

DetECCIÓN DE MARCADORES MICROSATÉLITES ASOCIADOS CON LA RESISTENCIA A *Curvularia pallescens* (Boedijn) EN MAÍZ

Detection of SSR markers associated with the resistance to *Curvularia pallescens* (Boedijn) in maize

Hilda FERNÁNDEZ ¹✉, Carmen GUEVARA ², Félix SAN VICENTE¹, Carlos MARIN R.¹ y Luis SUBERO ³

¹Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA). Centro Nacional de Investigaciones Agropecuarias (CENIAP). Apartado 4653, Maracay, estado Aragua, Venezuela, ²Planta de Bioinsumos, INIA. Turmero, estado Aragua y ³Universidad Central de Venezuela, Facultad de Agronomía. Maracay, estado Aragua.
E-mail: hfernandez@inia.gov.ve ✉ Autor para correspondencia

Recibido: 16/03/2010 Fin de primer arbitraje: 23/09/2010 Primera revisión recibida: 28/12/2011 Aceptado: 30/12/2011

RESUMEN

El cultivo del maíz en Venezuela es frecuentemente afectado por un grupo de enfermedades foliares, entre las cuales se encuentra la mancha blanca causada por el hongo *Curvularia pallescens*. Esta enfermedad aparece en el período reproductivo de la planta, afectando de manera significativa el rendimiento en granos. Con la finalidad de identificar marcadores SSR, o simple sequence repeat por sus siglas en inglés, asociados con la resistencia a la mancha blanca causada por *C. pallescens* en maíz, se realizó un análisis de segregantes agrupados o Bulk Segregant Analysis, BSA por sus siglas en inglés, asistido con marcadores SSR. Para ello se utilizó una población F₂ integrada por 100 plantas derivadas de un cruce entre dos líneas elites (resistente x susceptible), previamente inoculadas con aislamientos puros de *C. pallescens*. Para el análisis BSA se formaron dos grupos contrastantes (resistentes y susceptibles), los cuales fueron evaluados junto a los dos progenitores con 50 loci SSR. De estos loci solo cuatro resultaron polimórficos, tres de los 46 restantes no amplificaron y 43 de ellos no presentaron bandas diferenciales. Para determinar la asociación entre los loci polimórficos y la resistencia, se empleó una prueba basada en el estadístico chi-cuadrado de independencia (p=0,05), encontrándose asociación entre el locus Bnl439 y la resistencia a *C. pallescens*. Adicionalmente, a partir de los resultados de los análisis estadísticos, se calcularon los valores predictivos, especificidad y sensibilidad de los cinco loci polimórficos, entre los cuales el marcador Bnl439 presentó el valor más alto de especificidad (76%), y el mayor valor predictivo positivo (85%).

Palabras clave: mancha blanca, BSA, SSR polimórficos, resistencia.

ABSTRACT

The Maize crop in Venezuela is frequently affected by a group of foliar diseases, among which one finds the white spot caused by the fungus *Curvularia pallescens*. This disease appears in the plant reproductive stage, affecting grain yield considerably. With the purpose of identifying SSR (simple sequence repeat) markers associated with resistance to white spot in maize, we performed a Bulk Segregant Analysis (BSA) assisted with SSR markers. We used an F₂ population comprised by 100 plants, derived from a cross between two lines (resistant x susceptible), which were previously inoculated with pure isolates of *C. pallescens*. Using the BSA methodology two contrasting groups (resistant and susceptible) were formed, which were evaluated along with their parents with 50 pairs of SSR loci. Only four of the 50 loci evaluated resulted polymorphic, three of the remaining 45 did not amplified, and 43 of them did not show differential bands with the parents or the contrasting groups. To determine the association between the polymorphic loci and resistance, a Chi-square test of independence was applied (p=0.05) finding Bnl439 locus associated with resistance to *C. pallescens*. Additionally, from the results of the statistical analyses, we calculated predictive values, specificity and sensibility of the 5 polymorphic loci, among which Bnl439 marker presented the highest specificity value (76%), and positive predictive value (85%).

Key words: White spot, BSA, polymorphic SSR, resistance.

