



**FACULTAD DE CIENCIAS AGRARIAS
UNIVERSIDAD NACIONAL DE ROSARIO**

**Cartografía genómica de Pu_6 , un gen que confiere
resistencia a roya negra (*Puccinia helianthi* Schw.)
en girasol (*Helianthus annuus* L.).**

Ing. Agr. Pablo Nicolás Vergani

**TESIS PARA OPTAR AL TITULO DE MAGISTER EN
GENÉTICA VEGETAL**

DIRECTOR:

Ing. Agr., Mg. Sc. Carlos A. Sala.

ASESORES:

Lic. Mariano Bulos.

Ing. Agr., Mg. Sc. Graciela Nestares.

Ing. Agr. Amelia B. Bertero de Romano.

2013



Cartografía genómica de *Pu₆*, un gen que confiere resistencia a roya negra (*Puccinia helianthi* Schw.) en girasol (*Helianthus annuus* L.).

Pablo Nicolás Vergani

Ingeniero Agrónomo – Universidad de Buenos Aires

Esta Tesis es presentada como parte de los requisitos para optar al grado académico de Magister en Genética Vegetal, de la Universidad Nacional de Rosario y no ha sido previamente presentada para la obtención de otro título en ésta u otra Universidad. La misma contiene los resultados obtenidos en investigaciones llevadas a cabo en las instalaciones del Departamento de Biotecnología, Nidera S.A, Venado Tuerto, durante el período comprendido entre octubre de 2010 y diciembre de 2012, bajo la dirección de Ing. Agr. Mg. Sc. Carlos A. Sala.

Nombre y firma del Maestrando

Nombre y firma del Director

Nombres y firmas de los Asesores

Defendida:de 20__.

Agradecimientos:

A Carlos A. Sala y Mariano Bulos por la dirección de este trabajo, el tiempo dedicado y principalmente por transmitirme un poco de su pasión por la investigación.

A Graciela Nestares por tan valiosas recomendaciones y la excelente predisposición.

A Baby Romano por su asesoramiento en fitopatología, el tiempo cedido para llevar a cabo el mismo y su apoyo moral.

A mi familia por el apoyo de siempre.

Publicaciones y presentaciones a congresos:

- **Genome localization of rust resistance genes.** M. Bulos, E. Altieri, M.L. Ramos, P. Vergani, y C.A. Sala. Proc. 18th Int. Sunflower Conf., Mar del Plata, Argentina. Febrero, 2012.
- **A survey of physiological races of *Puccinia helianthi* in Argentina.** P.S. Moreno, A. Bertero de Romano, M.C. Romano, P. Vergani, M. Sposaro, M. Bulos, E. Altieri, M.L. Ramos y C. A. Sala. Proc. 18th Int. Sunflower Conf., Mar del Plata, Argentina. Febrero, 2012.
- **Genomic position and allelic relationships of the *Pu₆* gene conferring rust resistance in sunflower.** Mariano Bulos, Pablo Vergani, Emiliano Altieri, María Laura Ramos, Carlos A. Sala. Theor. Appl. Genet. (enviado).

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN.....	1
OBJETIVOS	4
<i>Generales</i>	4
<i>Específicos</i>	4
MATERIALES Y MÉTODOS	5
<i>Materiales utilizados y obtención de la población de mapeo</i>	5
<i>Evaluación de la resistencia a roya negra del girasol</i>	5
<i>Extracción del ADN</i>	6
<i>Amplificación del ADN</i>	7
<i>Análisis de segregantes en bulk</i>	7
<i>Mapeo genómico</i>	7
<i>Identificación de marcadores moleculares específicos del alelo Pu₆</i>	8
RESULTADOS	9
<i>Evaluación de la resistencia a roya negra del girasol</i>	9
<i>Polimorfismo entre parentales y análisis de segregantes en bulk</i>	10
<i>Mapeo genómico</i>	11
<i>Identificación de marcadores moleculares específicos del alelo Pu₆</i>	11
DISCUSIÓN.....	13
CONCLUSIONES.....	18
BIBLIOGRAFÍA.....	19
ANEXOS.....	23

Abreviaturas utilizadas:

BSA: análisis de la mezcla de ADN de individuos segregantes (*Bulked Segregant Analysis*).

cM: centimorgan.

EDTA: ácido etilendiaminotetraacético.

F₁: filial uno, es la generación obtenida por el cruzamiento de dos líneas endocriadas.

F₂: filial dos, es la generación obtenida por autofecundación de los individuos de la filial uno.

F_{2:3}: individuos F₃ provenientes por autofecundación de un individuo F₂.

F₃: filial tres, es la generación obtenida por autofecundación de los individuos de la filial dos.

GL: grupo de ligamiento.

LOD: logaritmo de los impares (Logarithm of odds).

MM: marcadores moleculares.

NA: norteamericanas.

pb: pares de bases.

PCR: reacción en cadena de la polimerasa.

RNG: roya negra del girasol (*Puccinia helianthi* Schw.).

RPM: revoluciones por minuto.

SDS: dodecil sulfato de sodio.

SSR: secuencias repetidas en tándem o Microsatélites (*Simple Sequence Repeat*).

USDA-ARS: Departamento de agricultura de Estados Unidos, servicio de investigación para la agricultura.

Resumen:

Cartografía genómica de *Pu₆*, un gen que confiere resistencia a roya negra (*Puccinia helianthi* Schw.) en girasol (*Helianthus annuus* L.).

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus* Ckll.) es uno de los principales cultivos oleaginosos anuales del mundo. La variedad de ambientes que explora el cultivo expone al mismo a diversas condiciones predisponentes para el desarrollo de enfermedades causadas por una cantidad de organismos fitopatógenos. La roya negra del girasol (RNG) es una enfermedad fúngica causada por *Puccinia helianthi* Schw. y es la más común de las royas tanto en el girasol silvestre como en el cultivado. La enfermedad, se encuentra en todos los países donde se cultiva girasol, causando serias pérdidas de rendimiento. El modo más práctico para controlar esta enfermedad es por medio de la resistencia varietal o genética. Varios genes de resistencia a este patógeno han sido identificados y cartografiados en el mapa genómico del girasol. Los marcadores moleculares (MM) asociados a genes de resistencia facilitan la selección simultánea de resistencia a múltiples enfermedades. Los objetivos de este trabajo fueron (a) confeccionar un mapa de ligamiento de MM de la región genómica que controla la resistencia a RNG proveniente de la línea endocriada P386 (b) hallar MM específicos del alelo *Pu₆*. Se realizó el cruzamiento entre las líneas P386 [resistente (R)] y la línea R702 CLPlus [susceptible (S)]. Por autofecundación, se obtuvo la población F₂ y las familias F₃. El ADN de cada una de las líneas parentales, la F₁ y de cada una de las plantas F₂ fue extraído para conducir análisis moleculares. Se evaluaron las progenies F₃ y las líneas parentales por su resistencia a RNG. Se realizó el análisis de la mezcla de ADN de individuos segregantes por MM para determinar cuáles eran polimórficos entre las líneas parentales y los grupos: resistente y susceptible. Se analizó el ADN de todas las plantas F₂ con los MM generados. Fue obtenido un mapa de ligamiento que cubre 26,8 cM entre el MM CRT404 y ORS317, siendo los MM más cercanos al *locus Pu₆* ORS316 a 2,2 cM –en el extremo distal- y ORS224 a 4,1 cM -en el extremo proximal-. El polimorfismo para el microsatélite ORS316 permite distinguir todas las fuentes de resistencia del GL13 con respecto a *Pu₆* y, por esa razón, ese SSR puede usarse como un marcador específico de este alelo.

Abstract:**Genomic mapping of *Pu₆*, a gene conferring rust (*Puccinia helianthi* Schw.) resistance in sunflower (*Helianthus annuus* L.).**

Sunflower (*Helianthus annuus* L. var. macrocarpus Ckll.) is one of the main oil crops of the world. It grows in different environmental conditions which expose it to different diseases caused by several pathogens. Sunflower rust (SR) is a fungal disease caused by *Puccinia helianthi* Schw. and is the most common rust in wild and cultivated sunflower. This disease is present in many countries where sunflower is planted, causing serious yield losses. The best alternative of control of this disease is genetic resistance. Several rust resistance genes have been identified and mapped in the sunflower genome. The objectives of this work were (a) to make a genetic map of the genomic region containing the rust resistance gene from the inbred line P386. (b) to find a specific MM of the allele *Pu₆*. The inbred lines P386 [resistant (R)] and R702 CLPlus [susceptible (S)] were crossed and the F_1 was selfed to obtain an F_2 population. Each F_2 plant was selfed to produce $F_{2:3}$ families. DNA from parental lines, F_1 and from each one of F_2 plants was extracted to conduct molecular analysis. F_3 families and parental lines were evaluated by SR resistance. A Bulk Segregant Analysis was conducted to determine polymorphic MM among parental lines and the susceptible and resistant bulks. A screening of F_2 plants was made with MM previously generated. A linkage map which covers 26.8 cM between the MM CRT404 and ORS317 was obtained. The closest markers linked to the *Pu₆* locus were ORS316 at 2.2 cM –in the distal position- and ORS224 at 4.1 cM –in the proximal position-. Polymorphisms for the SSR ORS316 permitted to distinguish all the resistant sources in LG13 from *Pu₆*, and, for this reason, it could be used as a specific marker for this allele.

