



## MULTI-TRAIT MODELS FOR GENOMIC REGIONS ASSOCIATED WITH MAL DE RÍO CUARTO AND BACTERIAL DISEASE IN MAIZE



### MODELOS MULTIVARIADOS EN LA BÚSQUEDA DE REGIONES GENÓMICAS PARA RESISTENCIA A MAL DE RÍO CUARTO Y BACTERIOSIS EN MAÍZ

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

#### ABSTRACT

Maize (*Zea Mays* L.) production has been greatly benefited from the improvement of inbred lines in regard to the resistance to diseases. However, the absence of resistant genotypes to bacteriosis is remarkable. The aim of the study was to identify genomic regions for resistance to Mal de Río Cuarto (MRC) and to bacterial disease (BD) in a diverse maize germplasm evaluated in the Argentinian region where MRC virus is endemic. A maize diverse population was assessed for both diseases during the 2019-2020 crop season. Incidence and severity of MRC and BD were estimated for each line and a genome wide association study (GWAS) was conducted with 78,376 SNP markers. A multi-trait mixed linear model was used for simultaneous evaluation of resistance to MRC and BD in the scored lines. The germplasm showed high genetic variability for both MRC and BD resistance. No significant genetic correlation was observed between the response to both diseases. Promising genomic regions for resistance to MRC and BD were identified and will be confirmed in further trials.

**Key words:** maize disease; genome wide association study; SNP; multi-trait model.

#### RESUMEN

La producción de maíz (*Zea Mays* L.) ha sido ampliamente beneficiada con la mejora de líneas endocriadas respecto a la resistencia a enfermedades causadas por virus y hongos. Sin embargo, es notable la ausencia de genotipos resistentes a bacteriosis. El objetivo del presente estudio fue identificar regiones genómicas para la mejora de resistencia a Mal de Río Cuarto (MRC) y a bacteriosis (BD) en un germoplasma diverso de maíz. Se evaluó, para ambas enfermedades, una población diversa de líneas de maíz en el ciclo de cultivo 2019-2020 en la región argentina donde la virosis MRC es endémica. Se estimó incidencia y severidad de MRC y BD en cada línea y se realizó un estudio de mapeo por asociación (GWAS) con 78.376 marcadores SNPs. Un modelo multicarácter se utilizó para evaluar simultáneamente la resistencia a MRC y BD en las líneas evaluadas. El germoplasma evidenció alta variabilidad genética tanto para la mejora de la resistencia a MRC como a BD, pero no se observó correlación genética significativa entre la respuesta a ambas enfermedades. Se identificaron regiones genómicas promisorias para resistencia a MRC y a BD, que serán confirmadas en evaluaciones en nuevos ambientes.

**Palabras clave:** enfermedad en maíz; mapeo por asociación; SNP; modelo multivariado.

<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:  
Marcos Ruiz  
mruiz@ayv.unrc.edu.ar

ORCID 0000-0001-5624-0183

#### Cite this article as:

Ruiz M., Rossi E.A., Bonamico N.C., Balzarini M.G. 2021. MULTI-TRAIT MODELS FOR GENOMIC REGIONS ASSOCIATED WITH MAL DE RÍO CUARTO AND BACTERIAL DISEASE IN MAIZE. BAG. Journal of Basic and Applied Genetics XXXII (1): 7-15.

Received: 06/25/2020

Revised version received: 10/30/2020

Accepted: 11/10/2020

General Editor: Elsa Camadro

DOI: 10.35407/bag.2020.32.01.01

ISSN online version: 1852-6233

## INTRODUCCIÓN

El maíz es un importante cultivo a nivel mundial con una producción aproximada de 1.148 millones de toneladas. Argentina es el cuarto productor con un total de 43,5 millones de toneladas cosechadas en el ciclo agrícola 2018/19. Entre otros factores, su producción es afectada por la presencia de enfermedades que pueden amenazar el cultivo y consecuentemente la seguridad alimentaria y la sustentabilidad agrícola (Nelson *et al.*, 2018). Las enfermedades más comunes en maíz son causadas por virus y hongos (Agrios, 2005) aunque entre las patologías emergentes, se encuentran las producidas por bacterias. Las enfermedades producidas por bacterias patógenas en maíz han incrementado su prevalencia en Argentina (Plazas, 2018), debido posiblemente a la masiva adopción de la siembra directa. Es notable la ausencia de genotipos resistentes a este tipo de enfermedades (Gurr y Rushton, 2005). La base genética de la respuesta a la infección por bacterias o bacteriosis (BD) ha sido significativamente menos investigada que aquélla relacionada con enfermedades fúngicas y virales en maíz (Rossi *et al.*, 2019).

Entre las enfermedades virales, el Mal de Río Cuarto (MRC) juega un rol prevalente para el cultivo de maíz en Argentina ya que ha causado severas pérdidas de rendimiento con diferentes valores de incidencia y severidad a través de los años (Giménez Pecci *et al.*, 2012). El agente causal es el *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV), el cual se clasifica como un miembro del género *Fijivirus*, familia *Reoviridae* (King *et al.*, 2012) y se transmite de manera persistente propagativa por insectos vectores, principalmente por la chicharrita *Delphacodes kuscheli* Fennah (Ornaghi *et al.*, 1993).