INTRODUCCIÓN

El rendimiento y la producción del maíz en Venezuela se ven afectados por un grupo de

enfermedades foliares, que se presentan todos los años en zonas cálidas y con alta humedad relativa, como es el caso del estado Portuguesa, donde destaca la mancha blanca, causada por el hongo *C.*

pallescens. La mayoría de los cultivares sembrados en el país son susceptibles a la enfermedad y debido al área foliar afectada pueden llegar a causar pérdidas importantes en la producción (Pineda 1992).

Con relación a los marcadores microsatélites o SSR empleados en este estudio, los mismos han sido utilizados por diversos autores para evaluar enfermedades en maíz. Chen *et al.* (2003), estudiaron el tizón del sur, una enfermedad destructiva en maíz, mediante un análisis de familias segregantes con marcadores SSR; Nair *et al.* (2001), utilizando marcadores SSR estudiaron el mildiú lanoso (SDM) del sorgo y otra forma severa del mildiú lanoso del estado de Rajasthan en la India denominado (RDM) en 47 líneas de maíz; Nair *et al.* (2005), también realizaron un estudio de la misma enfermedad por medio de un análisis de locus de características cuantitativas o QTL vía SSR, llevado a cabo sobre una población de retrocruza; Wu *et al.* (2002), evaluaron con 87 pares de marcadores SSR el mosaico enanizante MDMV-V del maíz en una población F₂; Danson *et al.* (2006) usaron 52 marcadores SSR para estudiar la resistencia al virus del rayado en híbridos de maíz.

El análisis de segregantes agrupados o BSA, utilizado también en este trabajo, fue desarrollado por Michelmore *et al.* (1991) y su uso conjuntamente con las técnicas basadas en marcadores moleculares han hecho posible la identificación de QTL responsables de la resistencia a enfermedades de las plantas (Pérez-Enciso, 1998). El objetivo de este estudio fue la identificación de marcadores SSR asociados al carácter de resistencia a la mancha blanca causada por *C. pallescens* en maíz, susceptibles de ser utilizados en un programa de mejoramiento asistido por marcadores moleculares, que involucren poblaciones relacionadas genéticamente con la utilizada en este trabajo.

MATERIALES Y METODOS

Material Vegetal

El estudio se efectuó en una población F₂ integrada por 100 plantas, obtenida por autofecundación del híbrido resultante del cruce entre las líneas elites 05LEB013 resistente y la línea 05LEB004 susceptible al patógeno estudiado. Tanto las líneas parentales, como las poblaciones F₁ y F₂, fueron generadas en el Instituto Nacional de Investigaciones Agrícolas (INIA), Maracay, edo. Aragua.

Evaluación fenotípica de la resistencia a *C. pallescens* y conformación de los grupos contrastantes para el análisis BSA

Bajo condiciones de invernadero se evaluaron 200 plantas de la población F₂, para ello a los 30 días después de siembra se inocularon con aislamientos puros del patógeno en estudio, manteniendo juntas tanto las plantas tolerantes como las susceptibles, hasta el final del experimento. Las inoculaciones fueron efectuadas con una asperjadora manual, a una concentración de 6.0 x 10⁴ conidios/cc, a razón de tres aspersiones por cada hilera de plantas. Ocho días después de la inoculación se evaluó la reacción de las plantas frente al patógeno y con la ayuda de una escala visual de severidad de la enfermedad (James, 1971) se establecieron 6 categorías o clases: altamente resistentes, resistentes, moderadamente resistentes, susceptibles, moderadamente susceptibles y altamente susceptibles, (Cuadro 1).

Para el análisis BSA, los grupos fueron conformados siguiendo los criterios utilizados por Quarrie *et al.*, (1999) para marcadores codominantes, por lo tanto ambos grupos, resistentes y susceptibles estuvieron integrados por 34 individuos cada uno.