INTRODUCCIÓN

El girasol cultivado (*Helianthus annuus* L. var. *macrocarpus* Ckll.) es uno de los principales cultivos oleaginosos anuales del mundo (Dedio y Putt, 1980). Hay dos tipos principales de girasol cultivado: oleaginoso para producción de aceite vegetal y no oleaginoso para consumo humano y alimentación de aves (Berglund, 2007). El 90% de la producción mundial de girasol se destina a la industria oleaginosa para la extracción de aceite vegetal y harina proteica. Entre los principales países productores de girasol se encuentran Rusia, Ucrania, Francia, España, Hungría, Rumania, Argentina, Turquía, Estados Unidos de Norteamérica, China e India (National Sunflower Association, 2012), con una producción mundial de grano que oscila entre los 27-30 Tg (ASAGIR, 2008). La variedad de ambientes que explora el cultivo expone al mismo a diversas condiciones predisponentes para el desarrollo de enfermedades causadas por una cantidad de organismos fitopatógenos (Sackston, 1981).

La roya negra del girasol (RNG) es una enfermedad fúngica causada por *Puccinia helianthi* Schw. y es la más común de las royas tanto en el girasol silvestre como en el cultivado. Es un patógeno macrocíclico, posee cinco estados de esporas: espermacio, aecio, uredio, telio y basidio (Alexopoulos, 1979; Agrios, 1997). Es un patógeno autoico ya que completa enteramente su ciclo de vida en un mismo hospedante. La enfermedad que produce se caracteriza por la presencia de pequeñas pústulas en ambas caras de las hojas. Estas pústulas también pueden encontrarse en las brácteas, el capítulo y el tallo cuando se producen infecciones severas. El color de las pústulas varía de acuerdo a los estados de las esporas. Las aeciosporas se observan como agrupaciones de copas anaranjadas presentes sólo en la cara inferior de las hojas, las urediosporas son pulverulentas y de color marrón canela, en tanto, las teliosporas tornan a color negro como respuesta a las bajas temperaturas. En los cultivares susceptibles, las pústulas se observan rodeadas por un halo clorótico (Gulya, 1997). La enfermedad se encuentra en todos los países donde se cultiva girasol, causando serias pérdidas de rendimiento. Zimmer y Zimmerman (1972), demostraron que los aquenios cosechados de las plantas infectadas con RNG y con downy mildew (*Plasmopara halstedii*) fueron significativamente más pequeños, livianos, con mayor porcentaje de cáscara y con menor contenido de aceite que los aquenios cosechados de plantas sanas. Fick y Zimmer (1975), hallaron diferencias significativas en el peso de los granos y en el porcentaje de aceite entre isohíbridos de girasol con y sin resistencia a roya negra. Por su parte, Siddiqui y Brown (1977), detectaron que la disminución en el rendimiento de aceite de plantas infectadas con *P. helianthi* estuvo causada por las reducciones en el número de semillas producidas por capítulo, el peso de las semillas individuales y el porcentaje de aceite contenido en las semillas. Ivancovich *et al.* (1985) y

Juncos y Bertero (1985), encontraron diferencias significativas, tanto en el rendimiento de granos como en el rendimiento de aceite, entre parcelas tratadas con respecto a las no tratadas con fungicida bajo condiciones de ataque severo de RNG. En los híbridos confiteros, Gulya (1997) asegura que el mayor impacto de la RNG sobre el rendimiento se debe a la reducción del tamaño de los granos.

El control de la RNG por medio de fungicidas es posible, pero usualmente no es redituable. El modo más práctico para controlar esta enfermedad es por medio de la resistencia varietal o genética (Sackston, 1981). Se han hallado varios genes de resistencia a este patógeno. Putt y Sackston (1963) identificaron un gen dominante -denominado R_7 - presente en las líneas 953-102, MC69 y MC90, que confiere resistencia a las razas norteamericanas (NA) 1 y 2¹. También informaron el descubrimiento del gen R_2 el cual imparte resistencia a las razas NA 1 y 3, y se encuentra presente tanto en la línea 953-88 como en MC29. Por su parte, Antonelli (1985) y Senetiner *et al.* (1985) estudiaron la resistencia genética a un aislamiento argentino de RNG, denominado clon 340, y encontraron cuatro líneas resistentes al mismo. La línea LC 74/75-20620 contenía el gen dominante Ph_1 , los materiales MP557 y MP555 llevaban el gen dominante Ph_2 , y la línea Pergamino 71-538 poseía el gen dominante Ph_{2a} y el gen recesivo ph_3 , siendo Ph_{2a} alélico de Ph_2 y ph_3 el alelo recesivo de ambos. Miller *et al.* (1988) informaron que las líneas HAR1, HAR3, HAR4, HAR5 y 647-1 contenían el gen R_4 el cual brinda resistencia a la raza NA 4 y que la línea HAR2 posee el gen R_5 . Yang *et al.* (1989) descubrieron un nuevo gen en la línea argentina P386 que confiere resistencia a las razas NA 1-4 al cual denominaron Pu_6 . Queresh y Jan (1992) descubrieron que la accesión PI413037 contenía cuatro genes de resistencia a RNG ligados en fase de acoplamiento, los cuales fueron denominados R_6 , R_7 , R_8 y R_9 y confieren resistencia a las razas NA 1, 2, 3 y 4, respectivamente. Lambrides y Miller (1994) identificaron un gen que otorga resistencia a la raza 6 del patógeno en una línea australiana, al cual se lo llamó R_{10} . Por lo menos 21 alelos putativos de resistencia han sido postulados para el *locus* R_4 , los cuales se han designado como R_{4a} - R_{4u} (Sendall *et al.*, 2006). Qi *et al.* (2012) realizaron el mapeo del gen R_{11} presente en la línea RfANN-1742, el cual confiere resistencia a las razas internacionales 336 y 777² (Qi *et al.*, 2011a). Por otra parte, Gong *et al.* (2012) hallaron marcadores moleculares (MM) vinculados al gen R_{12} presente en la línea RHA464. Recientemente, Bulos *et al.* (2013), identificaron un gen de resistencia presente en la línea HAR6, provisoriamente denominado R_{HAR6} , el cual confiere resistencia a las razas 777 (Miller y Gulya, 2001) y 336 (Qi *et al.*, 2011a).

¹ Nomenclatura de las razas de RNG según Sackston, 1962.

² Nomenclatura de las razas de RNG según Gulya y Masirevic, 1996.

Los MM son útiles para realizar selección asistida cuando se dificulta la evaluación de la enfermedad, debido a la penetrancia o expresividad variable del gen, a interacciones epistáticas entre genes de resistencia presentes en una misma línea, o en aquellos casos en que la resistencia es cuantitativa (Sala *et al.*, 2009). Los MM vinculados a genes de resistencia a enfermedades facilitan la selección de alelos de resistencia en ausencia de patógeno, eliminando la necesidad de controlar las condiciones ambientales. En este sentido, los MM asociados a genes de resistencia facilitan la selección simultánea de resistencia a múltiples enfermedades (Lawson *et al.*, 2010).

Lawson *et al.* (1998) hallaron MM asociados a los genes R_1 y R_{adv} (presente en la línea P2). Por otra parte, Bachlava *et al.* (2010) mapearon un gen con idéntica denominación (R_{adv}) en la línea RHA340. Lawson *et al.* (2010), identificaron tres microsatélites (SSR) ligados al gen R_2 . Qi *et al.* (2011b) encontraron dos MM que flanquean al gen R_4 , ubicando al mismo en el grupo de ligamiento (GL) 13. Qi *et al.* (2011c) hallaron dos SSR ubicados en el GL 2 que flanquean al gen R_5 . Qi *et al.* (2012), también hallaron tres MM vinculados al gen R_{11} ubicado en el GL 13. En tanto, Gong *et al.* (2012) identificaron dos MM ligados al gen R_{12} . Por su parte, Bulos *et al.* (2013) encontraron dos MM vinculados al gen R_{HAR6} y realizaron el mapeo genético del mismo ubicándolo en el GL 13.

La línea P386 posee el gen denominado Pu_6 el cual brinda resistencia a las razas de RNG más difundidas en las regiones que se cultiva girasol en la Argentina; 700, 704, 720, 740, 744 y 760 (Moreno *et al.*, 2012). Además, el mismo difiere de la resistencia otorgada por los genes R_1 , R_2 , R_4 y R_5 (Yang *et al.*, 1989) representando una valiosa fuente de resistencia a *P. helianthi* para ser utilizada por los fitomejoradores. Debido a que varios de los genes de resistencia a RNG han sido vinculados a MM y/o cartografiados, se postula que es posible saturar con MM la región genómica que contiene a Pu_6 de modo de hallar MM específicos del mismo.

