



UNIVERSIDAD NACIONAL DE RÍO CUARTO  
FACULTAD DE CIENCIAS EXACTAS, FÍSICO-QUÍMICAS Y  
NATURALES

Tesis para acceder al título de Doctor  
en Ciencias Biológicas

**MAPEO POR ASOCIACIÓN DE RESISTENCIA A LA  
ENFERMEDAD MAL DE RÍO CUARTO EN MAÍZ**

Ing. Agr. MSc. Ezequiel Alejandro Rossi

DIRECTOR: Dra. Natalia Cecilia Bonamico

CODIRECTOR: Ing. Agr. MSc. Miguel Di Renzo

Río Cuarto, febrero de 2019

## COMISIÓN ASESORA Y JURADO

Nombre y Apellido..... Lugar de trabajo.....

Firma..... Aclaración.....

Nombre y Apellido..... Lugar de trabajo.....

Firma..... Aclaración.....

Nombre y Apellido..... Lugar de trabajo.....

Firma..... Aclaración.....

## DEFENSA ORAL Y PÚBLICA

Lugar y fecha.....

Calificación.....

### **Recursos financieros para la realización de la tesis:**

- Proyectos de Investigación orientados a las demandas y a las oportunidades Piodo 2018. MINCYT Córdoba. Identificación de regiones genómicas de maíz asociadas a la reacción al Virus del Mal de Río Cuarto (MRCV). 2018/20. Directora: Ing. Agr. Dra. Natalia Bonamico. Res N° 000058/18. \$200.000.
- Proyecto PPI-SECYT-UNRC. Regiones genómicas responsables de la reacción al virus del Mal de Río Cuarto (MRCV) en maíz. 2016/19. Cod. A35. Directora: Ing. Agr. Dra. Natalia Bonamico. Res Rec N°. 161/16; 331/16; 130/17; 1038/18. \$69.000.
- Proyecto SPU MISIONES VII: Fortalecimiento académico-científico mediante misiones universitarias vinculadas al análisis estadístico de datos moleculares y su aplicación en agrobiotecnología. 2015/16. 40- #- 0193. Responsable: Ing. Agr. Dra. Natalia Bonamico. UNRC(Arg) / UNC(Arg) / UdelaR(Uruguay). Res N° 5246 SPU 2015. \$22.000.
- Proyecto FONCYT. PICT 2012-1878: Identificación de loci ligados a reacción a Mal de Río Cuarto. 2014/17. Responsable: Ing. Agr. MSc. Miguel Di Renzo. Res N° 141/13. \$ 322.192.
- Proyecto PPI-SECYT-UNRC. Mapeo de asociación: QTL para tolerancia a Mal de Río Cuarto. 2012/15. Director: Ing. Agr. MSc. Miguel Di Renzo. Res. Rec. N° 328/12; 852/11. \$21.600.

## ABREVIATURAS

RS: revisión sistemática

MA: meta-análisis

QTL: *quantitative trait loci* (loci de carácter cuantitativo)

SNPs: *single nucleotide polymorphism* (polimorfismo de nucleótido único)

MRC: Mal de Río Cuarto

MRCV: Mal de Río Cuarto Virus

SEV: severidad

INC: incidencia

ISE: índice de severidad de la enfermedad

BLUE: *best linear unbiased estimation* (mejor estimación lineal insesgada)

BLUP: *best linear unbiased prediction* (mejor predicción lineal insesgada)

DL: desequilibrio de ligamiento

OR: *odd ratio* (cociente de chances)

## ÍNDICE

|   | Página |
|---|--------|
| Índice de cuadros   | viii   |
| Índice de figuras   | x      |
| Resumen   | xii    |
| Abstract  | xiii   |
| CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN                                    | 1      |
| 1.1 Maíz  | 1      |
| 1.2 Enfermedades del maíz                                   | 1      |
| 1.2.1 Mal de Río Cuarto                                     | 2      |
| 1.3 Resistencia genética                                    | 3      |
| 1.4 Revisión sistemática y meta-análisis                    | 3      |
| 1.5 Mapeo por asociación                                    | 5      |
| CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS                           | 7      |
| 2.1 Hipótesis   | 7      |
| 2.2 Objetivo general  | 7      |
| 2.3 Objetivos específicos                                   | 7      |
| CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS                            | 8      |
| 3.1 Revisión sistemática y meta-análisis                    | 8      |
| 3.2 Material vegetal y ensayo de campo                      | 9      |
| 3.3 Evaluación del fenotipo                                 | 12     |
| 3.4 Caracterización del genotipo                            | 14     |
| 3.5 Análisis estadístico fenotípico                         | 14     |
| 3.5.1 Gráfico de sectores, histogramas y medidas de resumen | 14     |
| 3.5.2 Medias ajustadas                                      | 14     |
| 3.5.3 Heredabilidad   | 15     |

|                        |   |    |
|------------------------|---|----|
| 3.6                    | Análisis estadístico genotípico                       | 15 |
| 3.6.1                  | Estructura poblacional                                | 15 |
| 3.6.2                  | Diversidad genética                                   | 16 |
| 3.6.3                  | Parentesco relativo y distancia genética              | 16 |
| 3.6.4                  | Desequilibrio de ligamiento                           | 17 |
| 3.7                    | Análisis estadístico fenotípico-genotípico            | 17 |
| 3.7.1                  | Mapeo por asociación                                  | 17 |
| 3.7.2                  | Regresión lineal múltiple                             | 19 |
| CAPÍTULO 4: RESULTADOS |   | 20 |
| 4.1                    | Revisión sistemática y meta-análisis                  | 20 |
| 4.2                    | Análisis estadístico fenotípico                       | 25 |
| 4.2.1                  | Gráfico de sectores, histogramas y medidas de resumen | 25 |
| 4.2.2                  | Heredabilidad   | 28 |
| 4.3                    | Análisis estadístico genotípico                       | 29 |
| 4.3.1                  | Estructura poblacional                                | 29 |
| 4.3.2                  | Diversidad genética                                   | 31 |
| 4.3.3                  | Parentesco relativo y distancia genética              | 32 |
| 4.3.4                  | Desequilibrio de ligamiento                           | 32 |
| 4.4                    | Análisis estadístico fenotípico-genotípico            | 33 |
| 4.4.1                  | Mapeo por asociación                                  | 33 |
| 4.4.2                  | Regresión lineal múltiple                             | 41 |
| CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN  |   | 42 |
| 5.1                    | Revisión sistemática y meta-análisis                  | 42 |
| 5.2                    | Evaluación del fenotipo                               | 42 |
| 5.3                    | Estructura poblacional                                | 43 |
| 5.4                    | Diversidad genética                                   | 43 |

|  |    |
|--|----|
| 5.5 Parentesco y desequilibrio de ligamiento | 44 |
| 5.6 Modelo para el mapeo por asociación      | 45 |
| 5.7 Mapeo por asociación                     | 46 |
| 5.8 Regresión lineal múltiple                | 46 |
| CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES                     | 48 |
| REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS                   | 49 |
| ANEXO  | 61 |
| Figuras                                      | 61 |
| Cuadros                                      | 70 |

## ÍNDICE DE CUADROS

| Cuadro |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Adaptación ambiental, color de grano y textura de grano de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.   | 11     |
| 2      | Estudios primarios que informan QTL para resistencia a enfermedades virales en maíz.  | 22     |
| 3      | Número de QTL y chances ( <i>odd ratio</i> (OR)) de encontrar loci de efecto mayor para resistencia a virus en los 10 cromosomas de maíz.   | 23     |
| 4      | Número de líneas (n), valor medio (Media), valor mínimo (Mín.) y valor máximo (Máx.) para severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.        | 28     |
| 5      | Estimación de los componentes de varianza y de la heredabilidad generalizada ( $\bar{H}^2$ ) para severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en seis ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. | 29     |
| 6      | Análisis molecular de la varianza (AMOVA) entre grupos definidos según adaptación ambiental de las líneas de maíz de CIMMYT.  | 30     |
| 7      | Diversidad genética y contenido de información polimórfica (PIC), estimados con 7.584 marcadores moleculares SNPs, de las líneas de maíz de CIMMYT y de cada grupo definido según adaptación ambiental.   | 31     |
| 8      | Marcadores moleculares SNPs asociados con severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.   | 38     |

- 9 Marcadores moleculares SNPs asociados con severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto, para los BLUP de las líneas de maíz de CIMMYT a través de tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. 40
- 10 Regresión lineal múltiple de severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT, con los SNPs asociados en ambientes individuales y a través de ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. 41

## ÍNDICE DE FIGURAS

| Figura |   | Página |
|--------|---|--------|
| 1      | Siembra del ensayo en Rodeo Viejo y Sampacho, provincia de Córdoba, Argentina.  | 10     |
| 2      | Síntomas de la enfermedad Mal de Río Cuarto observados en las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.  | 13     |
| 3      | Diagrama de flujo de los estudios recopilados en la revisión sistemática y criterios de exclusión para el meta-análisis.  | 20     |
| 4      | Gráficos <i>Forest Plot</i> del meta-análisis realizado con 31 estudios donde se identifican QTL para resistencia a enfermedades virales en maíz.   | 24     |
| 5      | Distribución de la frecuencia poblacional del grado de severidad de la enfermedad Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.                                 | 25     |
| 6      | Distribución de la frecuencia relativa de la incidencia de la enfermedad Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.  | 26     |
| 7      | Distribución de la frecuencia relativa del índice de severidad de la enfermedad Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.                                   | 27     |
| 8      | Estructura poblacional de líneas de maíz de CIMMYT. Valor del logaritmo de asignación probabilística ( $\ln P(D)$ ) estimado y $\Delta k$ obtenidos con STRUCTURE.  | 30     |
| 9      | Gráfico del análisis de componentes principales de líneas de maíz de CIMMYT, obtenido a partir de 45.925 marcadores moleculares SNPs.   | 31     |
| 10     | Parentesco relativo por pares (coeficiente de parentesco) (A) y distancia genética de Nei (B) de líneas de maíz de CIMMYT, estimados mediante 45.925 marcadores moleculares SNPs.   | 32     |
| 11     | Desequilibrio de ligamiento de líneas de maíz de CIMMYT, estimado mediante 45.925 marcadores moleculares SNPs en todo el genoma.  | 33     |
| 12     | Distribución empírica de los valores $p$ de severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto (MRC) de líneas de maíz de CIMMYT en tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. | 34     |
| 13     | Distribución empírica de los valores $p$ de severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río   | 35     |

Cuarto (MRC) de los BLUP de líneas de maíz de CIMMYT a través de tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.

- 14 *Manhattan plots* resultantes del análisis de asociación, de todo el genoma para severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de líneas de maíz de CIMMYT en los ambientes Chaján (E1); y Río Cuarto (E8) de la provincia de Córdoba, Argentina. 36
  
- 15 *Manhattan plots* resultantes del análisis de asociación, de todo el genoma para severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de líneas de maíz de CIMMYT en el ambiente Sampacho (E9); y para los BLUP a través de tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. 37

## RESUMEN

El Mal de Río Cuarto (MRC) es la enfermedad viral más importante del maíz (*Zea mays* L.) en Argentina. El uso de genotipos resistentes es el medio más económico, ambientalmente sostenible y efectivo para controlar enfermedades en cultivos extensivos. El objetivo de este trabajo fue identificar regiones genómicas asociadas con la resistencia a la enfermedad MRC en un grupo de líneas de maíz de CIMMYT. Una revisión sistemática y un meta-análisis se realizaron con el propósito de identificar cromosomas que portan QTL de efecto mayor para resistencia a enfermedades virales en maíz. La evaluación fenotípica de 291 líneas de maíz se realizó en cuatro localidades de la provincia de Córdoba, Argentina durante 2015/16, 2016/17 y 2017/18. La combinación año-localidad definió nueve ambientes. A partir de los síntomas observados se estimaron los caracteres severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) MRC. Las medias ajustadas de las líneas de maíz en cada uno de tres ambientes y la mejor predicción lineal insesgada (BLUP) a través de éstos se estimaron mediante modelos lineales mixtos. A partir de la caracterización genotípica disponible públicamente de las líneas de maíz, se seleccionaron 45.925 SNPs. El análisis de estructura genética poblacional indicó la presencia de tres subgrupos definidos en base a la adaptación ambiental de las líneas de maíz. El análisis del desequilibrio de ligamiento (DL) mostró una rápida caída (10-20 kb;  $r^2 < 0,10$ ) que brindó la posibilidad de alcanzar una alta resolución de mapeo. El análisis de mapeo por asociación se realizó para los tres ambientes que permitieron diferenciar a los genotipos. Este permitió identificar 54 marcadores SNPs, en 46 regiones genómicas, asociados significativamente con la resistencia a la enfermedad MRC. La variación fenotípica explicada por estos QTL osciló entre 6% y 24%, con un valor medio de 10%. Veintitrés de estos marcadores se encuentran en regiones donde previamente se reportaron grupos de genes y QTL para resistencia a enfermedades virales en maíz. El análisis de regresión lineal múltiple con los marcadores significativos en la asociación permitió identificar 2, 3, 4 y 5 SNPs que explicaron entre 21% y 44% de la variación fenotípica, según carácter y ambiente. Estos SNPs resultan promisorios para la selección de líneas de maíz de CIMMYT con alelos favorables para la resistencia a la enfermedad MRC.

## ABSTRACT

### ASSOCIATION MAPPING OF RESISTANCE TO MAL DE RIO CUARTO DISEASE IN MAIZ

Mal de Rio Cuarto (MRC) is the most important viral disease of maize (*Zea mays* L.) in Argentina. The development of resistant genotypes is the most economical, environmentally sustainable and effective way for controlling this disease. The aim of this study was to detect genomic regions associated with resistance to MRC disease in maize lines. Systematic review and meta-analysis were performed to identify chromosomes carrying major-effect QTL for resistance to viral diseases in maize. Severity (SEV), incidence (INC) and disease severity index (DSI) estimated in three environments and 45,925 SNPs in a population of genotypes were used to identify genomic regions associated with MRC disease resistance. Mixed models were used to estimate the best linear unbiased estimation (BLUE) of maize lines in each environment and the best linear unbiased prediction (BLUP) across environment. Population structure analysis showed three subgroups. Linkage disequilibrium (LD) analysis indicated faster LD decay (10-20 kb;  $r^2 < 0,10$ ), that allowed achievement a higher mapping resolution. Association mapping allowed to identify 54 significant SNPs associated to MRC resistance in all environments. These SNPs were grouped in 46 genomic regions. The phenotypic variation explained by these QTL ranged between 6% and 24%, with an average value of 10%. Twenty-three SNPs were localized in the same genomic regions where previously were reported maize viral diseases resistance QTLs and gene clusters. The ability of multiple linear regression models to explain large proportions of the phenotypic variances suggests that simple assays involving a small number of SNPs could be designed for selecting lines with favorable alleles for MRC disease resistance.

## CAPÍTULO 1: INTRODUCCIÓN

### 1.1 Maíz

El maíz (*Zea mays* L.) es uno de los cultivos más importante en todo el mundo debido a su aporte en la producción de alimentos y biocombustibles (Hallauer *et al.*, 2010; Zhang *et al.*, 2016). La teoría más aceptada sobre su origen sugiere que fue domesticado hace 9.000 años atrás en México a partir del teosinte (*Zea mays* ssp. *parviglumis*) (Prasanna, 2012). El maíz es una especie alógama, es decir de polinización cruzada, que posee las flores masculinas y femeninas en la misma planta, pero separadas en distintos órganos. Esta característica hizo que su domesticación sea parcialmente diferente al resto de las especies cultivadas (Hallauer *et al.*, 2010).

Debido a la variabilidad genética disponible, el maíz es un excelente modelo vegetal para comprender la variación natural (Wallace *et al.*, 2014). Posee un genoma complejo y un alto nivel de diversidad en comparación con otros cultivos (Romay *et al.*, 2013). Es usado como especie modelo en estudios sobre mecanismos genéticos de caracteres cuantitativos (Liu *et al.*, 2014). La disección genética de estos caracteres es importante para mejorar la eficiencia de los programas de mejoramiento y como herramienta para entender los procesos básicos del desarrollo, de la fisiología y de la bioquímica de plantas (Hansey *et al.*, 2011).

Las líneas de maíz del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT) desarrolladas durante los últimos 25 años, están disponibles para los mejoradores del sector público y privado, para la investigación y los productores de todo el mundo. Se distribuyen por medio del acuerdo estándar de transferencia de material (SMTA) del Tratado Internacional sobre los Recursos Fitogenéticos para la Alimentación y la Agricultura (ITPGRFA) y se han convertido en la principal fuente pública mundial de germoplasma de maíz (Chen *et al.*, 2016).

### 1.2 Enfermedades del maíz

Las enfermedades de las plantas cultivadas causan pérdidas importantes en los cultivos, lo que constituye una amenaza para la seguridad alimentaria mundial y la sostenibilidad agrícola (Nelson *et al.*, 2018). Las enfermedades pueden ser originadas por agentes bióticos o abióticos. Dentro de los factores bióticos podemos encontrar diferentes patógenos como hongos, bacterias y virus (Botta y Gonzalez, 2010). Para que se desarrolle

una enfermedad debe establecerse una relación de parasitismo entre el patógeno y la planta, y un ambiente favorable al desarrollo del patógeno. Así, el triángulo de la enfermedad está constituido por el hospedante, el patógeno y el ambiente (Botta y Gonzalez, 2010). En el caso de las enfermedades virales, se agrega el insecto vector que interacciona con los otros tres componentes, constituyéndose así el tetraedro de la enfermedad (Redinbaugh y Pratt, 2009).

### 1.2.1 Mal de Río Cuarto

En Argentina, el Mal de Río Cuarto (MRC) es la enfermedad viral más importante del cultivo de maíz y provoca importantes pérdidas de producción en años desfavorables. La primera gran epidemia se produjo en el ciclo agrícola 1981/82. En esta oportunidad, en el departamento Río Cuarto se estimaron pérdidas de 65 millones de dólares causadas por MRC. Posteriormente, disminuyó su incidencia y severidad, pero en el ciclo 1996/97 la enfermedad afectó 300.000 ha del área maicera, con daños en cultivares susceptibles que ocasionaron pérdidas de rendimiento del 70% al 100% en los lotes afectados. En este ciclo, el MRC afectó al menos el 50% de los lotes sembrados (Laguna y Gimenez Pecci, 1997), lo que produjo pérdidas económicas para nuestro país de aproximadamente 120 millones de dólares (Lenardón *et al.*, 1998). En el ciclo agrícola 2006/07 la enfermedad se presentó nuevamente y es considerada como la tercera gran epidemia de MRC con afección severa de la producción (Lenardón, 2007).