Cuadro 1. Categorías definidas y porcentaje de rangos de severidad según la escala utilizada

Categorías	Rangos (%)					
	Altamente Resistente	Resistente	Moderadamente Resistente	Moderadamente Susceptible	Susceptible	Altamente Susceptible
1	0%					
2		1-5%				
3			6-15%			
4				16-25%		
5					26-40%	
6						>40%

Extracción, verificación y cuantificación del ADN

El ADN de las dos líneas progenitoras y el de cada uno de los individuos de los dos grupos contrastantes, fue aislado usando el protocolo de Doyle and Doyle (1990), con pequeñas modificaciones, que consistieron en agregar 0,01g de bisulfito sódico y polivinil pirrolidona (PVP), para prevenir la oxidación al momento de la maceración con nitrógeno líquido. Luego se procedió a verificar la calidad en geles de agarosa al 0,8%. La cuantificación se efectuó mediante lecturas con un equipo mini espectrofotómetro marca NANO Drop y de forma visual usando como referencia un marcador Lambda de 100 ng de concentración. La concentración de ADN se ajustó hasta 50 ng/μl.

Análisis BSA

Para este análisis se mezclaron volúmenes iguales del ADN de los individuos resistentes y susceptibles por separado (Michelmore *et al.* 1991, Quarrie *et al.* 1999). Ambos grupos de ADN y las dos líneas parentales fueron analizados utilizando 50 pares de marcadores SSR (Cuadro 2), distribuidos en todo el genoma del maíz, y obtenidos de la base de datos (Maize Data Gen Bank: <http://www.maizegdb.org>). Las amplificaciones de los *loci* microsatélites fueron efectuadas en un volumen total de 15 μl, con la mezcla de reacción compuesta por 50ng de ADN, 2,5 mM de MgCl₂, buffer Taq 10X, 200 mM de dNTP, 1μM de cada iniciador y 5U de Taq polimerasa. Los ciclos PCR se llevaron a cabo en un termociclador MJ Research modelo PTC-200, y consistieron en una fase inicial de desnaturalización por cuatro minutos a 94°C, seguida por 29 ciclos de 1 minuto a 95°C, 1 minuto a 56 grados (esta temperatura varió de acuerdo al marcador utilizado), 1 minuto a 72°C y una fase final de extensión de 7 minutos a 72°C.

Electroforesis

Los productos de amplificación fueron separados por electroforesis en geles de agarosa MICROPOR (PROMEGA) al 3%, y teñidos con bromuro de etidio a una concentración de 0,5ug/ml, durante tres horas a 100 voltios constantes. Para la visualización de las bandas se utilizó el equipo analizador de geles CHEMI-DOC BIO-RAD, software Quantity One versión 4.2, empleándose el marcador de peso molecular de 25 pb PROMEGA como referencia.

Selección de marcadores polimórficos

Fueron considerados como polimórficos, aquellos marcadores que presentaron diferencias en la migración de la banda de cada uno de los padres y grupos contrastantes.

Evaluación molecular de la población F₂ con los marcadores SSR polimórficos

Para esta evaluación los 100 individuos de la población F₂, fueron analizados con los marcadores polimórficos. Tanto para las amplificaciones de los marcadores SSR polimórficos como para la electroforesis se procedió de la forma descrita anteriormente para el análisis BSA.

Registro de datos

Con los datos obtenidos a partir de la lectura de los geles se construyó una matriz de genotipage, la cual estuvo constituida por la asignación de genotipos, donde de forma hipotética, se asignó el genotipo (aa) para los individuos con una banda en igual posición que el padre resistente, (ab) para los individuos heterocigotos que presentaban dos bandas en igual posición tanto para el padre resistente como

Cuadro 2. *Loci* SSR utilizados para evaluar la población F₂.

Cromosoma	Marcadores SSR
1	phi037, bnlg439, bnlg1083, bnlg1484, phi227562
2	bnlg125, phi127, phi083, bnlg1045, phi101049, umc1555
3	umc1594, bnlg1601, phi036, umc1136, phi053
4	dupssr34, mmc0321, phi06, umc1943, phi093
5	bnlg105, umc1792, bnlg2323, phi109188
6	umc1014, umc1143, phi031, bnlg391, phi078
7	umc1066, umc1642, bnlg1367, phi057, phi116, phi112
8	bnlg2181, bnlg1031, phi121, phi015, bnlg1194
9	umc1657, bnlg1288, phi022, bnlg1730, phi065
10	phi117, umc1152, umc1196, phi 063

para el padre susceptible y (bb) para los individuos con una banda en igual posición que el padre susceptible.