OBJETIVOS

Generales

De acuerdo a lo expuesto los objetivos de este trabajo fueron (a) confeccionar un mapa de ligamiento de MM de la región genómica que controla la resistencia a RNG proveniente de la línea endocriada P386, (b) hallar MM específicos del alelo Pu_6 .

Específicos

- 1- Realizar cruzamientos entre las líneas endocriadas P386 (resistente, R) y la línea R702 CLPlus (susceptible, S) a RNG. Posteriormente y por autofecundación, obtener la población F_2 y las familias F_3 .
- 2- Extraer ADN de las líneas parentales R y S, de las plantas F_1 y de cada planta F_2 para conducir análisis moleculares.
- 3- Evaluar las progenies F_3 y las líneas parentales por su resistencia a RNG.
- 4- Realizar el análisis de la mezcla de ADN de individuos segregantes (*Bulked Segregant Analysis*, BSA por su acrónimo inglés) por MM para determinar cuáles son polimórficos entre las líneas parentales y los grupos: resistente y susceptible.
- 5- Analizar el ADN de todas las plantas F_2 con los MM generados en el punto anterior.
- 6- Realizar el mapa de ligamiento de la región que incluye el *locus* de resistencia Pu_6 .
- 7- Determinar si los MM más estrechamente ligados a *locus* Pu_6 son discriminantes de otras fuentes de resistencia.

MATERIALES Y MÉTODOS

Materiales utilizados y obtención de la población de mapeo

Con la finalidad de obtener poblaciones segregantes para conducir análisis fenotípicos y genotípicos de resistencia a RNG y luego realizar el mapeo genómico del gen que otorga la resistencia, se utilizaron dos líneas endocriadas de girasol: P386 y R702 CLPlus. La línea endocriada P386 es una línea argentina que posee el gen de resistencia a RNG Pu_6 , el cual confiere resistencia a las razas fisiológicas NA 1, 2, 3 y 4 (Yang *et al.*, 1989). La línea endocriada de girasol oleaginoso R702 CLPlus, propiedad de Nidera S.A, es una línea restauradora de la fertilidad polínica y susceptible a RNG. También fue utilizada como testigo susceptible la línea endocriada de girasol oleaginoso HA89 (PI599773), la cual fue liberada por USDA-ARS y la Estación Experimental de Agricultura de Texas en octubre de 1971 (USDA-ARS, National Genetic Resources Program, 2013).

Con la finalidad de obtener plantas F_1 se realizó el cruzamiento entre la línea P386 y R702 CLPlus resistente y susceptible, respectivamente. Cinco capítulos de cada línea fueron aislados mediante bolsas de malla de poliamida para evitar la contaminación con polen externo. Se recolectó polen de manera individual de tres capítulos de la línea P386 cuando las flores tubulosas comenzaron a madurar. El polen fue depositado en un sobre de papel y mantenido en heladera a temperatura constante de 4°C. El polen recolectado fue aplicado sobre cada uno de los tres capítulos de las plantas susceptibles emasculadas cuando las flores tubulosas presentaban los estigmas receptivos (Dedio y Putt, 1980).

Diez semillas de uno de tales capítulos fueron sembradas bajo condiciones de invernáculo y la condición híbrida de cada planta fue constatada mediante el uso de dos MM microsatélites polimórficos entre los genotipos parentales. Por autofecundación de uno de los individuos F_1 se obtuvieron semillas F_2 las cuales fueron sembradas y autofecundadas obteniéndose 140 familias $F_{2:3}$. Las autofecundaciones fueron conducidas aislando los capítulos con bolsas de malla de poliamida para evitar la contaminación con polen externo.

Evaluación de la resistencia a roya negra del girasol

Para conducir las evaluaciones de resistencia a RNG se sembraron diez individuos de cada línea parental, de su F_1 y del testigo susceptible, conjuntamente con 140 individuos F_2 en bandejas de plástico de 20x20x30 centímetros, usando como sustrato mezcla de tierra y perlita. Las 180 plantas obtenidas fueron inoculados en el estado de desarrollo V2 (Schneiter y Miller, 1981) con el aislamiento de RNG B.A.&S. 2009 perteneciente a la raza fisiológica 760 (Moreno *et al.* 2012). Las inoculaciones con el patógeno se realizaron mezclando esporas del mismo con talco inerte en partes iguales. Esa mezcla fue pulverizada sobre las plántulas previamente asperjadas con agua. Una vez inoculadas, las plantas fueron incubadas en cámaras bajo condiciones de oscuridad y 100% de humedad y

mantenidas de 16 a 20 horas a una temperatura constante de 20°C. Luego, las plantas continuaron su desarrollo en invernáculo a temperatura de 22°C ± 2°C con un fotoperiodo de 16 horas, utilizando lámparas de vapor de sodio para suplementar el periodo de iluminación natural.

La evaluación de los síntomas fue realizada 12-14 días después de la inoculación, usando una escala de 0-4, siendo 0, 1 y 2 plantas resistentes y 3 y 4 plantas susceptibles (Yang *et al.*, 1986).

Las familias F_{2:3} fueron evaluadas utilizando el mismo procedimiento. Para ello, se sembraron 25 semillas de cada familia y todos los individuos fueron inoculados al mismo tiempo. Cada planta fue individualmente analizada para posteriormente determinar la proporción de plantas susceptibles y resistentes en cada una de las familias. Las familias con todas las plantas con síntomas fueron consideradas susceptibles (S) mientras que aquellas familias con todas las plantas sin pústulas fueron categorizadas como resistentes (R). Las familias que presentaron plantas sanas y plantas con pústulas fueron consideradas segregantes (Seg).

La bondad de ajuste de los datos de segregación fenotípica a modelos teóricos se realizó mediante pruebas de Chi cuadrado (χ^2).

Extracción del ADN

El ADN de cada planta F₂ y de las líneas parentales fue extraído a partir de material foliar mediante el método desarrollado por Dellaporta *et al.* (1983) con modificaciones. El buffer de extracción consistió en 100 mM Tris-HCl pH8, 50 mM EDTA pH8, 500 mM cloruro de sodio, 2,5% SDS y 10 µM 2-mercaptoetanol. Una vez preparado el buffer se agregó 1 ml del mismo a cada tubo con muestra vegetal molida. Luego, se los incubó en baño termostático a 65°C durante diez minutos agitando en forma manual cada dos a tres minutos. Una vez cumplido el tiempo, se los dejó enfriar hasta alcanzar temperatura ambiente. Se agregó a cada tubo 300 µl de acetato de potasio y se colocaron en agua a 2°C aproximadamente durante 20 minutos.

Las muestras fueron centrifugadas durante 11 minutos a 11.000 RPM y se transfirió 1 ml del sobrenadante a un tubo de 2 ml que contenía 1 ml de isopropanol frío. Se mezcló hasta observar un precipitado, se centrifugó nuevamente durante seis minutos a 11.000 RPM y se descartó el sobrenadante. Se agregó etanol 80° y se centrifugó a 11.000 RPM por cinco minutos. Se eliminó el sobrenadante, los tubos se secaron invirtiéndolos sobre papel absorbente. Por último, se pusieron a secar los tubos con el ADN obtenido en flujo laminar durante 30 minutos y a cada tubo se le agregó 200 µl de buffer TE para resuspender el ADN.

La calidad y cantidad del ADN extraído fueron evaluadas mediante electroforesis en agarosa al 1,5%. El ADN se cuantificó mediante fluorometría utilizando el Qbit® dsDNA BR kit (número de catálogo Q23850, Qiagen). El ADN fue diluido a una concentración de 60 ng/μl.

Amplificación del ADN

Ciento ochenta MM microsatélites fueron utilizados para detectar polimorfismo entre los parentales. Los ensayos de PCR fueron conducidos en un volumen de reacción de 10 μl, conteniendo 1x PCR buffer, 400 μM dNTPs, 2,5 mM MgCl₂, 0,5 U Taq ADN polimerasa (Biotools, Madrid, España), 0,4 μM de cada cebador y 50 ng de ADN genómico. Las condiciones de ciclado de PCR fueron las siguientes: un primer paso de desnaturalización a 95°C por tres minutos, seguido por 38 ciclos de 94°C por 30 segundos, 50°C por 30 segundos, 72°C por 45 segundos; y un paso de extensión final a 72°C por diez minutos. El producto de PCR fue visualizado en gel de agarosa Metaphor al 4% teñido con SybrSafe (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, USA), o en gel de poliacrilamida al 6% teñido con nitrato de plata (Silver Sequence; Promega Biotech, Madison, USA).