La etiología describe al agente causal de la enfermedad MRC como un miembro del género *Fijivirus*, familia *Reoviridae* (Nome *et al.*, 1981). La transmisión del virus al maíz se realiza por medio del insecto vector *Delphacodes kuscheli* de manera persistente y propagativa (Ornaghi *et al.*, 1993). El vector es un reservorio natural del virus y por ello la población de macrópteros migrantes, con capacidad de desplazarse a los cultivos recién implantados, constituye el inóculo potencial que definirá las epidemias de la enfermedad (Ornaghi *et al.*, 1999).

El principal síntoma de la enfermedad MRC es la presencia de enaciones o protuberancias sobre las nervaduras en el envés de las hojas, así como en vainas, brácteas y en tallo. Cuando la infección ocurre en estado de coleoptile, las plantas de maíz no superan los 30 cm de altura. Las plantas presentan 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 (Abdala *et al.*, 1997).

### 1.3 Resistencia genética

El inminente cambio climático ha favorecido el aumento poblacional de insectos vectores de virus que causan enfermedades en plantas (Krishnareddy, 2013). Interferir en alguna de las interacciones del tetraedro de las enfermedades virales puede ser un modo eficiente de control (Redinbaugh y Pratt, 2009; Lucas, 2011). Las siembras tempranas y el uso de agroquímicos son estrategias de manejo agronómico para reducir la incidencia de la enfermedad MRC. El tratamiento con insecticidas sistémicos proporciona un control efectivo del insecto vector, que repercute favorablemente en el rendimiento del cultivo (March *et al.*, 2002). Sin embargo, una alternativa eficaz para controlar enfermedades en cultivos extensivos consiste en utilizar resistencia genética. En efecto, para disminuir la intensidad de la enfermedad MRC, el uso de germoplasma de maíz resistente, bajo un manejo integrado, constituye el procedimiento más económico y ambientalmente sustentable (March *et al.*, 1997; Di Renzo *et al.*, 2002). Así mismo, combinar y acumular genes de resistencia provenientes de diferentes fuentes de germoplasma permitirá brindar soluciones en un clima cada vez más inestable (Lucas, 2011).

La identificación de loci que confieren resistencia a enfermedades virales ofrece un enfoque para desarrollar materiales genéticamente resistentes que reduzcan las pérdidas de rendimiento causadas por éstas (Zambrano *et al.*, 2014a). Los genes involucrados en la resistencia a enfermedades e insectos se encuentran agrupados en regiones específicas del genoma del maíz (McMullen y Simcox, 1995; Redinbaugh y Pratt, 2009; Zhao *et al.*, 2015).

La reacción a la enfermedad MRC se comporta como un carácter cuantitativo (Di Renzo *et al.*, 2002; Kreff *et al.*, 2006; Bonamico *et al.*, 2012). Los loci que regulan caracteres de variación continua (*quantitative trait loci* QTL) pueden ser detectados mediante mapeo tradicional en poblaciones segregantes provenientes de cruzamientos biparentales (Di Renzo *et al.*, 2004; Dintinger *et al.*, 2005; Bonamico *et al.*, 2012; Rossi *et al.*, 2015). En el mapeo con poblaciones biparentales se pierden alelos que no segregan entre los padres de la población y muchos de los loci de efecto menor (Warburton *et al.*, 2015).

#### 1.4 Revisión sistemática y meta-análisis

Una revisión sistemática (RS) es una investigación científica en la cual la unidad de análisis está constituida por los estudios originales primarios (Ferreira González *et al.*, 2011). Una revisión sistemática es la búsqueda y evaluación crítica de todos los estudios que dan respuesta a una misma pregunta de investigación, la cual se realiza con una metodología sistemática y explícita para identificar, seleccionar y evaluar críticamente las investigaciones relevantes. La revisión sistemática sigue un protocolo para identificar, evaluar los estudios, y analizar e interpretar los resultados (González *et al.*, 2014). Constituye una herramienta esencial para sintetizar la información científica disponible, incrementar la validez de las conclusiones de los estudios individuales y para identificar áreas de incertidumbre donde sea necesario realizar investigación (Ferreira González *et al.*, 2011). Los protocolos para desarrollar revisiones sistemáticas en medicina están bien desarrollados y son ampliamente utilizados. Sin embargo, estos protocolos podrían no ser directamente aplicables en el sector agrícola. Así, resulta necesario realizar pequeñas modificaciones para la utilización de las revisiones sistemáticas en agricultura (Sargeant *et al.*, 2005). Finalmente, luego de realizar una revisión sistemática, es común aplicar un meta-análisis.

El meta-análisis consiste en aplicar métodos estadísticos para resumir los resultados de los estudios independientes (Centro Cochrane Iberoamericano, 2012). Al realizar una RS se debe establecer *a priori* cual será la pregunta de investigación. Esta debe ser clara, concisa y bien definida. Especificar la pregunta con la que se va a llevar a cabo la revisión sistemática es parte fundamental, ya que de ello depende que la búsqueda de información sea exitosa. Es decir, que los estudios recopilados en la RS posean la información requerida para llevar a cabo un meta-análisis. La pregunta debería estar estructurada de tal manera que se pueda expresar en términos de Población (*Population*, P), Intervención (*Intervention*, I), Casos (*Cases*, C), Resultado (*Outcome*, O) y Estudios (*Studies*, S). Además, se espera que la pregunta de investigación pueda recopilar toda la información posible para evitar sesgos de publicación (Sargeant *et al.*, 2005).

Recientemente, diferentes enfoques de meta-análisis se utilizaron para comparar sistemas agrícolas, principalmente para evaluar efectos de condiciones ambientales sobre la producción (Hossard *et al.*, 2016; Pittelkow *et al.*, 2015; Rotundo y Westgate, 2009), pero escaso número de meta-análisis se han enfocado sobre asociaciones genómicas fenotipo-genotipo (Rossi *et al.*, 2018; Teissier *et al.*, 2018; Zeggini y Ioannidis, 2009). En maíz, numerosos trabajos de investigación publicados informan QTL identificados para

resistencia a enfermedades virales. Por lo tanto, resulta de interés realizar una revisión sistemática para recopilar estos estudios con el objetivo de determinar mediante meta-análisis las regiones del genoma donde se localizan los QTL de efecto mayor.

### 1.5 Mapeo por asociación

Con la creciente disponibilidad de datos genómicos polimórficos y el potencial de explorar todos los eventos de recombinación que han ocurrido en la historia evolutiva de un germoplasma específico, estudios de mapeo por asociación se han convertido en una alternativa de gran alcance para la disección de caracteres cuantitativos en plantas (Hao *et al.*, 2015). El mapeo por asociación es un método alternativo para la identificación de secuencias de ADN que contribuyen a caracteres cuantitativos, incluyendo la resistencia a enfermedades (Warburton *et al.*, 2015). Esta estrategia de mapeo utiliza poblaciones con desequilibrio de ligamiento (DL), el cual consiste en asociaciones no al azar entre alelos de diferentes loci (Würschum, 2012). El DL también se conoce como desequilibrio de fase gamética, desequilibrio gamético o asociación alélica. Es la correlación entre los polimorfismos, causada por su historia compartida de mutación y recombinación. A pesar de que DL y ligamiento están relacionados, son claramente diferentes. Ligamiento se refiere a la herencia correlacionada de loci debida a la conexión física en un cromosoma, mientras que DL se refiere a la correlación entre los alelos en una población. La presencia de estratificación en la población y la desigual distribución de alelos en los grupos pueden dar lugar a falsas asociaciones no funcionales. Cuando existe DL altamente significativo entre los polimorfismos de diferentes cromosomas pueden producir asociaciones entre un marcador y un fenotipo, a pesar de que el marcador no está ligado físicamente al locus responsable de la variación fenotípica (Flint-García *et al.*, 2003). El mapeo por asociación explora la variabilidad genética de líneas que no forman parte de un esquema de cruzamiento específico (Zhao *et al.*, 2014). Es por ello que las colecciones de germoplasma, tales como las líneas de maíz desarrolladas por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), son utilizadas en este tipo de estudio.

La elección del germoplasma es fundamental para el éxito de los análisis de asociación. El germoplasma debe abarcar tanta variación fenotípica como sea posible (Flint-García *et al.*, 2005). La caracterización genética puede ser utilizada para identificar sub-grupos en el germoplasma (Flint-García *et al.*, 2005). Una restricción para el uso del mapeo por asociación en plantas es la presencia de estratificación en la estructura genética de la población y de relaciones genéticas, lo que puede causar DL entre

loci que no están ligados, y llevar a identificar asociaciones espurias entre marcadores y el carácter fenotípico de interés (Hao *et al.*, 2015, Peña Malavera *et al.*, 2014). El problema surge debido a una distribución desigual de las frecuencias alélicas entre los sub-grupos. Las frecuencias alélicas para el fenotipo y los marcadores pueden diferir entre sub-grupos. Por lo tanto, valores altos de DL en algunos sub-grupos pueden resultar de la estratificación poblacional y no del efecto del ligamiento. Antes de iniciar estudios de mapeo por asociación, resulta necesario calcular empíricamente la magnitud del mismo y describir la estructura poblacional mediante el uso de un gran número de marcadores independientes (Pritchard y Rosenberg, 1999). Para la resolución del mapeo por asociación y para detectar estratificación poblacional se han utilizado métodos estadísticos como los que se implementan en el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000a).

## CAPÍTULO 2: HIPÓTESIS Y OBJETIVOS

### 2.1 Hipótesis

El análisis conjunto de marcadores moleculares de ADN polimórficos y la variabilidad fenotípica para la reacción a la enfermedad Mal de Río Cuarto presente en poblaciones con desequilibrio de ligamiento, permite identificar regiones genómicas responsables de la resistencia a la enfermedad.

### 2.2 Objetivo general

Identificar asociaciones entre polimorfismos genéticos (marcadores moleculares de ADN) y la reacción (resistencia o susceptibilidad) a la enfermedad viral Mal de Río Cuarto en un grupo de líneas de maíz de CIMMYT.

### 2.3 Objetivos específicos

1. Realizar una revisión sistemática sobre QTL de resistencia a enfermedades virales en maíz.
2. Realizar un meta-análisis para identificar cromosomas que portan QTL de efecto mayor para resistencia a enfermedades virales en maíz.
3. Evaluar la reacción fenotípica (susceptible-resistente) a Mal de Río Cuarto en el grupo de líneas de maíz de CIMMYT.
4. Analizar la diversidad genética del grupo de líneas de maíz de CIMMYT.
5. Describir la estructura genética del grupo de líneas de maíz de CIMMYT.
6. Identificar polimorfismos genéticos en el grupo de líneas de maíz de CIMMYT asociados con la resistencia a la enfermedad MRC mediante análisis de mapeo por asociación.

## CAPÍTULO 3: MATERIALES Y MÉTODOS

### 3.1 Revisión sistemática y meta-análisis

La revisión sistemática (RS) se realizó según la metodología propuesta por Sargeant *et al.* (2005). Dado que *a priori* de la RS es necesario establecer una pregunta de investigación clara y concisa, se definieron los siguientes términos de búsqueda: (“*Zea mays*” OR maize OR corn), (tolerance OR resistance AND “virus disease”), (QTL OR loci OR “Quantitative Trait loci”). Con estos términos se realizó la búsqueda en once bases de datos de biología y agrícolas (Scopus, Scimedirect, Academic Search Premier, PubMed, Science Electronic Library Online, Agrícola, SpringerLink, Willey Online Library, Cambridge University Press, Journal Storage, Red de Revistas Científicas de América Latina y el Caribe, España y Portugal). Posteriormente, se realizó una selección por título incluyendo aquellos sobre enfermedades virales en maíz. Luego se realizó una selección por resumen donde se escogieron aquellos trabajos con información sobre QTL detectados para resistencia a enfermedades virales en maíz. Por último, se realizó una selección por texto completo donde se eligieron aquellos trabajos con la información necesaria para el meta-análisis (MA).

El meta-análisis estuvo orientado a identificar la posición de QTL con efecto relativamente mayor. Para ello el total de QTL fue ordenado en función del porcentaje de la variación fenotípica explicada por el QTL ( $R^2$ ) y aquellos pertenecientes al cuartil superior de la lista ordenada fueron considerados loci de efecto mayor (QTL con  $R^2$  mayor al percentil 75). El MA se realizó para cada uno de los 10 cromosomas del maíz. De cada estudio primario se extrajeron: 1) el número total de QTL reportados en el cromosoma estudiado ( $N_e$ ), 2) el número total de QTL reportados en el resto del genoma ( $N_c$ ), 3) el número de QTL de efecto mayor reportados en el cromosoma estudiado ( $E_e$ ) y 4) el número de QTL de efecto mayor reportados en el resto del genoma ( $E_c$ ). En cada cromosoma se estimó, para cada estudio primario, el *odd ratio* (OR) relacionado a las chances de encontrar QTL de efecto mayor. Este estadístico representa el cociente de la chance de que el cromosoma estudiado porte QTL de efecto mayor, respecto a la chance de encontrar QTL de efecto mayor en el resto del genoma ( $E_e \times (N_c - E_c) / (E_c \times (N_e - E_e))$ ). Para cada OR se obtuvieron los intervalos de confianza del 95%. Los OR obtenidos se promediaron ponderando la información provista por cada estudio en función de la cantidad de QTL reportados. Se construyó un *Forest Plot* (FP) (Borenstein *et al.*, 2009)

para cada cromosoma con la finalidad de visualizar el efecto global estimado (OR promedio).

### 3.2 Material vegetal y ensayo de campo

Un grupo de líneas de maíz desarrolladas y provistas (<http://www.cimmyt.org/seed-request>; 30/07/2015) por el Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT), fue evaluado por su fenotipo y caracterizado por su genotipo. El grupo de líneas para el estudio de mapeo por asociación está compuesto por 291 líneas de maíz (Cuadro 1).

La evaluación de las líneas (genotipos) por su reacción a la enfermedad viral Mal de Río Cuarto se realizó en la provincia de Córdoba, Argentina, en cuatro localidades de la zona en donde la enfermedad es endémica durante los ciclos agrícolas 2015/2016, 2016/2017 y 2017/2018. Las localidades son Chaján (33° 33' S 65° 00' O), Río Cuarto (CAMDOCEX, UNRC; 33° 06' S; 64° 17' O), Rodeo Viejo (32° 56' S 64° 42' O) y Sampacho (33° 26' S; 64° 43'). En Chaján, en el ciclo agrícola 2015/2016 y en Rodeo Viejo, en el ciclo agrícola 2016/2017 se establecieron dos fechas de siembra, en Río Cuarto una fecha de siembra en cada ciclo agrícola y en Sampacho sólo una fecha de siembra en el ciclo agrícola 2017/2018. Cada combinación localidad, ciclo agrícola y fecha de siembra es considerada como un ambiente distinto de evaluación. En el ciclo agrícola 2015/2016, en Chaján se sembró durante la segunda (E1) y la última semana de noviembre (E2) y en Río Cuarto durante la primera semana de diciembre (E3) de 2015. En el ciclo agrícola 2016/2017, en Río Cuarto se sembró durante la primera semana de noviembre (E4), en Chaján durante la segunda semana de noviembre (E5) y en Rodeo Viejo durante la segunda (E6) y la tercera semana de noviembre (E7) de 2016. En el ciclo agrícola 2017/2018, en Sampacho se sembró durante la segunda semana de noviembre (E8) y en Río Cuarto durante la tercera semana de noviembre (E9) de 2017. El diseño utilizado fue un diseño completamente al azar en los ambientes E1, E2 y E3 debido a la escasa disponibilidad de semilla. En los ambientes E4, E5, E6, E7, E8 y E9 se utilizó un diseño parcialmente repetido (Williams *et al.*, 2011), en los que un 15% de genotipos presentaron tres repeticiones y el resto de los genotipos sólo una repetición. Cada genotipo se estableció en parcelas de un surco de 3,0 m de largo espaciados a 0,52 m. Las parcelas se ubicaron próximas o sobre cultivos invernales de avena, debido a que éstos son reservorios naturales del insecto vector.



Figura 1. Siembra del ensayo en Rodeo Viejo (izquierda) y Sampacho (derecha), provincia de Córdoba, Argentina.

Cuadro 1. Adaptación ambiental, color de grano y textura de grano de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.

| Color    |       | Textura                          |  |   |
|----------|-------|----------------------------------|--|---|
| de       | de    | Highland                         | Subtropical  | Lowland   |
| grano    | grano |                                  |  |   |
| Blanco   | D     | 1 línea<br>(457)                 | 34 líneas<br>(76, 77, 79, 81, 82, 84, 96, 101, 102, 103, 104, 105, 106, 107, 108, 127, 131, 133, 135, 136, 177, 178, 179, 180, 183, 184, 315, 442, 483, 504, 505, 510, 511, 545) | 33 líneas<br>(2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 12, 13, 14, 34, 35, 42, 43, 44, 45, 46, 47, 235, 249, 267, 271, 273, 274, 275, 278, 281, 446, 448, 476, 477, 494, 502)   |
|          | F     |                                  | 17 líneas<br>(123, 379, 380, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 391, 393, 509, 520, 541, 559, 560)   | 26 líneas<br>(16, 17, 22, 23, 24, 66, 268, 269, 365, 366, 402, 403, 420, 449, 478, 490, 491, 492, 495, 498, 503, 530, 550, 553, 554, 558)   |
|          | SD    | 4 líneas<br>(455, 456, 458, 459) | 22 líneas<br>(78, 80, 91, 92, 94, 95, 97, 98, 99, 109, 110, 137, 316, 320, 444, 445, 484, 522, 523, 538, 543, 544)   | 19 líneas<br>(1, 9, 10, 11, 15, 65, 247, 266, 270, 276, 280, 447, 482, 499, 500, 515, 516, 549, 556)  |
|          | SF    |                                  | 22 líneas<br>(83, 93, 100, 126, 311, 312, 321, 381, 382, 392, 394, 395, 440, 441, 485, 488, 489, 517, 521, 536, 539, 548)  | 10 líneas<br>(248, 272, 277, 279, 450, 531, 532, 552, 555, 557)   |
| Amarillo | D     | 1 línea<br>(461)                 | 17 líneas<br>(121, 125)  | 8 líneas<br>(20, 283, 285, 305, 361, 466, 472, 475)   |
|          | F     |                                  | 1 línea<br>(124)   | 50 líneas<br>(60, 70, 71, 72, 223, 224, 225, 226, 227, 228, 229, 286, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 295, 296, 299, 300, 303, 304, 359, 360, 362, 363, 364, 425, 426, 427, 428, 429, 430, 431, 433, 434, 436, 437, 438, 454, 467, 470, 471, 479, 480, 481, 497, 551) |
|          | SD    | 17 líneas<br>(460, 462)          |  | 19 líneas<br>(18, 19, 21, 67, 282, 293, 297, 302, 306, 308, 358, 439, 452, 453, 468, 469, 473, 474, 493)  |
|          | SF    |                                  |  | 17 líneas<br>(59, 284, 294, 298, 301, 307, 408, 409, 432, 435, 451, 465, 496, 501, 533, 534, 535)   |

D: dentado; F: Flint; SD: semi dentado; SF: semi flint. Entre paréntesis se indica las líneas que corresponden a cada grupo.

