



## ALLELES ASSOCIATED TO DISEASE SEVERITY INDEX OF MAL DE RÍO CUARTO DISEASE IN MAIZE EXOTIC GERMPLASM



## ALELOS ASOCIADOS AL ÍNDICE DE SEVERIDAD DE LA ENFERMEDAD MAL DE RÍO CUARTO EN GERMOPLASMA EXÓTICO DE MAÍZ

Rossi E.A.<sup>1,2</sup>, Ruiz M.<sup>1,2</sup>, Bonamico N.C.<sup>1,2</sup>, Balzarini M.G.<sup>3,4</sup>

### ABSTRACT

Mal de Río Cuarto (MRC) is one of the most important viral diseases of maize in Argentina. The disease severity index (DSI) allows to combine the incidence and severity of a disease in a single metric. The genotypic reaction to MRC has been extensively studied in biparental populations. However, this complex trait has not been analyzed by genome-wide association studies (GWAS). The aim of this work is to identify new resistance alleles associated with DSI of MRC in an exotic germplasm from the International Maize and Wheat Improvement Center (CIMMYT). A population of maize lines from CIMMYT was phenotypically evaluated in environments in the area where the disease is endemic. The predictors of genetic effects (BLUP, best linear unbiased predictor) and 78,376 SNP markers (Single Nucleotide Polymorphism) were used to perform the GWAS in 186 maize lines. The values of variance components and mean-basis heritability suggest a wide genotypic variability in the population. The GWAS allowed to identify 11 putative QTL of resistance to MRC. The incorporation of exotic germplasm into local maize breeding programs could contribute favorably to the creation of hybrids with a higher level of resistance to MRC. The predictive ability of associated markers with MRC resistance indicates that marker-assisted selection is an advisable tool for selecting MRC resistant genotypes.

**Key words:** Disease severity index; genome-wide association study; QTL; SNP.

### RESUMEN

El Mal de Río Cuarto (MRC) es una de las enfermedades virales más importantes del maíz en Argentina. El índice de severidad de enfermedad (ISE) permite combinar la incidencia y la severidad de una enfermedad en una métrica única. La reacción genotípica a MRC ha sido muy estudiada en poblaciones biparentales, sin embargo este carácter complejo no se ha analizado mediante estudios de mapeo por asociación. El objetivo del presente trabajo es identificar nuevos alelos de resistencia asociados con el ISE de la enfermedad MRC de maíz en un germoplasma exótico del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). Una población de líneas de maíz del CIMMYT se evaluó fenotípicamente en ambientes donde la enfermedad es endémica. Los predictores del efecto genotípico (BLUP, *best linear unbiased predictor*) del ISE de MRC y 78.376 marcadores SNP (*Single Nucleotide Polymorphism*) se usaron para realizar el mapeo por asociación en 186 líneas de maíz. Los componentes de varianza y los valores de heredabilidad sugieren una amplia variabilidad genotípica en la población de líneas. El mapeo por asociación permitió identificar 11 posibles QTL de resistencia a MRC. La incorporación de germoplasma exótico en los programas de mejoramiento de maíz locales podría contribuir favorablemente a la creación de genotipos híbridos con mayor nivel de resistencia a MRC. La capacidad predictiva de los marcadores asociados con la resistencia a MRC indican que la selección asistida por marcadores es una herramienta recomendable para seleccionar genotipos resistentes a MRC.

**Palabras clave:** índice de severidad de enfermedad; mapeo por asociación; QTL; SNP.

<sup>1</sup> INIAB-Instituto de Investigaciones Agrobiotecnológicas (CONICET-UNRC).

<sup>2</sup> Facultad de Agronomía y Veterinaria, Universidad Nacional de Río Cuarto.

<sup>3</sup> CONICET-Consejo Nacional de Investigaciones Científicas y Técnicas.

<sup>4</sup> Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Córdoba.

Corresponding author:  
Ezequiel Rossi  
erossi@ayv.unrc.edu.ar

0000-0003-2043-6760

### Cite this article as:

Rossi E.A., Ruiz M., Bonamico N.C., Balzarini M.G. 2020. ALLELES ASSOCIATED TO DISEASE SEVERITY INDEX OF MAL DE RÍO CUARTO DISEASE IN MAIZE EXOTIC GERMPLASM. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXI (2): 45-53.

Received: 05/12/2020

Revised version received: 09/15/2020

Accepted: 10/14/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2020.31.02.05

ISSN online version: 1852-6233

## INTRODUCCIÓN

El maíz (*Zea mays* L.) es hospedante natural de más de 50 virus (Lapierre y Signoret, 2004), y una de las enfermedades virales más importantes en Argentina es el Mal de Río Cuarto (MRC) (Gimenez Pecci *et al.*, 2012). El agente causal de la enfermedad MRC es el *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) perteneciente a la familia Reoviridae, género *Fijivirus* (Distéfano *et al.*, 2002). Este virus es naturalmente transmitido en forma persistente, cíclica y propagativa por medio de insectos, siendo la chicharrita *Delphacodes kuscheli* Fennah el principal vector de la enfermedad (Remes Lenicov *et al.*, 1985). La forma de transmisión indica que el vector es reservorio natural del virus y la población de macrópteros migrantes constituye el principal inóculo de la enfermedad (Ornaghi *et al.*, 1993).

El principal síntoma de la enfermedad MRC es la presencia de enaciones o protuberancias sobre las nervaduras en el envés de las hojas. Las plantas pueden presentar otros síntomas como resultado de las modificaciones en los niveles hormonales endógenos, tales como tallos achatados, entrenudos cortos, hojas del tercio superior recortadas o reducidas a la vaina foliar, panojas atrofiadas de tamaño reducido y espigas múltiples con pocos o sin granos (Giménez Pecci *et al.*, 2012). Las siembras tempranas y el uso de agroquímicos son estrategias de manejo agronómico para reducir la enfermedad MRC mediante el control del insecto vector, pero la siembra de genotipos resistentes es el proceder recomendado (Di Renzo *et al.*, 2004).