Análisis de segregantes en *bulk*

Con los MM que resultaron polimórficos entre parentales se condujo un análisis de segregantes en grupo (*Bulk Segregant Analysis* o BSA, en inglés, Michelmore *et al.*, 1991), se realizaron dos *bulks* de ADN de diez plantas F₂ categorizadas fenotípicamente como resistentes y dos *bulks* de ADN de diez plantas F₂ categorizadas fenotípicamente como susceptibles.

Mapeo genómico

Sobre la base de los resultados obtenidos en el análisis de segregantes en *bulk*, los MM SSRs que presentaron un patrón de polimorfismo entre *bulks* y parentales congruente con sus fenotipos fueron evaluados en toda la población F₂ utilizando la misma metodología de amplificación y análisis descripta. Los datos de la lectura obtenida para cada individuo a través de todos los microsatélites conjuntamente con los datos fenotípicos, fueron registrados en una matriz la cual fue analizada mediante el programa MAPMAKER/EXP 3.0 (Lander *et al.*, 1987) con el cual se construyó un mapa de ligamiento. Para este análisis se utilizó el valor de LOD mínimo de 3,0, la función de mapeo de Kosambi (Kosambi, 1994) y una distancia máxima de 30 cM para identificar ligamiento entre marcadores. El gráfico del mapa fue realizada mediante MapChart (Voorrips, 2001).

Identificación de marcadores moleculares específicos del alelo Pu_6

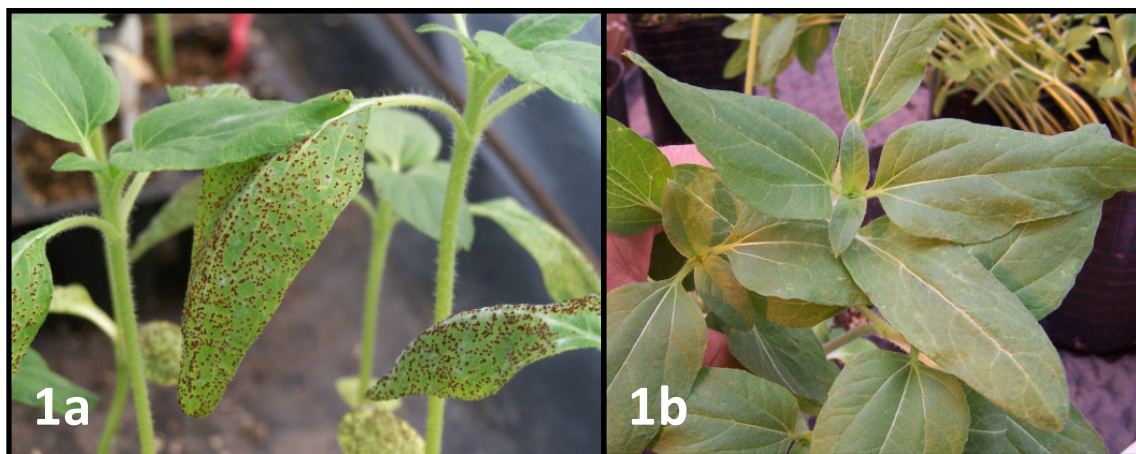
Con los MM más estrechamente ligados al *locus* Pu_6 se realizó un análisis de polimorfismo entre las siguientes fuentes de resistencia a RNG: HAR1, HAR2, HAR3, HAR4, HAR5, HAR6, HAR8 y P386; y las líneas susceptibles: HA89, RHA801 y R702 CLPlus. Los productos de amplificación fueron resueltos en geles de poliacrilamida al 6%. Aquellos MM que discriminaran al alelo Pu_6 de los restantes genes de resistencia o susceptibilidad se considerarán MM putativamente específicos del alelo Pu_6 .

RESULTADOS

Evaluación de la resistencia a roya negra del girasol

En la Fig. 1 puede observarse que las plantas de la línea P386, luego de inoculadas con el aislamiento B.A.&S. 2009, no mostraron pústulas ni halos cloróticos. Las plantas inoculadas de las líneas R702 CLPlus y HA89, en cambio, uniformemente mostraron gran cantidad de pústulas mayores a 0,4 mm (categorización 3 y 4 en la escala de Yang, 1986).

Fig. 1. – Aspecto de plántulas de girasol susceptibles (1a) y resistentes a RNG (1b).



Las plantas F_1 provenientes de la cruce R702 CLPlus x P386 tampoco mostraron ningún síntoma cuando fueron evaluadas 12-14 días post-inoculación. Esto sugiere que la resistencia a RNG en P386 es un carácter completamente dominante.

La inoculación de las plantas F_2 obtenidas por autofecundación de un sólo capítulo F_1 mostraron 111 individuos resistentes y 29 plantas susceptibles ($\chi^2 = 1,371$; g.l. = 1; $p = 0,241$). Tales resultados no difieren significativamente de los esperados para la segregación de un único gen con dominancia completa (Tabla 1).

La inoculación de las plantas F_3 permitió distinguir claramente tres tipos de familias. Treinta y dos familias no presentaron plantas con síntomas y fueron catalogadas como R. Otras 29 familias mostraron únicamente plantas susceptibles (familias S) mientras que 79 exhibieron tanto plantas R como S (familias segregantes). La proporción de familias R:Seg:S fue de 32:79:29, la cual no difirió significativamente ($\chi^2 = 2,443$; g.l. = 2; $p = 0,295$) de la proporción 1:2:1 esperada para la segregación de un único gen dominante (Tabla 1).

Tabla 1. Herencia de la resistencia a roya en la línea P386. Respuesta de las plantas de girasol [Resistente (R), Susceptible (S)] a RNG en poblaciones F₁, F₂ y familias F_{2:3} resultantes del cruzamiento entre la línea resistente P386 y R702 CLPlus, y prueba de bondad de ajuste, Chi cuadrado, del modelo de control de la resistencia de un solo locus.

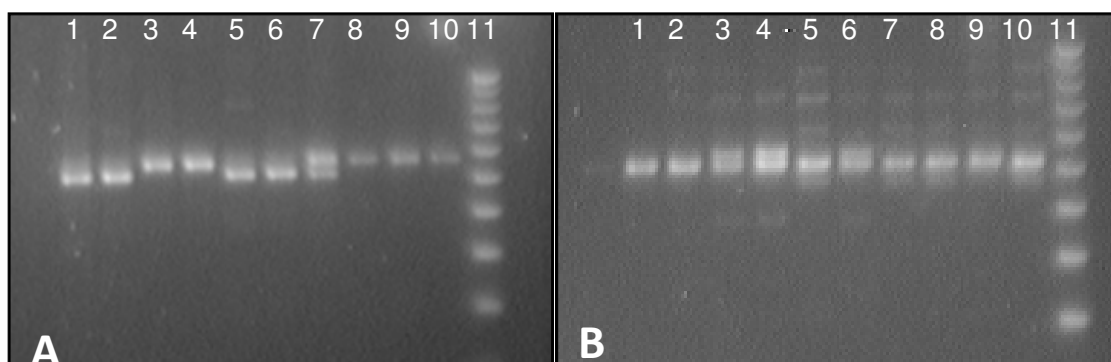
Reacción a RNG	F ₁		F ₂		Relación probada	χ^2 valor-p	F _{2:3}			Relación probada	χ^2 valor-p
	R	S	R	S			R	Seg.	S		
Número de plantas	10	0	111	29	3:1	0,241	32	79	29	1:2:1	0,295

Polimorfismo entre parentales y análisis de segregantes en *bulk*

De un total de 180 SSRs analizados para detectar polimorfismo entre los parentales P386 y R702 CLPlus sólo 50 fueron polimórficos entre ambas líneas. Con esos 50 MM polimórficos se realizó el análisis de segregantes en *bulk* que permitió identificar un MM, ORS316, cuyo patrón era perfectamente congruente con el fenotipo de los parentales y de los grupos resistentes y susceptibles. Este MM se encuentra localizado en GL13. Los restantes MM, que no mostraron las mismas diferencias entre parentales y grupos resistentes y susceptibles no se hallarían en el mismo GL que el carácter en cuestión, o bien, se localizarían alejados a una distancia tal, dentro del mismo grupo, como para que sus patrones no se asocien a las diferencias existentes entre grupos resistentes y susceptibles (Fig. 2).

Dada la localización del MM ORS316 en el GL13 se evaluó el polimorfismo de 20 SSRs adicionales pertenecientes a dicho GL. De ellos, se encontraron siete SSRs polimórficos entre P386 y R702 CLPlus: HA3330, NidGi1, NidGi3, ORS224, HA2598, ORS317 y CRT504, los cuales fueron analizados, junto con el ORS316, en los 140 individuos de la población F₂ y en ambos parentales. En el ANEXO I se provee la secuencia de los cebadores para cada uno de los MM mencionados.

Fig. 2.- Patrones de los productos de PCR obtenidos para dos de los MM utilizados en la evaluación de los segregantes en *bulk*. A) ORS316, marcador ligado al carácter, b) ORS229, marcador no ligado.