La resistencia genética es el método más eficiente y efectivo para el control de MRC y por ello se han realizado numerosas evaluaciones de material genético en la zona donde la enfermedad es endémica (Di Renzo *et al.*, 2004; Bonamico *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2015). Numerosos QTL (*Quantitative trait loci*) para resistencia a MRC se han identificado a través del fenotipado de poblaciones biparentales generadas localmente. El mapeo por asociación (GWAS, *genome wide association study*) también es usado para la identificación de variantes alélicas específicas que incrementan la resistencia a enfermedades (Zila *et al.*, 2014). Para GWAS, es esencial contar con poblaciones compuestas por individuos genotípica y fenotípicamente diversos, que presenten una alta densidad de polimorfismos en la secuencia de ADN (Yan *et al.*, 2011).

Germoplasmas diversos de especies alógamas como el maíz demandan alta densidad de marcadores. Esto se debe a que el desequilibrio de ligamiento puede disminuir entre dos sitios polimórficos a una distancia corta (unos pocos miles pares de bases) a causa de la alta frecuencia de recombinación (Remington *et al.*,

2001). Las líneas de maíz del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), desarrolladas durante los últimos 25 años, se han convertido en la principal fuente pública de germoplasma diverso de maíz (Chen *et al.*, 2016). La genotipificación densa de este germoplasma de alta diversidad genómica aporta información para la implementación de GWAS para identificar *loci* de resistencia a enfermedades presentes en la región maicera de Argentina.

Si bien es común que los mejoradores evalúen múltiples caracteres en sus esquemas de selección (Malosetti *et al.*, 2008) en programas de mejoramiento genético, la evaluación de resistencia a MRC no se ha realizado simultáneamente con BD. El enfoque multicarácter incrementa el poder de detección de aquellos QTL que afectan a más de un carácter simultáneamente (Knott y Haley, 2000). El ajuste de un modelo que permita caracterizar genotipos considerando más de un carácter y sus potenciales correlaciones (Covarrubias Pazaran, 2016) representa una forma novedosa de abordar la resistencia a enfermedades. El objetivo del presente estudio fue identificar regiones genómicas de maíz promisorias para la mejora de la resistencia a la enfermedad MRC y a BD en un germoplasma diverso de maíz.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### *Material vegetal y ensayo de campo*

Se sembró una población diversa de 185 líneas de maíz del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) para determinar su resistencia a Mal de Río Cuarto (MRC) y a bacteriosis (BD) durante el ciclo de cultivo 2019-2020 en Río Cuarto, Córdoba, Argentina (64° 20' W, 33° 8' S). Se utilizó un diseño parcialmente repetido (p-rep) (Cullis *et al.*, 2006). El diseño implicó el uso de tres repeticiones en 50 líneas (de modo que  $p = 27\%$ ) y parcelas individuales en las 135 líneas restantes. Cada línea se sembró en una parcela que consistió de un surco de 2,5 m de longitud y 0,52 m de ancho. Se sembró a doble densidad y se ralearon plantas, tres semanas posteriores a la emergencia para obtener 10 plantas por parcela. La infección de ambas enfermedades ocurrió de manera natural. Líneas experimentales susceptibles se evaluaron conjuntamente en el ensayo para verificar la ocurrencia de MRC.

Ambas enfermedades se evaluaron mediante la observación de síntomas en la etapa de floración (95-100 días post siembra). La incidencia de MRC y BD se estimó como la proporción de plantas que presentaron síntomas sobre el total de plantas de cada parcela (INC-MRC y INC-BD, respectivamente). La severidad en ambas enfermedades (SEV-MRC y SEV-BD) se evaluó utilizando las escalas propuestas por Ornaghi *et al.* (1999) y Schuelter *et al.* (2003) para MRC y BD, respectivamente.

Para SEV-MRC, cada planta se clasificó por el grado de severidad: 0= 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 SEV-BD, las plantas de cada parcela se evaluaron visualmente por la lesión foliar, siendo 1= sin lesiones; 2= lesiones dispersas; 3= hasta el 50% de las hojas con lesiones, con lesiones graves en el 25% de las hojas inferiores; 4= hasta el 75% de las hojas con lesiones, con lesiones graves en el 50% de las hojas inferiores; 5= 100% de las hojas con lesiones, con lesiones graves en el 75% de las hojas inferiores; 6= planta muerta. Para el análisis estadístico se usó la severidad promedio por parcela.

### Datos genómicos

La caracterización genotípica realizada por Wu *et al.* (2016) con marcadores moleculares del tipo SNP utilizada en este trabajo se encuentra disponible en <http://data.cimmyt.org/dvn>. De un total de 362.008 SNPs se seleccionaron 78.376 marcadores distribuidos en los 10 cromosomas de maíz. La selección de marcadores se basó en la calidad, y en un primer paso, se eliminaron marcadores con una frecuencia alélica menor a 0,05 o con errores de secuenciación. Posteriormente, se eliminaron los marcadores con una tasa de datos faltantes superior al 35%. La base de datos utilizada en este trabajo está disponible en <https://github.com/PlantbreedingUNRC/GWAS-MRC-BD>.