La reacción a la enfermedad MRC se comporta como un carácter cuantitativo (Di Renzo *et al.*, 2002). Estudios moleculares de la reacción genotípica a MRC, han permitido identificar alelos de resistencia en poblaciones biparentales (Di Renzo *et al.*, 2004; Bonamico *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2015). Sin embargo, en este tipo de mapeo pueden perderse alelos que no segregan entre los parentales de la población y alelos asociados a loci de efecto menor (Warburton *et al.*, 2015). La creciente disponibilidad de datos genómicos polimórficos y el potencial para explorar múltiples eventos de recombinación ocurridos en la historia evolutiva de un germoplasma específico, han convertido a los estudios de mapeo por asociación (GWAS, del inglés *genome wide association studies*) en una importante alternativa para estudiar caracteres de variación cuantitativa en plantas (Hao *et al.*, 2015).

La respuesta de los genotipos a enfermedades virales es comúnmente estimada mediante los caracteres incidencia y severidad (Rossi *et al.*, 2019b). Sin embargo, en MRC existen diversos síntomas que se manifiestan en distintos grados de severidad y con distinta incidencia en las poblaciones evaluadas. Para contemplar esta característica de la enfermedad se han realizado estudios donde los caracteres incidencia y severidad se

han sintetizado o resumido en un índice, como es el caso del índice de severidad de enfermedad (ISE) (Shi *et al.*, 2012; Bonamico *et al.*, 2013; Chen *et al.*, 2015). Este índice constituye una media de la severidad de la reacción al MRC, ponderada por la incidencia de los distintos grados de severidad observada en un conjunto de plantas de cada genotipo. Si bien se han realizado análisis de QTL en poblaciones biparentales para el ISE de MRC en la zona de Argentina donde la enfermedad es endémica (Bonamico *et al.*, 2012; Di Renzo *et al.*, 2004), no se ha analizado este carácter en el contexto de GWAS, principalmente por la falta del fenotipado en poblaciones de gran tamaño extensamente genotipadas.

El Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) es una importante fuente de germoplasma para la incorporación de alelos exóticos en los programas de mejoramiento de todo el mundo. Las líneas de maíz de CIMMYT han sido extensivamente genotipadas mediante marcadores SNPs (Wu *et al.*, 2016) y son adecuadas para realizar estudios de mapeo por asociación en distintas partes del mundo donde puedan ser evaluadas fenotípicamente; algunas de estas líneas ya han mostrado buena adaptación en la zona de Argentina donde la enfermedad es endémica (Rossi *et al.*, 2019a). El objetivo del presente trabajo fue identificar nuevos alelos de resistencia asociados al ISE de la enfermedad MRC de maíz en un germoplasma exótico de CIMMYT.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal y ensayo de campo*

Una población de 210 líneas endocriadas de maíz proveniente del CIMMYT se evaluó fenotípicamente para la reacción a la enfermedad viral Mal de Río Cuarto en la zona donde la enfermedad es endémica. La población fue caracterizada por su adaptación a la región sur de Córdoba y su diversidad genotípica por Rossi *et al.* (2019a). Los ensayos de campo se realizaron en las localidades de Río Cuarto (64° 20' W, 33° 8' S) y Sampacho (64° 44' W, 33° 20' S), Córdoba, Argentina, bajo condiciones de transmisión natural. Los ensayos se establecieron en los ciclos agrícolas 2018-2019 y 2019-2020 en Río Cuarto y en el ciclo agrícola 2018-2019 en Sampacho. Cada combinación año-localidad se consideró un ambiente de análisis: Río Cuarto 2018-2019 (RC-18-19), Río Cuarto 2019-2020 (RC-19-20) y Sampacho 2018-2019 (SA-18-19). Cada genotipo se sembró en parcelas de un surco de 2,5 m de largo. En cada ambiente se utilizó un diseño parcialmente repetido (Cullis *et al.*, 2006) donde un 25% de los genotipos se repitió tres veces y el 75% de los genotipos restantes se sembró en una sola parcela, sin repeticiones. El 25% de los genotipos repetidos fue diferente en cada ambiente de acuerdo a la disponibilidad de semillas. Las plantas

de cada parcela se evaluaron individualmente según el grado de severidad propuesto por Ornaghi *et al.* (1993): 0=planta sin síntomas; 1=presencia de enaciones; 2=presencia de enaciones + acortamiento de entrenudos + láminas foliares atrofiadas en el tercio superior; 3=máximo desarrollo de la enfermedad con enaciones + acortamiento de entrenudos + láminas foliares atrofiadas en el tercio superior + espigas pequeñas, múltiples y sin granos. Para cada parcela se estimó el índice de severidad de enfermedad (ISE) según Di Renzo *et al.* (2002), el cual involucra los caracteres incidencia y severidad de MRC. Este índice puede tomar valores de 0 a 100, donde 0 corresponde a genotipos sin síntomas y 100 a genotipos severamente afectados.

$$ISE = \frac{\sum(\text{grado } i \times \text{plantas en el grado } i)}{\text{total de plantas} \times 3} \times 100$$

### Datos genotípicos

La caracterización molecular de la colección de líneas de maíz de CIMMYT fue realizada por Wu *et al.* (2016). Un total de 362.008 marcadores SNP, obtenidos mediante genotipado por secuenciación, está disponible públicamente en el repositorio de datos de CIMMYT (<http://data.cimmyt.org/dvn>). A partir del total de marcadores, se seleccionaron 78.376 SNP con una tasa de datos faltantes menor al 35% y una mínima frecuencia alélica superior a 0,05.