Segregación de los marcadores polimórficos

Mediante el programa MAPDISTO XLS, versión 1.6.0. Se efectuó una prueba de bondad de ajuste χ^2 , a fin de verificar cuanto de las proporciones observadas por los cinco marcadores polimórficos se desviaron significativamente de las mendelianas esperadas para una población F₂. La hipótesis nula fue (H₀) fue: hay segregación mendeliana si la desviación del marcador resulta no significativa. La regla de decisión fue: en aquellos marcadores donde la segregación resultó no significativa, se acepta la hipótesis nula, puesto que los marcadores segregaron para las proporciones mendelianas esperadas (1:2:1). Por el contrario en los que la segregación resultó significativa, se rechaza la hipótesis nula, dado que los marcadores no segregaron de acuerdo a las proporciones mendelianas esperadas para una población F₂.

Asociación entre los marcadores polimórficos y respuesta fenotípica de la población F₂

Para determinar la asociación entre los marcadores y la respuesta fenotípica a *C. pallescens*, se efectuó una prueba de independencia basada en el estadístico chi-cuadrado (p=0,05), utilizando la hoja de cálculo de Microsoft® Excel 2003. La hipótesis nula (H₀) fue: no hay asociación entre el marcador molecular y la resistencia. La regla de decisión acepta la hipótesis nula, si el valor de χ^2 calculado es menor que el valor de χ^2 tabulado.

Sensibilidad y especificidad de los marcadores SSR polimórficos

La validez de los marcadores y la seguridad al utilizarlos, se determinaron con base a lo reportado en el Cuadro 3, a partir del cual fue posible determinar sensibilidad (SE), especificidad (ES),

Cuadro 3. Evaluación de los Marcadores SSR polimórficos y respuesta de la población F₂.

Evaluación del Marcador	Respuesta de la población F ₂		
	Susceptible (S)	Resistente (R)	Total
Negativo	A (bb)	B	A+B
Positivo	C	D (aa)	C+D
Total	A+C	B+D	A+B+C+D

falsos positivos (FP), falsos negativos (FN), valor predictivo positivo (VPP) y valor predictivo negativo (VPN) para los marcadores asociados con la resistencia (Cuadro 4).

Estos valores permiten conocer la probabilidad de obtener un resultado concreto (verdaderos positivos o verdaderos negativos) en función de la verdadera respuesta de cada genotipo con respecto a la presencia de la banda evaluada. Luego de calcular estos valores, se determinó el porcentaje de falsos positivos y negativos al hacer uso de estos marcadores candidatos en la población F₂ evaluada (Fernández y Díaz, 2003).

Además, se determinó la seguridad de utilizar estos marcadores, calculando los valores predictivos de un resultado positivo o negativo, que dependen directamente de la frecuencia del marcador en la población evaluada (Fernández y Díaz, 2003). Estos valores permiten conocer cuál es la probabilidad que un individuo fenotípicamente resistente tenga el marcador, y aquel fenotípicamente susceptible no lo tenga.

Se consideraron individuos resistentes o verdaderos positivos para la presencia del marcador asociado con la resistencia, aquellos que presentaron el genotipo (aa) y no presentaron síntomas. Por el contrario, se consideraron individuos susceptibles o verdaderos negativos para la presencia del marcador, a aquellos que presentaron el genotipo (bb) y presentaron síntomas.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Análisis de Grupos Segregantes (BSA)

El análisis BSA permitió identificar cuatro *loci* SSR polimórficos para la resistencia a la enfermedad, estos fueron: bnlg1083, phi037,

Cuadro 4. Formulas derivadas del Cuadro 3, para calcular los parámetros que determinan validez y seguridad de los marcadores asociados con la resistencia.