### 3.3 Evaluación del fenotipo

La reacción fenotípica (susceptibilidad-resistencia) de cada una de las 291 líneas de maíz se evaluó mediante el registro de caracteres relacionados con los síntomas de la enfermedad MRC. Entre ellos altura de planta (AP) y altura de espiga (AE), acortamiento de entrenudos (EA), presencia de enaciones (EN), hojas rasgadas (HR), ancho (HA) y largo (HL) de la hoja bandera, características de la panoja (PA) y de la espiga. La altura de planta y altura de espiga se midieron en centímetros, desde la base del suelo hasta el extremo de la panoja, y desde la base del suelo hasta la inserción de la primera espiga, respectivamente. Los síntomas en la panoja (PA) se evaluaron según una escala discreta donde 0 = normal; 1 = extremo de las ramificaciones de la panoja sin flores diferenciadas; 2 = entre 2 cm y 50% de la longitud de las ramificaciones de la panoja sin flores diferenciadas; 3 = flores diferenciadas en el eje central y en menos del 50% de la longitud de las ramificaciones de la panoja; 4 = panoja sin flores diferenciadas. Para enaciones (EN) se definieron tres categorías, 0 = ausencia; 1 = tenues; 2 = callo. El acortamiento de entrenudos y el aspecto de las hojas del tercio superior (rasgadas, ancho o largo afectado) se evaluaron según una escala discreta donde 0 representaba estado normal y 1 la presencia del síntoma. Los síntomas en la espiga se midieron a madurez fisiológica del cultivo. En este estado fenológico se observó presencia o ausencia de espigas curvas, vacías o múltiples. A partir del registro de todos estos síntomas, cada planta se clasificó por el grado de severidad de enfermedad según la escala propuesta por Ornaghi *et al.*, (1999): 0 = planta asintomática; 1 = enaciones; 2 = enaciones + espiga curva; 3 = enaciones + enanismo + espiga pequeña, múltiple y sin granos. Para cada uno de los genotipos, la severidad (SEV) se expresó como el promedio del registro de grados de las plantas individuales. Luego se determinó la incidencia (INC) que considera el porcentaje de plantas que presentaron síntomas respecto al total de plantas de cada genotipo. Considerando la incidencia y la severidad, se estimó el índice de severidad de la enfermedad (ISE) según Di Renzo *et al.* (2002):

$$ISE = \sum_{i=0}^3 \left( \frac{\text{grado}_i \times \text{n}^\circ \text{ de plantas en el grado}_i}{\text{n}^\circ \text{ total de plantas} \times 3} \right) \times 100$$

donde “grado<sub>i</sub>” grado de severidad de cada planta evaluada según la escala descripta y “n° total de plantas” es el número total de plantas evaluadas en cada genotipo.

A)



B)



C)



D)



Figura 2. Síntomas de la enfermedad Mal de Río Cuarto observados en las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. A) acortamiento de entrenudos; B) hojas rasgadas y cortas, panoja estéril; C) y D) enaciones tipo callo.

### 3.4 Caracterización del genotipo

La caracterización de las líneas de maíz de CIMMYT con marcadores moleculares SNPs realizada por Wu *et al.* (2016) es de disponibilidad pública (<http://data.cimmyt.org/dvn>). La información genotípica disponible corresponde a 262 genotipos de los 291 evaluados en el presente estudio. A partir de un total de 362.008, se seleccionaron 45.925 SNPs correspondientes a los 10 cromosomas. Una tasa de datos faltantes menor al 25% y una frecuencia superior al 0,05 en el alelo menos frecuente fueron los criterios utilizados para la selección de marcadores. De estos, se seleccionó al azar un grupo de 7.584 SNPs para realizar el análisis de diversidad y la descripción de la estructura genética.

### 3.5 Análisis estadístico fenotípico

#### 3.5.1 Gráficos de sectores, histogramas y medidas de resumen

En cada uno de los ambientes, para una mejor comprensión del comportamiento de las líneas de maíz frente al grado de severidad, se construyeron gráficos de sectores. Este tipo de gráfico permite representar contribuciones porcentuales a un total, de la distribución de frecuencias de una variable categórica. Para los caracteres INC e ISE se realizaron histogramas de frecuencias con la finalidad de aproximar la distribución teórica subyacente en cada uno de los ambientes individuales. Además, se aplicó estadística descriptiva (medidas de resumen).

#### 3.5.2 Medias ajustadas

Los caracteres se analizaron, para los ambientes E4, E5, E6, E7, E8 y E9, usando modelos lineales mixtos. El modelo general fue el de Federer (Federer, 1961) y la notación propuesta por Eckermann *et al.* (2001).

$$y_{ijk} = \mu + \beta_i + G_{jk} + \varepsilon_{ijk}$$

donde  $y_{ijk}$  es la observación de la variable respuesta del carácter,  $\mu$  es la media general,  $\beta_i$  es el efecto aleatorio de bloque  $\beta_i \sim N(0, \sigma^2_b)$ ,  $G_j$  es el efecto fijo del genotipo, y  $\varepsilon_{ijk}$  es el error.

La aplicación de este modelo permitió obtener la mejor estimación lineal insesgada (BLUE) para cada genotipo en cada uno de los ambientes.

### 3.5.3 Heredabilidad

Los componentes de varianza, en los ambientes que presentaron diseño con repeticiones, se estimaron mediante un modelo lineal mixto y el procedimiento de máxima verosimilitud restringida (REML) utilizando el paquete lme4 con el programa INFOSTAT (Di Rienzo *et al.*, 2018) y su vinculación con R (R Development Core Team 2005). El diseño experimental utilizado genera datos desbalanceados por lo cual la heredabilidad se estimó de acuerdo a Piepho y Mohring (2007).

$$\bar{H}^2 = \frac{\sigma_g^2}{\sigma_g^2 + \bar{v}/2}$$

donde  $\bar{H}^2$  es la heredabilidad generalizada,  $\bar{v}$  es la varianza media de la diferencia de dos medias genotípicas ajustadas (BLUE) y  $\sigma_g^2$  es la varianza genotípica.

## 3.6 Análisis estadístico genotípico

### 3.6.1 Estructura poblacional

El modelo bayesiano del programa STRUCTURE 2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000a) se utilizó para describir la estructura genética del grupo de líneas de maíz. Este programa permite realizar inferencias sobre la estructura poblacional a partir de las frecuencias alélicas de distintos loci, que puedan compartir un conjunto de genotipos y de esta forma asignarlos probabilísticamente a un sub-grupo  $k$ . El procedimiento utiliza la serie llamada Cadena de Markov Monte Carlo (MCMC), que después de un período de simulación de los procesos iniciales de corrida alcanza un nivel óptimo de convergencia entre el número de iteraciones y el logaritmo de la asignación probabilística ( $\ln P(D)$ ). Este valor se obtiene calculando primero el logaritmo de verosimilitud en cada paso de la MCMC. A continuación, se calcula la media de estos valores y se le resta la mitad de su varianza. Los parámetros utilizados por STRUCTURE fueron el modelo ancestral “*admixture*” con un período de 10.000 iteraciones seguido de 10.000 repeticiones de MCMC. Se realizaron 10 corridas independientes para cada valor de  $k$  que varió entre 2 y 10. Para determinar el número óptimo de  $k$  se utilizó la metodología del número de agrupamientos más probable según Evanno *et al.* (2005). Estos autores proponen una estadística basada en la tasa de cambio de segundo orden en el logaritmo de probabilidad de los datos entre valores de  $k$  sucesivos ( $\Delta k$ ). La metodología muestra un pico claro en el número de  $k$  más probable. Para aplicar esta metodología se utilizó el sitio web STRUCTURE HARVESTER (Earl y vonHoldt, 2012). Un análisis molecular de la varianza (AMOVA) (Excoffier *et al.*, 1992)

entre los sub-grupos se realizó con INFOGEN (Balzarini y Di Rienzo, 2017) para investigar diferencias entre los sub-grupos formados por STRUCTURE. También se calculó la correlación entre líneas o genotipos dentro de un mismo sub-grupo, mediante el coeficiente  $Phi_{ST}$ , relativa a la correlación entre cualquier par de líneas o genotipos seleccionado al azar del total.

### 3.6.2 Diversidad genética

La diversidad genética y el contenido de información polimórfica se estimaron mediante el programa INFOGEN. La diversidad genética es una medida de variabilidad apropiada para poblaciones de líneas endocriadas, en las que hay muy pocos individuos heterocigotos pero muchos tipos diferentes de alelos que se encuentran en homocigosis. La diversidad genética es una función de la heterocigosis y se calcula a partir de la suma de cuadrados de frecuencias alélicas. Así, para  $m$  loci, la diversidad genética (D) promedio es:

$$D = 1 - \frac{1}{m} \sum_{j=1}^m \sum_{i=1}^l p_{ij}^2$$

donde  $p_{ij}$  es la frecuencia del alelo  $i$  en el *locus*  $j$  (Balzarini *et al.*, 2010).

El contenido de información polimórfica (PIC) según Botstein *et al.* (1980) es definido como:

$$PIC = 2 \sum_{i=2}^l \sum_{j=1}^{i-1} \left[ p_i p_j (1 - p_i p_j) \right]$$

Para el ordenamiento de las líneas basado en la caracterización molecular se realizó un análisis de componentes principales mediante el programa TASSEL 5.2.40 (Bradbury *et al.*, 2007) combinando la información provista por todos los marcadores.

### 3.6.3 Parentesco relativo y distancia genética

La matriz de estimaciones de parentesco y la matriz de distancia genética de Nei (Nei, 1972) por pares de líneas se calcularon con el programa TASSEL 5.2.40 (Bradbury *et al.*, 2007). Estas matrices se realizaron con 45.925 marcadores SNPs.

### 3.6.4 Desequilibrio de ligamiento

El programa TASSEL 5.2.40 (Bradbury *et al.*, 2007) se utilizó para calcular el desequilibrio de ligamiento entre 45.925 marcadores SNPs. Con el objetivo de observar el DL en la población se calculó el valor de  $r^2$  en las líneas de maíz. Para tener una visión general del DL presente en todo el genoma y observar bloques de ligamientos se presentaron los gráficos de DL por pares de marcadores para cada uno de los 10 cromosomas del genoma del maíz. El grado de DL en todo el genoma se evaluó en función del valor del coeficiente de correlación al cuadrado entre pares de marcadores ( $r^2$ ) y la distancia física entre SNPs (Remington *et al.*, 2001).

## 3.7 Análisis estadístico fenotípico-genotípico

### 3.7.1 Mapeo por asociación

Las medias de cada carácter, del ambiente E1 y los BLUE de los ambientes E8 y E9, fueron los datos utilizados para realizar los análisis de asociación. Luego se estimó la mejor predicción lineal insesgada (BLUP) a través de los tres ambientes mediante el siguiente modelo:

$$y_{ij} = \mu + G_i + E_j + G \times E_{ij}$$

donde  $y_{ij}$  es la observación de la variable respuesta del carácter,  $\mu$  es la media general,  $G_i$  es el efecto aleatorio de genotipo  $E_i \sim N(0, \sigma_g^2)$ ,  $E_j$  es el efecto fijo del ambiente y  $G \times E_{ij}$  es el efecto aleatorio de la interacción genotipo  $\times$  ambiente.

Con el objetivo de establecer el modelo a ser utilizado en el mapeo por asociación se compararon los modelos estadísticos implementados en el programa TASSEL 5.2.40. Estos varían desde el modelo más simple, en el que sólo se considera la matriz de marcadores moleculares y las medias ajustadas fenotípicas, hasta modelos en donde además se tienen en cuenta la relación de parentesco y la estructura genética poblacional. Los modelos comparados fueron: (a) modelo lineal general de efectos fijos sin corrección por estructura poblacional (*naive*); (b) modelo lineal mixto con la matriz de parentesco relativo entre individuos calculada previamente como efecto aleatorio (K) propuesto por Parisseaux y Bernardo (2004); (c) modelo lineal general con la estructura poblacional como covariable de efecto fijo. En este caso se incluyeron dos variantes, el modelo propuesto por Pritchard *et al.* (2000b), que considera la estructura poblacional determinada

mediante STRUCTURE (Q) y el modelo propuesto por Price *et al.* (2006), que considera la estructura poblacional determinada mediante análisis de componentes principales (ACP); y (d) modelo lineal mixto con la matriz de parentesco relativo entre individuos como efecto aleatorio y la estructura poblacional como covariable de efecto fijo. En este último, también se incluyeron dos variantes en la comparación en base a la estructura poblacional utilizada, los modelos propuestos por Zhao *et al.* (2007) (PCA+K), y por Yu *et al.* (2006) (Q+K).

$$a) Y = X\beta + \varepsilon$$

Y = vector fenotípico, X = matriz de marcadores moleculares SNPs,  $\beta$  = vector de efectos alélicos desconocido que se desea estimar,  $\varepsilon$  = error residual.

$$b) Y = X\beta + Zu + \varepsilon$$

Y = vector fenotípico, X = matriz de marcadores moleculares SNPs,  $\beta$  = vector de efectos alélicos desconocido que se desea estimar, Z = matriz de parentesco relativo, u = vector de los efectos poligénicos aleatorios del parentesco,  $\varepsilon$  = error residual.

$$c) Y = X\beta + Qv + \varepsilon$$

Y = vector fenotípico, X = matriz de marcadores moleculares SNPs,  $\beta$  = vector de efectos alélicos desconocido que se desea estimar, Q = estructura poblacional representada por la matriz de CP o la matriz de valores Q obtenidos en el análisis en STRUCTURE, v = vector de los efectos poblacionales,  $\varepsilon$  = error residual.

$$d) Y = X\beta + Zu + Qv + \varepsilon$$

Y = vector fenotípico, X = matriz de marcadores moleculares SNPs,  $\beta$  = vector de efectos alélicos desconocido que se desea estimar, Z = matriz de parentesco relativo, u = vector de los efectos poligénicos aleatorios del parentesco, Q = estructura poblacional representada por la matriz de CP o la matriz de valores Q obtenidos en el análisis en STRUCTURE, v = vector de los efectos poblacionales,  $\varepsilon$  = error residual.

La comparación entre modelos se realizó mediante gráficos de distribución empírica que permiten evaluar la desviación de los valores de probabilidad (valores  $p$ ) observados, para la asociación entre SNPs y los caracteres, de los valores  $p$  esperados bajo la hipótesis nula de ausencia de asociaciones entre los marcadores y los caracteres. El modelo que mejor se ajustó en cada ambiente y para cada carácter, fue seleccionado para realizar la

asociación. La significancia estadística, para declarar la asociación entre un marcador y un carácter, se definió de manera uniforme en el valor umbral  $p \leq 3,18 \times 10^{-5}$ , el cual se obtiene al corregir el valor  $\alpha$  propuesto por el número efectivo de test independientes ( $=\alpha/M_{eff}$ ). Esta corrección es la propuesta por Li y Ji (2005) para controlar falsos positivos cuando se realizan comparaciones múltiples. El valor umbral definido es equivalente a un valor de LOD de 4,00.

### 3.7.2 Regresión lineal múltiple

Para estimar la proporción de variación fenotípica explicada por los SNPs significativos en la asociación, se realizó una regresión lineal múltiple para los BLUE de cada carácter en cada ambiente, y para los BLUP a través de ambientes usando los valores fenotípicos como variable respuesta (Y) y los marcadores moleculares SNPs significativos como predictores (X). Las mejores combinaciones de marcadores en el modelo se dedujeron mediante un procedimiento de selección por etapas basado en el criterio de información de Akaike (AIC).

$$Y_i = \beta_0 + \beta_1 x_{1i} + \beta_2 x_{2i} + \dots + \beta_k x_{ki} + \varepsilon_i$$

$Y_i$  = observación de la variable dependiente (valores fenotípicos de cada carácter) Y,  $x_{1i}$ ,  $x_{2i}$ , ...  $x_{ki}$  = valor de las variables regresoras (marcadores moleculares)  $X_1, X_2, \dots X_k$ .

## CAPÍTULO 4: RESULTADOS

### 4.1 Revisión sistemática y meta-análisis

A partir de la revisión sistemática realizada en 11 bases de datos (en biología y agrícolas) se obtuvo un total de 8.933 estudios no duplicados. Posteriormente, se excluyeron 8.745 estudios por no contener todas las palabras claves utilizadas en la configuración de búsqueda y 188 estudios pasaron a la evaluación por resumen. En esta etapa de evaluación se excluyeron 106 estudios por falta de relación completa con el tema y 82 estudios pasaron a la evaluación por texto completo. En esta última etapa de evaluación se excluyeron 51 estudios por no contener la información necesaria para realizar el meta-análisis. Finalmente, un total de 31 estudios se utilizaron para el meta-análisis. En la Figura 3 se muestra el diagrama de flujo de los estudios recopilados en la revisión sistemática y los criterios de exclusión para el meta-análisis.