### Análisis estadístico

Los datos fenotípicos multi-ambientales se analizaron con la función “mmer” del paquete “sommer” (Covarrubias Pazarán, 2016) en el software R (R Core Team 2016). Para obtener la mejor predicción lineal insesgada (BLUP) (West *et al.*, 2007) de los efectos de genotipos a través de ambientes, se ajustó un modelo lineal mixto (MLM) multi-ambiental. El modelo lineal mixto ajustado incluyó efectos de ambientes fijos, efectos de genotipos aleatorios y efectos de interacción genotipo-ambiente (GE) aleatorios:

$$y = X\beta + Z u + \varepsilon$$

donde  $y$  es el vector de las observaciones fenotípicas,  $X$  y  $Z$  son las matrices de diseño. El vector  $\beta$  representa los efectos ambientales considerados como fijos,  $u$  representa los efectos aleatorios de genotipo y de la interacción GE y  $\varepsilon$  representa el error aleatorio. Los efectos genéticos aleatorios se asumieron normalmente distribuidos  $N(0, \sigma_g^2)$ , con la matriz de varianza-covarianza ( $G$ ) con estructura diagonal. Los efectos de la interacción GE se asumieron normalmente distribuidos con media cero y matriz de varianza-covarianza no estructurada. Los errores se asumieron normalmente

distribuidos *i.i.d.*  $N(0, \sigma_e^2)$  e independientes del resto de efectos aleatorios. Ajustado el modelo se obtuvo el mejor predictor lineal insesgado (BLUP) del efecto de genotipo. El valor del BLUP para cada genotipo mide el efecto genético de la línea, descontando el efecto ambiental y la potencial interacción GE, y este valor fue usado como variable respuesta en el estudio de mapeo por asociación con el perfil molecular.

La heredabilidad del ISE, se estimó a partir de los componentes de varianza obtenidos del MLM ajustado de acuerdo a Holland *et al.* (2010).

En ambientes individuales:

$$H^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + (\sigma_e^2/p)}$$

A través de ambientes:

$$H^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + (\sigma_{ge}^2/e) + (\sigma_e^2/p)}$$

donde  $\sigma_g^2$  es el componente de varianza genotípica,  $\sigma_{ge}^2$  es el componente de varianza de la interacción GE,  $\sigma_e^2$  es la varianza residual,  $e$  es el número de ambientes, y  $p$  es la media ponderada del número de repeticiones de cada genotipo a través de ambientes.

### Mapeo por asociación

El software TASSEL 5.2.60 (Bradbury *et al.*, 2007) se usó para realizar la asociación entre los 78.376 SNPs y los BLUPs del ISE a través de ambientes para la población de líneas de maíz con información fenotípica y genotípica ( $n=186$ ). Se compararon distintos modelos estadísticos de asociación (GWAS) para establecer el de mejor ajuste a los datos del estudio: 1) modelo lineal general propuesto por Pritchard *et al.* (2000), con la estructura poblacional determinada por la matriz  $Q$  con tres grupos (Wu *et al.*, 2016), como covariable de efecto fijo (modelo  $Q$ ); 2) modelo lineal general propuesto por Price *et al.* (2006), con la estructura poblacional determinada mediante análisis de componentes principales, como covariable de efecto fijo (modelo PCA); 3) modelo lineal mixto propuesto por Pariseaux y Bernardo (2004), con la matriz de parentesco relativo entre individuos (*Kinship*) como efecto aleatorio (modelo  $K$ ); 4) modelo lineal mixto con la matriz *kinship* como efecto aleatorio y la matriz  $Q$  como covariable de efecto fijo (modelo  $Q+K$ ) (Yu *et al.*, 2006); 5) modelo lineal mixto con la matriz *kinship* como efecto aleatorio y las componentes principales como covariable de efecto fijo (modelo PCA+K) (Zhao *et al.*, 2007). La comparación entre modelos se realizó mediante el gráfico de distribución empírica ( $Q-Q$  plot) que permite evaluar la desviación de los valores de probabilidad ( $-\log_{10}$  de valores  $-P$ ) observados respecto

a los esperados bajo la hipótesis de asociación nula entre el marcador y la variable respuesta, *i.e.* el valor BLUP de la línea para el carácter ISE. Se utilizó el procedimiento propuesto por Li y Ji (2005) para corregir los valores-*P* y evitar el incremento de la tasa de falsos positivos debido a la multiplicidad de pruebas de hipótesis que se realizan al evaluar la asociación marcador por marcador. La significancia estadística, para declarar asociación significativa entre un marcador y el ISE, se definió en el valor umbral de  $-\log_{10}(\text{valor-}P) > 4$  (valor  $P < 0.0001$ ). El gráfico de distribución empírica (*Q-Q plot*) y el gráfico *Manhattan plot*, donde se muestran los resultados de las pruebas de asociación marcador por marcador, se realizaron con el paquete “qqman” (Turner, 2018) del software R (R Core Team 2016) usando el modelo de asociación seleccionado.

Para predecir el efecto genotípico del ISE de MRC se ajustaron dos modelos de predicción genómica usando los méritos genéticos de las líneas como variable respuesta (*i.e.* BLUP de los efectos de genotipo del ISE). En el primer modelo, se consideraron como predictores todos los marcadores SNP utilizados en el mapeo por asociación. En el segundo modelo, solo se consideraron los marcadores SNP que resultaron estadísticamente asociados en el GWAS. El modelo de predicción genómica utilizado en ambos casos fue el modelo Bayes C propuesto por Habbier *et al.* (2011). La implementación de este modelo se realizó mediante el paquete BGLR (Pérez Rodríguez y de los Campos, 2014) del software R (R Core Team 2016). La eficiencia de la predicción se evaluó mediante validación cruzada. En cada repetición de la validación, los datos se dividieron aleatoriamente en un conjunto de entrenamiento (70% de las observaciones) y el conjunto complementario se usó para validar las predicciones del mérito genético, realizada a partir de uno u otro conjunto de marcadores (30% de las observaciones). La validación se repitió 50 veces con asignaciones aleatorias independientes de las líneas a los conjuntos de datos de entrenamiento y validación. La eficiencia de la predicción, con uno u otro conjunto de marcadores, se cuantificó utilizando la correlación entre los méritos genéticos de cada línea y los méritos predichos por el modelo de predicción genómica. La correlación se calculó en las 50 repeticiones aleatorias del proceso.

