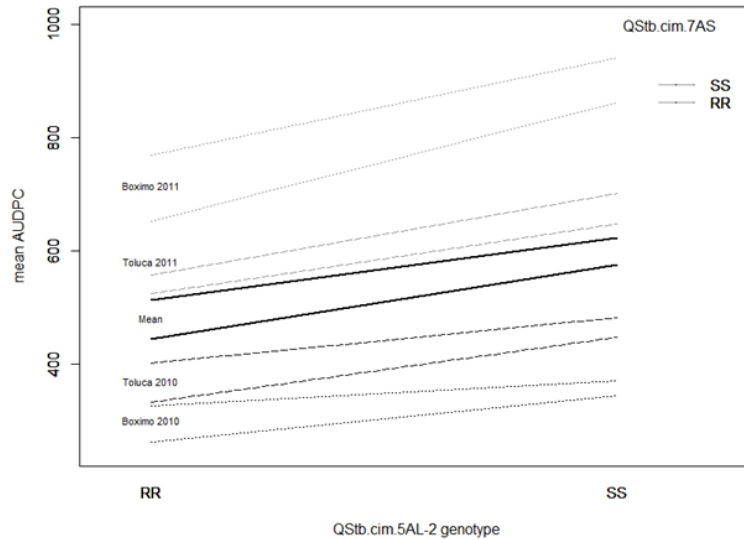


Figure 9. Interaction plots of RILs of the NASMA × RPB709.71/COC population grouped by the genotypes of the flanking markers for the QTL *QStb.cim.5AL-2* and *QStb.cim.7AS* associated with Septoria tritici blotch resistance. The marker code indicates whether the allele originates from the susceptible (SS) parent ‘NASMA’ or the resistant (RR) parent ‘RPB709.71/COC’. Each line type represents a different environment.

Discussion

Due to high pathogenic variability and frequent sexual reproduction, *Z. tritici* remains a steadfast biotic stress pathogen, requiring multiple management strategies to mitigate the threat of Septoria tritici blotch and protect wheat production. Future disease management strategies must focus on augmented evaluations of genotype by environment by management systems; deepen the understanding of host-pathogen interaction and the improvement of varietal resistance (Driscoll *et al.* 2014). For the latter, up to date, only a few studies have deliberately evaluated adult-plant resistance under challenging field conditions over diverse wheat growing environments for the development of robust resistant phenotypes that remain durable. QTL analyses using bi-parental population assessed for Septoria tritici blotch resistance under field conditions were so far solely carried out using resistant European winter wheat sources. To our knowledge, the present study is the first QTL analyses targeting adult-plant resistance in multiple location-year trials using resistant spring bread wheat sources.

This study identified overall five across environment consistent QTL for Septoria tritici blotch resistance in the CIMMYT wheat lines IAS20*5/H567.71 and RPB709.71/COC. The QTL with the highest additive effect in the NASMA × IAS20*5/H567.71 population was observed on chromosome 1BS closely linked to markers *wmc230* and *Ku_c16938_25916260*. Liu *et al.* (2013) recently re-located the gene *Stb2* from line Veranapolis to the same chromosome location, with

wmc406 and *barc008* as flanking markers. The marker *barc008* co-segregated with *wmc230* in our study. However, *Stb2* was mapped 5 cM distal to *barc008*, and was fully effective in adult plant stage, while our QTL was mapped proximal to *barc008* and was partially effective in adult plant stage and explained only up to 13% of the phenotypic variance (Fig. 10). The gene *Stb11*, derived from the Portuguese line TE 9111 was furthermore mapped to wheat chromosome 1BS (Chartrain *et al.* 2005b). The most closely linked locus to *Stb11* was once more *barc008*. Assessments of identity by state of observed marker alleles using the closest linked markers of this QTL showed that the critical band of IAS20*5/H567.71 was equal to TE 9111 for *barc008* with 275 bp (Chartrain *et al.* 2005b) but not for any of the other markers. *Stb11* is treated as an isolate-specific QTL due to a continuous distribution of disease scores in progeny plants after inoculation of the pathogen and was mapped as a seedling resistance gene specific to isolate IPO90012 from Mexico. Whether this isolate has similar or very different specificities to the cluster of six isolates used in our study is not known. Furthermore, in the study of Jlibene *et al.* (1995) line IAS20*5/H567.71 was tested as parent in the cross IAS20*5/H567.71//CAR853/COC at four geographically different locations in Morocco and inoculated with a group of 27 different isolates. Only isolate St27 from Essaouira (southern Morocco) was virulent on this line and therefore suggests a rather non-isolate specific resistance. The effect of *Stb11* on resistance to *Septoria tritici* blotch under field conditions is also not yet known. An additional *Septoria tritici* blotch seedling resistance gene on 1BS was reported by Tabib Ghaffary *et al.* (2011) in the French cultivar ‘Apache’. The most closely linked marker for this gene

was DArT locus *wPt-2019*, also closely linked to *barc008* according to comparisons with shared markers in the Conan x Reeder reference map in the GrainGenes 2.0 database. A *Stb11*-like QTL named *StbWW* was reported by Raman *et al.* (2009) and derived from Australian wheat breeding lines ‘*WW1842*’, ‘*WW2451*’ and ‘*WW2449*’. The gene was mapped in the same chromosome region flanked by markers *wmc230* and *wms273* (Fig. 10). This gene partially protected adult wheat plants from *Septoria tritici blotch* attack and explained up to 38 % of the phenotypic variance under greenhouse condition. Similar to our study one of the three mapping populations also showed segregation distortion towards the resistant allele. Finally, a QTL significant at seedling and adult-plant stage on 1BS was reported by Goudemand *et al.* (2013) using QTL meta-analyses and association mapping, but unfortunately linkage maps did not include to *Stb* genes linked microsatellite loci which would have facilitated comparative analyses. The diverse evidence from comparable genetic maps and gene action suggest that the identified QTL in our study is equal to *StbWW* and possibly allelic to *Stb11*, while validation via conventional crossing is still required. The resistance line IAS20*5/H567.71 has mainly South American cultivars in its pedigree; hence identity by descent due to the same origin of the diverse published resistance source is unlikely. The CIMMYT International *Septoria* Observation Nurseries (ISEPTON) has recently been characterized with linked to *Stb* genes linked SSRs including *Stb11* which was observed at very low frequency. This QTL is therefore a good candidate to be introgressed into CIMMYT wheat.