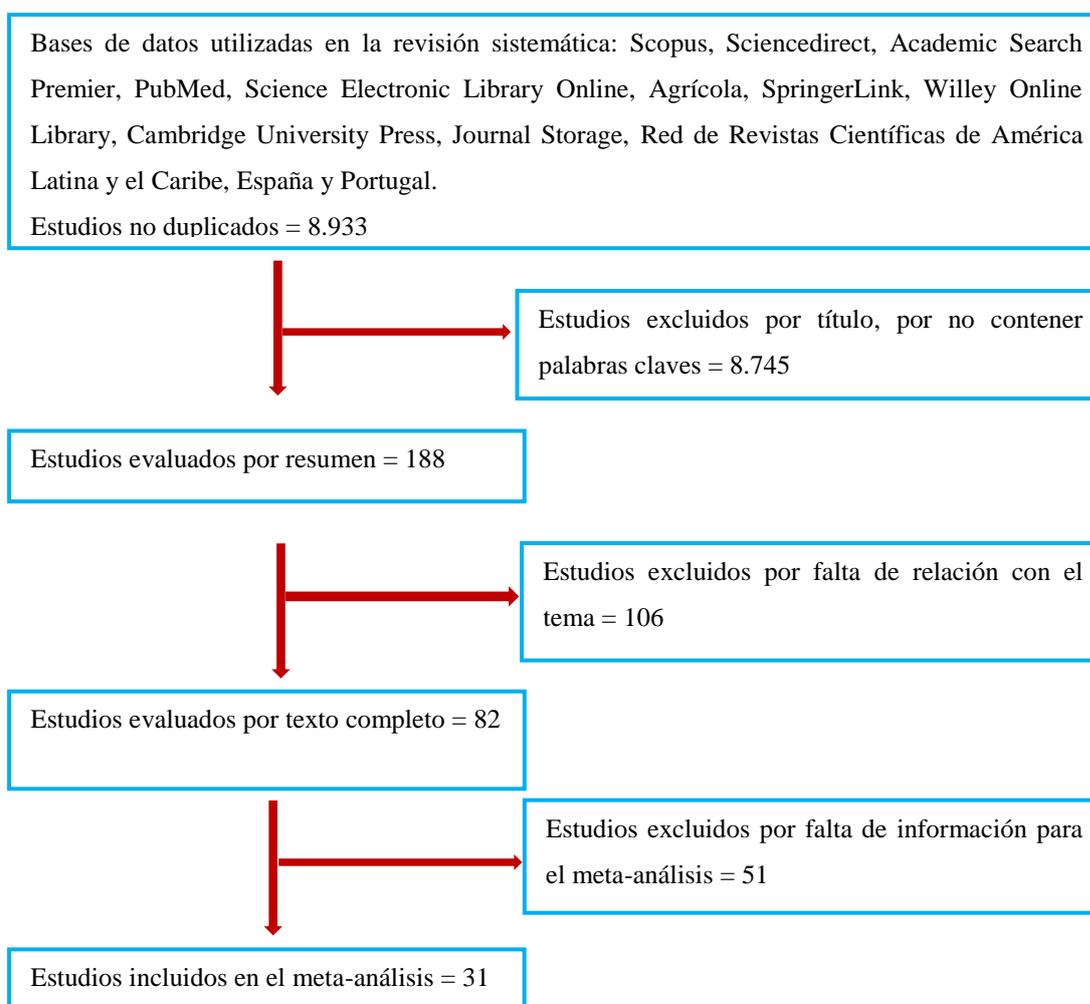


Figura 3. Diagrama de flujo de los estudios recopilados en la revisión sistemática y criterios de exclusión para el meta-análisis.

En el Cuadro 2 se presenta la información referida a los estudios primarios que informan QTL para la resistencia a enfermedades virales en maíz. En los 31 estudios seleccionados para realizar el meta-análisis se brinda información sobre QTL asociados a la resistencia a 13 enfermedades causadas por virus en el mundo. Las enfermedades virales de maíz informadas en estos estudios corresponden a 12 agentes causales distintos pertenecientes a nueve familias de virus. Entre ellos se encuentran *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV) y *Maize rough dwarf virus* (MRDV) de la familia Fijiviridae, *Barley yellow dwarf virus* (BYDV) de la familia Luteovirus y *Maize streak virus* (MSV) de la familia Geminiviridae. Como miembro de la familia Potyviridae, se menciona *Sugarcane mosaic virus* (SCMV) y como representantes de la familia Rhabdoviridae, se destacan *Maize mosaic virus* (MMV) y *Maize fine streak virus* (MFSV). Mientras que *Maize stripe virus* (MSpV) pertenece a la familia Tenuiviridae y *Maize chlorotic dwarf virus* (MCDV) a la familia Sequiviridae. *Foxtail mosaic virus* (FoM) es miembro de la familia Potexvirus, en tanto que para *Wheat streak mosaic virus* (WSM) poco se conoce acerca de la familia a la que pertenece. *Maize chlorotic mottle virus* (MCMV) es miembro de la familia Tombusviridae. El 70% de los artículos correspondieron a cuatro de los 12 agentes causales mencionados: *Sugarcane mosaic virus* (8 artículos), *Maize streak virus* (6 artículos), *Maize rough dwarf virus* (4 artículos) y *Mal de Río Cuarto virus* (4 artículos). De los 31 estudios, en 27 de ellos se realizó mapeo tradicional de QTL en poblaciones biparentales. De éstos, 16 se realizaron en generaciones tempranas (F2) y 11 en generaciones avanzadas (RIL), mientras que los restantes cuatro aplicaron mapeo por asociación en poblaciones diversas. El tamaño medio de la población para poblaciones en estudios de mapeo por asociación fue de 412 individuos, mientras que para poblaciones F2 y RIL fue de 225 y 153 individuos, respectivamente.

Cuadro 2. Estudios primarios que informan QTL para resistencia a enfermedades virales en maíz.

| Estudio                        | Virus                                | Germoplasma             | Población de mapeo |         |
|--------------------------------|--------------------------------------|-------------------------|--------------------|---------|
|                                |                                      |                         | Tipo               | Tamaño  |
| Bonamico <i>et al.</i> (2012)  | MRCV                                 | BLS14 × Mo17            | RIL                | 145     |
| Bonamico <i>et al.</i> (2013)  | MRCV                                 | BLS14 × Mo17            | RIL                | 145     |
| Chen <i>et al.</i> (2015)      | MRDV                                 | DP                      | IL                 | 527     |
| de Souza <i>et al.</i> (2008)  | SCMV                                 | L520 × L19              | F2                 | 150     |
| Di Renzo <i>et al.</i> (2004)  | MRCV                                 | BLS14 × Mo17            | F2                 | 227     |
| Dintinger <i>et al.</i> (2005) | MStV                                 | Rev81 × B73             | F2                 | 157     |
| Dintinger <i>et al.</i> (2014) | MMV-MSpV                             | MP705 × B73             | RIL                | 174     |
| Duße <i>et al.</i> (2000)      | SCMV                                 | FAP1360A × F7           | F2                 | 121     |
| Gowda <i>et al.</i> (2015)     | MCMV-SCMV                            | DP                      | IL                 | 615     |
| Horn <i>et al.</i> (2014)      | BYDV                                 | DP                      | IL                 | 267     |
| Horn <i>et al.</i> (2015)      | BYDV                                 | Ky226 - W64A - FAP1360A | F2F4               | 443     |
| Ji <i>et al.</i> (2010)        | FoMV                                 | Mo17 × B73              | RIL                | 94      |
| Jones <i>et al.</i> (2004)     | MCDV                                 | Oh1V1 × Va35            | F2                 | 314     |
| Kyetere <i>et al.</i> (1999)   | MSV                                  | Tzi4 × Hi34             | RIL                | 87      |
| Lagat <i>et al.</i> (2008)     | MSV                                  | MAL13 × MAL9            | F2S4               | ...     |
| Li <i>et al.</i> (2016)        | SCMV                                 | DP                      | IL                 | 527     |
| Liu <i>et al.</i> (2009)       | SCMV                                 | Huangzao4 × Mo17        | RIL                | 239     |
| Luan <i>et al.</i> (2012)      | MRDV                                 | 90110 × Ye478           | RIL                | 120     |
| Ming <i>et al.</i> (1997)      | MMV                                  | Hi31 × Kil4             | RIL                | 96      |
| Nair <i>et al.</i> (2015)      | MSV                                  | CML206 × CML312         | F2                 | 253     |
| Pernet <i>et al.</i> (1999a)   | MSV                                  | CIRAD390 × B73          | F2                 | 191     |
| Pernet <i>et al.</i> (1999b)   | MSV                                  | D211 × B73              | F2                 | 165     |
| Rossi <i>et al.</i> (2015)     | MRCV                                 | LP116 × B73             | F2                 | 208     |
| Shi <i>et al.</i> (2012)       | MRDV                                 | X178 × B73              | RIL                | 89      |
| Soldanova (2012)               | SCMV                                 | TR42 × TR56             | F3                 | 120     |
| Tao <i>et al.</i> (2013)       | MRDV                                 | NT401-NT399-NT409-NT    | BC1F2              | 211     |
| Welz <i>et al.</i> (1998)      | MSV                                  | CML202 × Lo951          | F2                 | 196     |
| Xia <i>et al.</i> (1999)       | SCMV                                 | D32 × D145              | F2                 | 219     |
| Yuan <i>et al.</i> (2003)      | SCMV                                 | FAP1360A × F7           | F2                 | 121     |
| Zambrano <i>et al.</i> (2014a) | MDMV-SCMV-<br>WSMV-MCDV-<br>MMV-MFSV | Oh1V1 × Oh28            | RIL                | 260     |
| Zambrano <i>et al.</i> (2014b) | MFSV                                 | Ki11×B73/Oh1VI×Oh28     | RIL                | 193/256 |

MRCV: *Mal de Río Cuarto virus*; MRDV: *Maize rough dwarf virus*; MSpV: *Maize stripe virus*; MMV: *Maize mosaic virus*; SCMV: *Sugarcane mosaic virus*; MCMV: *Maize chlorotic motile virus*; BYDV: *Barley yellow dwarf virus*; FoMV: *Foxtail mosaic virus*; MCDV: *Maize chlorotic dwarf virus*; MSV: *Maize streak virus*; MDMV: *Maize dwarf mosaic virus*; WSMV: *Wheat streak mosaic virus*; MFSV: *Maize fine streak virus*. DP= Diverse population. IL= Inbred line. RIL= Recombinant inbred line.

Los 31 estudios primarios que participaron en el MA informaron un total de 217 QTL para enfermedades causadas por virus en maíz, de los cuales 104 son de efecto mayor (QTL con R<sup>2</sup> mayor al percentil 75). Los cromosomas 1 y 3 presentaron mayor número de QTL, 56 y 31, respectivamente. Los cromosomas 7 y 9 poseen menor número de QTL para

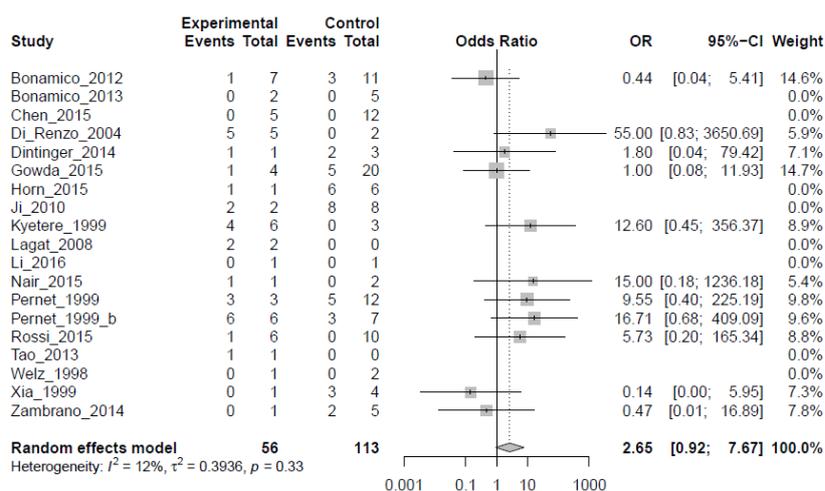
resistencia a enfermedades causadas por virus en maíz. La Figura 4 muestra los gráficos *Forest Plot* del meta-análisis para los *odd ratio* (OR) entre la cantidad de QTL de efecto mayor de los cromosomas 1, 6 y 10, y la cantidad de QTL de efecto mayor en el resto del genoma de maíz. Trabajos incluidos más de una vez significa un carácter distinto. El meta-análisis sugiere que en los cromosomas 1, 6 y 10 las chances de encontrar QTL de efecto mayor para resistencia a enfermedades virales en maíz duplican las chances de encontrarlos en el resto del genoma (Cuadro 3, Figura 4). En el resto de los cromosomas, las chances de encontrar QTL de efecto mayor no se diferenciaron de las chances de encontrar esos QTL en el resto del genoma (Anexo, Figuras 16 y 17).

Cuadro 3. Número de QTL y chances (*odd ratio*=OR) de encontrar loci de efecto mayor para resistencia a virus en los 10 cromosomas de maíz.

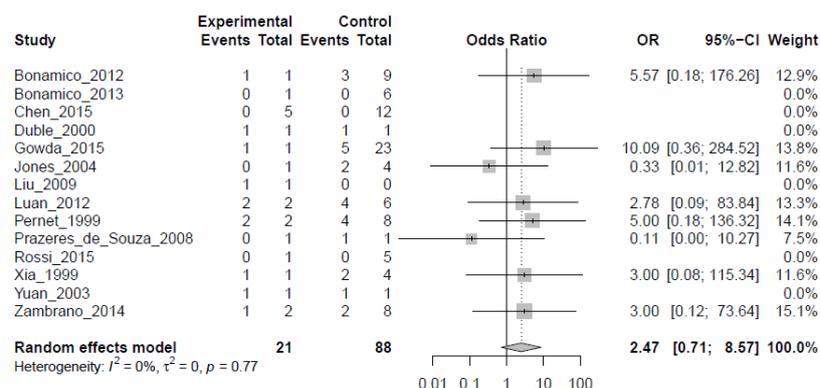
| Cromosoma | Número de QTL | OR                    |
|-----------|---------------|-----------------------|
| 1         | 56            | 2,65<br>[0,92; 7,67]  |
| 2         | 18            | 0,42<br>[0,08; 2,13]  |
| 3         | 31            | 0,50<br>[0,14; 1,82]  |
| 4         | 12            | 0,14<br>[0,02; 0,84]  |
| 5         | 21            | 1,22<br>[0,07; 22,19] |
| 6         | 21            | 2,47<br>[0,71; 8,57]  |
| 7         | 6             | 0,33<br>[0,03; 3,51]  |
| 8         | 19            | 0,68<br>[0,15; 2,99]  |
| 9         | 4             | 0,08<br>[0,00; 2,24]  |
| 10        | 29            | 2,29<br>[0,76; 6,90]  |

\*Corchetes indican intervalos de confianza (95%)

### Cromosoma 1



### Cromosoma 6



### Cromosoma 10

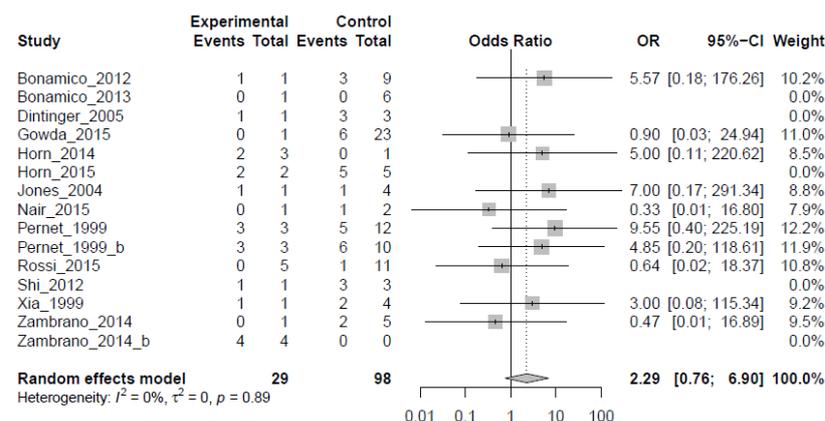


Figura 4. Gráficos *Forest Plot* del meta-análisis realizado con 31 estudios donde se identifican QTL para resistencia a enfermedades virales en maíz. Se presentan los *odds ratio* (OR) entre la cantidad de QTL de efecto mayor de los cromosomas 1, 6 y 10 y la cantidad de QTL de efecto mayor en el resto del genoma de maíz.

## 4.2 Análisis estadístico fenotípico

### 4.2.1 Gráfico de sectores, histogramas y medidas de resumen

La proporción de las diferentes categorías observadas en el carácter severidad (SEV) de la enfermedad MRC, para cada uno de los ambientes de evaluación se muestra en la Figura 5. Las distribuciones de frecuencias en estos gráficos permiten observar tres grupos de ambientes. Por un lado, los ambientes E8 y E9 donde se observa mayor proporción de genotipos con presencia de enfermedad. En otro grupo de ambientes se podría ubicar a los ambientes E1 y E7 donde se observa menor proporción de genotipos con enfermedad, pero la mayoría de esos genotipos presentaron los síntomas más severos (grado de severidad 3). Por último, los ambientes E2, E3, E4, E5, y E6 constituyen el grupo de ambientes donde la mayor proporción de genotipos no presentó síntomas de la enfermedad MRC (grado de severidad 0).

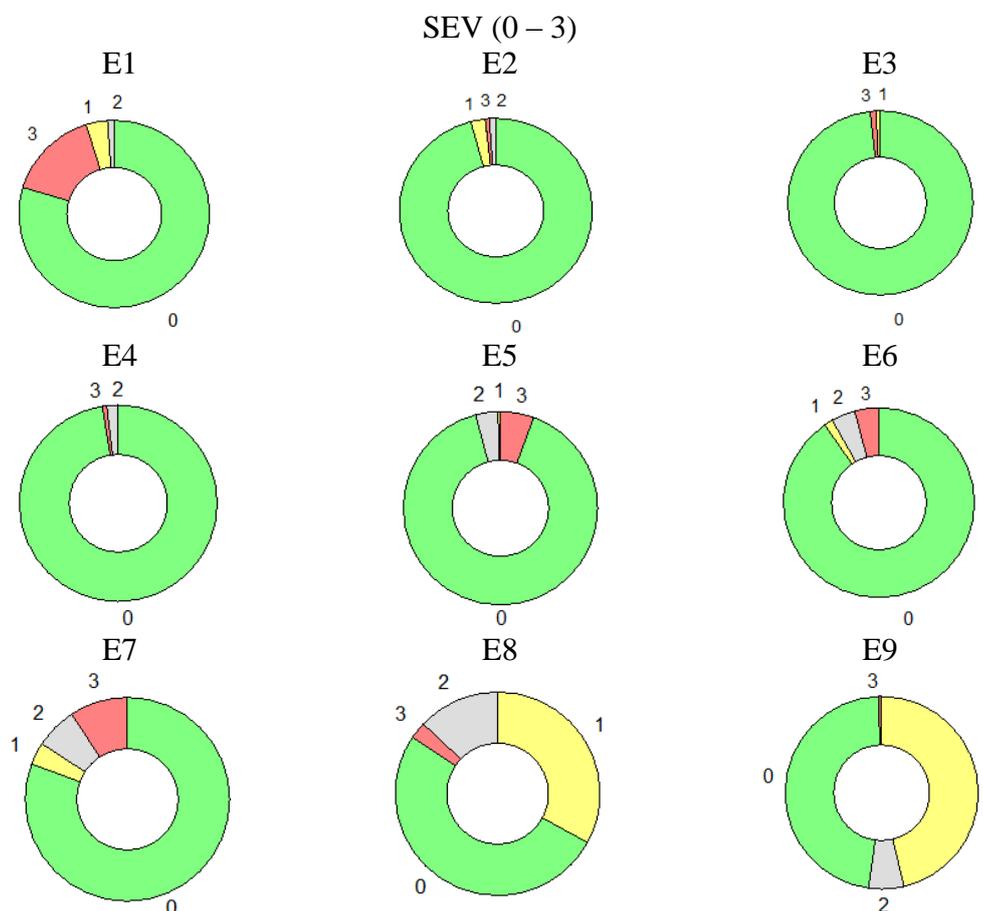


Figura 5. Distribución de la frecuencia poblacional del grado de severidad (SEV) de la enfermedad Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. (E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E2: Chaján 2° fecha de siembra 2015/2016; E3: Río Cuarto 2015/2016; E4: Río Cuarto 2016/2017; E5: Chaján 2016/2017; E6: Rodeo Viejo 1° fecha de siembra 2016/2017; E7: Rodeo Viejo 2° fecha de siembra 2016/2017; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018).