## RESULTADOS

El ISE de MRC de las líneas de maíz, al considerar los BLUPs a través de ambientes, sugiere una amplia variabilidad genotípica en el grupo de líneas evaluadas (Figura 1). La Tabla 1 muestra los valores medios del ISE en los tres ambientes de evaluación y a través de ambientes. Los tres ambientes de evaluación presentaron un adecuado nivel de transmisión natural del virus.

El ensayo realizado en la localidad de Sampacho en el ciclo agrícola 2018–2019 (SA-18–19) fue el que presentó el mayor valor medio para el ISE. Los componentes de varianza genotípica fueron altamente significativos en los tres ambientes individuales y a través de ambientes. El componente de varianza de la interacción genotipo × ambiente también fue significativo pero pequeño respecto de la varianza genotípica a través de ambientes (Tabla 1). La heredabilidad osciló entre 0,46 y 0,60 en ambientes individuales y fue de 0,70 a través de ambientes.

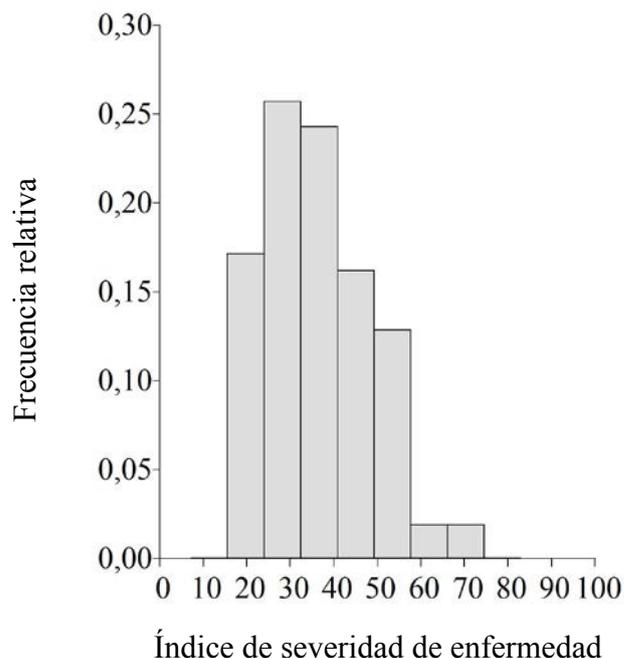


Figura 1. Frecuencia de distribución relativa para el índice de severidad de enfermedad (ISE) de Mal de Río Cuarto a través de ambientes.

Los gráficos de distribución empírica (*Q-Q plot*) permitieron comparar entre los distintos modelos de mapeo por asociación utilizados. El modelo Q+K presentó una distribución sesgada hacia los valores significativos. Los modelos K, PCA y PCA+K mostraron algunos puntos por debajo de la diagonal, indicando una posible sobre-parametrización (datos no mostrados). El modelo Q, que considera una estructura genética de la población de tres grupos, fue el que mejor ajustó para realizar la asociación entre los SNP y los BLUP del ISE (Figura 2).

Un total de 14 SNP resultaron estadísticamente asociados con el ISE a través de ambientes con un valor umbral de  $-\log_{10}(\text{valor } P) > 4,00$  (valor  $P < 0,0001$ ) (Figura 2, Tabla 2). Según la posición física de los SNP, estos se agruparon en 11 posibles QTL de resistencia a MRC ubicados en los cromosomas 1, 2, 4, 6, 7, 8 y 9. El porcentaje de variación fenotípica explicada en forma

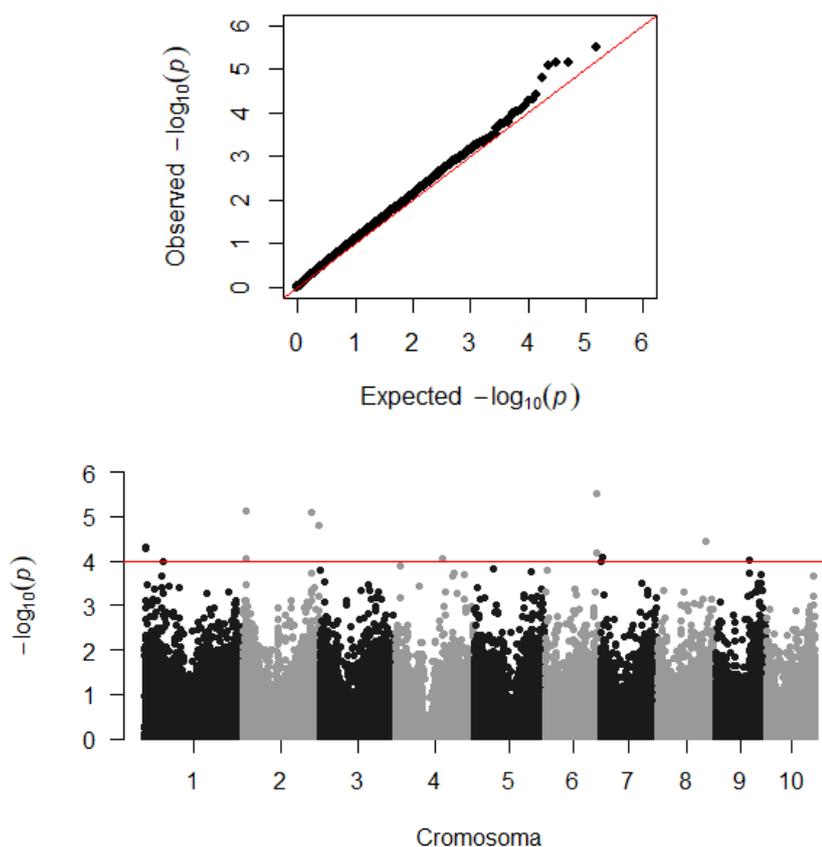
**Tabla 1.** Medias, mínimo, máximo, componentes de varianza y heredabilidad ( $H^2$ ) del índice de severidad de enfermedad (ISE) de Mal de Río Cuarto (MRC) estimados a partir de 210 líneas de maíz en ambientes individuales y a través de ambientes de la zona donde la enfermedad es endémica.