Parámetro	Formula
Especificidad	ES= A/(A+C)
Sensibilidad	SE = D/(B+D)
Falsos positivos	FP= C/(A+C)
Falsos negativos	FN= B/B+D)
Valor predictivo positivo	VPP = D/(C+D)
Valor predictivo negativo	VPN=A/(A+B)

bnlg1601, y bnl439; detectando entre ellos diferentes tipos de polimorfismo, expresado por la diferente migración de bandas para cada parental, y grupos contrastantes, como se aprecia en la Figura 1.

Comportamiento de los marcadores SSR utilizados

De los 50 *loci* SSR evaluados con los padres y ambos grupos segregantes, solo cuatro resultaron polimórficos, tres de los 46 restantes no amplificaron y 43 de ellos no presentaron bandas diferenciales tanto con los padres como para los grupos contrastantes. Los cuatro marcadores polimórficos revelaron evidente polimorfismo entre las bandas del parental resistente y susceptible y cada grupo contrastante, (Figura 1). Del comportamiento de estos *loci*, se puede observar que tanto el grupo resistente (RB) como el susceptible (Sb) presentaron un patrón de bandas idéntico al respectivo parental, lo que permite deducir que las bandas que presenta cada grupo contrastante fueron heredadas de cada parental.

Segregación de los marcadores polimórficos y datos fenotípicos de la resistencia en la población F₂

Con la prueba de bondad de ajuste χ^2 efectuada se detectó que en tres de los marcadores polimórficos el Bnlg 1083, Bnlg1601 y el Bnl439 la segregación fue no significativa, es decir se acepta la hipótesis nula, puesto que las frecuencias se ajustaron a la segregación mendeliana correspondiente a la proporción 1:2:1, lo que sugiere que la herencia de la resistencia a *C. pallescens* es de tipo monogénico. Por el contrario, en el marcador Phi037 la segregación fue significativa y en este caso se rechaza la hipótesis nula, puesto que las frecuencias no se ajustaron a las proporciones mendelianas esperadas (Cuadro 5).

Marcadores moleculares que mostraron desviaciones de la segregación mendeliana han sido reportados en maíz (Bentolila *et al.* 1992; Gardiner *et al.* 1993; Sibov *et al.* 2003, Yan *et al.* 2003) y en otras especies de plantas (Konishi *et al.* 1990; Faris *et al.* 1998). De igual modo, el análisis de los datos fenotípicos (datos no mostrados) de la evaluación de la resistencia, presentó segregación mendeliana para un gen dominante 3:1 de genotipos resistentes y susceptibles, lo que corrobora lo observado con los tres marcadores polimórficos. Resistencia monogénica ha sido reportada para otros patógenos en plantas; Yang *et al.* (2004) en un estudio similar, encontraron un gen dominante que controla la resistencia a *Fusarium graminearum* Schw en maíz; igualmente, en maíz Yang *et al.*, (2005) usando marcadores SSR y RFLP detectaron el gen Rpi1 que controla la resistencia a *Pythium inflatum*; y Li *et al.* (1998) mediante marcadores AFLPs determinaron el alelo R2 que confiere resistencia a *Phytophthora infestans* en papa.

Cuadro 5. Chi-cuadrado calculado para los marcadores polimórficos y la resistencia en la población F₂ y número de genotipos observados de acuerdo a la presencia de las bandas. n = (100).

Nº	Marcador	χ^2	Proporción	P	Hmza	Hmzb	Htz
			1:2:1				
1	Phi1083	3,44	0,179	ns	23	33	44
2	Phi037	30,78	0,000	***	43	34	23
3	Bnlg1601	5,28	0,071	ns	26	34	40
4	Bnl439	2,72	0,256	ns	32	24	44
6	Resistencia	4,38	0,111	ns	34	21	45

Hmza = homocigotos resistentes (aa)
 Hmzb = homocigotos susceptibles (bb)
 htz = heterocigotos (ab)
 *** Significativo ($p \leq 0,05$) ns : No significativo ($p > 0,05$)