En las Figuras 6 y 7 se muestran los gráficos de distribuciones de frecuencia relativa de los caracteres incidencia (INC) e índice de severidad (ISE) de la enfermedad Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT, en cada uno de los ambientes de evaluación. En todos los casos, la distribución se asemeja a una distribución sesgada hacia la derecha. En los ambientes E1, E8 y E9 se observa una mayor frecuencia de genotipos con valores mayores de ambos caracteres, INC e ISE, lo cual indica que estos ambientes fueron los más afectados por la enfermedad MRC.

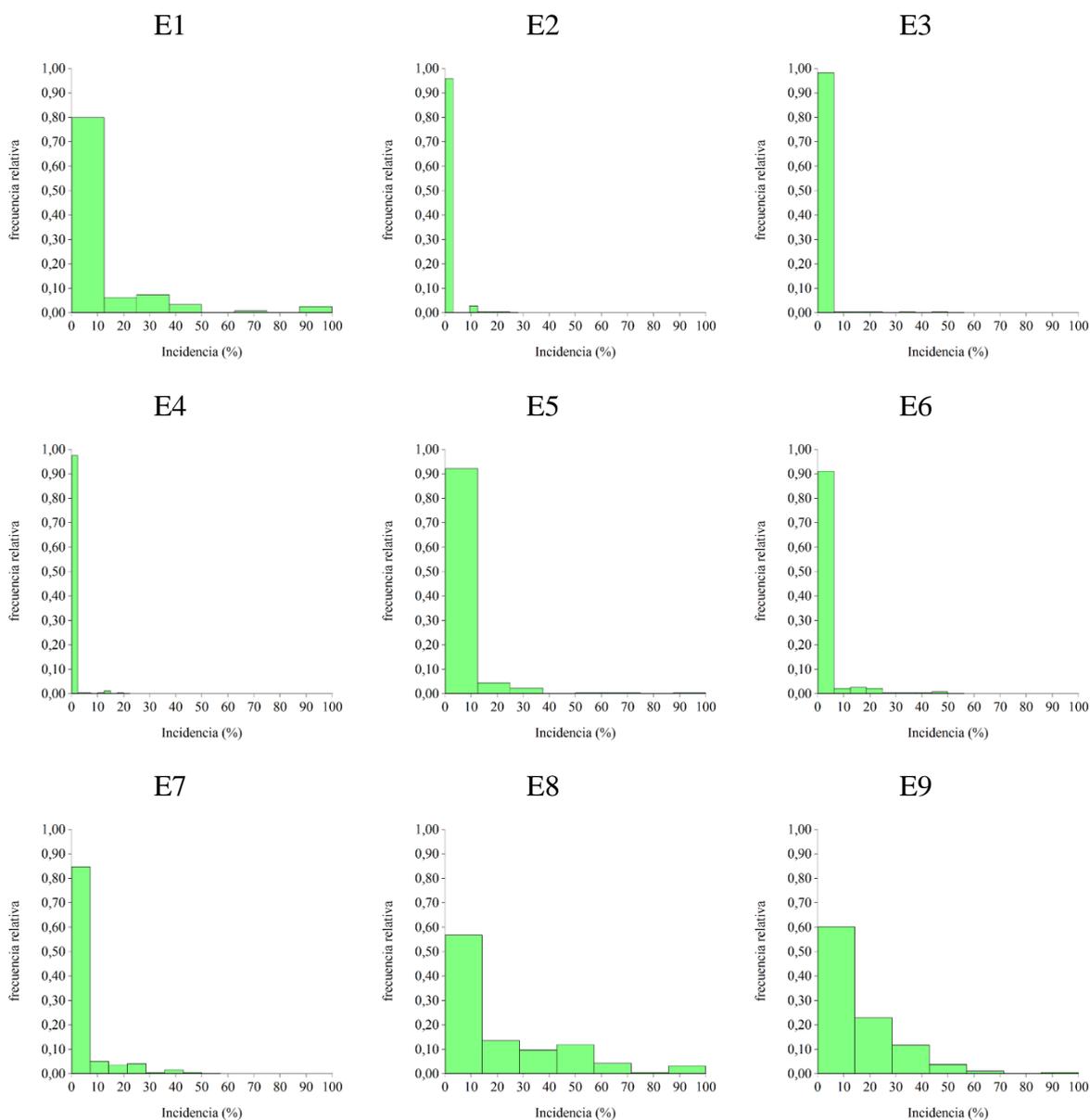


Figura 6. Distribución de la frecuencia relativa de la incidencia (INC) de la enfermedad Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E2: Chaján 2° fecha de siembra 2015/2016; E3: Río Cuarto 2015/2016; E4: Río Cuarto 2016/2017; E5: Chaján 2016/2017; E6: Rodeo Viejo 1° fecha de siembra 2016/2017; E7: Rodeo Viejo 2° fecha de siembra 2016/2017; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018

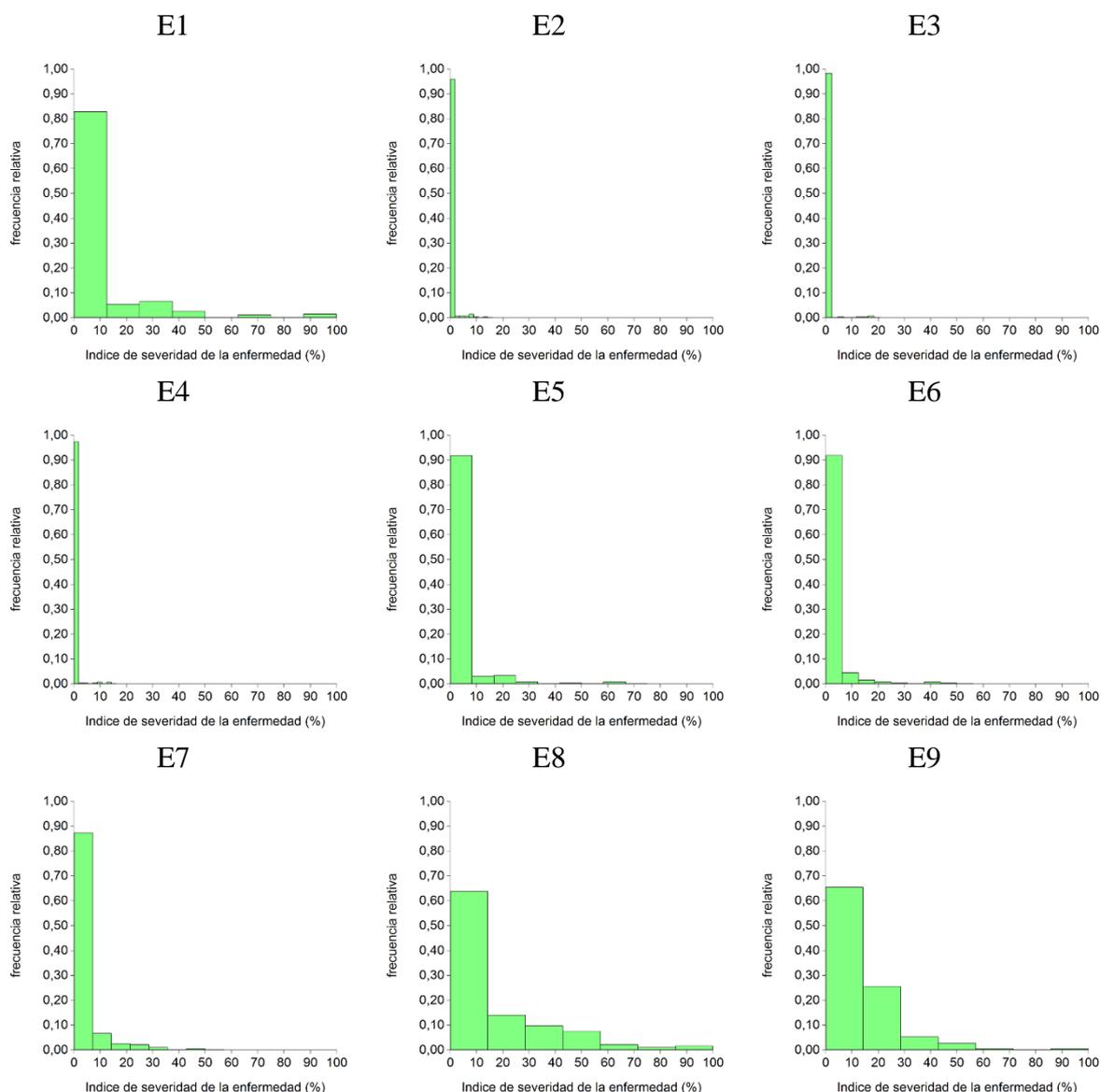


Figura 7. Distribución de la frecuencia relativa del índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E2: Chaján 2° fecha de siembra 2015/2016; E3: Río Cuarto 2015/2016; E4: Río Cuarto 2016/2017; E5: Chaján 2016/2017; E6: Rodeo Viejo 1° fecha de siembra 2016/2017; E7: Rodeo Viejo 2° fecha de siembra 2016/2017; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018

La presencia de enfermedad se observó en los nueve ambientes de evaluación, ya que el valor medio en cada uno de los tres caracteres fue distinto de cero (Cuadro 4). Se observa también que los ambientes E2, E3 y E4 fueron los menos afectados por la enfermedad, mientras que E1, E8 y E9 fueron los ambientes más afectados la enfermedad. Entre ellos se destacó el ambiente E8 como el de mayor presencia de la enfermedad Mal de Río Cuarto, ya que registró los valores medios superiores, 0,45, 19% y 15% para los caracteres SEV,

INC e ISE, respectivamente (Cuadro 4). Los ambientes E1, E8 y E9 fueron los utilizados para el análisis de asociación.

Cuadro 4. Número de líneas (n), valor medio (Media), valor mínimo (Mín.) y valor máximo (Máx.) para severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en nueve ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.

| Ambiente | Caracteres |       |      |      |         |       |      |        |         |       |      |        |
|----------|------------|-------|------|------|---------|-------|------|--------|---------|-------|------|--------|
|          | SEV (0-3)  |       |      |      | INC (%) |       |      |        | ISE (%) |       |      |        |
|          | n          | Media | Mín. | Máx. | n       | Media | Mín. | Máx.   | n       | Media | Mín. | Máx.   |
| E1       | 274        | 0,20  | 0,00 | 3,00 | 274     | 8,26  | 0,00 | 100,00 | 274     | 6,90  | 0,00 | 100,00 |
| E2       | 288        | 0,01  | 0,00 | 3,00 | 288     | 0,57  | 0,00 | 25,00  | 288     | 0,28  | 0,00 | 14,30  |
| E3       | 287        | 0,01  | 0,00 | 3,00 | 287     | 0,45  | 0,00 | 50,00  | 287     | 0,24  | 0,00 | 18,50  |
| E4       | 274        | 0,01  | 0,00 | 3,00 | 274     | 0,31  | 0,00 | 20,00  | 274     | 0,23  | 0,00 | 14,29  |
| E5       | 268        | 0,06  | 0,00 | 3,00 | 268     | 2,62  | 0,00 | 100,00 | 268     | 2,07  | 0,00 | 66,67  |
| E6       | 270        | 0,05  | 0,00 | 3,00 | 270     | 1,95  | 0,00 | 50,00  | 270     | 1,46  | 0,00 | 50,00  |
| E7       | 196        | 0,08  | 0,00 | 3,00 | 196     | 3,45  | 0,00 | 50,00  | 196     | 2,57  | 0,00 | 50,00  |
| E8       | 185        | 0,45  | 0,00 | 3,00 | 185     | 18,98 | 0,00 | 100,00 | 185     | 14,92 | 0,00 | 100,00 |
| E9       | 188        | 0,32  | 0,00 | 3,00 | 188     | 12,98 | 0,00 | 100,00 | 188     | 10,77 | 0,00 | 100,00 |

E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E2: Chaján 2° fecha de siembra 2015/2016; E3: Río Cuarto 2015/2016; E4: Río Cuarto 2016/2017; E5: Chaján 2016/2017; E6: Rodeo Viejo 1° fecha de siembra 2016/2017; E7: Rodeo Viejo 2° fecha de siembra 2016/2017; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018.

#### 4.2.2 Heredabilidad

En el Cuadro 5 se presentan las estimaciones de los componentes de varianza estimadas a partir del modelo lineal mixto para SEV, INC e ISE del Mal de Río Cuarto en ambientes individuales. Los ambientes E1, E2 y E3 no se presentan, ya que el diseño sin repeticiones utilizado en ellos no permite discriminar la estimación de la varianza entre genotípica y residual. Los mayores valores de varianza genotípica para los tres caracteres se observan en los ambientes E8 y E9, donde la presión natural de la enfermedad fue mayor y permitió discriminar a los genotipos. Los valores de heredabilidad generalizada estimada oscilaron entre 0,60 y 0,71 para SEV, entre 0,63 y 0,70 para INC y entre 0,63 y 0,71 para ISE.

Cuadro 5. Estimación de los componentes de varianza y de la heredabilidad generalizada ( $\bar{H}^2$ ) para severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en seis ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.

| Ambiente | SEV (0-3)    |           |             | INC (%)      |           |             | ISE (%)      |           |             |
|----------|--------------|-----------|-------------|--------------|-----------|-------------|--------------|-----------|-------------|
|          | $\sigma_g^2$ | $\bar{v}$ | $\bar{H}^2$ | $\sigma_g^2$ | $\bar{v}$ | $\bar{H}^2$ | $\sigma_g^2$ | $\bar{v}$ | $\bar{H}^2$ |
| E4       | 0,002        | 0,002     | 0,604       | 3,648        | 4,260     | 0,631       | 2,074        | 2,320     | 0,641       |
| E5       | 0,053        | 0,060     | 0,638       | 85,193       | 101,830   | 0,626       | 54,317       | 64,100    | 0,629       |
| E6       | 0,029        | 0,030     | 0,658       | 49,562       | 49,790    | 0,666       | 33,872       | 34,170    | 0,665       |
| E7       | 0,048        | 0,040     | 0,708       | 74,132       | 75,760    | 0,662       | 54,464       | 48,130    | 0,694       |
| E8       | 0,490        | 0,430     | 0,695       | 716,633      | 619,840   | 0,698       | 549,434      | 447,200   | 0,711       |
| E9       | 0,202        | 0,200     | 0,669       | 288,660      | 257,970   | 0,691       | 224,101      | 204,330   | 0,687       |

E4: Río Cuarto 2016/2017; E5: Chaján 2016/2017; E6: Rodeo Viejo 1° fecha de siembra 2016/2017; E7: Rodeo Viejo 2° fecha de siembra 2016/2017; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018.  $\sigma_g^2$ : varianza genotípica;  $\bar{v}$ : varianza media de la diferencia de dos medias genotípicas ajustadas (BLUE);  $\bar{H}^2$ : heredabilidad generalizada

### 4.3 Análisis estadístico genotípico

#### 4.3.1 Estructura poblacional

Para describir la estructura genética poblacional en el grupo de líneas de maíz utilizadas en el presente estudio, se utilizaron 7.584 marcadores moleculares SNPs. El valor del logaritmo de asignación probabilística  $-\ln P(D)$  para cada hipotético  $k$  fue mayor para  $k = 2$ ,  $k = 3$ ,  $k = 6$  y  $k = 10$ , además fueron los que presentaron menores desvíos (Figura 8 A). El máximo valor del estadístico *ad hoc*  $\Delta k$  se alcanzó con  $k = 3$ , observándose un segundo pico de menor valor en  $k = 6$  (Figura 8 B). Si se comparan estos resultados con información de las líneas provistas por CIMMYT, la asignación de éstas a los diferentes grupos en  $k = 3$  es la más consistente con el criterio de adaptación ambiental y representa más adecuadamente la diversidad de orígenes de la población. Por lo tanto, al confirmar la presencia de tres grupos, la estructura genética presente en la población de las líneas está dada por la diferente adaptación ambiental (Figura 8 C). La presencia de estratificación en la estructura genética de la población se observó también al realizar el análisis molecular de la varianza, el cual indicó que la variación genética total se repartió en un 4% entre grupos y un 96% dentro de los grupos (Cuadro 6). El valor del coeficiente  $Phi_{ST}$  de 0,04, estadísticamente significativo (valor  $p < 0,0001$ ), sugiere que el factor grupo es el que produce la estructuración genética.