Ambiente	Índice de severidad de enfermedad (ISE)					
	Media	Mínimo	Máximo	$\sigma_g^2$	$\sigma_{ge}^2$	$H^2$
RC-18-19	34,8	0,0	100,0	429,6***	-	0,54
RC-19-20	28,8	0,0	100,0	256,7***	-	0,46
SA-18-19	58,3	0,0	100,0	736,8***	-	0,60
BLUPs	36,0	10,0	80,0	397,2***	73,24*	0,70

RC-18-19: Río Cuarto 2018-2019; RC-19-20: Río Cuarto 2019-2020; SA-18-19: Sampacho 2018-2019.

$\sigma_g^2$  componente de varianza genotípica;

$\sigma_{ge}^2$  componente de varianza de la interacción genotipo×ambiente. \*\*\* <0,0001; \* <0,05. Rango de ISE: 0-100%.



**Figura 2.** Distribución empírica (Q-Q plot) (arriba) y pruebas de asociación marcador por marcador (Manhattan plot) (abajo), de los resultados del mapeo por asociación para el índice de severidad de la enfermedad (ISE) de Mal de Río Cuarto a través de ambientes.

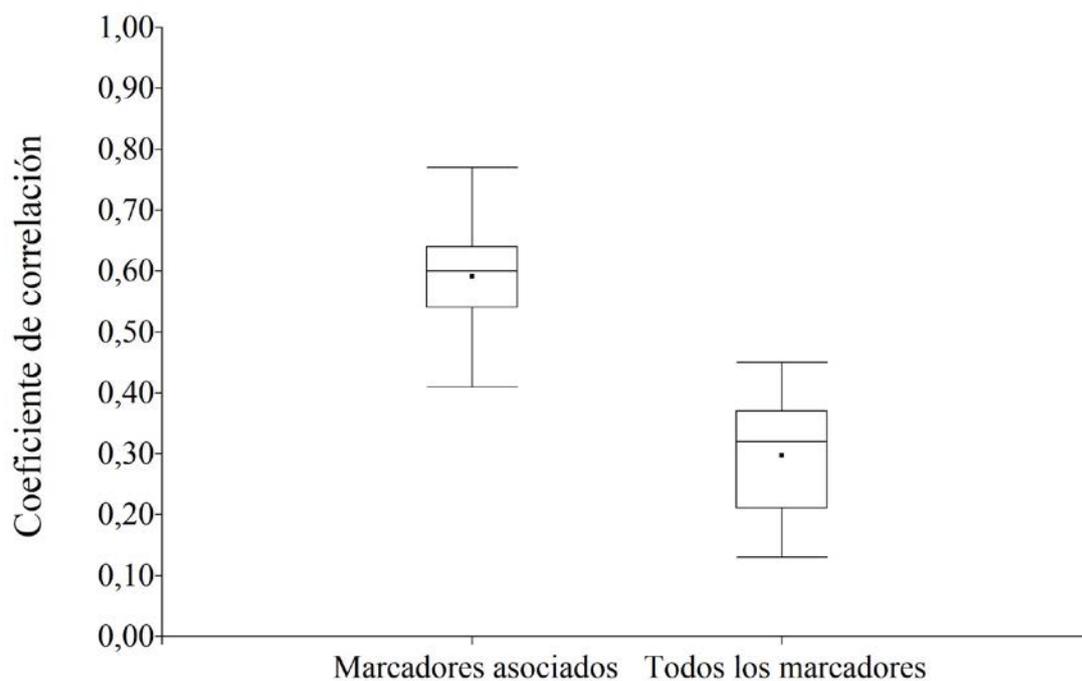
individual por cada QTL osciló entre 10 y 16% (Tabla 1). Los efectos del QTL 2 (bin 1.04) y del QTL 6 (bin 2.09) resultaron estadísticamente no significativos. Los QTL 9, 4 y 11, ubicados en los bin 7.01, 2.02 y 9.04 respectivamente, fueron los que presentaron mayor efecto genético aditivo (Tabla 2).

La eficiencia de la predicción fue en promedio de  $r=0,30$  para el modelo donde se incluyeron todos los SNPs y aumentó a  $r=0,60$  cuando sólo se incluyeron en el modelo el conjunto reducido de SNPs conformado con aquellos marcadores estadísticamente asociados al ISE de MRC según los resultados del GWAS (Figura 3).

**Tabla 2.** Detalles de los marcadores SNP asociados con el índice de severidad de enfermedad (ISE) de Mal de Río Cuarto.