### Análisis estadístico

Los datos fenotípicos se analizaron utilizando un modelo lineal mixto (MLM) multicarácter (Maier *et al.*, 2015). La base de datos utilizada en el modelo consta de 185 líneas de maíz evaluadas mediante cuatro caracteres (INC-MRC, SEV-MRC, INC-BD y SEV-BD). Se usó un modelo lineal mixto multivariado para obtener el predictor lineal del efecto aleatorio de genotipo, es decir un BLUP multivariado de efectos de genotipo que considera los cuatro caracteres evaluados simultáneamente. La observación  $y_{ijk}$  para el carácter  $k$  es escrito como una función lineal del efecto del bloque desde donde es observada y del efecto de genotipo,

$$y_{ijk} = \mu + \beta_i + G_j + \varepsilon_{ijk} \text{ para el carácter } k$$

donde  $y_{ijk}$  es la observación fenotípica para el carácter  $k$ =INC-MRC, SEV-MRC, INC-BD, SEV-BD,  $\mu$  es la media general,  $\beta_i$  es el efecto aleatorio del  $i$ -ésimo bloque  $\beta_i \sim N(0, \sigma_b^2)$ ,  $G_j$  es el efecto aleatorio del  $j$ -ésimo genotipo y  $\varepsilon_{ijk}$  es el componente de error aleatorio independiente que se supone normal con media y varianza constante.

El MLM multivariado es un modelo para el vector de observaciones  $Y$  donde se consideran las observaciones de los  $k$  caracteres y que estima no sólo varianzas de los caracteres sino también covarianzas entre ellos. En este trabajo se ajustó utilizando la función “mmer” del paquete “sommer” (CovarrubiasPazaran, 2016), software R (R Core Team, 2016).

Los componentes de varianza obtenidos del MLM multivariado fueron usados para estimar la heredabilidad del carácter  $k$ , tal como lo propusieron Hallauer y Miranda (1988).

$$H^2 = \frac{\sigma_{gk}^2}{\sigma_{gk}^2 + \left(\frac{\sigma_{ek}^2}{p}\right)}$$

donde  $\sigma_{gk}^2$  es la varianza genotípica para el carácter  $k$ -ésimo,  $\sigma_{ek}^2$  es la varianza residual asociada a las observaciones de ese carácter, y  $p$  es una media ponderada del número de repeticiones (Holland *et al.*, 2003). Las varianzas genéticas estimadas para cada carácter y las covarianzas genética entre pares de caracteres, obtenidas del ajuste del MLM multivariado, permitieron estimar la correlación genética ( $r_g$ ) entre los caracteres  $l$  y  $m$ :

$$r_{g(l,m)} = \frac{\sigma_{g(l,m)}^2}{\sqrt{\sigma_{gl}^2 \sigma_{gm}^2}}$$

donde  $\sigma_{g(l,m)}^2$  es la covarianza genética entre los caracteres  $l$  y  $m$ , y los elementos del denominador corresponden a las varianzas genéticas de ambos caracteres.

### Asociación entre variación fenotípica y variación genotípica

El software Tassel 5.2.60 (Bradbury *et al.*, 2007) se utilizó para realizar el análisis de asociación entre variación fenotípica y variación genotípica. El GWAS se llevó a cabo con 78.376 SNPs. La incidencia y la severidad de MRC y BD fueron usadas como variables dependientes.

Para llevar a cabo la asociación se ajustaron seis modelos. Los modelos fueron: 1) el modelo *Naive*, que realiza la asociación de la información genotípica y fenotípica sin tener en cuenta la posible existencia de estructura genética en la población en estudio; 2) el modelo Q, que utiliza la matriz de estructura poblacional definida con el programa Structure (Pritchard, 2000) considerando la correlación genética entre líneas; 3) el modelo PCA, el cual modela la estructura poblacional subyacente en la población de líneas de maíz, mediante la incorporación de cinco componentes principales (Price *et al.*, 2006). También se ajustaron modelos

que incorporaron la matriz de *Kinship* para modelar la relación genética entre dos líneas de la población en estudio, 4) el modelo K (Parisseaux y Bernardo, 2004); 5) el modelo Q + K (Yu *et al.*, 2006); y 6) el modelo PCA + K (Zhao *et al.*, 2007). A partir del gráfico de cuantiles-cuantiles (*Q-Q plot*) se seleccionaron los modelos apropiados para cada carácter. Este gráfico compara los valores observados del  $-\log_{10}$  (*valor-p*) para cada marcador con los valores esperados del  $-\log_{10}$  (*valor-p*) bajo la hipótesis nula de no asociación entre marcadores moleculares y los caracteres en estudio. El procedimiento de Li y Ji (2005) se utilizó para realizar correcciones de los valores *p* por multiplicidad. Los marcadores SNPs que superaron el umbral de  $-\log_{10}$  (*valor-p*)  $>4$  ( $p < 0,0001$ ), se consideraron asociados de manera significativa con el carácter. Los gráficos *Q-Q plot* y *Manhattan plot* se realizaron con el paquete “qqman” (Turner, 2018) del software R (R Core Team, 2016) utilizando las salidas de GWAS del software Tassel.