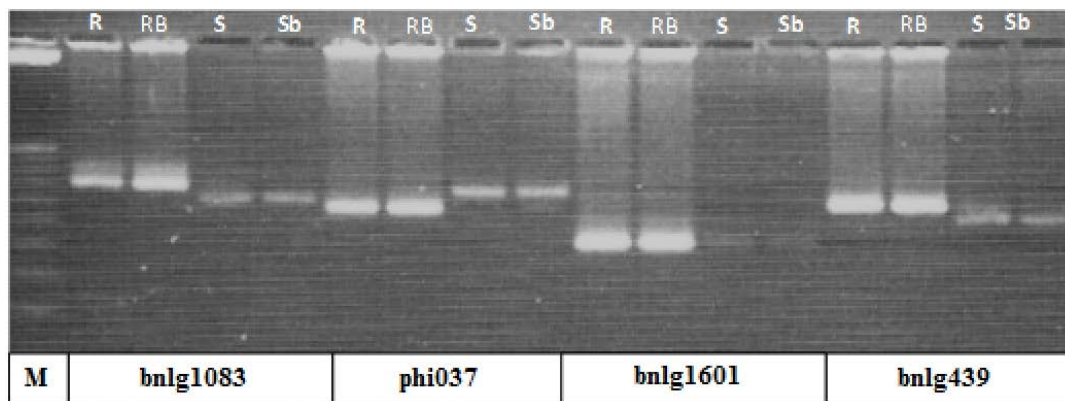


Figura 1. Polimorfismos presentados por los *loci* bnlg1083, phi037, bnlg1601 y bnl439, con los parentales y grupos contrastantes BSA (M= marcador de peso molecular 25 pb, R = padre resistente, RB = grupo resistente, S = padre susceptible y Sb = grupo susceptible).

Asociación entre los marcadores polimórficos y respuesta fenotípica de la población F₂

Como se presenta en el Cuadro 6, la prueba χ^2 de independencia permitió determinar la asociación entre el locus BnlG439 y la resistencia a *C. pallescens*. Para este locus, el valor de χ^2 calculado (10,84) fue evidentemente mayor que el tabulado (3,84), lo que permitió rechazar la hipótesis nula (H₀). Varios autores han reportado diferentes tipos de marcadores asociados con resistencia a enfermedades en plantas; Hurtado *et al.* (2004) en un trabajo similar encontraron un marcador SSR asociado a la resistencia a *Xanthomonas axonopodis pv manihotis* en yuca; Kozhukhova *et al.* (2007) detectaron un marcador codominante en maíz asociado a la resistencia a *Fusarium moniliforme Sheldon var. lactis*; (Mittal M. y Boora KS, 2005) a *Helminthosporium turcicum* en sorgo; y Panday, S. *et al.* (2002) a *Colletotrichum graminicola* en sorgo.

Sensibilidad y especificidad de los cuatro marcadores SSR polimórficos

Así mismo, el marcador BnlG 439 presentó el valor más alto de especificidad, indicando que el 76% de los individuos evaluados con este marcador presentaron la banda o alelos relacionados con la resistencia (aa) y la expresaron fenotípicamente, o sea, no presentaron síntomas; por el contrario, el 24% fueron falsos positivos puesto que presentaron la banda relacionada con la resistencia (aa) pero fenotípicamente no lo expresaron, es decir, se comportaron como susceptibles. Además, este marcador presentó el mayor valor predictivo positivo (85%), lo que sugiere alta frecuencia del mismo en la población evaluada.

CONCLUSIONES

- El análisis BSA permitió detectar cuatro loci polimórficos para el carácter de resistencia, de los cuales solo el BnlG439 presentó asociación con la misma, esto pudiera estar indicando que este marcador está ubicado más cerca de la región del cromosoma donde está localizado el gen de resistencia a *C. pallescens*.
- Como esperado el marcador BnlG439 asociado con el carácter de resistencia, detectó alto número de individuos resistentes, lo que confirma que el progenitor masculino (resistente), ha sido capaz de transmitir a la descendencia los genes de resistencia al patógeno.
- Con base en los valores predictivos positivos generados por el marcador BnlG439, es posible sugerir el uso de este marcador en pruebas diagnósticas para detectar la presencia de la banda relacionada con la resistencia, en individuos resistentes de poblaciones genéticamente relacionadas con el progenitor masculino portador de la resistencia, usado en este trabajo.
- Los individuos fenotípicamente resistentes que no presentaron la banda (alelos) de resistencia, probablemente tuvieron recombinación, durante la cual pudo haber delección o inserción de algunas regiones genómicas.