QTL	Marcador	Cromosoma	Bin	Alelos	Efecto aditivo	Valor P	R <sup>2</sup>
1	S1_2467319	1	1,01	A/T	-2,28 *	4,75x10 <sup>-5</sup>	0,12
	S1_2467320			T/C			
2	S1_56399197	1	1,04	T/C	-0,61 ns	9,90x10 <sup>-5</sup>	0,13
3	S2_9278082	2	2,02	G/A	-2,17 **	8,80x10 <sup>-5</sup>	0,12
4	S2_12441417	2	2,02	T/A	-4,07 ***	7,22x10 <sup>-6</sup>	0,15
	S2_12441430			A/C			
5	S2_211077915	2	2,08	C/T	-2,78 **	8,29x10 <sup>-6</sup>	0,12
6	S2_234192035	2	2,09	C/G	0,44 ns	1,57x10 <sup>-5</sup>	0,16
7	S4_143512347	4	4,05	T/G	-2,02 *	8,92x10 <sup>-5</sup>	0,10
8	S6_158274989	6	6,06	G/C	1,76 *	6,53x10 <sup>-5</sup>	0,11
	S6_158275013			G/A			
9	S7_7160192	7	7,01	A/T	-6,02 ***	7,93x10 <sup>-5</sup>	0,15
10	S8_146017787	8	8,05	G/T	-2,21 **	3,70x10 <sup>-5</sup>	0,12
11	S9_102698811	9	9,04	C/T	-3,87 *	9,56x10 <sup>-5</sup>	0,13

R<sup>2</sup>: variación fenotípica explicada por cada marcador. La posición física exacta de cada SNP se puede inferir a partir del nombre del marcador, por ejemplo, S9\_102698811: cromosoma 9; 102.698.811 pb. El alelo subrayado indica el alelo de resistencia para cada marcador.



**Figura 3.** Distribución de la correlación entre los valores observados de los BLUP del índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto y los valores predichos por el modelo de predicción construido a partir de los marcadores SNPs identificados como significativamente asociados en el mapeo y a partir de todo el conjunto de SNPs disponibles.

## DISCUSIÓN

La evaluación fenotípica precisa y confiable es uno de los principales requisitos para realizar estudios de mapeo por asociación (GWAS) (Yu *et al.*, 2008). En maíz, la enfermedad viral MRC es transmitida solamente por insectos, siendo el principal vector la chicharrita *Delphacodes kuscheli*, por lo que la evaluación fenotípica se debe realizar bajo condiciones de transmisión natural de la enfermedad. La variación de los valores extremos del ISE de MRC es común entre ambientes de evaluación. En el presente estudio, todos los ambientes registraron valores extremos del ISE y por lo tanto permitieron diferenciar a los genotipos. De todos modos, para evitar posibles efectos ambientales, se decidió utilizar los BLUP a través de ambientes como variable indicadora de la *performance* de cada línea durante el análisis de asociación con el perfil molecular.

Los componentes de varianza genotípica y los valores de heredabilidad estimados en el presente estudio indican una amplia variabilidad genotípica en la población de líneas de maíz proveniente del CIMMYT. Los valores de heredabilidad del ISE, estimados en ambientes individuales y a través de ambientes, son superiores a los reportados por Di Renzo *et al.* (2002), quienes evaluaron una población de familias  $F_{2,3}$  en tres ambientes de la zona donde la enfermedad MRC es endémica.

En estudios de mapeo por asociación, la elección del modelo a utilizar es un paso importante para considerar los efectos que pueden tener la estructura poblacional presente y las relaciones de parentesco entre los genotipos en las asociaciones (Gutiérrez *et al.*, 2011). En nuestro trabajo, el modelo que mejor ajustó fue el que considera la estructura poblacional determinada por la matriz Q como covariable de efecto fijo. En este caso la matriz Q incluida se compone de tres grupos de acuerdo a la adaptación ambiental de las líneas de maíz. Esta estructura de la población fue propuesta por Wu *et al.* (2016), quienes caracterizaron molecularmente la colección completa de 538 líneas de maíz de CIMMYT que incluye a la población evaluada en el presente estudio.

La integración de datos fenotípicos y genotípicos podría aumentar potencialmente la eficiencia del mejoramiento de caracteres complejos (Guo *et al.*, 2020) como la resistencia a MRC. Si bien las bases genéticas de la enfermedad MRC han sido ampliamente estudiadas en poblaciones biparentales (Di Renzo *et al.*, 2004; Bonamico *et al.*, 2012), la evaluación de poblaciones diversas de germoplasma exótico ha sido muy poco explorada. En el presente estudio, el mapeo por asociación permitió identificar 11 posibles QTL para resistencia a MRC. Al comparar los QTL identificados para el ISE con los identificados en estudios previos, tanto para el ISE como para los caracteres incidencia y severidad, se observan coincidencias en las posiciones físicas y en la proporción

de la variación fenotípica explicada. Por ejemplo, en el bin 4.05, donde nosotros identificamos un SNP asociado al ISE, Bonamico *et al.* (2013) identificaron un marcador microsatélite (SSR) para el ISE de MRC, al evaluar una población de líneas endocriadas recombinantes (RILs). En el bin 1.01, Bonamico *et al.* (2012) identificaron un marcador SSR asociado con incidencia y con severidad de MRC. En el mismo bin, en nuestro trabajo identificamos un SNP asociado al ISE de la enfermedad. Redinbaugh *et al.* (2018) combinaron resultados de estudios donde se identificaban QTL para resistencia a enfermedades virales en maíz e identificaron nueve regiones del genoma donde se agrupaban loci de resistencia (*clusters*). Uno de esos *clusters* se ubica en el bin 2.08 y reporta QTL de resistencia para tres enfermedades virales. En el mismo bin y en una posición física (pares de bases) muy próxima, identificamos un marcador asociado con el ISE de MRC. Los QTL identificados en este estudio, en los bin 7.01 y 9.04 podrían considerarse como nuevos alelos de resistencia aportados por el germoplasma exótico de CIMMYT debido a que en estudios previos no han sido reportados QTL para MRC en esas posiciones.

La relación entre incidencia y severidad de enfermedades vegetales es epidemiológicamente importante (Seem, 1984). Esta relación puede ser estudiada según la correlación genética entre ambos caracteres como se realizó en el trabajo de Rossi *et al.* (2020). Otra manera de estudiar la relación es a través de la estimación del ISE, el cual combina la incidencia y la severidad de una enfermedad en un único índice. Esto explica que los posibles QTL 1, 4, 8 y 9, identificados en este estudio, fueron también identificados por Rossi *et al.* (2020) al evaluar la reacción a MRC mediante los caracteres incidencia y severidad individualmente. Según Dintinger *et al.* (2005) los QTL asociados a incidencia y severidad podrían involucrar mecanismos de resistencia que reducen la evolución de síntomas severos en la planta, y mecanismos de resistencia que reducen la probabilidad que una planta manifieste síntomas.