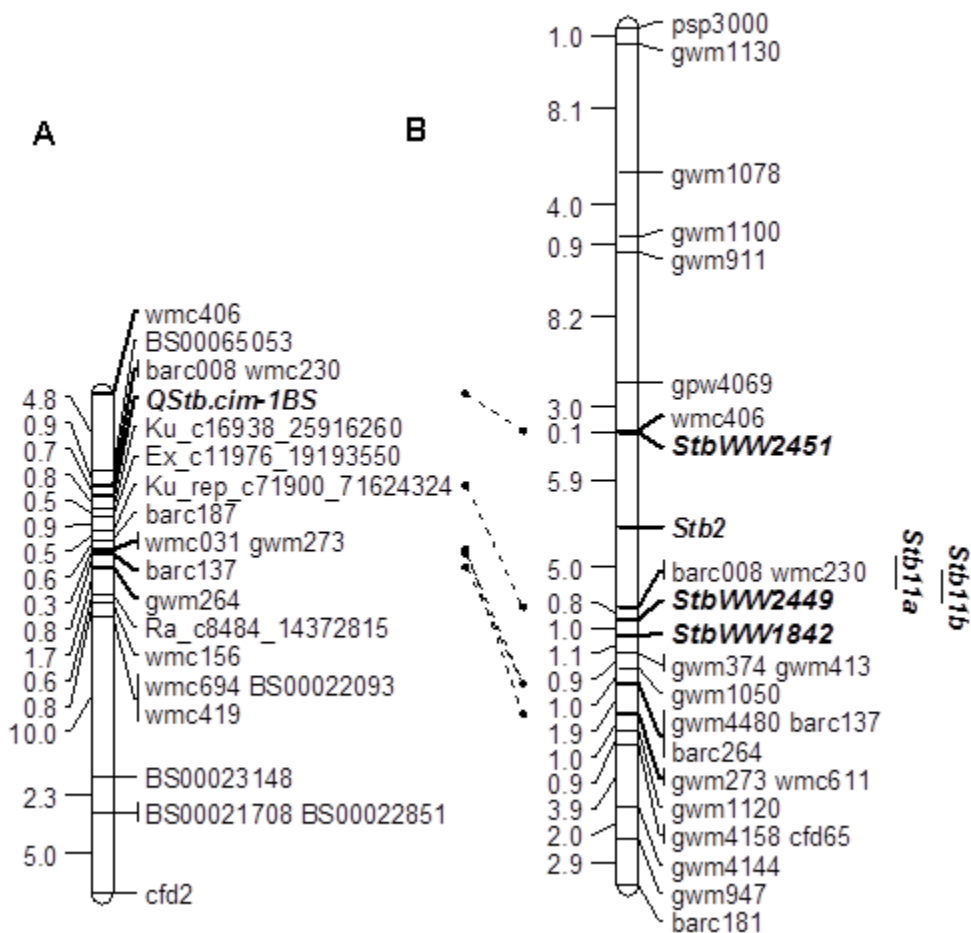


Figure 10. Comparison of the current and previous linkage maps. A. 1BS linkage group from the current study. B. Linkage map and estimated gene locations adapted from Liu *et al.* (2013). *StbWW2451*, *StbWW2499*, *StbWW1842* (Raman *et al.* 2009). *Stb11a* (Chartrain *et al.* 2005b). *Stb11b* (Tabib Ghaffary *et al.* 2012).

The second identified QTL *QStb.cim.5AL-1* in the NASMA × IAS20*5/H567.71 population explained only up to 9% of the phenotypic variance (data not shown). Tabib Ghaffary *et al.* (2012) assigned the gene symbol *Stb17* to a QTL identified on chromosome 5AL. *Stb17* derived from durum wheat, was expressed in adult plant stage and explained 32% of the observed phenotypic variance. The *Stb17* closely linked marker *hbg247* was mapped in our population to chromosome 5BL and was not linked with the disease ratings. In addition, *QStb.cim.5AL-1* was

mapped more than 20 cM proximal of *wms617*, a second marker closely linked to *Stb17*. Thus, an additional source for Septoria tritici blotch resistance has been detected here.

The highest additive effect QTL in the NASMA × RPB709.71/COC population mapped to chromosome 3BL explaining 23% of the phenotypic variance. A Meta-QTL on 3BL was published in Goudemand *et al.* (2013) but linkage maps did not allow a comparative analysis. Therefore this QTL represents a novel gene for STB resistance.

A second QTL on chromosome 5AL was detected in the NASMA × RPB709.71/COC population. The QTL was tightly linked to the *Vrn-A1* gene. Previous mapping studies revealed that Septoria tritici blotch was negatively related with earliness and plant height (Risser *et al.* 2011, Goudemand *et al.* 2013). Unfortunately, heading dates were not recorded in our field trails but breeders' notations ranging from 1 (early) to 3 (late) were available for both locations (Boximo and Toluca) in 2011. Late RILs were less prone to Septoria tritici blotch resistance than early RILs and correlations between the breeders' notations and disease scores were -0.43 and -0.49 for Toluca and Boximo 2011, respectively. The means of the disease scorings for 2011 were subsequently adjusted for the breeder' notation, including the notations into an ANOVA model. QTL analyses was repeated with the adjusted means but revealed the same results, which suggest that *QStb.cim.5AL-2* is either closely linked or corresponds to *Vrn-A1*. The

correlation with plant height in both populations was negative, but low to moderate and no effect on resistance was observed.

The third QTL on chromosome 7AS in the NASMA × RPB709.71/COC population was of minor effect. Common relative map positions of our 7AS linkage group to previously published maps for SSRs markers *barc174*, *barc108*, *wmc65* and *barc121* were found with differences only in map distances (Fig. 11). Goodwin *et al.* (2015) recently re-located the gene *Stb3* to chromosome 7AS completely linked with SSR marker *wmc83*. In the NASMA × RPB709.71/COC population however, *wmc83* and nearly located markers *barc222* and *cfa2028* were monomorph with the QTL being mapped proximal not distal to *barc174*. However, since genetic distance can vary in different populations and markers are relative close, allelism between QTL *QStb.cim-7AS* and *Stb3* cannot be ruled out.