Cuadro 6. Resultados de la prueba de χ^2 de independencia para los marcadores SSR utilizados en la evaluación de la población F₂.

Marcador SSR	BnlG1083	Phi037	BnlG1601	BnlG439
χ^2 (0,05; 1gl)				
Calculado	2,140	0,190	3,180	10,380
Tabulado	3,840	3,840	3,840	3,840
Probabilidad χ^2	0,123	0,633	0,066	0,019
Distribución χ^2	0,143	0,659	0,074	0,013
Especificidad (%)	48	43	72	76
Sensibilidad (%)	71	64	56	70
Falsos Positivos (%)	52	57	28	24
Falsos Negativos (%)	29	36	44	30
Valor Predictivo (+) (%)	66	64	75	85
Valor Predictivo (-) (%)	55	43	52	53

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen al INIA y al programa BID FONACIT II (subproyecto 20040004491) por el aporte financiero para realizar este trabajo. A Luis Angulo por sus sugerencias y revisión del manuscrito.

LITERATURA CITADA

- Bentolila, S.; T. Hardy, C. Guitton and G. Freyssinet. 1992. Comparative genetic analysis of F₂ plants and anther culture derived plants of maize. *Genome* 35: 575-582.
- Danson J.; M. Lagat, J. Ininda and M. Kimani. 2006. Application of simple sequence repeats (SSRs) markers to study the resistance of locally adapted maize hybrid to damaging maize streak virus disease. *African Journal of Biotechnology* 5 (6): 1430-1434.
- Doyle, J. J. and J. L. Doyle. 1990. Isolation of plant DNA from fresh tissue *Focus* 12:13-25.
- Chen C. X.; Q. H. Xing, C. Y. Liang, Y. J. Yu, F. S. Liang, H. G. Wang, Z. L. Wang and B. Wang. 2003. Genetic mapping of resistant gene to southern corn rust and the tagging analysis on different genetic background. *Acta Genética Sinica [Yi Chuan Xue Bao]* 30 (4): 341-344.
- Faris, J. D.; B. Laddomada and B. S. Gill. 1998. Molecular mapping of segregation distortion loci in *Aegilops tauschii*. *Genetics* 149: 319-327.
- Fernández, P. y P. Díaz. 2003. Pruebas diagnósticas. Unidad de Epidemiología Clínica y Bioestadística. Complejo Hospitalario-Universitario Juan Canalejo. A Coruña (España). En línea. <http://www.fisterra.com/mbe/investiga/pruebasdiagnosticas.htm>. Consultado: Febrero 04/2012.
- Gardiner, J.; E. Coe, S. Melia Hancock, S. D. Hoisington and S. Chao. 1993. Development of a core RFLP map in maize using an immortalized-F₂ population. *Genetics* 134: 917-930.
- Gordon, S. G.; M. Bartsch, I. Matthies, H. O. Gevers, P. E. Lipps and R. C. Pratt. 2004. Linkage of molecular markers to *Cercospora zeaе maydis* resistance in maize. *Crop Sci.* 44: 628-636.
- Hurtado, P. X.; E. Álvarez, G. Llano y M. Fregène. 2004. Detección de marcadores microsatélites asociados con la resistencia al añublo bacterial de la yuca (*Manihot esculenta* Crantz) en Colombia. *Fitopatología Colombiana* 28 (2): 81-86.
- James, C. 1971. A manual of assessment keys for plant diseases. Canadian Department of Agriculture Publication N° 1458.
- Konishi, T.; K. Abe, S. Matuura and Y. Yano. 1990. Distorted segregation of the esterase isozyme genotypes in barley (*Hordeum vulgare* L.). *Jpn J. Genet.* 65: 411-416.
- Kozhukhova, N. E.; Y. M. Sivolap, B. F. Varenyk and V. M. Sokolov. Marking loci responsible for resistance of maize to *Fusarium* rot. *Cytology and Genetics* 41 (2): 98-102.
- Li X.; H. J. van Eck, J. N. A. M. Rouppe van der Voort, D. J. Huigen, P. Stam and E. Jacobsen. 1998. Autotetraploids and genetic mapping using common AFLP markers: the R2 allele conferring resistance to *Phytophthora infestans* mapped on potato chromosome 4. *Theor. Appl. Genet.* 96 (8): 1121-1128.
- Maize Gen Data Base (maizegdb). En línea <http://www.maizegdb.org/cgi>. Consultado: Junio/2008.
- Michelmore, R. W.; I. Paran and R. V. Kesseli. 1991. Identification of markers linked to disease resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proceedings of the National. Academy of Sciences (USA)* 88: 9828-9832.
- Mittal, M. and K. S. Boora. 2005. Molecular tagging of gene conferring leaf blight resistance using microsatellites in sorghum [*Sorghum bicolor* (L.) Moench]. *Indian J. Exp. Biol.* 43 (5): 462-466.
- Nair, S. K.; T. A. S. Setty, R. S. Rathore, R. Kumar, N. Singh and B. Prasanna. 2001. Towards molecular marker mapping of genes conferring resistance to Sorghum Downy Mildew (*Peronosclerospora sorghi*) in maize. *Maize Genetic Cooperation News Letter* 75: 47-48.