La validación cruzada del modelo de predicción genómica demostró la capacidad predictiva de los marcadores asociados al ISE de MRC, identificados en el GWAS. La menor capacidad predictiva del modelo que incluye todos los marcadores podría estar relacionada a correlaciones entre los marcadores y de éstos con el efecto ambiente, los cuales podrían enmascarar el efecto de otros marcadores. Si bien se requieren numerosos estudios para avalar el desempeño de la predicción genómica para la resistencia a MRC en maíz, los resultados indican que la selección asistida por marcadores basada en los SNPs que se encontraron asociados al ISE de MRC podría ser una herramienta muy útil para la selección. El uso del genotipado mediante PCR específica de alelos (KASP, *Kompetitive Allele Specific PCR*), técnica de laboratorio que permite genotipar

alelos específicos de unos pocos marcadores, combinado con selección asistida por marcadores, representa una alternativa más económica y rápida que la selección genómica.

Los resultados sugieren que el germoplasma exótico de CIMMYT tiene amplia variabilidad genética para la resistencia a la enfermedad MRC. La evaluación de un germoplasma exótico para la reacción a una enfermedad endémica local contribuye a validar regiones genómicas identificadas en estudios previos e identificar nuevos alelos de resistencia. En la industria semillera argentina, la importación de paquetes tecnológicos “cerrados” es difícil porque se requiere de adaptación a las condiciones agroecológicas de cada región del país. Por lo tanto, la incorporación de germoplasma exótico adaptado a las condiciones agroecológicas locales, podría favorecer la creación de genotipos híbridos con mayor nivel de resistencia a MRC en los programas de mejoramiento de maíz. La eficiencia predictiva de los marcadores asociados con la resistencia a MRC indican que la selección asistida por marcadores constituye una herramienta promisoría para seleccionar genotipos resistentes a MRC.

## BIBLIOGRAFÍA

- Bonamico N.C., Di Renzo M.A., Borghi M.L., Ibañez M.A., Díaz D.G., Salerno J.C., Balzarini M.G. (2013) Mapeo de QTL para una medida multivariada de la reacción al virus del Mal de Río Cuarto. *J. Basic Appl. Genet.* 24: 11-21.
- Bonamico N.C., Di Renzo M.A., Ibañez M.A., Borghi M.L., Díaz D.G., Salerno J.C., Balzarini M.G. (2012) QTL analysis of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize using recombinant inbred lines. *J. Agric. Sci.* 150: 619-629. <https://doi.org/10.1017/S0021859611000943>.
- Bradbury P.J., Zhang Z., Kroon D.E., Casstevens T.M., Ramdoss Y., Buckler E.S. (2007) TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics.* <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btm308>.
- Chen G., Wang X., Hao J., Yan J., Ding J. (2015) Genome-wide association implicates candidate genes conferring resistance to maize rough dwarf disease in maize. *PLoS ONE* 10: 1-13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142001>.
- Covarrubias Pazarán G. (2016) Genome-Assisted prediction of quantitative traits using the r package sommer. *PLoS ONE* 11: 1-15. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0156744>.
- Cullis B.R., Smith A.B., Coombes N.E. (2006) On the design of early generation variety trials with correlated data. *J. Agric. Biol. Environ. Stat.* 11: 381-393. <https://doi.org/10.1198/108571106X154443>.
- Dintinger J., Verger D., Caiveau S., Risterucci A.M., Gilles J., Chiroleu F., Hamon P. (2005) Genetic mapping of maize stripe disease resistance from the Mascarene source. *Theor. Appl. Genet.* 111: 347-359. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2027-3>.
- Di Renzo M.A., Bonamico N.C., Díaz D.G., Ibañez M.A., Faricelli M.E., Balzarini M.G., Salerno J.C. (2004) Microsatellite markers linked to QTL for resistance to Mal de Río Cuarto disease in *Zea mays* L. *J. Agric. Sci.* 142: 289-295. <https://doi.org/10.1017/S0021859604004307>.
- Di Renzo M.A., Bonamico N.C., Díaz D.G., Salerno J.C., Ibañez M.A., Gesumaria J.J. (2002) Inheritance of resistance to Mal de Río Cuarto (MRC) disease in *Zea mays* (L.) *J. Agric. Sci.* 139: 47-53. <https://doi.org/10.1017/S0021859602002241>.
- Distéfano A.J., Conci L.R., Muñoz Hidalgo M., Guzmán F.A., Hopp H.E., del Vas M. (2002) Sequence analysis of genome segments S4 and S8 of Mal de Río Cuarto virus (MRCV): evidence that the virus should be a separate *Fijivirus* species. *Arch. Virol.* 147: 1699-1709.
- Gimenez Pecci M.P. (2012) Mal de Río Cuarto del maíz. En: Gimenez Pecci M.P., Laguna I.G., Lenardón S.L. (Eds.) *Enfermedades del maíz producidas por virus y mollicutes en Argentina*, INTA, Buenos Aires, pp. 41-56.
- Guo J., Pradhan S., Shahi D., Khan J., Mcbreen J., Bai G.J., Murphy P., Babar M.A. (2020) Increased prediction accuracy using combined genomic information and physiological traits in a soft wheat panel evaluated in multi-environments. *Sci. Rep.* 10: 7023. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-63919-3>.
- Gutierrez L., Cuesta Marcos A., Castro A.J., von Zitzewitz J., Schmitt M., Hayes P.M. (2011) Association mapping of malting quality quantitative trait loci in winter barley: positive signals from small germplasm arrays. *Plant Genome* 4: 256-272.
- Habier D., Fernando R., Kizilkaya K., Garrick D. (2011) Extension of the Bayesian alphabet for genomic selection. *BMC Bioinformatics* 12: 186.
- Hao D., Cheng Y., Chen G., Lu H., Shi M., Zhang Z., Huang X., Mao Y., Xue L. (2015) Identification of significant single nucleotide polymorphisms for resistance to maize rough dwarf disease in elite maize (*Zea mays* L.) inbred lines. *Euphytica* 203: 109-20.
- Holland J.B., Nyquist W.E., Cervantes Martínez C.T. (2010) Estimating and Interpreting Heritability for Plant Breeding: An Update. *Plant Breed. Rev.* <https://doi.org/10.1002/9780470650202.ch2>.
- Lapierre H., Signoret P.A. (2004) Viruses and virus diseases of *Poaceae* (Gramineae). INRA ED, Paris.
- Li J., Ji L. (2005) Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigen values of a correlation matrix. *Heredity* 95: 221-227. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800717>.
- Ornaghi J.A., Boito G., Sanchez G., March G. Beviacqua J.E. (1993) Studies on the populations of *Delphacodes kuscheli* Fennah in different years and agricultural areas. *J. Plant Genet. Breed.* 47: 277-282.
- Parisseaux B., Bernardo R. (2004) In silico mapping of quantitative trait loci in maize. *Theor. Appl. Genet.* 109: 508-514. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1666-0>.
- Perez Rodriguez P., de los Campos G. (2014) Genome-Wide Regression and Prediction with the BGLR Statistical Package. *Genetics* 198 (2): 483-495.
- Price A.L., Patterson N.J., Plenge R.M., Weinblatt M.E., Shadick N.A., Reich D. (2006) Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 38: 904-909. <https://doi.org/10.1038/ng1847>.
- Pritchard J.K., Stephens M., Rosenberg N.A., Donnelly P. (2000) Association mapping in structured populations. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 170-181. <https://doi.org/10.1086/302959>.
- R Core Team (2016) R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria, URL (<http://www.R-project.org/>).
- Redinbaugh M.G., Lübberstedt T., Leng P., Xu M. (2018) The genetics and genomics of virus resistance in maize. In: Bennetzen J., Flint Garcia