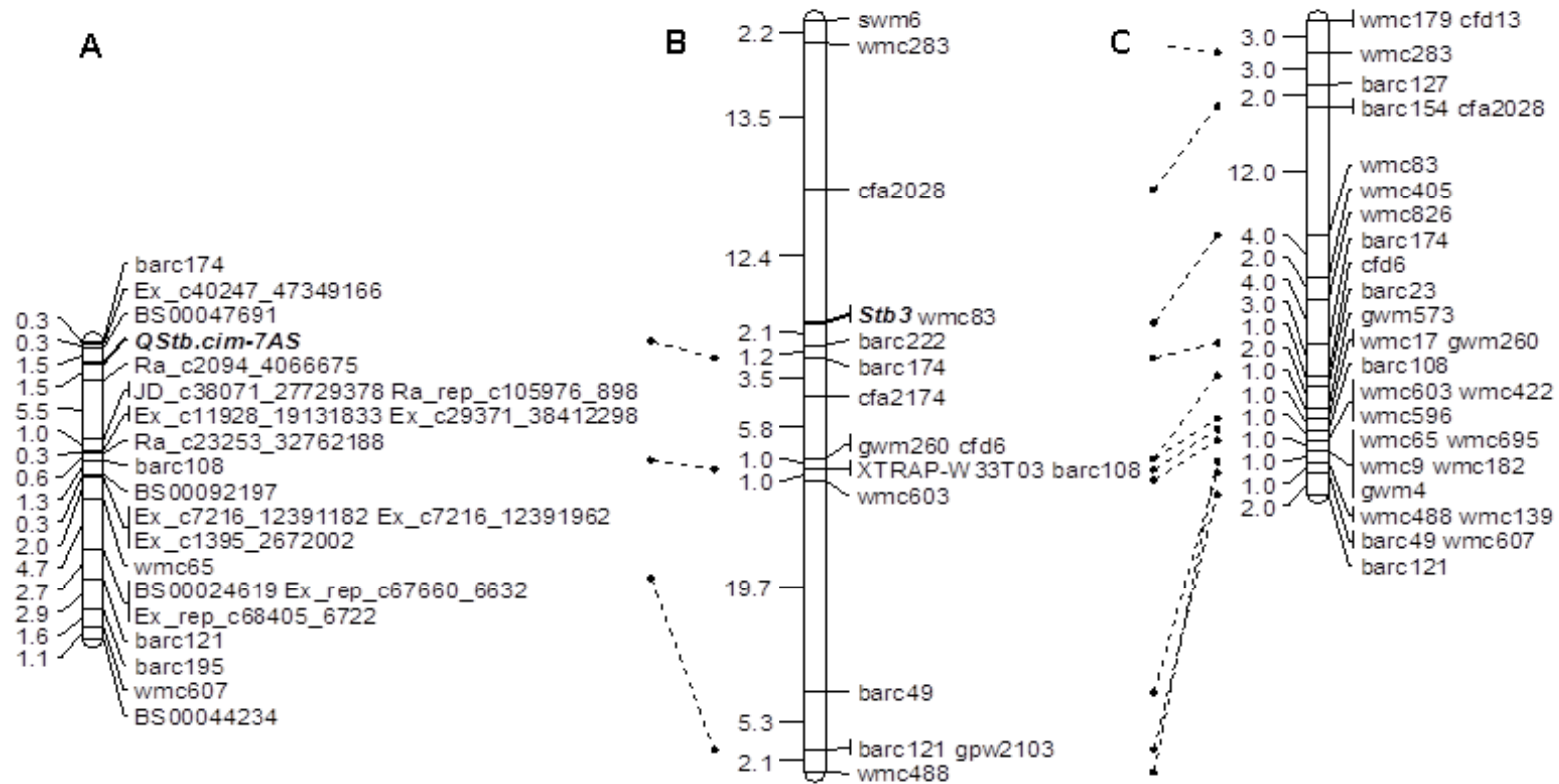


Figure 11. Comparison of the current and previous linkage maps. A 7AS linkage group from the current study. B Linkage map from Goodwin *et al.* (2015). C Consensus map from Sommers *et al.* 2004.

The host resistance to *Septoria tritici* blotch is reported to be both qualitative and quantitative. Although gene-for-gene interactions exist between certain qualitative genes and the corresponding pathogen isolates, the resistance conferred by each gene is weak and cannot provide sufficient protection to wheat as those in rusts and powdery mildew (Goodwin 2012). Like in other diseases, breakdown of *Septoria tritici* blotch resistance genes has been observed, e.g. resistance of the wheat cultivar ‘Gene’ was defeated only 5 years after its release, implying its resistance nature of ‘race-specific’ (Cowger *et al.* 2000). Thus it is therefore recommended to pyramid both qualitative and quantitative resistance genes in breeding materials to achieve more durable resistance (Raman and Milgate 2012).

In this study we identified previously known and new QTL for adult-plant resistance against *Septoria tritici* blotch under field conditions in diverse environments and against a cluster of Mexican virulent isolates which are useful to accelerate the additional assembling of more resistant quantitative genes to *Septoria tritici* blotch. Further fine mapping and the characterization of the two RIL populations beyond the Mexican environments is required and aimed for, to evaluate the stability of the QTL and test their usefulness in archiving long-term durable control of the disease.

Overall five across environment consistent QTL for *Septoria tritici* blotch resistance were observed in the two RIL populations. QTL were additive and showed no major epistatic effects. However, the variance explained by the QTL varied largely from 4 to 27% in the individual environments (data not shown) demonstrating the complex inheritance of *Septoria tritici* resistance. Quantitative genetic theory points

out that the best ways of using molecular markers in selection largely depend on the genetic architecture of the trait (Bernardo, 2014). Larger effect QTL are commonly used in marker-assisted selection (MAS). Despite the success in detecting larger effect QTL involved in quantitative disease resistance and with additive behavior, a deficit of commercially relevant *Septoria tritici* blotch resistant wheat germplasm so far remains and the underlying complex genetic architecture therefore challenges if MAS is the best approach for the development of durable resistant phenotypes. As an alternative concept, genomic selection has been proposed (Meuwissen *et al* 2001). In genomic selection, effects are estimated for all genomic region using large populations genotyped and high-density marker panels. First experimental results applying genomic selection on *Septoria tritici* blotch resistance in wheat suggested that the approach is promising to improve breeding for quantitative disease resistances (Miedaner *et al.* 2013). Recently, Bernardo *et al.* (2014) suggested major genes could be fitted in genomic selection prediction models as fixed effects when only a few major genes are present and each gene accounts for $\geq 10\%$ of the genetic variance. Thus a combined approach including high-density marker panels and major quantitative genes such as found here could be proposed. Low cost KASP assays were developed as flanking markers for all five QTL. These assays will facilitate MAS or their integration into large scale genome-wide marker data used in genomic selection approaches.

References

Adhikari TB, Yang X, Cavaletto JR, Hu X, Buechley G, Ohm HW, Shaner G, Goodwin SB (2004a) Molecular mapping of Stb1, a potentially durable gene for resistance to Septoria tritici blotch in wheat. Theor Appl Genet 109:944–953

Adhikari TB, Cavaletto JR, Dubcovsky J, Gieco JO, Schlatter AR, Goodwin SB (2004b) Molecular mapping of the Stb4 gene for resistance to Septoria tritici blotch in wheat. Phytopathology 94:1198–1206

Adhikari TB, Anderson JM, Goodwin SB (2003) Identification and molecular mapping of a gene in wheat conferring resistance to *Mycosphaerella graminicola*. Phytopathology 93:1158–1164

Arraiano LS, Worland AJ, Ellerbrook C, Brown JKM (2001) Chromosomal location of a gene for resistance to Septoria tritici blotch (*Mycosphaerella graminicola*) in the hexaploid wheat ‘Synthetic 6x’. Theor Appl Genet 103:758–764

Bekele A, Firdisa E, Kebede T, Solomon G (2011) Screening wheat germplasm for *Septoria* resistance in Ethiopia. In: Duveiller E, Singh PK *et al.* (eds) 2001. 8th International Symposium on *Mycosphaerella* and *Stagonospora* Diseases of Cereals. Book of Abstracts. Mexico City, Mexico, pp 94

Bernardo R (2014) Genome wide selection when major genes are known. Crop Sci 54:68–75

Brading PA, Verstappen EC, Kema GH, Brown JK (2002) A gene-for-gene relationship between wheat and *Mycosphaerella graminicola*, the *Septoria tritici* blotch pathogen. *Phytopathology* 92:439–445

Chartrain L, Berry ST, Brown JK (2005a) Resistance of wheat line KavKaz-K4500 L.6.A.4 to *Septoria tritici* blotch controlled by isolate-specific resistance genes. *Phytopathology* 95:664–671

Chartrain L, Joaquim P, Berry ST, Arraiano LS, Azanza F, Brown JK (2005b) Genetics of resistance to *Septoria tritici* blotch in the Portuguese wheat breeding line TE 9111. *Theor Appl Genet* 110:1138–1144