## RESULTADOS

Para ambas enfermedades se observaron tanto valores mínimos como valores máximos de las respectivas escalas de evaluación de síntomas. El valor medio de INC-MRC fue 43% y de SEV-MRC 0,88, mientras que para INC-BD y SEV-BD fueron 83% y 2,5, respectivamente. El valor estimado de heredabilidad varió entre 0,35 (INC-BD) y 0,7 (SEV-BD) (Tabla 1).

**Tabla 1.** Medidas resumen y parámetros genéticos estimados para incidencia (INC) y severidad (SEV) de Mal de Río Cuarto (MRC) y de bacteriosis (BD) en una población diversa de 185 líneas de maíz evaluadas en Río Cuarto, Córdoba, Argentina, durante el ciclo de cultivo 2019/2020.

Carácter	Media $\pm$ EE	Mínimo	Máximo	$\sigma_g^2$	H <sup>2</sup>
INC-MRC	43,25 $\pm$ 2,13	0	100	367,16	0,47
SEV-MRC	0,88 $\pm$ 0,05	0	3	0,25	0,55
INC-BD	82,96 $\pm$ 1,87	0	100	216,09	0,35
SEV-BD	2,53 $\pm$ 0,07	1	6	0,59	0,69

EE= error experimental;  $\sigma_g^2$  = varianza genotípica; H<sup>2</sup>= Heredabilidad

El MLM multivariado reveló que la correlación genética entre caracteres es positiva y significativa cuando se trata de INC y SEV de una misma enfermedad,

mientras que la correlación entre caracteres de distinta enfermedad no resultó estadísticamente significativa (Tabla 2).

**Tabla 2.** Correlación entre los caracteres incidencia (INC) y severidad (SEV) de Mal de Río Cuarto (MRC) y de bacteriosis (BD) en una población diversa de 185 líneas de maíz evaluadas en Río Cuarto, Córdoba, Argentina, en el ciclo de cultivo 2019/2020.

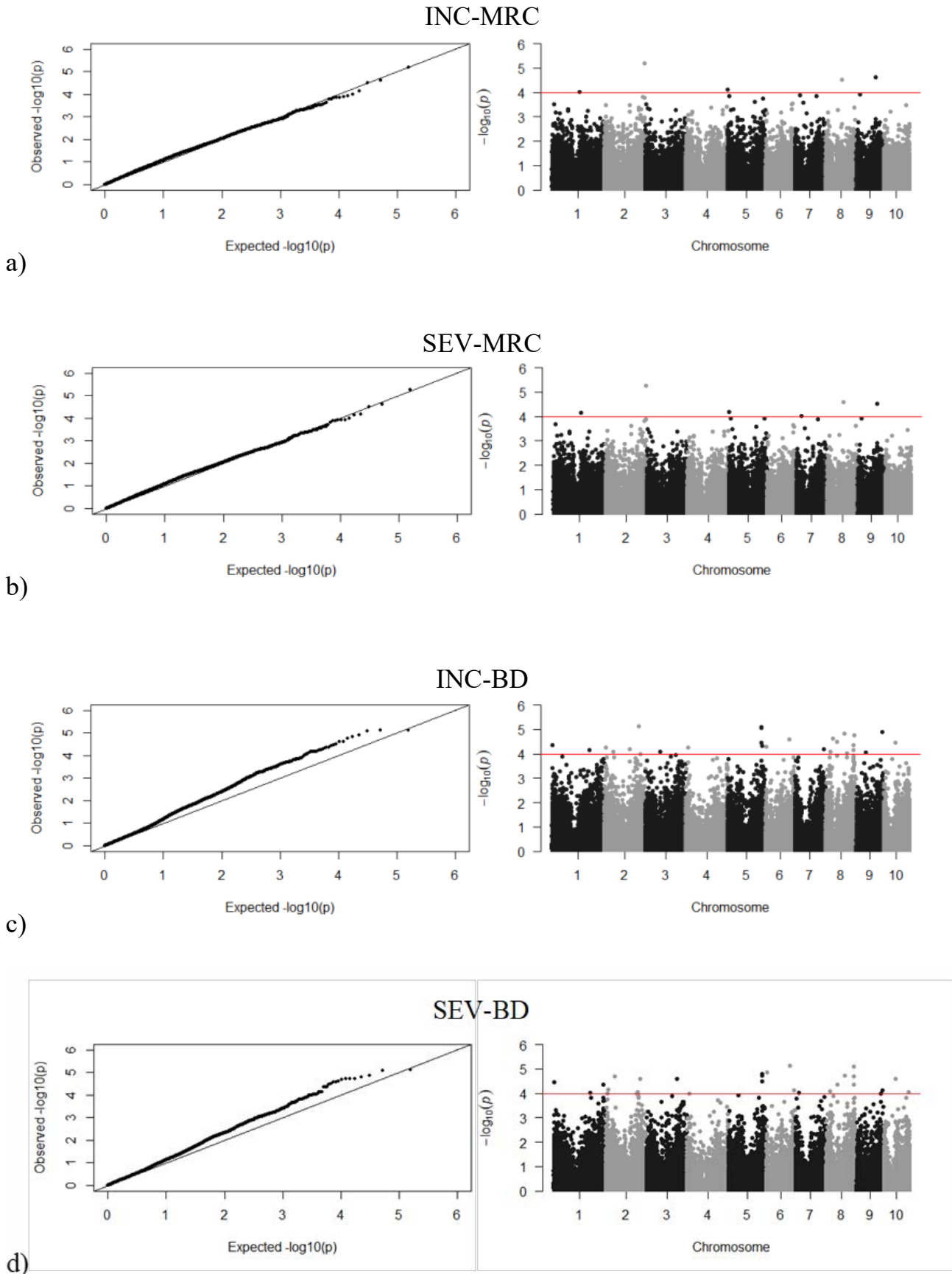
Carácter	INC-MRC	SEV-MRC	INC-BD	SEV-BD
INC-MRC	1	0,89*	-0,23	0,03
SEV-MRC	-	1	-0,25	0,01
INC-BD	-	-	1	0,94*
SEV-BD	-	-	-	1