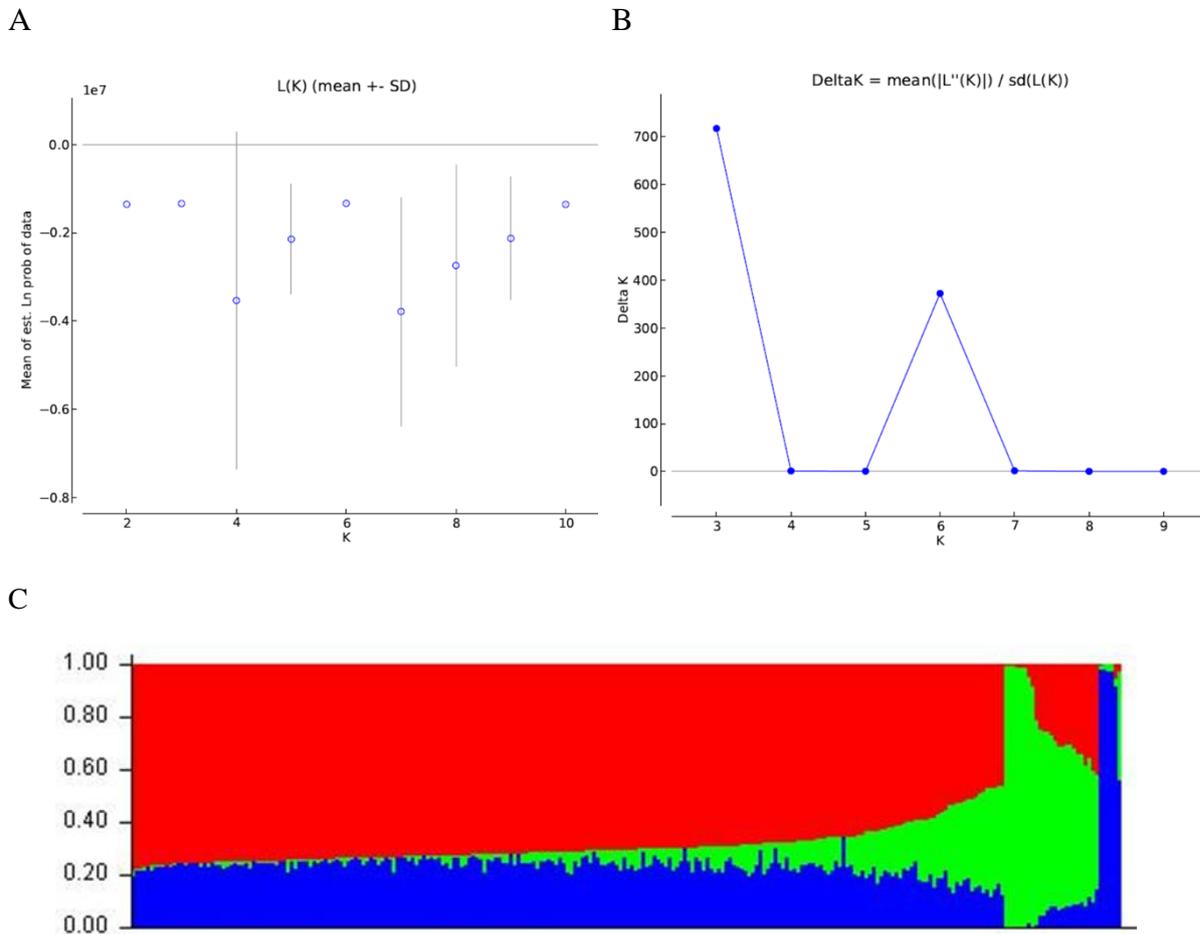


Figura 8. Estructura poblacional de líneas de maíz de CIMMYT. A) Valor del logaritmo de asignación probabilística  $-\ln P(D)$  estimado. B)  $\Delta k$  obtenidos con STRUCTURE. C) Estructura de la población con  $k$  establecido en tres grupos.

Cuadro 6. Análisis molecular de la varianza (AMOVA) entre grupos definidos según adaptación ambiental de las líneas de maíz de CIMMYT.

| Fuente de Variación | SC    | GL  | CM   | Valor $p$ | %      |
|---------------------|-------|-----|------|-----------|--------|
| Entre grupos        | 1,44  | 2   | 0,72 | <0,0001   | 4,16   |
| Dentro de grupos    | 47,47 | 255 | 0,19 | <0,0001   | 95,84  |
| Total               | 48,91 | 261 | 0,19 |           | 100,00 |

SC: Suma de cuadrados; GL: Grados de libertad; CM: Cuadrado medio.

### 4.3.2 Diversidad genética

La diversidad genética y el contenido de información polimórfica (PIC) fueron calculados para estimar la variabilidad genética de las líneas de maíz del CIMMYT y para cada uno de los grupos definidos según adaptación ambiental. Los valores de diversidad genética y de PIC totales fueron 0,52 y 0,46. Para cada grupo los valores de diversidad genética variaron entre 0,42 y 0,52 y los valores de PIC entre 0,35 y 0,45 (Cuadro 7). La Figura 9 muestra el gráfico obtenido a partir del análisis de componentes principales (ACP). Los distintos colores indican los individuos que pertenecen a cada uno de los grupos definidos según adaptación ambiental (A) y a la clasificación según color de grano (B). En el gráfico de la Figura 9 A, la CP1 permite observar en el centro los genotipos del grupo subtropical, mientras que hacia la derecha y hacia la izquierda se ubican los genotipos del grupo Lowland. Dentro del grupo Lowland hay genotipos que presentan amplia distancia genética entre ellos. En la figura 9 B, la CP1 permite diferenciar claramente a los genotipos de grano blanco de los genotipos de grano amarillo.

Cuadro 7. Diversidad genética y contenido de información polimórfica (PIC), estimados con 7.584 marcadores moleculares SNPs de las líneas de maíz de CIMMYT y de cada grupo definido según adaptación ambiental.

| Variabilidad        | Total | Highland | Lowland | Subtropical |
|---------------------|-------|----------|---------|-------------|
| Diversidad genética | 0,52  | 0,42     | 0,52    | 0,52        |
| PIC                 | 0,46  | 0,35     | 0,45    | 0,45        |

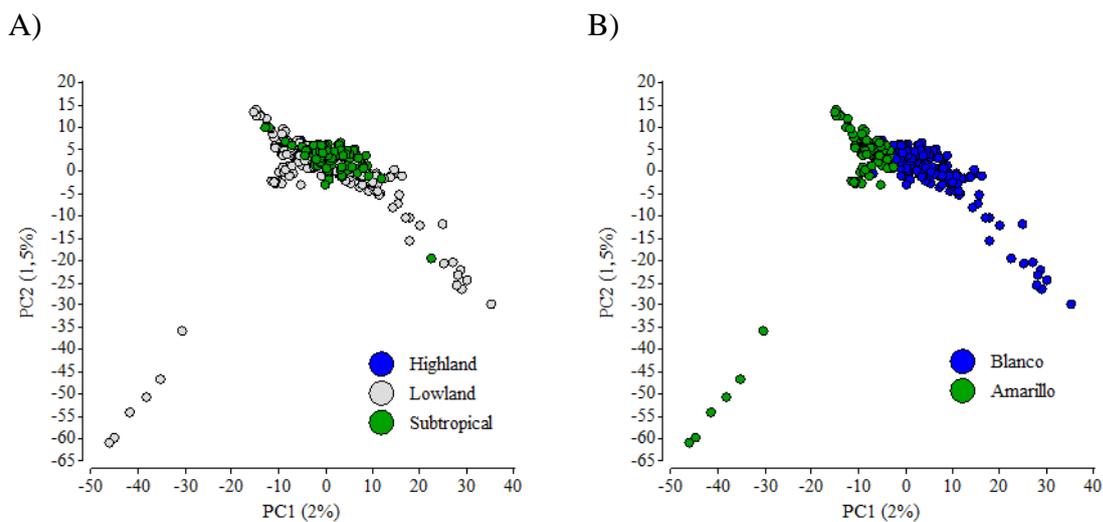


Figura 9. Gráfico del análisis de componentes principales de líneas de maíz de CIMMYT obtenido a partir de 45.925 marcadores moleculares SNPs. A) Clasificación según adaptación. B) Clasificación según color de grano.

### 4.3.3 Parentesco relativo y distancia genética

La estimación de parentesco relativo en base a los marcadores moleculares SNPs indica que el 95% de las estimaciones de parentesco entre pares de líneas registraron un valor menor a 0,05 (Figura 10 A). La distancia genética de Nei media entre las comparaciones por pares de líneas mostró un valor de 0,33, dado que el 95% de las comparaciones registraron valores entre 0,30 y 0,40 (Figura 10 B).

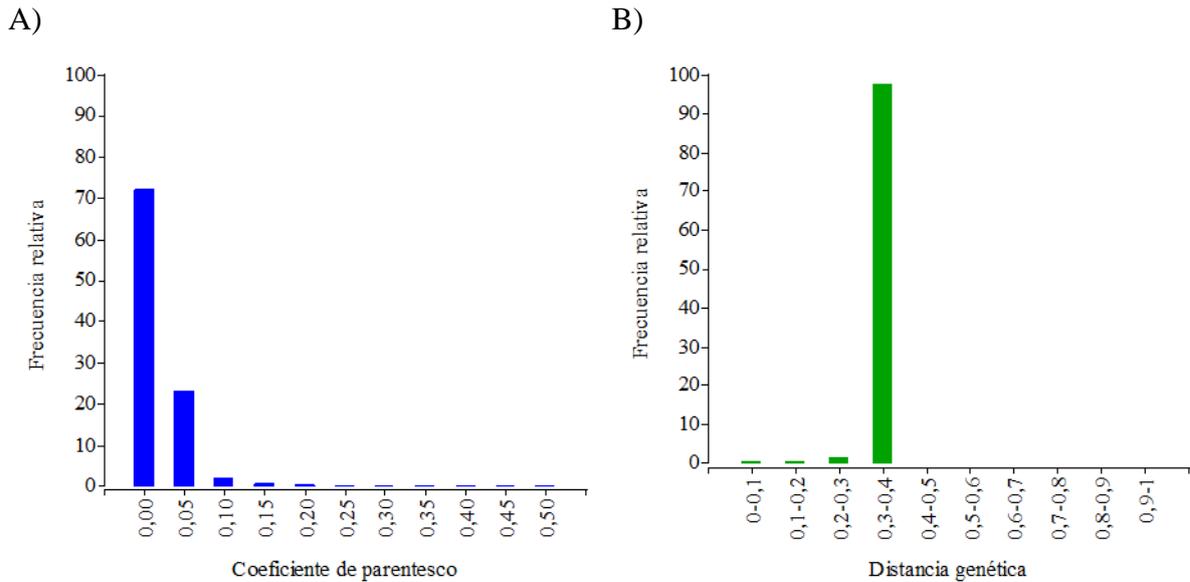


Figura 10. A) Parentesco relativo por pares (coeficiente de parentesco). B) Distancia genética de Nei (B) de líneas de maíz de CIMMYT, estimados mediante 45.925 marcadores moleculares SNPs. Para simplicidad se muestran solamente porcentajes de los coeficientes de parentesco relativo entre 0,00 y 0,50.

### 4.3.4 Desequilibrio de ligamiento

La estimación del desequilibrio de ligamiento entre pares de marcadores se realizó para la totalidad de las líneas de maíz. Para tener una visión general del desequilibrio de ligamiento presente en todo el genoma y observar bloques de ligamientos se presentan los gráficos de desequilibrio de ligamiento por pares de marcadores para cada uno de los diez cromosomas del genoma del maíz (Anexo, Figuras 18 y 19). Para los 45.925 marcadores moleculares utilizados, el DL se observó principalmente entre SNPs con ligamiento físico. En los cromosomas 1, 2 y 8 se observaron grandes bloques de ligamiento, mientras que en el resto de los cromosomas se observaron bloques de ligamiento de menor tamaño, o sólo ligamiento entre pares de marcadores.

Los valores de coeficientes de correlación al cuadrado entre pares de marcadores ( $r^2$ ) en función de la distancia física entre los marcadores SNPs se evaluó para observar la caída del desequilibrio de ligamiento en cada uno de los 10 cromosomas del genoma del maíz. La Figura 11 muestra que a medida que aumenta la distancia entre dos marcadores, el valor de DL disminuye rápidamente, lo cual indica que éste se da entre SNPs adyacentes. La caída del DL varió en los 10 cromosomas y entre las diferentes regiones dentro de cada cromosoma. En este grupo de líneas de maíz, el valor de  $r^2$  en todo el genoma fue menor a 0,10 a partir de una distancia de 10 a 20 kb.

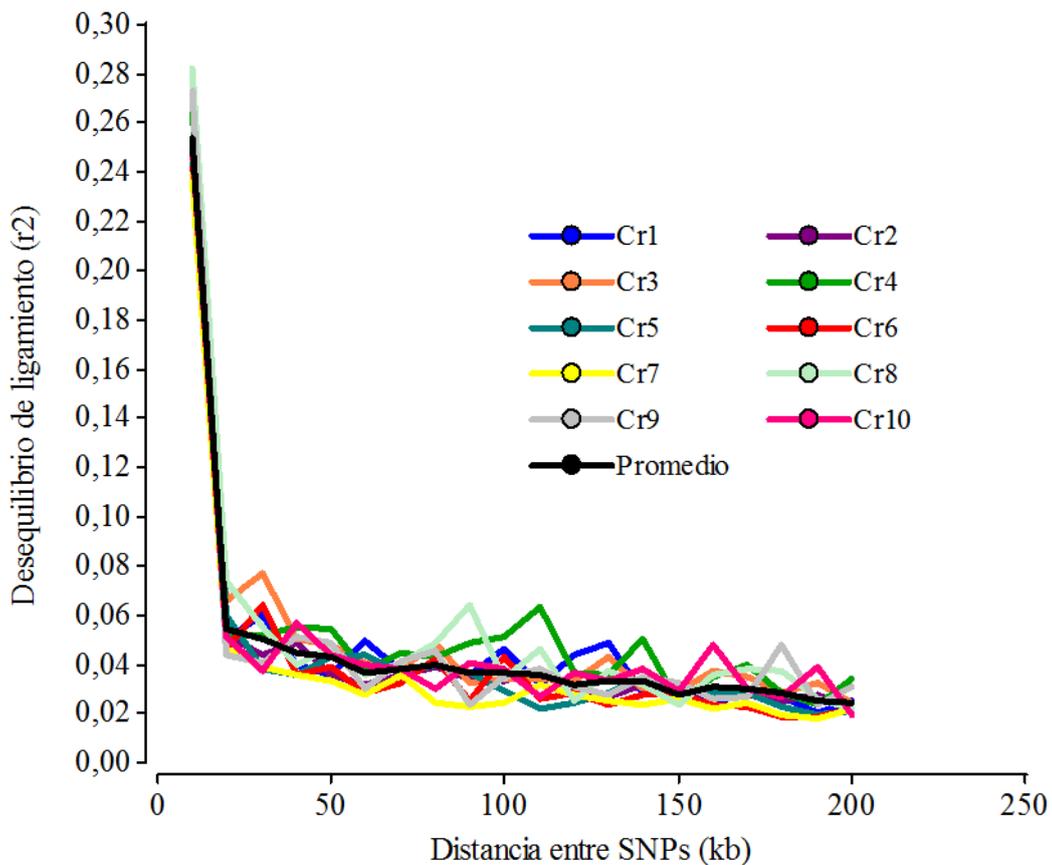


Figura 11. Desequilibrio de ligamiento de líneas de maíz de CIMMYT, estimado mediante 45.925 marcadores moleculares SNPs en todo el genoma.

#### 4.4 Análisis estadístico fenotípico-genotípico

##### 4.4.1 Mapeo por asociación

Los gráficos de distribución empírica permitieron comparar entre los distintos modelos utilizados para analizar los datos. Los gráficos muestran la distribución del  $-\log_{10}$  de los valores  $p$  observados frente al  $-\log_{10}$  de los valores  $p$  esperados bajo la hipótesis nula de que no existe asociación entre marcador y fenotipo. En la Figura 12 se muestran los

gráficos de la distribución empírica, para cada uno de los ambientes y para cada carácter de los seis modelos estadísticos comparados. Se observó que para SEV el modelo Q, el cual considera la estructura poblacional determinada mediante STRUCTURE, fue el que mejor ajustó en el ambiente E1, mientras que para los ambientes E8 y E9 el modelo K que tiene en cuenta la matriz de parentesco relativo entre individuos como efecto aleatorio, fue el de mejor ajuste. En el caso de INC, el modelo PCA+K en el que las componentes principales y la matriz de parentesco relativo son considerados fue el de mejor ajuste en el ambiente E1 y el modelo K en los ambientes E8 y E9. Para el ISE, los modelos Q, PCA+K y K fueron los mejores para los ambientes E1, E8 y E9, respectivamente. Para los BLUP a través de ambientes, el modelo PCA fue el que mejor ajustó para los tres caracteres (Figura 13).

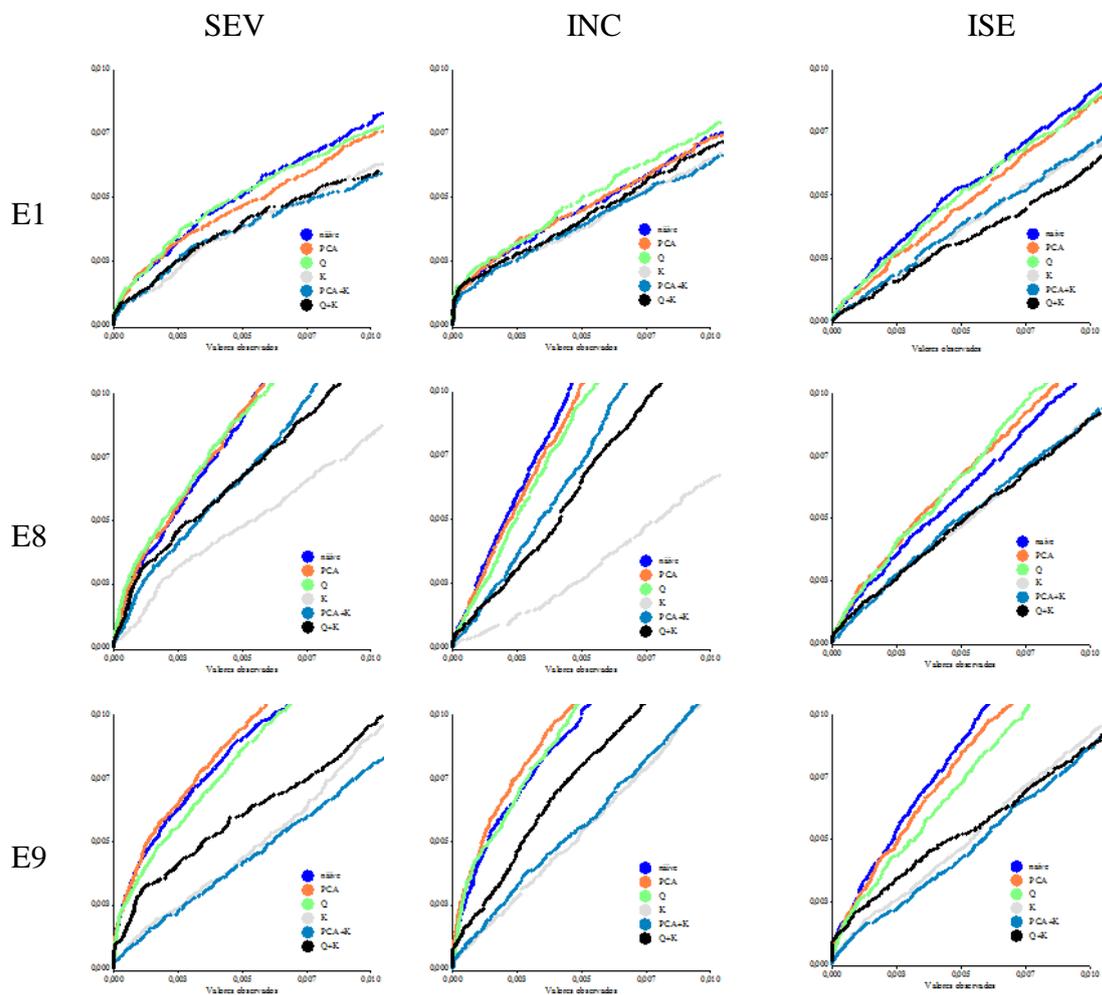


Figura 12. Distribución empírica de los valores  $p$  de severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto (MRC) en tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018.