Chartrain L, Sourdille P, Bernard M, Brown JKM (2009) Identification and location of *Stb9*, a gene for resistance to *Septoria tritici* blotch in wheat cultivars Courtot and Tonic. *Plant Pathol* 58:547–555

Cools HJ, Hawkins NJ, Fraaije BA (2013) Constraints on the evolution of azole resistance in plant pathogenic fungi. *Plant Pathol* 62:36–42

Cowger C, Hoffer ME, Mundt CC (2000) Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathol* 49:445–451

Duveiller E, Singh RP, Nicol JM (2007) The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases and potential epidemics. *Euphytica* 157:417–430

Eyal Z, Sharen AL, Prescott JM, van Ginkel M (1987) The *Septoria* diseases of wheat: concepts and methods of disease management. Mexico, D.F.: CIMMYT

Eriksen L, Borum F, Jahoor A (2003) Inheritance and localization of resistance to *Mycosphaerella graminicola* causing *Septoria tritici* blotch and plant height in the wheat (*Triticum aestivum* L.) genome with DNA markers. *Theor Appl Genet* 107:515–527

Goodwin, SB *et al.*, 2015. A New Map Location of Gene *Stb3* for Resistance to *Septoria Tritici* Blotch in Wheat. *Crop Science*, 55, pp. 35–43.

Goodwin SB (2012) Resistance in wheat to *Septoria* diseases caused by *Mycosphaerella graminicola* (*Septoria tritici*) and *Phaeosphaeria* (*Stagonospora*) *nodorum*. In: Sharma I (ed) Disease resistance in wheat. CABI, Cambridge, pp 151–159

Goudemand E, Laurent V, Duchalais L, Tabib Ghaffary MS, Kema GHJ, Lonnet P, Margalé E, Robert O (2013) Association mapping and meta-analysis: two complementary approaches for the detection of reliable *Septoria tritici* blotch quantitative resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Mol Breed* DOI 10.1007/s11032-013-9890-4.

Guyomarc’h H, Sourdille P, Charmet G, Edwards KJ, Bernard M (2002) Characterization of polymorphic microsatellite markers from *Aegilops tauschii* and transferability to the D-genome of bread wheat. *Theor Appl Genet* 104:1164–1172

Gupta PK, Rustgi S, Sharma S, Singh R, Kumar N, Balyan HS (2003) Transferable EST-SSR markers for the study of polymorphism and genetic diversity in bread wheat. *Mol Gen Genomics* 270:315–323

Jlibene M, Gustafson JP, Rajaram S (1994) Inheritance of resistance to *Mycosphaerella graminicola* in hexaploid wheat. *Plant Breed* 112:301–310

Jlibene M, Mazouz H, Farih A (1995) Host–pathogen interaction of wheat (*Triticum aestivum*) and *Septoria tritici* in Morocco. In: Gilchrist SL, van Ginkel M, McNab, A, Kema GHJ (eds) 1995. Proceedings of a *Septoria tritici* Proceedings of a *Septoria tritici* Workshop 20-24 September 1993, Mexico, D.F.: CIMMYT, p 34-40

Kelm C, Ghaffary SMT, Bruelheide H, Röder MS, Miersch S, Weber WE, Kema GHK, Saal B (2012) The genetic architecture of seedling resistance to *Septoria tritici* blotch in the winter wheat doubled-haploid population Solitär × Mazurka. *MolBreed* 29:813–830

Kema GHJ, van Silfhout CH (1997) Genetic variation for virulence and resistance in the wheat–*Mycosphaerella graminicola* pathosystem. III. Comparative seedling and adult plant experiments. *Phytopathology* 87:266–272

Kema GHJ, Verstappen ECP, Todorova M, Waalwijk C (1996) Successful crosses and molecular tetrad and progeny analyses demonstrate heterothallism in *Mycosphaerella graminicola*. *Curr Genet* 30:251–258

Kosellek C, Pillen K, Nelson JC, Weber EW, Saal B (2013) Inheritance of field resistance to *Septoria tritici* blotch in the wheat doubled-haploid population Solitär × Mazurka. *Euphytica* 194:161–176

Liu Y, Zhang L, Thompson IA, Goodwin SB, Ohm HW (2013) Molecular mapping re-locates the Stb2 gene for resistance to Septoria tritici blotch derived from cultivar Veranapolis on wheat chromosome 1BS. *Euphytica* 190:145–156

McCartney CA, Brule-Babel AL, Lamari L, Somers DJ (2003) Chromosomal location of a race-specific resistance gene to *Mycosphaerella graminicola* in the spring wheat ST6. *Theor Appl Genet* 107:1181–1186

McDonald BA, Mundt CC, Chen RS (1996) The role of selection on the genetic structure of pathogen populations: evidence from field experiments with *Mycosphaerella graminicola* on wheat. *Euphytica* 92:73–80

Meuwissen, THE, Hayes BJ, Goddard ME (2001) Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics* 157:1819–1829

Miedaner T, Zhao Y, Gowda M, Longin CFH, Korzun V, Ebmeyer E, Kazman E, Reif JC (2013) Genetic architecture of resistance to Septoria tritici blotch in European wheat. *BMC Genomics* 14:858

Nazari K, Yahyaoui A, Abdalla O, Nachit M, Ogonnaya, F, Brettell R, Rajaram S (2009) Wheat rust diseases in Central and West Asia and North Africa (CWANA) and breeding for the multiple disease resistance. (Presented at the International Workshop on Marker Assisted Breeding for Disease Resistance in Wheat, May 10–12 2009, Karaj, Iran)

O’Driscoll A, Kildea S, Doohan F, Spink J, Mullins E. (2014) The wheat-*Septoria* conflict: a new front opening up? *Trends in Plant Sci* 19 (9):602–610

Raman R, Milgate AW, Imtiaz M, Tan M-K, Raman H, Lisle C, Coombes N, Martin P (2009) Molecular mapping and physical location of major gene conferring seedling resistance to *Septoria tritici blotch* in wheat. *Mol Breed* 24:153–164. DOI:10.1007/s11032-009-9280-0

Raman H, Milgate A (2012) Molecular breeding for *Septoria tritici blotch* resistance in wheat. *Cereal Research Communications* 40:451–466. DOI: 10.1556/CRC.40.2012.4.1

Risser P, Ebmeyer E, Korzun V, Hartl L, Miedaner T (2011) Quantitative trait loci for adult-plant resistance to *Mycosphaerella graminicola* in two winter wheat populations. *Phytopathology* 101:1209–1216

Röder MS, Korzun V, Wendehake K, Plaschke J, Tixier M-H, Leroy P, Ganal M.W (1998) A microsatellite map of wheat. *Genetics* 149:2007–2023

Saghai-Maroo MA, Soliman K, Jorgensen RA, Allard RW (1984) Ribosomal DNA spacer length polymorphism in barley: Mendelian inheritance, chromosomal location and population dynamics. *Proc Natl Acad Sci* 81:8014–8018

Saari, E.E., & Prescott, J.M. (1975) A scale for appraising the foliar intensity of wheat disease. *Plant Dis Rep* 59:377–380