Calle 1 y 2: P386; Calle 3 y 4: R702 CLPlus; Calle 5, 6 y 7: 3 bulks R; Calle 8, 9 y 10: 3 bulks S; Calle 11: MM de Peso molecular de 25pb.

Mapeo genómico

Los datos fenotípicos obtenidos a partir de la inoculación de las familias $F_{2:3}$ permitieron establecer el genotipo para el *locus* Pu_6 de cada planta F_2 . Las plantas que por autofecundación produjeron familias uniformemente resistentes fueron de genotipo $Pu_6 Pu_6$. Las plantas que dieron origen a las familias segregantes fueron del genotipo $Pu_6 pu_6$ y las susceptibles, $pu_6 pu_6$. Tal información conjuntamente con los datos moleculares de cada individuo F_2 fueron analizados en conjunto permitiendo obtener el mapa de ligamiento que se muestra en la Fig. 3.

El mapa cubre un total de 26,8 cM entre el MM CRT504 y ORS317. Los MM más cercanos al *locus* Pu_6 son ORS316 a 2,2 cM -en el extremo distal- y ORS224 a 4,1 cM -en el extremo proximal-. El marcador HA2598, considerado como ligado en el análisis de segregantes en grupo, se ubicó a una distancia de 12,7cM del *locus* Pu_6 . En contraposición, los MM NidGi3 y HA3330 resultaron no ligados al gen de resistencia en cuestión.

Identificación de marcadores moleculares específicos del alelo Pu_6

El MM ORS316, el más cercano al *locus* Pu_6 , presentó cinco alelos al ser analizado en el grupo de líneas resistentes y susceptibles a RNG. Los materiales susceptibles HA89, RHA801, R702CLPlus y los materiales resistentes a RNG HAR1, HAR5 y HAR8 presentaron un alelo de 206 pb. Las líneas HAR3 y HAR4, presentaron un alelo de 202 pb. HAR6 y RHA340 presentaron alelos de 204 pb y 198 pb, respectivamente. Por último, P386 mostró un alelo de 200pb, el cual coincidió con el de la línea HAR2, cuyo gen de resistencia se localiza en otro GL (Fig. 4).

Fig. 3.- Mapa de ligamiento de una región del GL13 del girasol. Se observan las relaciones de ligamiento entre seis MM y el gen de resistencia Pu_6 .

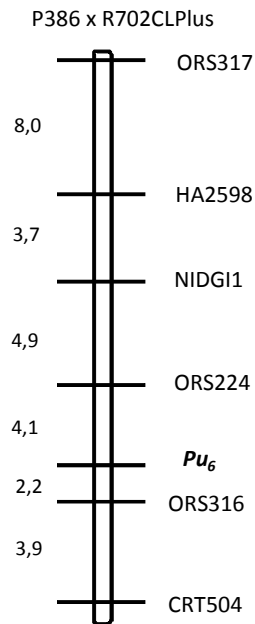
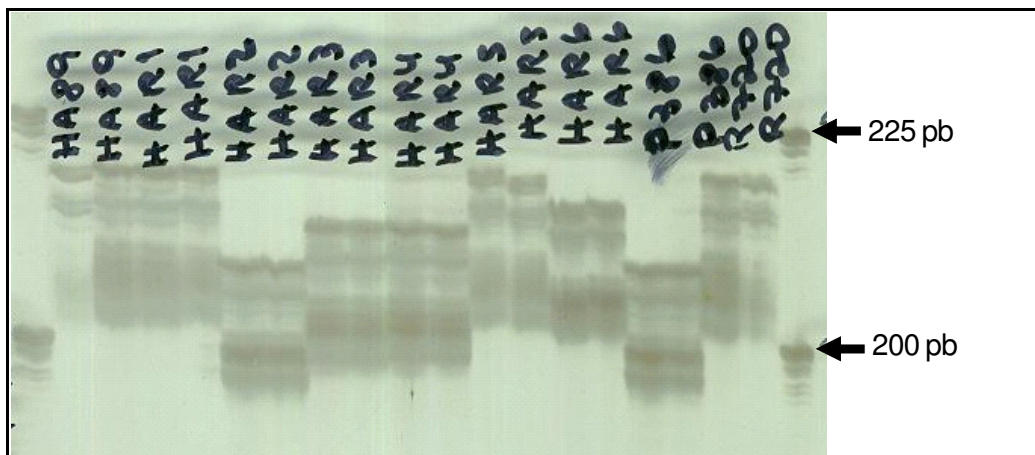


Fig. 4.- Patrones de los productos de PCR obtenidos visualizados en un gel de poliacrilamida 6% para el microsatélite ORS316 en las líneas S: HA89 y R720; y las líneas R a RNG: HAR1, HAR2, HAR3, HAR4, HAR5, HAR6 y P386.



DISCUSIÓN

La diversidad de razas fisiológicas halladas en *P. helianthi* (Moreno *et al.*, 2012; Sendall *et al.*, 2006) y la velocidad con la cual ocurren cambios en sus patrones de virulencia representa una amenaza continua para el cultivo comercial de girasol en todas las regiones del mundo donde la RNG es una enfermedad endémica. El uso de genes de resistencia fue y continúa siendo la solución utilizada para suprimir o disminuir el daño provocado por esta enfermedad. Sin embargo, para que esta estrategia sea sostenible en el tiempo es necesario incluir en las líneas e híbridos de girasol genes con distintos patrones de resistencia. El objetivo perseguido al utilizar y piramidizar los mismos es el de disminuir la frecuencia de recombinantes o mutantes del patógeno que lleven los determinantes genéticos necesarios para sortear el o los genes de resistencia del hospedante. De este modo, además, se extiende la vida útil de los genes de resistencia utilizados. De hecho, la combinación de nuevos genes de resistencia con genes hipostáticos que ya han sido sorteados por el patógeno puede otorgar resistencia a razas nuevas (Kelly y Miklas, 1998).

Hasta hace poco tiempo el desconocimiento sobre la localización genómica y la falta de información sobre los distintos genes de resistencia utilizados en diferentes cultivares imposibilitaba su utilización en una estrategia eficiente. Actualmente, nueve genes de resistencia han sido localizados en el mapa genómico del girasol (Tabla 2). R_1 , presente en la línea RHA279, se encuentra en el GL8 cercano a un *cluster* de genes de resistencia a *Plasmopara halstedii* (Lawson, 1998). R_2 , proveniente de la línea MC29, se ubica en el GL9 (Lawson *et al.*, 2011). Ambos genes, R_1 y R_2 , son hipostáticos ya que han sido sorteados por casi todas las razas de *P. helianthi* presentes en los países productores de girasol (USA, Australia, Argentina). R_5 , que confiere resistencia a la raza NA 4, se halla en el GL2 (Qi *et al.*, 2011c). R_4 , ubicado en el GL13 (Qi *et al.*, 2011b) se encuentra en las líneas argentinas HAR1, HAR3, HAR4 y HAR5, las cuales presentan diferentes patrones de resistencia/susceptibilidad al patógeno, por lo que es posible que los alelos R_4 presentes en cada una de ellas sean diferentes entre sí, como fuera postulado por Sendall *et al.*, (2006). Asimismo, otros dos genes que provienen de diferentes fuentes y ambos denominados R_{adv} fueron localizados en el GL13. Uno de ellos proviene de una línea privada denominada P2 (Yu *et al.*, 2003) y el otro de la línea pública RHA340, la cual debe su resistencia a una accesión de *H. argophyllus* (Bachlava *et al.*, 2011; Radwan *et al.*, 2008). En el mismo GL también se encuentra R_{11} , un gen de resistencia que deriva de una población silvestre de *H. annuus* (Qi *et al.*, 2012) y R_{HAR6} , el cual deriva de una línea de origen francés (Bulos *et al.*, 2013). Además, el factor de resistencia a RNG en la línea RHA397 que deriva de germoplasma sudafricano también se encuentra en el GL13 debido a que es alélico a R_{HAR6} (Gong *et al.*, 2012). En esta línea de investigación, Gong *et al.* (2012) mapearon en la línea

endocriada RHA464 el gen de resistencia R_{12} ubicado en el GL11 (Tabla 2). Como puede apreciarse en la Tabla 2, el GL13 se halla particularmente cubierto de genes de resistencia a RNG, muchos de los cuales podrían ser alelos del mismo *locus*. En la Fig. 5 se grafican las localizaciones de los genes de resistencia en el GL13 teniendo en cuenta los MM flanqueantes a cada uno de ellos.

Tabla 2. Localización genómica, origen y referencias de genes de resistencia a roya negra del girasol.