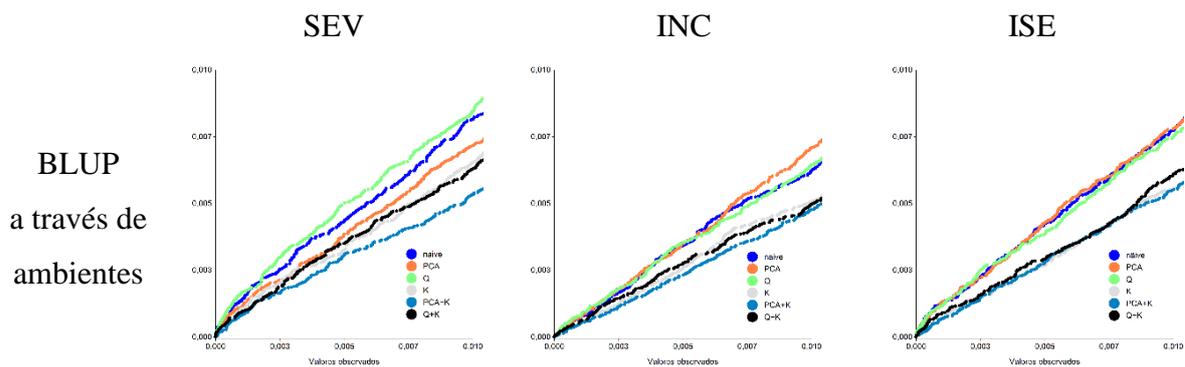
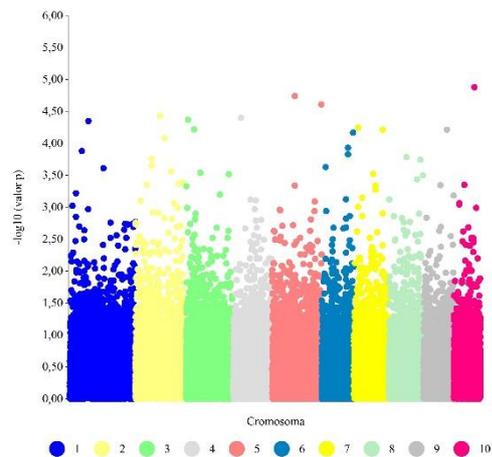


Figura 13. Distribución empírica de los valores  $p$  de severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto (MRC) para los BLUP estimados a través de tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.

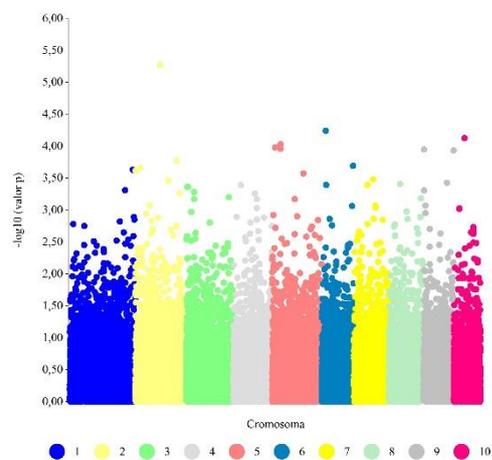
Para los ambientes E1, E8 y E9, y para los BLUP a través de estos ambientes se realizó el análisis de asociación con la finalidad de identificar posibles QTL para SEV, INC e ISE del Mal de Río Cuarto. Como resultado, un total de 54 marcadores moleculares SNPs presentaron asociaciones estadísticamente significativas (valor  $p < 0,0001$  o  $-\log_{10}$  valor  $p > 4,00$ ), considerando la corrección por el número de test efectivos, con SEV, INC e ISE en cada uno de los ambientes y con los BLUP a través de ambientes (Figuras 14, 15 y Cuadros 8, 9). Estos marcadores SNPs se ubicaron en los diez cromosomas del genoma del maíz, siendo en el cromosoma 2 y 5 donde se detectaron mayor número de asociaciones con 11 y 8 marcadores, respectivamente. Para los BLUP a través de ambientes, se identificaron 11 SNPs asociados a SEV, INC e ISE, de los cuales 10 fueron diferentes de los identificados en ambientes individuales. De acuerdo a la posición física de cada SNPs se determinó el bin en el cual se localiza según el mapa de referencia (Anexo, Figuras 20, 21, 22, 23 y 24) obtenido de la página web Maize GDB (<https://www.maizegdb.org>). La subdivisión de cada cromosoma en segmentos denominados bin fue propuesta por Gardiner *et al.* (1993) al desarrollar un mapa genético central del genoma del maíz. Cada bin es un segmento de aproximadamente 20 centiMorgans. Cada bin se designa con el número de cromosoma seguido de un decimal de dos dígitos (por ejemplo, 1.00, 1.01, 1.02, etc.). Esta localización física permitió agrupar a los 54 SNPs en 46 regiones genómicas. La variación fenotípica explicada ( $R^2$ ) por estos QTL osciló entre 6% y 24%, con un valor medio de 10%.

SEV

E1

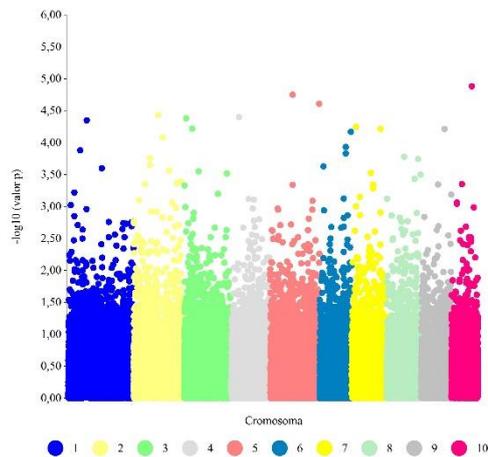


INC



E1

ISE



E8

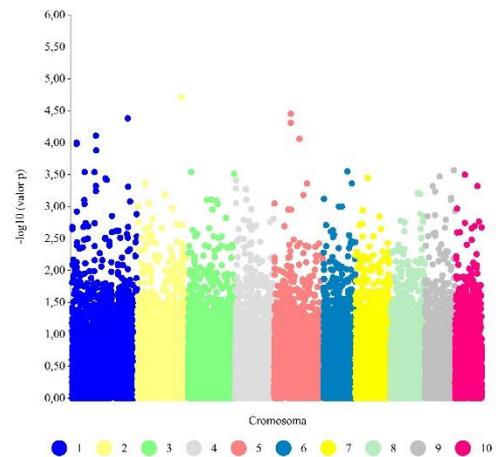


Figura 14. *Manhattan plots* resultantes del análisis de asociación, de todo el genoma para severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto en los ambientes Chaján (E1) y Río Cuarto (E8) de la provincia de Córdoba, Argentina. Se utilizaron 45.925 marcadores moleculares SNPs obtenidos mediante secuenciación. Valor umbral  $-\log_{10}$  valor  $p = 4,00$

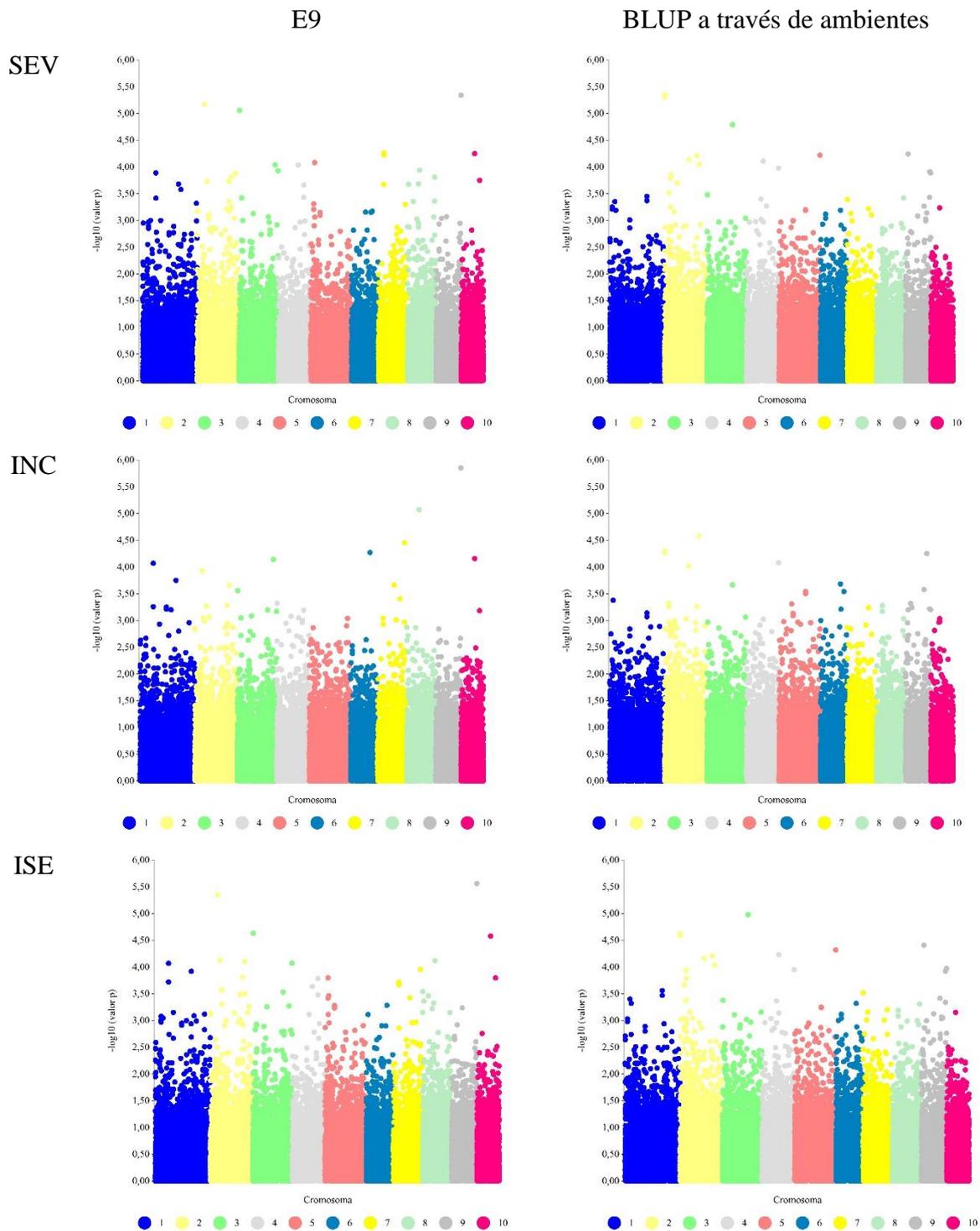


Figura 15. *Manhattan plots* resultantes del análisis de asociación, de todo el genoma para severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto en el ambiente Sampacho (E9) y para los BLUP a través de tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina. Se utilizaron 45.925 marcadores moleculares SNPs obtenidos mediante secuenciación. Valor umbral  $-\log_{10}$  valor  $p = 4,00$

Cuadro 8. Marcadores moleculares SNPs asociados con severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT evaluadas en tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.

| Carácter<br>SNPs | Cromosoma | Bin   | Alelos | Ambiente | Valor $p$             | LOD  | Efecto alélico | $R^2$ |
|------------------|-----------|-------|--------|----------|-----------------------|------|----------------|-------|
| SEV              |           |       |        |          |                       |      |                |       |
| S1_55389746      | 1         | 1.04  | G/C    | E1       | 4,46x10 <sup>-5</sup> | 4,35 | -0,53          | 0,09  |
| S2_14799241      | 2         | 2.02  | C/T    | E9       | 6,69x10 <sup>-6</sup> | 5,17 | -0,76          | 0,20  |
| S2_102285645     | 2         | 2.05  | C/T    | E1       | 3,72x10 <sup>-5</sup> | 4,43 | -0,58          | 0,10  |
| S2_151465957     | 2         | 2.05  | G/T    | E1       | 8,40x10 <sup>-5</sup> | 4,08 | -0,44          | 0,08  |
| S3_1967838       | 3         | 3.01  | A/G    | E9       | 8,78x10 <sup>-6</sup> | 5,06 | -0,36          | 0,13  |
| S3_3707617       | 3         | 3.01  | G/A    | E1       | 4,26x10 <sup>-5</sup> | 4,37 | -0,67          | 0,08  |
| S3_22613548      | 3         | 3.04  | T/A    | E1       | 6,00x10 <sup>-5</sup> | 4,22 | -0,42          | 0,09  |
| S3_220747709     | 3         | 3.09  | A/G    | E9       | 9,12x10 <sup>-5</sup> | 4,04 | -0,46          | 0,11  |
| S4_33885271      | 4         | 4.05  | C/T    | E1       | 4,01x10 <sup>-5</sup> | 4,40 | -0,62          | 0,07  |
| S4_179793747     | 4         | 4.07  | G/A    | E9       | 9,22x10 <sup>-5</sup> | 4,04 | -0,29          | 0,12  |
| S5_5924007       | 5         | 5.01  | G/T    | E9       | 8,27x10 <sup>-5</sup> | 4,08 | -0,47          | 0,12  |
| S5_83859926      | 5         | 5.04  | T/C    | E1       | 1,80x10 <sup>-5</sup> | 4,74 | -0,46          | 0,09  |
| S5_216204537     | 5         | 5.09  | A/C    | E1       | 2,44x10 <sup>-5</sup> | 4,61 | -0,53          | 0,09  |
| S6_166592667     | 6         | 6.07  | C/T    | E1       | 6,81x10 <sup>-5</sup> | 4,17 | -0,58          | 0,07  |
| S7_9913867       | 7         | 7.01  | T/C    | E1       | 5,66x10 <sup>-5</sup> | 4,25 | -0,58          | 0,09  |
| S7_23951563      | 7         | 7.02  | G/C    | E9       | 5,46x10 <sup>-5</sup> | 4,26 | -0,46          | 0,14  |
| S7_23951572      | 7         | 7.02  | A/C    | E9       | 5,93x10 <sup>-5</sup> | 4,23 | -0,47          | 0,14  |
| S7_23951578      | 7         | 7.02  | T/A    | E9       | 5,46x10 <sup>-5</sup> | 4,26 | -0,46          | 0,14  |
| S7_165197592     | 7         | 7.04  | A/G    | E1       | 6,11x10 <sup>-5</sup> | 4,21 | -0,59          | 0,08  |
| S9_140974250     | 9         | 9.06  | A/G    | E1       | 6,13x10 <sup>-5</sup> | 4,21 | -0,49          | 0,08  |
| S9_155585508     | 9         | 9.08  | A/G    | E9       | 4,57x10 <sup>-6</sup> | 5,34 | -0,53          | 0,15  |
| S10_126872937    | 10        | 10.04 | G/A    | E9       | 5,64x10 <sup>-5</sup> | 4,25 | -0,50          | 0,12  |
| S10_138027166    | 10        | 10.06 | T/C    | E1       | 1,32x10 <sup>-5</sup> | 4,88 | -0,56          | 0,10  |
| INC              |           |       |        |          |                       |      |                |       |
| S1_44343943      | 1         | 1.03  | A/G    | E9       | 8,51x10 <sup>-5</sup> | 4,07 | -22,81         | 0,12  |
| S2_102285645     | 2         | 2.05  | C/T    | E1       | 5,40x10 <sup>-6</sup> | 5,27 | -24,49         | 0,12  |
| S2_214063865     | 2         | 2.08  | T/C    | E8       | 8,43x10 <sup>-5</sup> | 4,07 | -28,10         | 0,12  |
| S3_220747709     | 3         | 3.09  | A/G    | E9       | 7,21x10 <sup>-5</sup> | 4,14 | -18,23         | 0,12  |
| S5_14468260      | 5         | 5.02  | G/C    | E1       | 9,27x10 <sup>-5</sup> | 4,03 | -15,87         | 0,08  |
| S6_34889640      | 6         | 6.01  | A/G    | E1       | 5,81x10 <sup>-5</sup> | 4,24 | -21,67         | 0,08  |
| S6_151485800     | 6         | 6.05  | T/C    | E9       | 5,37x10 <sup>-5</sup> | 4,27 | -10,70         | 0,11  |
| S7_170990040     | 7         | 7.05  | G/C    | E9       | 3,55x10 <sup>-5</sup> | 4,45 | -12,50         | 0,12  |
| S8_112149521     | 8         | 8.04  | C/G    | E9       | 8,47x10 <sup>-6</sup> | 5,07 | -13,61         | 0,14  |
| S9_155585508     | 9         | 9.08  | A/G    | E9       | 1,40x10 <sup>-6</sup> | 5,85 | -20,86         | 0,17  |
| S10_80487888     | 10        | 10.03 | T/C    | E8       | 8,40x10 <sup>-5</sup> | 4,08 | -18,00         | 0,12  |
| S10_87097244     | 10        | 10.03 | G/A    | E1       | 7,50x10 <sup>-5</sup> | 4,12 | -22,08         | 0,07  |
| S10_87097245     | 10        | 10.03 | C/A    | E1       | 7,50x10 <sup>-5</sup> | 4,12 | -22,08         | 0,07  |
| S10_87097254     | 10        | 10.03 | T/A    | E1       | 7,50x10 <sup>-5</sup> | 4,12 | -22,08         | 0,07  |
| S10_126872937    | 10        | 10.04 | G/A    | E9       | 6,94x10 <sup>-5</sup> | 4,16 | -18,40         | 0,13  |