Siah, A, Elbekali AY, Ramdani A, Reignault P, Torriani S FF, Brunner PC, Halama, P (2014) Qol resistance and mitochondrial genetic structure of *Zymoseptoria tritici* in Morocco. *Plant Dis* 98:1138–1144

Simón MR, Cordo CA, Castillo NS, Struik PC, Börner A (2012) Population structure of *Mycosphaerella graminicola* and location of genes for resistance to the pathogen: Recent advances in Argentina. International J Agronomy, ID 680275. 7 p

Somers DJ, Isaac P, Edwards K (2004) A high-density microsatellite consensus map for bread wheat (*Triticum aestivum* L.). Theor Appl Genet 109:1105

Song QJ, Fickus EW, Cregan PB (2000) Characterization of trinucleotide SSR motifs wheat. Theor Appl Genet 104:286–293

Sourdille P, Singh S, Cadalen T, Brown-Guedira G, Gay G, Qi L, Gill B, Dufour P, Murigneux A, Bernard M (2004) Microsatellite based deletion bin system for the establishment of genetic-physical map relationships in wheat (*Triticum aestivum* L.). Funct Integr Genomics 4:12–25

Tabib Ghaffary SM, Robert O, Laurent V, Lonnet P, Margale E, van der Lee TA, Visser RG, Kema GH (2011) Genetic analysis of resistance to Septoria tritici blotch in the French winter wheat cultivars Balance and Apache. Theor Appl Genet 123:741–754

Tabib Ghaffary SM, Faris JD, Friesen TL, Visser RG, van der Lee TA, Robert O, Kema GH (2012) New broad-spectrum resistance to Septoria tritici blotch derived from synthetic hexaploid wheat. Theor Appl Genet 124:125–142

Wang J, Li H, Zhang L, Li C, Meng L (2011) Users’Manual of QTL IciMapping v3.1

“Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch
mediante mapeo de QTL”

Benjamín Asael Martínez Cisneros

Wang S *et al*, (2014) Characterization of polyploid wheat genomic diversity using a high-density 90,000 SNP array. *Plant Biotechnology Journal* 6:787–796.

Conclusiones generales y discusión

Zymoseptoria tritici es uno de los principales patógenos del trigo y requiere múltiples estrategias de manejo para proteger su producción para consumo humano, esto debido a la alta variabilidad genética ocasionada por la alta tasa de reproducción sexual del patógeno, por lo cual, el control de STB es un desafío serio y constante para asegurar la producción mundial de este cultivo. El CIMMYT inició con la recolección de información sobre la resistencia a STB en 1971 con la distribución de los materiales para el primer *International Septoria Nursery* (ISEPTON), en donde se probaba la resistencia de estos materiales en diferentes ambientes internacionales, esto resultó en la identificación de las primeras fuentes de resistencia: los trigos de invierno de Rusia y Rumania, líneas de Sudamérica de áreas de Brasil y Argentina y líneas de Estados Unidos (Saari & Hettel, 1994). En este año el ISEPTON no. 25 con 52 entradas, la mayoría líneas avanzadas y mejoradas de CIMMYT está distribuido a colaboradores mundiales. La evaluación de germoplasma de CIMMYT se centra en Toluca, México.

Las futuras estrategias para el control de enfermedades deberán centrarse en aumentar las evaluaciones del genotipo en distintos ambientes con condiciones controladas para profundizar en la comprensión de la interacción entre el huésped y el patógeno para mejorar la resistencia a la enfermedad ocasionada por un patógeno con una alta variabilidad genética. Para este propósito, hasta la fecha, sólo unas pocas investigaciones han evaluado la resistencia en la fase adulta de la planta y en condiciones de campo difíciles sobre los cultivos de trigo para el

desarrollo de fenotipos robustos que puedan permanecer resistentes por largos periodos de tiempo. Los análisis de QTL en poblaciones biparentales para la valoración de la resistencia a STB en condiciones de campo han sido exclusivamente realizados hasta ahora con fuentes europeas resistentes de trigo de invierno. Para nosotros, la presente investigación es el primer análisis de QTL enfocado a la resistencia a STB en la fase adulta de la planta en diferentes ubicaciones y años a partir de líneas resistentes de trigo harinero de primavera.

En la presente investigación encontramos en nuestra población de mapeo de 193 líneas RIL, con los padres NASMA × RPB709.71/COC, tres QTL ligados a la resistencia a STB consistentes en cuatro diversos ambientes utilizando los marcadores moleculares SSR's y SNP's.

El primer QTL identificado con mayor efecto aditivo en la población descrita *QStb.cim-3BL*, fue localizado en el cromosoma 3BL y se encontró ligado a los marcadores SNP *Ex_c19778_28779907* y al SSR *wmc291* y explica el 23% de la variación fenotípica. Goudemand *et al.* (2013) publicaron un meta-QTL en el mismo cromosoma 3BL, intentamos encontrar similitudes con nuestro QTL pero los mapas de ligamiento no permitieron un análisis comparativo. Por lo tanto nuestro QTL puede representar un nuevo gen para la resistencia STB.

El segundo QTL identificado *QStb.cim-5AL-2*, fue localizado en el cromosoma 5AL y se encontró ligado a los marcadores SNP *Ex_c621_1231444* y *Ex_c5998_10513766*. Este QTL fue estrechamente ligado al gen de floración *Vrn-A1*. Análisis de mapeo anteriores revelaron que STB está inversamente

relacionado con la altura y la precocidad de la planta (Risser *et al.* 2011, Goudemand *et al.* 2013). Por desgracia, en nuestras pruebas de campo las fechas de floración no fueron registradas, pero tuvimos disponibles anotaciones de los mejoradores con escalas de la floración que van desde 1 (Precoz) a 3 (tardío) de las dos locaciones en Boximo y Toluca en el año 2011. Se observó que las líneas RIL tardías fueron menos propensas a STB que las líneas RIL precoces. Posteriormente se ajustaron los valores del desarrollo de la enfermedad del año 2011 con los datos de la floración, se repitió el análisis de QTL con los valores ajustados y se obtuvo el mismo resultado, lo que sugiere que el QTL *QStb.cim.5AL-2* está estrechamente ligado o corresponde al gen de floración *Vrn-A1*. La correlación fue negativa entre la altura de la planta y el desarrollo de la enfermedad y no se observó efecto significativo sobre la resistencia.

El tercer QTL identificado con el menor efecto aditivo *QStb.cim-7AS*, fue localizado en el cromosoma 7AS y se encontró ligado a los marcadores SSR *barc174* y al SNP *Ra_c2094_4066675*. En el grupo de ligamiento del cromosoma 7AS encontramos, con diferencias solamente en distancia mapa, a los marcadores SSR *barc174*, *barc108*, *wmc65* y *barc121* que ya habían sido previamente reportados en el mismo cromosoma y ligados a la resistencia a STB. Recientemente Goodwin *et al.* (2015) relocalizaron el gen *Stb3* en el cromosoma 7AS completamente ligado al marcador SSR *wmc83*. En nuestra población el marcador *wmc83* y los marcadores cercanos *barc222* y *cfa2028* resultaron ser monomórficos, sin relación con la resistencia a STB y nuestro QTL *QStb.cim-7AS*

resultado estar próximo al marcador SSR *barc174* ubicado a mayor distancia del gen *Stb3*. Sin embargo, como la distancia genética puede variar en diferentes poblaciones y los marcadores se encuentran relativamente cerca, no se puede descartar la relación entre nuestro QTL *QStb.cim-7AS* y el gen *Stb3*.