Gen de Resistencia	Fuente de mapeo	GL	Fuente Original	Referencias
R_1	RHA279	8	ANNspANN	Lawson <i>et al.</i> , 1998.
R_{adv}	P2	13	ARG	Lawson <i>et al.</i> , 1998.
R_{adv}	RHA340	13	ARG	Bachlava <i>et al.</i> , 2011.
R_2	MC29	9	ANNspANN	Lawson <i>et al.</i> , 2011.
R_4	HA-R3	13	ANN/PET/ARG	Qi <i>et al.</i> , 2011b.
R_5	HA-R2	2	ARG	Qi <i>et al.</i> , 2011c.
R_{11}	Rf ANN-1742	13	ANNspANN	Qi <i>et al.</i> , 2012.
R_{12}	RHA 464	11	ANNspANN	Gong <i>et al.</i> , 2012.
R_{HAR6}	HAR6	13	CTV	Bulos <i>et al.</i> , 2013.

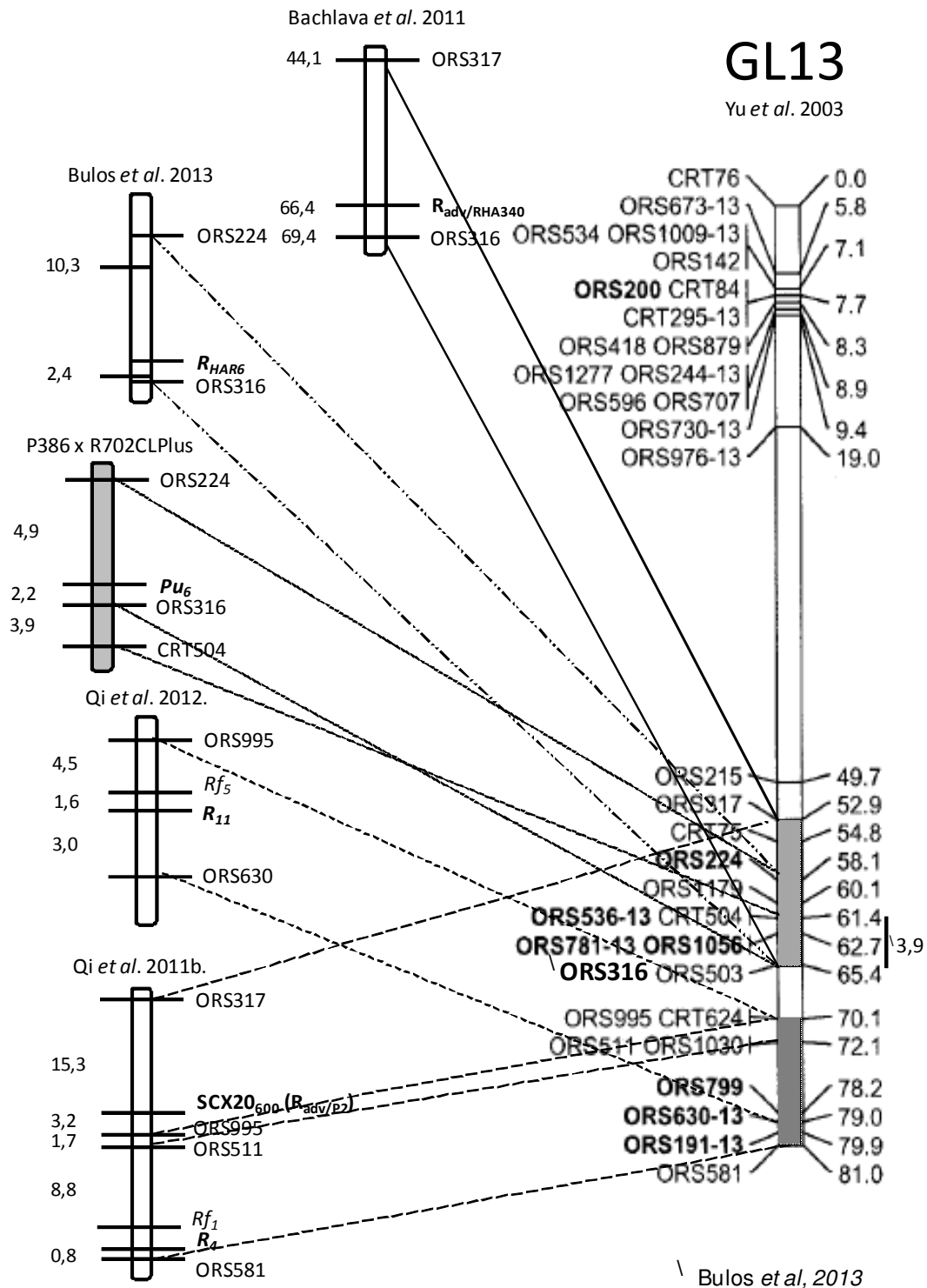
ANNspANN: *Helianthus annuus sp. annuus*. ARG: *Helianthus argophyllus*. PET: *Helianthus petiolaris*. CTV: girasol cultivado

Es aparente que desde el punto de vista del mejoramiento genético de girasol la combinación de diferentes fuentes de resistencia a una gran cantidad de razas y gobernadas por genes con segregación independiente sería el camino más eficiente para lograr sostenibilidad en el control genético de la RNG. Por ejemplo R_5 y R_4 serían candidatos óptimos para apilar en un híbrido comercial debido a que se hallan en diferentes GL y resisten a una gran cantidad de razas de RNG. El apilamiento entre Pu_6 y R_4 también puede ser considerado una estrategia óptima ya que la resistencia conferida por P386 no ha sido sorteada hasta el momento (Moreno *et al.*, 2012) y en la literatura se ha informado que ambos genes segregan independientemente (Yang *et al.*, 1989).

No obstante, los resultados obtenidos en este trabajo indican que Pu_6 también se encuentra en el GL13 del mapa genético de girasol y, por lo tanto, no segregaría independientemente de varios otros genes de resistencia, incluyendo a R_4 . La discordancia existente entre los resultados informados por Yang *et al.* (1989) y los de este trabajo se debe a que en las pruebas de alelismo realizadas por estos autores no se consideró la posibilidad de que los genes estuvieran ligados. Así, al analizar la F_2 producida luego de

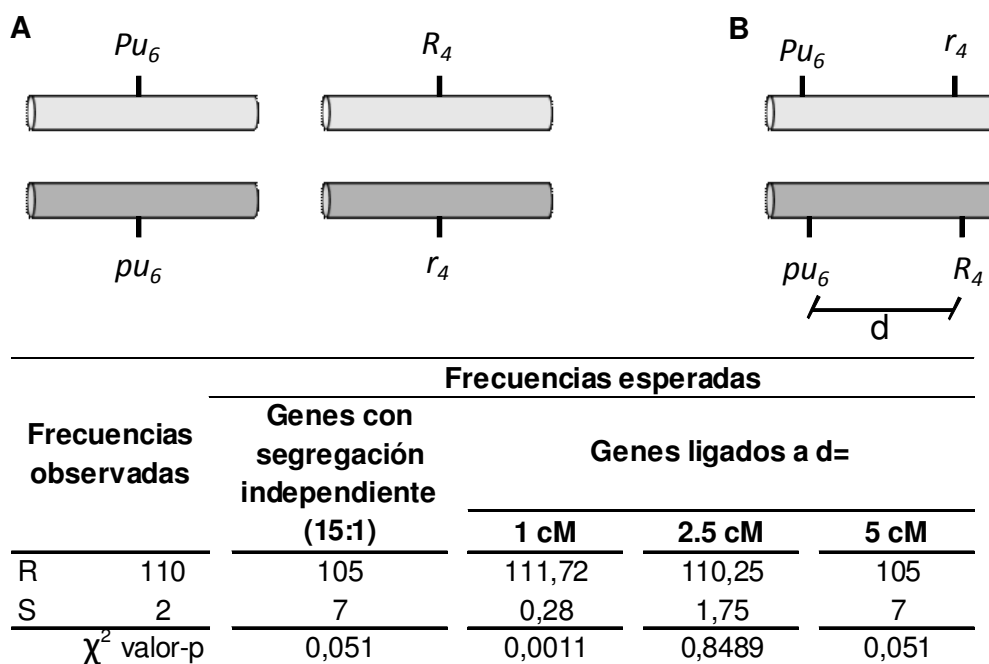
cruzar la línea P386 (Pu_6Pu_6/r_4r_4) con la fuente HAR3 (pu_6pu_6/R_4R_4) Yang *et al.*, (Tabla 6, 1989) obtuvieron una segregación de 110 plantas resistentes y dos individuos susceptibles

Fig. 5.- Localización genómica de los genes de resistencia a RNG $R_{adv/RHA340}$, R_{HAR6} , R_{11} , R_4 y Pu_6 y los genes de restauración polínica Rf_1 y Rf_5 en el GL13, basado en el mapa genómico de Yu *et al.*, 2003.



cuando los mismos fueron inoculados con la raza NA 4. Tales datos fueron considerados como el resultado de la segregación de dos genes independientes ya que la misma no difería de la relación teórica 15R:1S. No obstante, dos alelos dominantes para la resistencia pertenecientes a dos genes diferentes pero ligados entre sí a 2,5 cM hubiesen dado la misma segregación (Fig. 6).