\*correlación significativa ( $p < 0,0001$ )

INC-MRC: Incidencia de Mal de Río Cuarto, SEV-MRC: Severidad de Mal de Río Cuarto, INC-BD: Incidencia de bacteriosis, SEV-BD: severidad de bacteriosis.

A partir de la frecuencia alélica de los loci de cada línea, se clasificaron con el software Structure los genotipos del panel en tres grupos. El primer grupo estuvo compuesto por cuatro líneas, el segundo por 108 líneas y el tercer grupo por 73 líneas. Consecuentemente, la estructura genética que determina el agrupamiento de líneas fue contemplada en los modelos de asociación entre la variación fenotípica y la genotípica ajustadas carácter por carácter. El modelo Q (modelo que considera la estructura de grupos sugerida por el software Structure) fue el modelo de mejor ajuste para INC-MRC y SEV-MRC. Sin embargo, para INC-BD y SEV-BD la estructura de grupos fue menos discreta y quedó mejor representada por el modelo de asociación PCA + K, modelo que consideró cinco componentes del análisis de componentes principales de los datos moleculares como covariable y que además incorpora la correlación genética entre pares de líneas mediante la matriz de parentesco K (Figura 1).

El mapeo asociativo utilizando los 78.376 SNPs para GWAS, se realizó con el modelo más apropiado para cada carácter (Figura 1). Cinco regiones fueron declaradas como estadísticamente significativas tanto en el carácter INC-MRC como para SEV-MRC. Se identificaron otras 15 regiones como aportantes de alelos promisorios para INC-BD y SEV-BD. No se encontraron regiones genómicas que fuesen promisorias para mejorar la resistencia de ambas enfermedades simultáneamente. La proporción de variación fenotípica explicada por cada región cromosómica identificada como de alto potencial para la selección por resistencia a MRC osciló entre 0,11 y 0,19; valores similares fueron observados para BD (Tabla 3 y 4).



**Figura 1.** Gráficos Q-Q plot y Manhattan plot para el GWAS de los caracteres incidencia y severidad de Mal de Río Cuarto y de bacteriosis en una población diversa de 185 líneas de maíz. a) INC-MRC, b) SEV-MRC, c) INC-BD, d) SEV-BD. Umbral  $-\log_{10}(0,0001)$ .



**Tabla 3.** Marcadores moleculares asociados con incidencia (INC) y severidad (SEV) de Mal de Río Cuarto en una población diversa de 185 líneas de maíz evaluadas en Río Cuarto, Córdoba, Argentina, en el ciclo de cultivo 2019/2020.

Región genómica	Carácter	Marcador	Cromosoma	Bin	Alelo	p	R <sup>2</sup>
1	INC	S1_158003836	1	1,05	A/T	9,70x10 <sup>-5</sup>	0,11
	SEV					7,01x10 <sup>-5</sup>	0,12
2	INC	S2_234192015	2	2,09	G/A	6,40x10 <sup>-6</sup>	0,19
	SEV					5,25x10 <sup>-5</sup>	0,19
3	INC	S5_1726939	5	5,00	C/A	7,46x10 <sup>-5</sup>	0,12
	SEV					6,40x10 <sup>-5</sup>	0,12
4	INC	S8_93112262	8	8,03	G/A	3,05x10 <sup>-5</sup>	0,12
	SEV					2,46x10 <sup>-5</sup>	0,12
5	INC	S9_112644510	9	9,04	T/A	2,39x10 <sup>-5</sup>	0,18
	SEV					3,07x10 <sup>-5</sup>	0,17

Umbral de significancia: valor-p < 0,0001.

## DISCUSIÓN

La población diversa de líneas de maíz del CIMMYT evaluada en Río Cuarto, presentó amplia variabilidad fenotípica y genotípica respecto a la reacción de las líneas para resistencia a Mal de Río Cuarto (MRC) y a bacteriosis (BD). Los modelos mixtos ofrecen un enfoque apropiado para analizar conjuntamente los caracteres evaluados para la identificación de mejores genotipos considerando la posible correlación entre éstos (Malosetti *et al.*, 2008). La correlación entre caracteres puede ser positiva, negativa o nula. Wisser *et al.* (2011) y López Zuniga *et al.* (2019) observaron correlación positiva en caracteres de resistencia medido para tres enfermedades causadas por *Cochliobolus heterostrophus*, *Setosphaeria turcica*, y *Cercosporazeae maydis* en maíz. Sin embargo, en nuestro estudio no se observó correlación entre la respuesta al MRC y a la BD. Consecuentemente, el MLM multivariado constituye una herramienta útil para evaluar simultáneamente INC y SEV de MRC o de BD, pero no para el tratamiento de ambas enfermedades ya que la correlación genética entre resistencia a MRC y a BD fue baja. Los síntomas de BD se desarrollan principalmente en las hojas, mientras que, los síntomas de MRC afectan toda la planta cuando el ataque es severo (Abdala *et al.*, 1997). La reducción de la lámina foliar puede, consecuentemente, dificultar la evaluación de la resistencia a bacteriosis produciendo subestimaciones en las correlaciones genéticas entre caracteres.