Se ha reportado previamente el rompimiento de la resistencia a STB, por ejemplo, la resistencia de la variedad de trigo 'Gene' fue vencida después de solo 5 años de su lanzamiento, lo que implica que tenía un carácter de resistencia "raza-específica" (Cowger *et al.* 2000). Por lo tanto, para lograr una resistencia más duradera, se recomienda realizar el piramideo de ambos tipos genes de resistencia cualitativos y cuantitativos en el material de mejoramiento (Raman y Milgate 2012). Por lo cual es importante realizar la búsqueda continua de nuevos factores para la resistencia a enfermedades como fue realizado en la presente investigación.

En la presente investigación hemos identificado QTL nuevos y relacionados a otros previamente reportados para la resistencia en la fase adulta contra STB en diversos ambientes en contra de un grupo de aislamientos criollos mexicanos que son útiles para acelerar descubrimiento de genes cuantitativos más resistentes a STB. Para evaluar la estabilidad de los QTL identificados en la presente investigación y probar su estabilidad para conservar la resistencia en contra de la enfermedad se requiere de mapeo fino y de la caracterización de nuestra población en entornos diferentes de México en donde la enfermedad se encuentre presente y sea difícil de controlar. Uno de los planes futuros para esta población

es ser evaluada en campo, para la resistencia a STB, en Etiopia, en donde los diferentes aislamientos de *Z. tritici* muestran mayor agresividad en contra del trigo.

Los QTL identificados en la presente investigación fueron consistentes en todos los ambientes y no se observaron efectos epistáticos. Sin embargo, se observaron diferencias en los porcentajes de la varianza explicada por cada QTL, esto concuerda con la complejidad de la herencia de la resistencia a STB.

Los QTL en este estudio explicaban 5 a 23 % de la variación fenotípica. El mayor QTL en el cromosoma 3B podría ser un buen candidato para ser utilizado en el Mejoramiento Asistido por Marcadores por su efecto relativamente alto y aditivo. Aun no se han realizado estudios de pirámido de genes de resistencia a STB, debido a que se conoce poco del efecto de los genes publicados, especialmente en condiciones de campo en etapa adulta de la planta; pero aunque sea una tarea ardua es necesario que se inicie con el mejoramiento de las líneas de trigo para la resistencia a STB utilizando las diferentes fuentes de resistencia genética que se han logrado identificar mediante el mapeo de QTL realizando las cruces de los distintos materiales que poseen estas fuentes de resistencia.

Los marcadores aquí utilizados también se podrían aplicarse en un concepto relativamente nuevo: la Selección Genómica (Meuwissen *et al* 2001), en donde los efectos aditivos se estiman para toda la región genómica utilizando grandes poblaciones para el análisis genotípico y paneles con marcadores moleculares de alta densidad. Los primeros resultados experimentales de la Selección Genómica para la resistencia a STB en el trigo sugieren que el enfoque es prometedor para

mejorar la producción de la resistencia cuantitativa a la enfermedad (Miedaner *et al.* 2013).

Bernardo *et al.* (2014) sugirieron que cuando sólo unos pocos genes importantes están presentes y cada gen representa un porcentaje $\geq 10\%$ de la varianza genética se podrían utilizar solo los principales genes como efectos ajustados en los modelos de predicción para la Selección Genómica. Para nuestra población podrían ser utilizados los marcadores del QTL *QStb.cim-3BL*, el SNP *Ex_c19778_28779907* y el SSR *wmc291* y del QTL *QStb.cim-5AL-2*, los SNP *Ex_c621_1231444* y *Ex_c5998_10513766*. De esta manera se podría proponer un método de mejoramiento que combine los principales genes cuantitativos, tales como los encontrados en la presente investigación, con paneles de marcadores de alta densidad.

En la presente investigación juntamente con los marcadores SSR, se utilizaron los marcadores SNP, para la identificación de nuestros QTL, por medio de la plataforma KASP (*LGC Genomics*), en donde los resultados de la técnica se pueden utilizar directamente para el mapeo, que comparando con los SSR en donde el mayor gasto económico está representado en el tiempo que se necesita para realizar la técnica e interpretar los resultados, la técnica con SNP es más económica. Estos marcadores pueden ser utilizados en el mejoramiento asistido por marcadores o bien pueden ser integrados en los marcadores de gran escala genómica para realizar el mejoramiento con los métodos de la Selección Genómica.

Annex 1. Metodología para el Análisis Genotípico

Extracción de ADN de tejido liofilizado

1. Para extraer ADN de tejido liofilizado (50 mg), utilice tubos de 2 ml y proceda como sigue:
2. Agregue 1 mL de búfer CTAB (Tris, 100 mM, pH 7.5; NaCl, 700 mM; EDTA, 50 mM, pH 8; CTAB (bromuro mixto de alquiltrimetil-amonio) 1%; BME (β -mercaptoetanol), 140 mM), precalentado a 65° C.
3. Incube a 65° C durante 60 min agitando continuamente con suavidad.
4. Retire los tubos de la incubadora; déjelos enfriar y agregue 800 μ L de cloroformo:octanol (24:1). Mezcle durante 10 min.
5. Centrifugue a 3,750 rpm durante 10 min para separar la fase orgánica y acuosa.
6. Retire alrededor de 700 μ L de la fase acuosa y colóquelos en un tubo nuevo.
7. Agregue 10 μ L de RNasa A (10 mg/ml). Mezcle e incube a 37° C durante 30 min.
8. Agregue 500 μ L de isopropanol y mezcle.
9. Centrifugue los tubos a 12,000 rpm durante 15 min para precipitar el ADN.
10. Descarte el sobrenadante y agregue 1 mL de Etanol al 70% y mezcle.

11. Centrifugue los tubos a 12,000 rpm durante 15 min para precipitar el ADN.
12. Descarte el sobrenadante y deje secar el ADN hasta que desaparezca el olor del alcohol.
13. Agregue 200 μ L de Tris-HCl (1mM, pH 8), para resuspender el ADN.