Fig. 6.- Proporciones observadas y esperadas de individuos R y S en una población F_2 bajo condiciones de segregación independiente (A) o de ligamiento (B) de los genes de resistencia involucrados.



Los resultados obtenidos, sumados al análisis ulterior realizado sobre los datos proporcionados por Yang *et al.* (1989), indican que los genes de resistencia Pu_6 y R_4 no solo pertenecen al mismo GL sino que se hallarían ligados en repulsión a una distancia aproximada de 2,5 cM. En la Fig. 5, donde se sintetiza la información disponible en la literatura y en este trabajo respecto a la localización de varios genes de resistencia a RNG en el GL13, puede observarse que los genes de resistencia a RNG no se encuentran uniformemente distribuidos a lo largo del GL13 del mapa de girasol. De hecho, los mismos se hallan agrupados en el extremo distal de ese GL, conjuntamente con varios factores de restauración de la fertilidad polínica (Rf). En esta región del GL13 los genes de resistencia a RNG aparecen distribuidos en dos grupos. Uno de ellos incluye a R_{adv} (proveniente de RH340), R_{adv} (proveniente de P2), R_{HAR6} y Pu_6 . Este grupo se hallaría entre los MM ORS317 y ORS316. El segundo grupo involucra a los genes de resistencia a RNG R_{11} y R_4 conjuntamente con los factores de restauración Rf_1 y Rf_5 . Este segundo grupo se halla localizado entre los MM ORS995 y ORS581. Es de destacar que Pu_6 y R_4 pertenecen a

diferentes grupos de genes de resistencia lo cual respalda la conclusión previa de que si bien ambos se encuentran ligados existe la posibilidad de recombinación entre ellos.

Por lo expuesto, se deduce que el apilamiento de Pu_6 con R_4 en una misma línea endocriada es factible si se dispone de MM específicos de cada alelo de resistencia y se evalúa un número adecuado de progenies segregantes. Ese mismo objetivo –lograr un híbrido que lleve ambos genes de resistencia- sería más factible de lograr incorporando cada uno de los genes a diferentes líneas parentales.

Es de destacar que los genes de restauración de la fertilidad polínica Rf_1 , Rf_3 y Rf_5 se encuentran también en el GL13, en la misma región del genoma que lleva los genes de resistencia a RNG (Fig. 5). Esta información es de crucial importancia para decidir la incorporación de distintas fuentes de resistencia a RNG al germoplasma mantenedor o restaurador de girasol. De hecho, si se incorpora en el germoplasma mantenedor un gen de resistencia a RNG que se encuentra ligado en acoplamiento a un factor Rf no se podrán obtener las versiones androestériles de las líneas mantenedoras que exhiban resistencia a RNG, lo que tornaría inútil todo el proceso. Por lo anterior, el desarrollo de MM específicos de alelo para los genes de restauración y los factores de resistencia a RNG permitirá seleccionar materiales segregantes con resistencia a RNG y factores de restauración para incorporarlos dentro del germoplasma mantenedor. Los resultados obtenidos indican que la utilización del polimorfismo del MM ORS316 (localizado a 2,2 cM del *locus* Pu_6) es efectiva para discriminar el alelo de resistencia Pu_6 de las otras fuentes de resistencia localizadas en el mismo GL (R_4 de HAR3, HAR4 y HAR5 y R_{adv} de RHA340), como así también de varios materiales susceptibles. La utilidad de este resultado reside en la posibilidad de realizar selección asistida por MM en poblaciones segregantes para factores de resistencia no discriminables entre sí por métodos de inoculación.

Pu_6 , en conclusión, pertenece a un *cluster* de genes de resistencia a RNG y de muchos análogos de genes de resistencia (Radwan *et al.*, 2008) ubicados en el GL13. La dilucidación de la organización genómica de tales factores en esta región tendrá un impacto crucial en el mejoramiento molecular, no solo para el desarrollo de MM específicos de cada variante génica o alélica sino también para el diseño de segmentos completamente nuevos que combinen genes de resistencia a RNG de diferentes fuentes a través de la recombinación y la selección. Por otro lado, esta información permitirá eliminar el arrastre por ligamiento proveniente de la línea P386 durante la introgresión de Pu_6 en el germoplasma elite de girasol.

CONCLUSIONES

De acuerdo a la hipótesis y objetivos generales expuestos, se llegó a las siguientes conclusiones:

- El *locus* de resistencia a RNG denominado Pu_6 se encuentra en el extremo distal del GL 13 del mapa genético del girasol, flanqueado por los marcadores ORS316 a 2,2 cM –en el extremo distal- y ORS224 a 4,1 cM -en el extremo proximal-.
- La banda de 200 pb amplificada por el microsatélite ORS316 es un MM específico del alelo Pu_6 en cuanto a que permite su identificación con respecto a materiales susceptibles y a materiales con genes de resistencia a RNG ubicados en el mismo grupo de ligamiento.

BIBLIOGRAFÍA

- Agrios, G. N. 1997. Diseases caused by basidiomycetes. *In: Plant pathology*, 4th Ed. Academic Press, San Diego, CA. Pp. 368-381.
- Alexopoulos, C. J., Mims, C. W. 1979. Los hongos superiores. *In: Introducción a la micología*. Editorial Universitaria. Pp. 463-485.
- Antonelli, E.F. 1985. Variabilidad de la población patógena de *Puccinia helianthi* Schw. en la Argentina. *In: Proc. 11th Int. Sunflower Conf.* Mar del Plata, Argentina, 10-13 de Marzo. Pp. 591-596.
- ASAGIR (Asociación Argentina de Girasol). 2008. El Girasol, Importancia económica. Consultado el 10 de Octubre de 2012, (www.asagir.org.ar/asagir2008/importancia-economica.asp).
- Bachlava E., Radwan, O. E., Abratti, G., Gao, W., Tang, S., Heesacker, A. F., Bazzalo, M. E., Zambelli, A., Leon, A. J., Knapp, S. J. 2011. Downy mildew (Pl_8 and Pl_{14}) and rust (R_{Adv}) resistance genes reside in close proximity to tandemly duplicated clusters of non-TIR-like NBS-LRR-encoding genes on sunflower chromosomes 1 and 13. *Theor. Appl. Genet.* 122 (6):1211-1221.
- Berglund, D.R. 2007. Sunflower Production. Extension Publication A-1331. North Dakota Agricultural Experimentation Station and North Dakota State University Extension Service. Fargo, North Dakota. Pp. 3-5.
- Bulos, M., Ramos, M.L., Altieri, E., Sala, C.A. 2013. Molecular mapping of a rust resistance gene from HAR6 in sunflower. *Breeding Science* (en prensa).
- Dedio, W., Putt, E.D. 1980. Sunflower. *In: Fehr W.R and Hadley H.H. Hybridization of crop plants.* Crop Science Society of America. Madison, Wisconsin, USA. 1080. Pp. 631-643.
- Dellaporta, S. L., Wood, J., Hicks, J. B. 1983. A plant DNA Miniprep. Version II. *Plant Molecular Biology.* 1(4):19-21.
- Fick, G.N., Zimmer, D.E. 1975. Influence of rust on performance of near-isogenic sunflower hybrids. *Plant Dis. Rep.* 59(9):737-739.
- Gong, L., Hulke, B.S., Gulya, T.J., Markell, S.G., Qi, L.L. 2012. Molecular tagging of a novel rust resistance gene R_{12} in sunflower (*Helianthus annuus L.*). *Theor. Appl. Genet.* 126 (1):93-99.
- Gulya, T.J., Masirevic, S. 1996. Inoculation and evaluation methods for sunflower rust. *In: Proc 18th Sunflower Res Workshop*, Fargo, ND, 11-12 January 1996. National Sunflower Association, Bismarck. Pp. 31-38.
- Gulya, T.J. 1997. Sunflower rust. *In: Schneiter, AA (ed). Sunflower Technology & Production.* ASA, CSSA, SSSA, Madison USA. Pp. 276-282.