Respecto a la estructura genética poblacional detectada por Structure, observamos alta consistencia con el agrupamiento de líneas como Lowland, Subtropical y Highland propuesto por Wu *et al.* (2016),

quienes trabajaron con un set de líneas en el cual están contenidas las líneas del presente estudio. Al igual que lo observado por Gutiérrez *et al.* (2015), no hubo un único modelo GWAS que ajustara adecuadamente para todos los caracteres. El modelo que mejor ajustó para los caracteres INC-MRC y SEV-MRC fue el modelo Q (Pritchard, 2000); mientras que para INC-BD y SEV-BD ajustó el modelo PCA + K (Zhao *et al.*, 2007) que sugiere un agrupamiento más difuso y más dependiente de las relaciones de pares de líneas que el modelo Q.

El análisis de GWAS permitió identificar regiones genómicas previamente reportadas para la presencia de genes de resistencia a enfermedades. Di Renzo *et al.* (2004) y Bonamico *et al.* (2012) detectaron una región genómica que confiere resistencia a MRC en el bin 8.03 en una población segregante F<sub>2:3</sub> y en una población de RIL, ambas derivadas del cruzamiento entre las líneas de maíz Mo17 (susceptible) y BLS14 (resistente). Gowda *et al.* (2015), detectó una región genómica en el bin 1.05 para resistencia a *Maize lethal necrosis disease* en un germoplasma tropical de maíz. Gomes de Paula Lana *et al.* (2017), evaluaron la resistencia a bacteriosis, *Maize white spot*, en una población biparental y al igual que en el presente estudio detectaron regiones genómicas asociadas para resistencia en los bin 2.07 y 8.03. Rossi *et al.* (2020) informaron dos regiones genómicas asociadas para resistencia a *Maize white spot* en los bin 1.01 y 8.03 a partir de una población de líneas tropicales de maíz. Coincidentemente, estas dos regiones fueron asociadas significativamente con resistencia a bacteriosis en el presente estudio donde se utilizó una población diversa de diferente procedencia.

**Tabla 4.** Marcadores moleculares asociados con incidencia (INC) y severidad (SEV) de bacteriosis en una población diversa de 185 líneas de maíz evaluadas en Río Cuarto, Córdoba, Argentina, en el ciclo de cultivo 2019/2020.

Región genómica	Carácter	Marcador	Cromosoma	Bin	Alelo	p	R <sup>2</sup>
1	INC	S1_5246419	1	1,01	G/T	4,39x10 <sup>-5</sup>	0,18
	SEV					3,35x10 <sup>-5</sup>	0,18
2	INC	S2_10495415		2,02	C/A	5,44x10 <sup>-5</sup>	0,13
	SEV					9,91x10 <sup>-5</sup>	0,12
3	INC	S2_54359257	2	2,04	T/A	8,37x10 <sup>-5</sup>	0,15
	SEV					1,97x10 <sup>-5</sup>	0,18
4	INC	S2_200456510		2,07	A/G	7,30x10 <sup>-6</sup>	0,17
	SEV					2,46x10 <sup>-5</sup>	0,15
5	INC	S5_193547866			C/A	7,84x10 <sup>-6</sup>	0,18
	SEV					1,55x10 <sup>-5</sup>	0,17
6	INC	S5_193554917	5	5,05	G/C	8,42 x10 <sup>-6</sup>	0,19
	SEV					1,90x10 <sup>-5</sup>	0,18
7	INC	S5_193649629			C/A	3,58x10 <sup>-5</sup>	0,15
	SEV					3,11x10 <sup>-5</sup>	0,15
8	INC	S6_1960822		6,00	G/A	5,14x10 <sup>-5</sup>	0,13
	SEV					1,39x10 <sup>-5</sup>	0,15
9	INC	S6_137143684	6	6,05	C/T	2,45x10 <sup>-5</sup>	0,15
	SEV					7,56x10 <sup>-6</sup>	0,17
10	INC	S8_105846679		8,03	A/G	1,48x10 <sup>-5</sup>	0,17
	SEV					1,93x10 <sup>-5</sup>	0,17
11	INC	S8_63553514		8	C/G	3,12x10 <sup>-5</sup>	0,15
	SEV					4,49x10 <sup>-5</sup>	0,14
12	INC	S8_161634845		8,06	T/C	4,26x10 <sup>-5</sup>	0,14
	SEV					7,89x10 <sup>-6</sup>	0,17
13	INC	S8_162228387			T/C	6,84x10 <sup>-5</sup>	0,15
	SEV					4,50x10 <sup>-5</sup>	0,15
14	INC	S9_151998388	9	9,07	T/G	1,23x10 <sup>-5</sup>	0,18
	SEV					7,31x10 <sup>-5</sup>	0,15
15	INC	S10_67227666	10	10,03	A/G	3,55x10 <sup>-5</sup>	0,17
	SEV					2,55x10 <sup>-5</sup>	0,18

Umbral de significancia: valor-p &lt; 0,0001.