Protocolo de PCR para amplificación de SSR

1. Se prepara la siguiente mezcla de reacción con los componentes enlistados a continuación conforme a la cantidad de muestras que se desean analizar y se distribuyen 6 μ L de la mezcla en la placa para PCR:

Reactivo	Conc. final	Vol. 1 rxn. (μ L)
5X GoTaq® Flexi Buffer	1X	2.0
MgCl ₂ (25 mM)	1.5 mM	0.6
dNTP Mix (2.5 mM c/u)	200 μ M	0.8
Primers F + R (1.0 μ M c/u)	0.25 μ M c/u	2.5
Go taq® DNA Polymerase (5U/ μ L)	0.25 U	0.05
ADN (10-50 ng/ μ L)	40 ng	4.0
H ₂ O destilada estéril	-	0.05
Volumen total	-	10 μ L

2. Se agrega la muestra de ADN a cada pozo de la placa de PCR.
3. La placa se coloca en el termociclador y se corre el siguiente programa de amplificación:

PCR para SSR		
Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial	94° C	2 min
35 ciclos		
Desnaturalización	94° C	30 seg
Alineamiento	55° C	40 seg
Extensión	72° C	1 min
Terminan los ciclos		
Extensión final	72° C	7 min
Estabilización	15° C	Indefinido

Preparación de geles de acrilamida para SSR

1. El tamaño de los fragmentos de la mayoría de los iniciadores SSR es de 80 a 300 pb, nosotros utilizamos geles al 12% de acrilamida:bisacrilamida 29:1. Para preparar 1 gel se utilizan:
 - 21 mL Acrilamida 40% (29:1)
 - 12 mL TG Buffer 5X (receta 1X en el paso 2)
 - 27 mL ddH₂O
 - 240 µL APS (Persulfato de amonio) 25%
 - 30 µL TEMED
2. Una vez preparado el gel se vierte en los cristales previamente ensamblados. Al solidificar el gel, los cristales se colocan en la cámara de electroforesis y se llenan con búfer TG 1X (25 mM Tris, pH 8.3, 192 mM glicina).
3. Se procede a agregar los productos de PCR que contiene el búfer de carga del reactivo 5X GoTaq®Flexi Buffer. Se agrega el marcador de peso molecular Ø174 para comparar el tamaño de los productos.
4. Se corre el gel a 300 V en un periodo aproximado de 5 horas.

5. Al terminar la electroforesis se retira el gel de los cristales y se sumergen completamente en la solución FIXING (10% Etanol, 0.5% Acido Acetico) durante 5 min para comenzar con la tinción con nitrato de plata.
6. Se retira el gel de la solución FIXING y se sumerge completamente en la solución de nitrato de plata al 0.2% durante 10 – 30 min.
7. Se retira el gel de la solución de nitrato de plata 0.2% y se sumerge completamente en la solución DEVELOPER (3% NaOH, 0.2% Fomaldehido), se agitan hasta observar la tinción de las bandas del producto de PCR.
8. Se retira el gel de la solución DEVELOPER y se lava el gel con H₂O para quitar el exceso de solución y se procede a tomar la foto del gel con ayuda de un transiluminador de luz blanca.

Protocolo de PCR para amplificación de SNP

1. Se agregan 5 µL de ADN en la placa para PCR y se deja evaporar el ADN incubando las placas a 60° C por 1 – 2 horas.
2. Se prepara la siguiente mezcla de reacción con los componentes enlistados a continuación conforme a la cantidad de muestras que se desean analizar y se distribuyen 5 µL de la mezcla en la placa para PCR con el ADN evaporado:

Reactivo	Volumen 1 reacción (µL)
2X KASP Reaction Mix	2.5
Assay Mix	0.07

H2O	2.5
------------	-----

3. El *Assay Mix* contiene los oligonucleótidos fluorescentes específicos para el SNP que se desea analizar. Conforme al número de reacciones el *Assay Mix* se prepara respetando la siguiente relación a 10 µL.

Reactivo	Volumen (µL)
Alelo 1	1.2
Alelo 2	1.2
Común	3
H2O	4.2
Volumen total	10

4. Una vez preparada la mezcla de reacción junto con el *Assay Mix*, la mezcla de ambos es agregada a la placa para PCR con el ADN evaporado.
5. La placa se coloca en el termociclador y se corre el siguiente programa de amplificación:

PCR para SSR		
Paso	Temperatura	Tiempo
Desnaturalización Inicial y activación de la Polimerasa	94° C	15 min
11 ciclos		
Desnaturalización	94° C	30 seg
Alineamiento	65 a 57° C (disminuyendo 8° C por ciclo)	1 min
Extensión	72° C	30 seg
26 ciclos		
Desnaturalización	94° C	30 seg
Alineamiento	57° C	1 min
Extensión	72° C	30 seg
Terminan los ciclos		
Extensión final	72° C	2 min
Estabilización	20° C	Indefinido

6. Después del programa de amplificación se procede a realizar la lectura de la placa para PCR en el lector de fluorescencia PHERAstar (*BMG Labtech*)

“Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a *Septoria tritici blotch* mediante mapeo de QTL”

Benjamín Asael Martínez Cisneros

Company) ajustando los datos de fluorescencia de los oligonucleótidos para el SNP que se está analizando.

- Los datos obtenidos de la lectura de la placa para PCR son analizados con el programa KlusterCaller (*LGC Genomics*) para obtener el genotipo de las muestras analizadas.

Marcadores analizados en la población NASMA x RPB709.71/COC para su genotipeo

	SSR	SNP
Polimórficos entre los dos padres	107	4104
Monomórficos	116	14494
Sin amplificación	17	3502
Polimórficos entre R y S	50	129
Analizados en toda la población	44	45

Nombre de los marcadores analizados en toda la población	
SSR	SNP
<i>barc015</i>	<i>BS00002800</i>
<i>barc054</i>	<i>BS00003776</i>
<i>barc066</i>	<i>BS00022644</i>
<i>barc105</i>	<i>BS00024619</i>
<i>barc108</i>	<i>BS00031117</i>
<i>barc121</i>	<i>BS00044234</i>
<i>barc174</i>	<i>BS00047691</i>
<i>barc195</i>	<i>BS00092197</i>
<i>barc198</i>	<i>BS00097986</i>
<i>barc28</i>	<i>CAP11_rep_c4073_1924782</i>
<i>barc74</i>	<i>Ex_c11893_19077166</i>
<i>cfa2040</i>	<i>Ex_c11928_19131833</i>
<i>cfa2163</i>	<i>Ex_c13154_20784321</i>
<i>cfid188</i>	<i>Ex_c13606_21380703</i>
<i>gpw30878</i>	<i>Ex_c1395_2672002</i>
<i>hbg2477</i>	<i>Ex_c1395_2672221</i>

“Identificación de marcadores moleculares ligados a la resistencia a Septoria tritici blotch mediante mapeo de QTL”

Benjamín Asael Martínez Cisneros

<i>Vrn-A1</i>	<i>Ex_c17763_26513562</i>
<i>wmc048</i>	<i>Ex_c19778_28779907</i>
<i>wmc059</i>	<i>Ex_c24777_34031473</i>
<i>wmc089</i>	<i>Ex_c29371_38412298</i>
<i>wmc161</i>	<i>Ex_c3130_5789888</i>
<i>wmc272</i>	<i>Ex_c3907_7088011</i>
<i>wmc291</i>	<i>Ex_c40247_47349166</i>
<i>wmc307</i>	<i>Ex_c54193_57155537</i>
<i>wmc3137</i>	<i>Ex_c54193_57155632</i>
<i>wmc3179</i>	<i>Ex_c5998_10513766</i>
<i>wmc376</i>	<i>Ex_c621_1231298</i>
<i>wmc419</i>	<i>Ex_c621_1231444</i>
<i>wmc474</i>	<i>Ex_c7216_12391182</i>
<i>wmc533</i>	<i>Ex_c7216_12391962</i>
<i>wmc607</i>	<i>Ex_c8424_14192191</i>
<i>wmc65</i>	<i>Ex_c955_1827719</i>
<i>wmc657</i>	<i>Ex_rep_c101457_86818160</i>
<i>wms088</i>	<i>Ex_rep_c101994_87256479</i>
<i>wms146</i>	<i>Ex_rep_c67660_66321934</i>
<i>wms155</i>	<i>Ex_rep_c68405_67220227</i>
<i>wms186</i>	<i>JD_c15755_15117800</i>
<i>wms260</i>	<i>JD_c38071_27729378</i>
<i>wms291</i>	<i>Ku_c3684_6789632</i>
<i>wms319*</i>	<i>Ku_c7593_13054436</i>
<i>wms357</i>	<i>Ra_c2094_4066675</i>
<i>wms445</i>	<i>Ra_c23253_32762188</i>
<i>wms626</i>	<i>Ra_c69_149394</i>
<i>wms666</i>	<i>Ra_c9168_15363004</i>
	<i>Ra_rep_c105976_89839782</i>