- Ivancovich, A.J., Bruniard, J.M., Ludueña, P., Oliva, C. 1985. Estimación de pérdidas por royas en girasol. *In: Proc 11th Int Sunflower Conf.* Mar del Plata, Argentina, 10-13 de Marzo. Pp. 397-401.
- Juncos, E.S., Bertero de Romano, A. 1985. Evaluación de la incidencia de la roya negra (*Puccinia helianthi* Schw.) en los rendimientos de girasol. *Proc.11th Int Sunflower Conf.* Mar del Plata, Argentina, 10-13 de Marzo. Pp. 403-405.
- Kelly, J.D. and Miklas, P.N. 1998. The role of RAPD markers in breeding for disease resistance in common bean. *Mol. Breed.* 4(1):1-11.
- Kosambi, D.D. 1994. The estimation of map distances from recombination values. *Annals of Eugen.* 12(1):172-175.
- Lambrides, C.J., Miller, J.F. 1994. Inheritance of rust resistance in a source of MC29 sunflower germplasm. *Crop Sci.* 34(5):1225-1230.
- Lander, E. S., Green, P., Abrahamson, J., Barlow, A., Daly, M. J. 1987. MAPMAKER: an interactive computer package for constructing primary genetic linkage maps of experimental and natural populations. *Genomics* 1(2):174-181.
- Lawson, W.R., Goulter, K.C., Henry, R.J., Kong, G.A., Kochman, J.K. 1998. Marker-assisted selection for two resistance genes in sunflower. *Mol Breed.* 4:227-234.
- Lawson, W.R., Jan, C.C., Shatte, T., Smith, L. 2010. DNA markers linked to the *R₂* rust resistance gene in sunflower (*Helianthus annuus* L.) facilitate anticipatory breeding for this disease variant. *Mol. Breed.* 28:569-576.
- Michelmore, R.W., Paran, I., Kesseli, R.V. 1991. Identification of markers linked to disease-resistance genes by bulked segregant analysis: A rapid method to detect markers in specific genomic regions by using segregating populations. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 88:9828-9832.
- Miller, J.F., Rodriguez, R.H., Gulya, T.J. 1988. Evaluation of genetic materials for inheritance to Race 4 rust in sunflower. *In: Proc 12th Int. Sunflower Conf.* Novi Sad, Yugoslavia, July 25-29. Vol. 2: Pp. 361-365.
- Miller, J.F., Gulya, T.J. 2001. Registration of three rust resistant sunflower germplasm populations. *Crop Sci.* 41:601.
- Moreno, P.S., Bertero de Romano, A., Romano, M.C., Vergani, P., Sposaro, M., Bulos, M., Altieri, E., Ramos, M.L., Sala, C.A. 2012. A survey of physiological races of *Puccinia helianthi* in Argentina. *In: Proc. 18th Int. Sunflower Conf.*, Mar del Plata, Argentina, February 2012. Pp. 278-283.
- National Sunflower Association. 2012. Sunflower Statistics, World Supply & Disappearance. Consultado el 10 de Octubre de 2012 (<http://www.sunflowerlsa.com/stats/world-supply/>).

- Putt, E.D., Sackston, W.E. 1963. Studies on sunflower rust. IV. Two genes, R_1 and R_2 for resistance in the host. *Can. J. Plant Sci.* 43:490-496.
- Qi, L.L., Gulya, T.J., Seiler, G.J., Hulke, B.S., Vick, B.A. 2011a. Identification of resistance to new virulent races of rust in sunflowers and validation of DNA markers in the gene pool. *Phytopathol.* 101:241–249.
- Qi, L.L., Hulke, B.B., Vick, B.A., Gulya, T.J. 2011b. Molecular mapping of the rust resistance gene R_4 to a large NBS-LRR cluster on linkage group 13 of sunflower. *Theor. Appl. Genet.* 123(2):351-358.
- Qi, L.L., Gulya, T.J., Hulke, B.S., Vick, B.A. 2011c. Chromosome location, DNA markers and rust resistance of the sunflower gene R_5 . *Mol Breed.* 30(2):745-756.
- Qi, L.L., Seiler, G.J., Vick, B.A., Gulya T.J. 2012. Genetics and mapping of the R_{11} gene conferring resistance to recently emerged rust races, tightly linked to male fertility restoration, in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *Theor. Appl. Genet.* 125(5):921-932.
- Quresh, Z., Jan, C.C. 1992. Linkage and allelic relationships of recently identified resistance genes to prevailing sunflower rust race. *In: Proc. Sunflower Research Workshop, National Sunflower Association, Bismarck, ND, USA.* Pp. 55-56.
- Radwan, O., Gandhi, S., Heesacker, A., Whitaker, B., Taylor, C., Plocik, A., Kesseli, R., Kozik, A., Michelmore, R.W. and Knapp, S.J. 2008. Genetic diversity and genomic distribution of homologs encoding NBS-LRR disease resistance proteins in sunflower. *Mol. Genet. Genomics* 280:111-125.
- Sackston, W.E. 1962. Studies on sunflower rust. III. Occurrence, distribution, and significance of races of *Puccinia helianthi* Schw. *Can. J. Plant Sci.* 40:1449-1458.
- Sackston, W.E. 1981. The sunflower crop and diseases: progress, problems, and prospects. *Plant Dis.* 65:643-648.
- Sala, C., Bulos, M., Fresco, A., Altieri, E. 2009. Marcadores moleculares y mejoramiento genético de cultivos. *In: Levitus, G. Echenique, V. Rubintein, C. Hopp, E. Mroginski, L. (eds). Biotecnología y Mejoramiento II. INTA.* Pp. 325-327.
- Sendall, B.C., Kong, G.A., Goulter, K.C., Aitken, E.A.B., Thompson, S.M., Mitchell, J.H.M., Kochman, J.K., Lawson, W., Shatte, T., Gulya T. J. 2006. Diversity in the sunflower-*Puccinia helianthi* pathosystem in Australia. *Australasian Plant Pathology* 35:657-670.
- Schneider, A.A., Miller, J.F. 1981. Description of sunflower growth stages. *Crop Sci.* 21:901-903.
- Senetiner, A.C., Antonelli, E.F. Ludueña, P.M. 1985. Análisis genético de la resistencia a *Puccinia helianthi* Schw. de cuatro líneas de girasol. *In: Proc 11th Int. Sunflower Conf. Mar del Plata, Argentina, March 10-13. Vol.1: 597-602.*

- Siddiqui, M.Q., Brown, J.F. 1977. Effects of simulated rust epidemics on the growth and yield of sunflower. *Aust. J. Agricult. Res.* 28(3):389-393.
- USDA-ARS, National Genetic Resources Program. Germplasm Resources Information Network - (GRIN). [Online Database] National Germplasm Resources Laboratory, Beltsville, Maryland. Disponible en: <http://www.ars-grin.gov/cgi-bin/npgs/acc/obs.pl?1026742> (27 de enero de 2013).
- Voorrips, R. E. 2001. Mapchart Version 2.0: Windows software for the graphical presentation of the linkage maps and QTL. Plant Research International, Wageningen, The Netherlands, 1-15.
- Yang, S.M. 1986. A new race of *Puccinia helianthi* in sunflower. *Ann. Phytopath. Soc. Japan* 52:248-252.
- Yang, S.M., Antonelli, E.F., Luciano, A., Luciani, N.D. 1986. Reactions of Argentine and Australian sunflower rust differentials to four north American cultures of *Puccinia helianthi* from North Dakota. *Plant Dis.*70:833-886.
- Yang, S.M., Dowler, W.M., Luciano, A. 1989. Gene *Pu6*: New gene in sunflower for resistance to *Puccinia helianthi*. *Phytopathology* 79(4):474-477.
- Yu, J. K., Tang, S., Slabaugh, M. B., Heesacker, A., Cole, G., Herring, M., Soper, J., Han, F., Chu, W., Webb, D.M., Thompson, L., Edwards, K.J., Berry, S., Leon, A.J., Grondona, M., Olungu, C., Maes, N., & Knapp, S. J. 2003. Towards a saturated molecular genetic linkage map for cultivated sunflower. *Crop Sci.* 43(1):367-387.
- Zimmer, D.E., Zimmerman, D.C. 1972. Influence of some diseases on achene and oil quality of sunflower. *Crop Sci.* 12:859–861.

ANEXOS

Anexo I: Secuencia de los cebadores, motivos repetidos y temperatura de *annealing* de los marcadores SSRs utilizados en el mapeo genómico de *Pu*₆.

Nombre del MM	Motivo repetido y longitud del mismo	Secuencias del cebador		Temperatura de annealing
		forward	reverse	
CRT504	AG	TTGCCCAAATCGTTGCTAAGTG	GTTTCTTCCGTAGGACACATCACATTACTCACA	64
HA2598	(CT) (CA)	ATGTCTCCAAGGAATATGC	CAAAACAGGTGTTGCCTGAATC	62
HA3330		AAAGGCAAACTTTTGTACG	GGTGTGATTACAAGCTCTCC	
NidGi1	AT	CTTGACAAAGGCCCAAA	TTTTTCATGATGTTGATCTCCAA	60
NidGi3		GAGGAGGGTAGCCCTCAAAG	GACTTCGTGTAGCCGGTCTC	
ORS224	(ga)8 N2 (ga)13	AACCAAAGCGCTGAAGAAATC	TGGACTAACTACCAGAAGCTAC	54
ORS316	(AC)11	TGGCGTCTTCATAGCATCAG	GAGATTTGAGCTTCGTGTTGC	58
ORS317	(AC)11(AT)8(AG)6	TTTGGCAGTTTGGTGGCTTA	GGTCGTATGCTTAATTCTTCTCT	58