La variabilidad fenotípica y genotípica existente en el germoplasma diverso constituido por las líneas de maíz de CIMMYT resulta importante para apoyar programas de mejoramiento genético de maíz locales. El GWAS detectó regiones genómicas con alelos promisorios tanto para MRC como para BD, que individualmente explican una proporción de la variación fenotípica que oscila entre

10 y 20% de la variación total, pero no se identificaron regiones genómicas comunes a ambas enfermedades. Estudios multiambientales permitirán confirmar si estas regiones genómicas resultan promisorias para incorporar resistencia a Mal de Río Cuarto y a bacteriosis en programas locales de mejoramiento genético de maíz.

## BIBLIOGRAFÍA

- Abdala G., Vigliocco A., Boito G., Lorenzo E. (1997) Dwarfism in Mal de Río Cuarto disease. Histology of maize stems and endogenous gibberellin levels. *Biocell*. 20: 211-220.
- Agrios G. (2005) Plant pathology. Academic Press.
- 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 (5): 619-629. <https://doi.org/10.1017/S0021859611000943>.
- Bradbury P., Zhang Z., Kroon D., Casstevens T., Ramdoss Y., Buckler E. (2007) Tassel: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics* 23: 2633-2635.
- Chen J., Zavala C., Ortega N., Petroli C., Franco J., Burgueño J., Costich D., Hearne S.J. (2016) The development of quality control genotyping approaches: A case study using elite maize lines. *PLoS ONE* 11 (6): 1-17. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0157236>.
- Covarrubias Pazarán G. (2016) Genome assisted prediction of quantitative traits using the R package sommer. *PLoS ONE* 11 (6): e0156744. <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 (4): 381-393. <https://doi.org/10.1198/108571106X154443>.
- 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 (3): 289-295. <https://doi.org/10.1017/S0021859604004307>.
- Gimenez Pecci M. P. (2012) Mal de Río Cuarto del maíz. In: 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.
- Gomes de Paula Lana U., Prazeres de Souza I.R., Noda R.W., Pastina M.M., Vieira Magalhaes J., Teixeira Guimaraes C. (2017) Quantitative trait loci and resistance gene analogs associated with maize white spot resistance. *Plant Dis.* 101: 200-208. [doi:10.1094/PDIS-06-16-0899-RE](https://doi.org/10.1094/PDIS-06-16-0899-RE).
- Gowda M., Das B., Makumbi D., Babu R., Semagn K., Mahuku G., Olsen M.S., Bright J.M., Beyene Y., Prasanna B.M. (2015) Genome wide association and genomic prediction of resistance to maize lethal necrosis disease in tropical maize germplasm. *Theor. Appl. Genet.* 128 (10): 1957-1968. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2559-0>.
- Gurr S.J., Rushton P.J. (2005) Engineering plants with increased disease resistance: what are we going to express? *Trends Biotechnol.* 23: 275-282.
- Gutiérrez L., Germán S., Pereyra S., Hayes P.M., Pérez C.A., Capettini F., Locatelli A., Berberian H.M., Falconi E.E., Estrada R., Fros D., Gonza V., Altamirano H., Huerta Espino J., Neyra E., Orjeda G., Sandoval Islas S., Sing R., Turkington K., Castro A.J. (2015) Multi-environment multi-QTL association mapping identifies disease resistance QTL in barley germplasm from Latin America. *Theor. Appl. Genet.* 128: 501-519.
- Hallauer A.R., Miranda J.B. (1988) Quantitative genetics in maize breeding, 2nd Edn. Iowa State University Press, Ames, IA.
- Holland J.B., Nyquist W.E., Cervantes Martinez C.T. (2003) Estimating and interpreting heritability for plant breeding: an update. *Plant Breed. Rev.* 22: 9-111.
- King A.M.Q., Adams M.J., Carstens E.B., Lefkowitz E.J. (2012) Virus taxonomy: classification and nomenclature of viruses: Ninth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. Elsevier Academic Press.
- Knott S.A., Haley C.S. (2000) Multitrait least squares for quantitative trait loci detection. *Genetics* 156 (2): 899-911.
- 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>.
- Lopez Zuniga L.O., Wolters P., Davis S., Weldekidan T., Kolkman J.M., Rebecca N., Hooda K.S., Rucker E., Thomason W., Wisser R., Balint Kurti P. (2019) Using maize chromosome segment substitution line populations for the identification of loci associated with multiple disease resistance. *G3: Genes, Genom. Genet.* 9 (1): 189-201. <https://doi.org/10.1534/g3.118.200866>.
- Maier R., Moser G., Chen G.B., Ripke S., Coryell W., Potash J.B., Scheftner W.A., Shi J., Weissman M.M., Hultman C.M., Landén M., Levinson D.F., Kendler K.S., Smoller J.W., Wray N.R., Lee S.H. (2015) Joint Analysis of Psychiatric Disorders Increases Accuracy of Risk Prediction for Schizophrenia, Bipolar Disorder, and Major Depressive Disorder. *Am. J. Hum. Genet.* 96: 283-294.
- Malosetti M., Ribaut J.M., Vargas M., Crossa J., Van Eeuwijk F.A. (2008) A Multi-trait multi-environment QTL mixed model with an application to drought and nitrogen stress trials in maize (*Zea Mays* L.). *Euphytica* 161 (1-2): 241-57. <https://doi.org/10.1007/s10681-007-9594-0>.
- Nelson R., Wiesner Hanks T., Wisser R., Balint Kurti P. (2018) Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nat. Rev. Genet.* 19: 21-33. [doi:10.1038/nrg.2017.82](https://doi.org/10.1038/nrg.2017.82).
- 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.
- Ornaghi J.A., March G.J., Boito G.T., Marinelli A., Beviacqua J.E., Giuggia J., Lenardon S.L. (1999) Infectivity in natural populations of *Delphacodes kuscheli* vector of "Mal Río Cuarto" Virus. *Maydica*. 44: 219-223.