Referencias Bibliográficas

Bernardo, R., 2014. Genomewide selection when major genes are known. *Crop Science*, 54, pp.68–75.

Collard, B.C.Y. *et al.*, 2005. An introduction to markers, quantitative trait loci (QTL) mapping and marker-assisted selection for crop improvement: The basic concepts. *Euphytica*, 142, pp. 169–196.

Cowger, C., Hoffer, M.E. & Mundt, C.C., 2000. Specific adaptation by *Mycosphaerella graminicola* to a resistant wheat cultivar. *Plant Pathology*, 49, pp. 445–451.

Crow, J.F., 2007. Haldane, Bailey, Taylor and Recombinant-Inbred Lines. *Genetics Society of America*, 176, pp. 729–732.

Dreisigacker, S., 2012. Chapter 13, Genetic marker systems in wheat breeding. *Physiological breeding I: interdisciplinary approaches to improve crop adaptation*. Reynolds, M.P., Pask, A.J.D., Mullan, D., CIMMYT, 174 p.

Duveiller, E., Singh, R.P., Nicol, J.M., 2007 The challenges of maintaining wheat productivity: pests, diseases, and potential epidemics. *Euphytica*, 157, pp. 417–430.

FAO, 2010. World Summit on Food Security. The key challenges. <http://www.fao.org/wsfs/world-summit/wsfs-challenges/en/>.

Goodwin, S.B. *et al.*, 2015. A New Map Location of Gene Stb3 for Resistance to Septoria Tritici Blotch in Wheat. *Crop Science*, 55, pp. 35–43.

Goudemand, E. *et al.*, 2013. Association mapping and meta-analysis: two complementary approaches for the detection of reliable Septoria tritici blotch quantitative resistance in bread wheat (*Triticum aestivum* L.). *Molecular Breeding*, 32, pp. 563–584.

Grist, SA., Firgaira, F.A. & Morley, A.A., (1993). Nucleotide repeat polymorphisms isolated by the polymerase chain reaction. *Biotechniques*, 15, pp. 304–309.

Gupta, P., Varshney, R., Sharma, P. & Ramesh, B., 1999. Molecular markers and their applications in wheat breeding. *Plant Breed*, 118, pp. 369–390.

Jahufer, M., Barret, B., Griffiths, A. & Woodfield, D., 2003. DNA fingerprinting and genetic relationships among white clover cultivars. *Proceedings of the New Zealand Grassland Association*, 65, pp. 163–169.

Jones, N., Ougham, H. & Thomas, H., 1997. Markers and mapping: We are all geneticists now. *New Phytol*, 137, pp. 165–177.

Jorgensen, L.N., 2008. Resistance situation with fungicides in cereals. *Zemdirbyste-Agriculture*, 95, pp. 373–378.

Luo, M., Yang, Z., You, F., Kawahara, T., Waines, J. & Dvorak, J., 2007. The structure of wild and domesticated emmer wheat populations, gene flow between them, and the site of emmer domestication. *Theor Appl Genet*, 114, pp. 947–959.

Meuwissen, T.H.E., Hayes, B.J. & Goddard, M.E., 2001. Prediction of total genetic value using genome-wide dense marker maps. *Genetics*, 157, pp.1819–1829.

Miedaner, T. *et al.*, 2013. Genetic architecture of resistance to Septoria tritici blotch in European wheat. *BMC genomics*, 14, pp. 1–8.

Mohan, M., Nair, S., Bhagwat, A., Krishna, T.G., Yano, M., Bhatia, C.R. & Sasaki, T., 1997. Genome mapping, molecular markers and marker-assisted selection in crop plants. *Mol Breed*, 3, pp. 87–103.

Paterson, A.H., 1996. *Genome Mapping in Plants*. University of Michigan, 330 p.

Paveley, N.D., Lockley, K.D., Sylvester-Bradley, R. & Thomas, J., 1997. Determinants of fungicide spray decisions for wheat. *Pest Sci*, 49 pp. 379–388.

Ponomarenko, A., Goodwin, S.B. & Kema., G.H.J., 2011. Septoria tritici blotch (STB) of wheat. <http://www.apsnet.org/edcenter/intropp/lessons/fungi/ascomycetes/Pages/Septoria.aspx>.

Raman, H., Milgate, A., 2012. Molecular breeding for Septoria tritici blotch resistance in wheat. *Cereal Research Communications*, 40, pp. 451–466

Ribaut, J.M. & Hoisington, D., 1998 .Marker-assisted selection: New tools and strategies. *Trends Plant Sci*, 3, pp. 236–239.

Ribaut, J.M., Hu, X., Hoisington, D. & Gonzalez-De-Leon, D., 1997. Use of STSs and SSRs as rapid and reliable preselection tools in marker-assisted selection backcross scheme. *Plant Mol Biol Report*, 15, pp. 156–164.

Risser, P., Ebmeyer, E., Korzun, V., Hartl, L. & Miedaner, T., 2011. Quantitative trait loci for adult plant resistance to *Mycosphaerella graminicola* in two winter wheat populations. *Phytopathology*, 101, pp. 1209-1216.

Saari, E.E., & Hettel, G.P., 1994. Guide to the CIMMYT Wheat Crop Protection Subprogram. Wheat Special Report No. 24. CIMMYT

Tabib-Ghaffary, S.M. *et al.*, 2012. New broad-spectrum resistance to *Septoria tritici blotch* derived from synthetic hexaploid wheat. *Theoretical and applied genetics*, 124, pp. 125–142.

Torriani, S. F. F., Brunner, P. C., McDonald, B. A., & Sierotzki, H., 2009. Qol resistance emerged independently at least 4 times in European populations of *Mycosphaerella graminicola*. *Pest Manage Sci*, 65, pp. 155-162.

USDA, 2010. A Report from the Economic Research Service. Wheat Outlook. <http://usda.mannlib.cornell.edu/usda/ers/WHS//2010s/2010/WHS-06-14-2010.pdf>.

Winter, P. & Kahl, G., 1995. Molecular marker technologies for plant improvement. *World Journal of Microbiology & Biotechnology*, 11, pp. 438–448.

Young, N.D., 1996. QTL mapping and quantitative disease resistance in plants. *Annu Rev Phytopathol*, 34, pp. 479–501.