- S., Hirsch C., Tuberosa R. (Eds.) *The Maize Genome. Compendium of Plant Genomes*. Springer, Cham.
- Remes Lenicov A.M.M., Tesón A., Dagoberto E., Huguet N. (1985) Hallazgo de uno de los vectores del Mal de Río Cuarto en maíz. *Gaceta Agronómica* 5: 251-258.
- Rossi E.A., Borghi M.L., Di Renzo M.A., Bonamico N.C. (2015) Quantitative Trait loci (QTL) Identification for Resistance to Mal de Río Cuarto Virus (MRCV) in Maize Based on Segregate Population. *Open Agric. J.* 9: 48-55.
- Rossi E.A., Ruiz M., Bonamico N.C., Balzarini M.G. (2020) Genome-wide association study of resistance to Mal de Río Cuarto disease in maize. *Agronomy J.* <https://doi.org/10.1002/agj2.20448>.
- Rossi E.A., Ruiz M., Di Renzo M., Bonamico N.C. (2019a) Genotypic diversity in 291 maize lines from CIMMYT and phenotypic characterization in southern Córdoba, Argentina. *J. Basic Appl. Genet.* 30: 25-33.
- Rossi E.A., Ruiz M., Rueda Calderón M.A., Bruno C.I., Bonamico N.C., Balzarini M.G. (2019b) Meta-analysis of QTL studies for resistance to fungi and viruses in maize. *Crop Sci.* 59: 125-139. <https://doi.org/10.2135/cropsci2018.05.0330>.
- Seem R.C. (1984) Disease Incidence and Severity Relationships. *Annu. Rev. Phytopathol.* 22: 133-150. <https://doi.org/10.1146/annurev.py.22.090184.001025>.
- Shi L., Hao Z.F., Weng J.F., Xie C.X., Liu C.L., Zhang D., Zhang S. (2012) Identification of a major quantitative trait locus for resistance to maize rough dwarf virus in a Chinese maize inbred line X178 using a linkage map based on 514 gene-derived single nucleotide polymorphisms. *Mol. Breed.* 30: 615-625. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9652-0>.
- Turner D.S. (2018) qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *J. Open Source Softw.* 3: 731. <https://doi.org/10.21105/joss.00731>.
- Warburton M., Tang J., Windham G., Hawkins L., Murray S., Xu W., Boykin D., Perkins A., Williams W. (2015) Genome-Wide Association Mapping of *Aspergillus flavus* and Aflatoxin Accumulation Resistance in Maize. *Crop Sci.* 55: 1-11.
- West B., Welch K.B., Galecki A.T. (2007) *Linear mixed models: A practical guide using statistical software*. Chapman & Hall, Boca Raton, FL.
- Wu Y., San Vicente F., Huang K., Dhlwayo T., Costich D.E., Semagn K., Babu R. (2016) Molecular characterization of CIMMYT maize inbred lines with genotyping by sequencing SNPs. *Theor. Appl. Genet.* 129: 753-765. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2664-8>.
- Yu J., Holland J.B., McMullen M.D., Buckler E.S. (2008) Genetic design and statistical power of nested association mapping in maize. *Genetics* 178: 539-551. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.074245>.
- Yu J., Pressoir G., Briggs W.H., Bi I.V., Yamasaki M., Doebley J.F., Buckler E.S. (2006) A unified mixed model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat. Genet.* 38: 203-208. <https://doi.org/10.1038/ng1702>.
- Zhao K., Aranzana M.J., Kim S., Lister C., Shindo C., Tang C., Nordborg M. (2007) An Arabidopsis example of association mapping in structured samples. *PLoS Genet.* 3: 71-82. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030004>.