- Parisseaux B., Bernardo R. (2004) In silico mapping of quantitative trait loci in maize. *Theor. Appl. Genet.* 109: 508-514.
- Plazas M.C., De Rossi R.L., Brücher E., Guerra F.A., Vilaró M., Guerra G.D., Wu G., Ortiz Castro M.C., Broders K. (2018) First report of *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* causing bacteria leaf streak of maize (*Zea Mays*) in Argentina. *Plant Dis.* 102 (5): 1026. <https://doi.org/10.1094/PDIS-10-17-1578-PDN>.
- Price A., Patterson N., Plenge R., Weinblatt M., Shadick N., Reich D. (2006) Principal components analysis corrects for stratification in genome-wide association studies. *Nat. Genet.* 38: 904-909.
- Pritchard J., Stephens M., Rosenberg N., Donnelly P. (2000) Association mapping in structured populations. *Am. J. Hum. Genet.* 67: 170-181.
- R Core Team (2016) R: a language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria.
- Remington D.L., Thornsberry J.M., Matsuoka Y., Wilson L.M., Whitt S.R., Doebley J., Kresovich S., Goodman M.M., Buckler E.S. (2001) Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 98 (20): 11479-84. <https://doi.org/10.1073/pnas.201394398>.
- 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. doi:10.2174/1874331501509010048.
- Rossi E.A., Ruiz M., Rueda Calderón M.A., Bruno C.I., Bonamico N.C., Balzarini M.G. (2019) Metaanalysis of loci for resistance to maize diseases. *Crop Sci.* 59: 1-15.
- Rossi E.S., Kuki M.C., Pinto R.J.B., Scapim C.A., Faria M.V., De Leon N. (2020) Genomic-wide association study for white spot resistance in a tropical maize germplasm. *Euphytica* 216 (1). <https://doi.org/10.1007/s10681-019-2550-y>.
- Schuelter A.R., Prazeres De Souza I.R., Tavares F., Dos Santos M.X., Oliveira E., Guimarães C.T. (2003) *Phaeosphaeria* genetic control of maize resistance to *Phaeosphaeria*. *Rev. Bras. Milho e Sorgo* 2 (1): 80-86.
- Turner S.D. (2018) qqman: an R package for visualizing GWAS results using Q-Q and manhattan plots. *J. Open Source Softw.*
- Wisser R.J., Kolkman J.M., Patzoldt M.E., Holland J.B., Yu J., Krakowsky M., Nelson R.J., Balint Kurti P.J. (2011) Multivariate analysis of maize disease resistances suggests a pleiotropic genetic basis and implicates a GST gene. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 108 (18): 7339-44. <https://doi.org/10.1073/pnas.1011739108>.
- Wu Y., San Vicente F., Huang K., Dhliwayo T., Costich D.E., Semagn K., Sudha N., Olsen M., Prassana B.M., Zhang X., Babu R. (2016) Molecular characterization of CIMMYT maize inbred lines with genotyping by sequencing SNPs. *Theor. Appl. Genet.* 129 (4): 753-65. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2664-8>.
- Yan J.B., Warburton M., Crouch J. (2011) Association mapping for enhancing maize (*Zea mays* L.) genetic improvement. *Crop Sci.* 51: 433-49. <https://doi:10.2135/cropsci2010.04.0233>.
- Yu J., Pressoir G., Briggs W., Bi I., Yamasaki M., Doebley J., McMullen M., Gaut B., Holland J., Kresovich S., Buckler E. (2006) A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nat. Genet.* 38: 203-208.
- Zhao K., Aranzana M., Kim S., Lister C., Shindo C., Tang C., Toomajian C., Zheng H., Dean C., Marjoram P., Nordborg M. (2007) An *Arabidopsis* example of association mapping in structured samples. *PLoS Genet.* 3: e4.
- Zila C.T., Ogut F., Romay M.C., Gardner C.A., Buckler E.S., Holland J.B. (2014) Genome-wide association study of fusarium ear rot disease in the U.S.A. Maize inbred line collection. *BMC Plant Biol.* 14 (1): 1-15. <https://doi.org/10.1186/s12870-014-0372-6>.