- Nair, S. K.; B. M. Prassanna, A. Garg, R. S. Rathore, T. A. S. Setty and N. N. Singh. 2005. Identification and validation of QTLs conferring resistance to sorghum downy mildew (*Peronosclerospora sorghi*) and Rajasthan downy mildew (*P. heteropogoni*) in maize. *Theor. Applied Genetics* 110 (8): 1384-1392.
- Panday S.; A. Sindhu and K. S. Boora. 2002. RAPD based DNA markers linked to anthracnose disease resistance in *Sorghum bicolor* Moench. (L.) *Indian J. Exp. Biol.* 40 (2): 206-211.
- Pérez Enciso, M. 1998 Sequential bulked typing: A rapid approach for detecting QTLs. *Theor. Applied Genetics* 96 (3-4): 551-557.
- Pineda, J. 1992. Evaluación de la mancha foliar causada por *Curvularia sp* en materiales experimentales y comerciales de maíz. *In: Memorias de la I Jornada Científica del maíz. Guanare, estado Portuguesa, Venezuela del 09 al 13 de Septiembre 1992.*
- Quarrie, S. A.; V. Lazic Jancic, D. Kovacevic, A. Steed and S. Pekic. 1999. Bulk segregant analysis with molecular markers and its use for improving drought resistance in maize. *Journal of Experimental Botany* 50 (337): 1299-1306.
- Sibov, S. T.; Jr. C. L. de Souza, A. A. Garcia, A. F. Garcia, A. R. Silva, C. A. Mangolin, L. L. Benchimol and A. P. de Souza. 2003. Molecular mapping in tropical maize (*Zea maize* L.) using microsatellite markers. 1. Map construction and localization of loci showing distorted segregation. *Hereditas* 139 (2): 96-106.
- Wu, J. Y.; J. Q. Ding, X. Y. Du and W. C. Chen. 2002. Identification and molecular tagging of two complementary dominant resistance genes to maize dwarf mosaic virus. *Acta Botánica Sinica* 29 (12): 1095-1099.
- Yang, D.; C. Zhang, D. Zhang, D. Jin, M. Weng, S. Chen, H. Nguyen and B. Wang. 2004. Genetics analysis and molecular mapping of maize (*Zea mays* L.) stalk rot resistant gene Rfg1. *Theor. Applied Genetics* 108 (4): 706-711.
- Yang D.; D. Jin, B. Wang, D. Zhang, H. Nguyen, C. Zhang and S. Chen. 2005. Characterization and mapping of Rpi1, a gene that confers dominant resistance to stalk rot in maize. *Mol. Genet Genomics* 274 (3): 229-234.
- Yan, J. B.; T. Hua, H. Yi-Qin, Z. Yong-Lian and L. Jian-Sheng. 2003. Genetic analysis of segregation distortion of molecular markers in maize F₂ population. *Acta Genetic Sinica* 30: 913-918.