Continuación Cuadro 8.

| ISE           |    |       |       |    |                       |      |        |      |
|---------------|----|-------|-------|----|-----------------------|------|--------|------|
| S1_9301455    | 1  | 1.01  | A/G   | E8 | 9,99x10 <sup>-5</sup> | 4,00 | -34,00 | 0,12 |
| S1_44343943   | 1  | 1.03  | A/G   | E9 | 8,59x10 <sup>-5</sup> | 4,07 | -20,07 | 0,12 |
| S1_55389746   | 1  | 1.04  | G/C   | E1 | 4,47x10 <sup>-5</sup> | 4,35 | -17,50 | 0,09 |
| S1_82154843   | 1  | 1.04  | C/A   | E8 | 7,73x10 <sup>-5</sup> | 4,11 | -17,36 | 0,14 |
| S1_274718677  | 1  | 1.10  | A/G   | E8 | 4,18x10 <sup>-5</sup> | 4,38 | -20,31 | 0,12 |
| S2_14799241   | 2  | 2.02  | C/T   | E9 | 4,49x10 <sup>-6</sup> | 5,35 | -25,42 | 0,20 |
| S2_20109780   | 2  | 2.03  | C/T   | E9 | 7,38x10 <sup>-5</sup> | 4,13 | -13,37 | 0,11 |
| S2_102285645  | 2  | 2.05  | C/T   | E1 | 3,73x10 <sup>-5</sup> | 4,43 | -19,26 | 0,10 |
| S2_151465957  | 2  | 2.05  | G/T   | E1 | 8,39x10 <sup>-5</sup> | 4,08 | -14,69 | 0,08 |
| S2_207150971  | 2  | 2.08  | T/C/A | E9 | 7,96x10 <sup>-5</sup> | 4,10 | -20,50 | 0,24 |
| S2_214063865  | 2  | 2.08  | T/C   | E8 | 1,95x10 <sup>-5</sup> | 4,71 | -27,39 | 0,15 |
| S3_1967838    | 3  | 3.01  | A/G   | E9 | 2,32x10 <sup>-5</sup> | 4,63 | -11,47 | 0,12 |
| S3_3707617    | 3  | 3.01  | G/A   | E1 | 4,20x10 <sup>-5</sup> | 4,38 | -22,30 | 0,08 |
| S3_22613548   | 3  | 3.04  | T/A   | E1 | 6,00x10 <sup>-5</sup> | 4,22 | -14,02 | 0,09 |
| S3_229871661  | 3  | 3.09  | T/G   | E9 | 8,49x10 <sup>-5</sup> | 4,07 | -16,42 | 0,13 |
| S4_33885271   | 4  | 4.05  | C/T   | E1 | 3,95x10 <sup>-5</sup> | 4,40 | -20,55 | 0,07 |
| S5_56216291   | 5  | 5.03  | C/G   | E8 | 3,56x10 <sup>-5</sup> | 4,45 | -28,62 | 0,12 |
| S5_56216300   | 5  | 5.03  | A/T   | E8 | 3,56x10 <sup>-5</sup> | 4,45 | -28,62 | 0,12 |
| S5_56365874   | 5  | 5.03  | T/G   | E8 | 4,94x10 <sup>-5</sup> | 4,31 | -25,40 | 0,13 |
| S5_83859926   | 5  | 5.04  | T/C   | E1 | 1,80x10 <sup>-5</sup> | 4,75 | -15,31 | 0,09 |
| S5_142723210  | 5  | 5.04  | G/A   | E8 | 8,79x10 <sup>-5</sup> | 4,06 | -27,41 | 0,11 |
| S5_216204537  | 5  | 5.09  | A/C   | E1 | 2,43x10 <sup>-5</sup> | 4,61 | -17,82 | 0,09 |
| S6_166592667  | 6  | 6.07  | C/T   | E1 | 6,77x10 <sup>-5</sup> | 4,17 | -19,35 | 0,07 |
| S7_9913867    | 7  | 7.01  | T/C   | E1 | 5,64x10 <sup>-5</sup> | 4,25 | -19,28 | 0,09 |
| S7_165197592  | 7  | 7.04  | A/G   | E1 | 6,07x10 <sup>-5</sup> | 4,22 | -19,51 | 0,08 |
| S8_112149521  | 8  | 8.04  | C/G   | E9 | 7,64x10 <sup>-5</sup> | 4,12 | -10,46 | 0,11 |
| S9_140974250  | 9  | 9.06  | A/G   | E1 | 6,13x10 <sup>-5</sup> | 4,21 | -16,17 | 0,08 |
| S9_155585508  | 9  | 9.08  | A/G   | E9 | 2,72x10 <sup>-6</sup> | 5,56 | -17,69 | 0,16 |
| S10_126872937 | 10 | 10.04 | G/A   | E9 | 2,63x10 <sup>-5</sup> | 4,58 | -17,09 | 0,14 |
| S10_138027166 | 10 | 10.06 | T/C   | E1 | 1,32x10 <sup>-5</sup> | 4,88 | -18,66 | 0,10 |

$R^2$ : Variación fenotípica explicada. E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018.

La posición física exacta de cada SNP se puede inferir a partir del nombre del marcador, por ejemplo, S1\_55389746: cromosoma 1; 55389746 pb. LOD:  $-\log_{10}$  valor  $p$ .

Cuadro 9. Marcadores moleculares SNPs asociados con severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto para los BLUP de las líneas de maíz de CIMMYT a través de tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.

| Carácter<br>SNPs | Cromosoma | Bin  | Alelos | Valor $p$             | LOD  | Efecto alélico | $R^2$ |
|------------------|-----------|------|--------|-----------------------|------|----------------|-------|
| SEV              |           |      |        |                       |      |                |       |
| S2_841089        | 2         | 2.00 | T/C/G  | 4,46x10 <sup>-6</sup> | 5,35 | -0,10          | 0,13  |
| S2_841090        | 2         | 2.00 | G/T/A  | 4,86x10 <sup>-6</sup> | 5,31 | -0,14          | 0,12  |
| S2_151465806     | 2         | 2.05 | C/G    | 7,28x10 <sup>-5</sup> | 4,14 | -0,10          | 0,07  |
| S2_197936779     | 2         | 2.07 | A/G    | 6,24x10 <sup>-5</sup> | 4,21 | -0,14          | 0,07  |
| S2_207040885     | 2         | 2.08 | C/A    | 8,91x10 <sup>-5</sup> | 4,05 | -0,08          | 0,06  |
| S3_187339659     | 3         | 3.06 | C/G    | 1,62x10 <sup>-5</sup> | 4,79 | -0,11          | 0,08  |
| S4_164088491     | 4         | 4.06 | A/C    | 7,71x10 <sup>-5</sup> | 4,11 | -0,13          | 0,07  |
| S5_216204537     | 5         | 5.09 | A/C    | 5,96x10 <sup>-5</sup> | 4,22 | -0,12          | 0,07  |
| S9_11738830      | 9         | 9.01 | G/A    | 5,72x10 <sup>-5</sup> | 4,24 | -0,14          | 0,08  |
| INC              |           |      |        |                       |      |                |       |
| S2_841089        | 2         | 2.00 | T/C/G  | 5,09x10 <sup>-5</sup> | 4,29 | -3,00          | 0,11  |
| S2_841090        | 2         | 2.00 | G/T/A  | 5,38x10 <sup>-5</sup> | 4,27 | -3,75          | 0,11  |
| S2_151465806     | 2         | 2.05 | C/G    | 9,48x10 <sup>-5</sup> | 4,02 | -2,67          | 0,07  |
| S2_207040885     | 2         | 2.08 | C/A    | 2,65x10 <sup>-5</sup> | 4,58 | -2,49          | 0,08  |
| S4_239728918     | 4         | 4.10 | G/A    | 8,36x10 <sup>-5</sup> | 4,08 | -1,93          | 0,07  |
| S9_146872993     | 9         | 9.06 | G/A    | 5,60x10 <sup>-5</sup> | 4,25 | -2,01          | 0,07  |
| ISE              |           |      |        |                       |      |                |       |
| S2_841089        | 2         | 2.00 | T/C/G  | 2,42x10 <sup>-5</sup> | 4,62 | -2,90          | 0,12  |
| S2_841090        | 2         | 2.00 | G/T/A  | 2,58x10 <sup>-5</sup> | 4,59 | -4,10          | 0,12  |
| S2_151465806     | 2         | 2.05 | C/G    | 6,98x10 <sup>-5</sup> | 4,16 | -3,04          | 0,07  |
| S2_197936779     | 2         | 2.07 | A/G    | 6,16x10 <sup>-5</sup> | 4,21 | -4,57          | 0,07  |
| S2_207040885     | 2         | 2.08 | C/A    | 9,22x10 <sup>-5</sup> | 4,04 | -2,62          | 0,07  |
| S3_187339659     | 3         | 3.06 | C/G    | 1,05x10 <sup>-5</sup> | 4,98 | -3,54          | 0,09  |
| S4_164088491     | 4         | 4.06 | A/C    | 5,90x10 <sup>-5</sup> | 4,23 | -4,15          | 0,07  |
| S5_216204537     | 5         | 5.09 | A/C    | 4,79x10 <sup>-5</sup> | 4,32 | -3,95          | 0,08  |
| S9_11738830      | 9         | 9.01 | G/A    | 3,91x10 <sup>-5</sup> | 4,41 | -4,49          | 0,08  |

$R^2$ : Variación fenotípica explicada.

#### 4.4.2 Regresión lineal múltiple

El análisis de regresión lineal múltiple realizado para cada uno de los caracteres, en cada uno de los ambientes E1, E8 y E9 y para los BLUP a través de estos, se presenta en el Cuadro 10. La variación fenotípica explicada por los modelos de regresión osciló entre 21 y 44%. Para el carácter SEV, el modelo que explicó mayor porcentaje de la variación fenotípica (36%) fue el modelo con tres SNPs en el ambiente E9. El modelo lineal con cuatro SNPs explicó un 44% de la variación fenotípica del carácter incidencia en el ambiente E9, mientras que el modelo que explicó la mayor variación fenotípica para el ISE (37%) fue el modelo del ambiente E8 con dos SNPs.

Cuadro 10. Regresión lineal múltiple de severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto de las líneas de maíz de CIMMYT, con los SNPs asociados en ambientes individuales y a través de tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.

| Carácter | Ambiente | Número SNPs en el modelo <sup>a</sup> | Número de líneas | Valor <i>p</i> | R <sup>2</sup> ajustado |
|----------|----------|---------------------------------------|------------------|----------------|-------------------------|
| SEV      | E1       | 3                                     | 135              | <0,05          | 23                      |
|          | E9       | 3                                     | 42               | <0,05          | 36                      |
| INC      | E1       | 4                                     | 103              | <0,05          | 32                      |
|          | E8       | 2                                     | 110              | <0,05          | 22                      |
|          | E9       | 4                                     | 76               | <0,05          | 44                      |
| ISE      | E1       | 3                                     | 136              | <0,05          | 21                      |
|          | E8       | 2                                     | 51               | <0,05          | 37                      |
|          | E9       | 3                                     | 96               | <0,05          | 36                      |
| BLUP-SEV |          | 3                                     | 77               | <0,05          | 22                      |
| BLUP-INC |          | 4                                     | 136              | <0,05          | 25                      |
| BLUP-ISE |          | 3                                     | 76               | <0,05          | 24                      |

<sup>a</sup> El número de SNPs en el modelo final fue el resultado de la selección mediante el uso del enfoque de selección por etapas (*stepwise*) basado en los valores de AIC. E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018.

## CAPÍTULO 5: DISCUSIÓN

### 5.1 Revisión sistemática y meta-análisis

La amplitud en la estrategia de búsqueda de la revisión sistemática realizada por Sargeant *et al.* (2005) en estudios de salud pública y por Rossi *et al.* (2018) en enfermedades de maíz, les permitió reducir el sesgo en la selección de estudios. Del mismo modo, en el presente trabajo la revisión sistemática permitió la búsqueda exhaustiva y objetiva de información sobre QTL para resistencia a enfermedades virales en maíz. El meta-análisis facilita la identificación de regiones genómicas involucradas en la resistencia a enfermedades en plantas (Ali *et al.*, 2013; Rossi *et al.*, 2018), lo cual juega un rol importante en el mejoramiento genético vegetal. En este estudio, la revisión sistemática conjuntamente con el meta-análisis, permitieron identificar QTL totales y QTL con efecto mayor para 13 enfermedades virales del maíz. De acuerdo a la información extraída de los artículos recopilados en la RS, tres de los cromosomas de maíz (cromosomas 1, 3, y 10) son aquellos en donde se localizan el mayor número de QTL para resistencia a virus. Las enfermedades virales para las cuales se recopilaron mayor número de estudios fueron *Sugarcane mosaic virus* (SCMV), *Maize streak virus* (MSV), *Maize rough dwarf virus* (MRDV) y *Mal de Río Cuarto virus* (MRCV). Según lo observado en el meta-análisis, en los cromosomas 1, 6 y 10, se encuentran las regiones genómicas con chances significativas de encontrar QTL de efecto mayor para resistencia a enfermedades virales en maíz.

### 5.2 Evaluación del fenotipo

La evaluación de genotipos de maíz por su reacción a MRC mediante infección natural del virus es compleja. La interacción de factores como el estrés hídrico, la baja fertilidad de los lotes o el uso de herbicidas en estado de emergencia de los cultivos ocasionan un estrés bajo el cual las plántulas de maíz son más proclives a la infección viral. Las condiciones ambientales de los ensayos establecidos en los ambientes E8 y E9 presentaron sequía, caída de granizo y elevadas temperaturas durante el ciclo del cultivo. Esto podría explicar el mayor nivel de daño causado por la enfermedad en estos ambientes, ya que las plantas estuvieron bajo una situación de mayor estrés y por lo tanto con mayor predisposición a la infección mediante el insecto vector tal como lo indican otros autores (Presello *et al.*, 1997). Los valores de heredabilidad para SEV, INC e ISE fueron similares en ambientes individuales (0.60 a 0.71). Estos valores son superiores a los informados por Di Renzo *et al.* (2002) y Bonamico *et al.* (2012) quienes en estudios de mapeo de QTL

para MRC con poblaciones biparentales informaron valores de heredabilidad de 0,47 a 0,56 en ambientes individuales y de 0,20 a 0,27 a través de ambientes, respectivamente. Por otro lado, Rossi *et al.* (2015) al mapear QTL para MRC en una población biparental, informaron valores de heredabilidad similares a los del presente estudio.

### 5.3 Estructura poblacional

En general, las líneas endocriadas de maíz tienen una historia compleja, ya que derivan de variedades de polinización abierta entre las que luego se realizaron cruzamientos. Esta historia dificulta la localización de líneas dentro de grupos que reflejen el grado de similitud genética. La información genealógica puede ser una guía importante, dado que líneas derivadas de antecesores comunes pueden compartir alelos y, por lo tanto, tienen mayor probabilidad de ser agrupadas respecto a aquellas que provienen de antecesores no comunes. Además, la selección y la deriva genética durante el proceso de endocria pueden causar discrepancias entre la genealogía y la constitución genética (Liu *et al.*, 2003). La descripción de la estructura genética es de gran importancia para la selección de líneas parentales en mejoramiento genético y para la reducción de falsas asociaciones en estudios de mapeo por asociación (Liu *et al.*, 2014). En el presente estudio las líneas se agruparon mediante el método de agrupamiento basado en modelos bayesianos, implementados en el programa STRUCTURE (Pritchard *et al.*, 2000a). Este análisis permitió confirmar la estructura de las líneas endocriadas de maíz de CIMMYT en tres grupos según su adaptación ambiental. Estudios previos también reportaron estratificación en la estructura genética poblacional de líneas de maíz de CIMMYT (Semagn *et al.*, 2012; Suwarno *et al.*, 2015). La estratificación en la estructura genética debe ser considerada al momento de utilizar el grupo de líneas de maíz del presente estudio en posteriores estudios de mapeo por asociación para identificar loci de diferentes caracteres de interés.

### 5.4 Diversidad genética

Los marcadores moleculares proveen información biológica importante. Las técnicas biotecnológicas que involucran el uso de marcadores moleculares facilitan la identificación y la cuantificación de la variabilidad genética para su uso y conservación en muchas especies de interés (Edwards y McCouch, 2007). Este conocimiento es fundamental para el uso, manejo y conservación del germoplasma vegetal (líneas *elite*, poblaciones cultivadas y silvestres). El grado de variabilidad genética en una población se evalúa mediante el contenido de información polimórfica (PIC), la diversidad genética, los valores de los

coeficientes de parentesco relativo y la distancia genética entre individuos (Dinesh *et al.*, 2016). En el presente estudio, la variabilidad genética observada en el grupo de líneas de maíz de CIMMYT fue caracterizada con 7.584 marcadores moleculares SNPs. Los valores de diversidad genética obtenidos concuerdan con los informados por Dinesh *et al.* (2016) y Semagn *et al.* (2012), quienes evaluaron mediante este tipo de marcadores moleculares 64 y 450 líneas de maíz de CIMMYT, respectivamente. Los valores de PIC obtenidos en este estudio son mayores a los informados en los estudios mencionados. La totalidad de las líneas de maíz CIMMYT fueron caracterizadas genotípicamente por Wu *et al.* (2016) mediante 362.008 SNPs y estos autores reportaron valores de PIC de 0,21 a 0,25 y valores de diversidad genética de 0,26 a 0,31. Las diferencias de estos valores con los obtenidos aquí puede deberse a que en este estudio para la estimación se utilizó sólo un grupo del total de líneas de maíz de CIMMYT, así como un menor número de marcadores. No obstante, ambos resultados muestran la amplia variabilidad genética presente en las líneas de maíz de CIMMYT.

### 5.5 Parentesco y desequilibrio de ligamiento

Los marcadores moleculares pueden ser usados para calcular el parentesco relativo entre pares de individuos. El parentesco relativo refleja la identidad aproximada entre dos genotipos sobre la probabilidad media de identidad entre dos genotipos aleatorios (Yan *et al.*, 2009). En este estudio, los valores de los coeficientes del análisis de parentesco fueron en su mayoría menores a 0,05. Además, el 95% de las distancias genéticas se ubicaron entre 0,30 y 0,40 indicando que cada línea aporta variabilidad genética que puede ser de interés en un programa de mejoramiento de maíz. Los valores observados en el presente estudio concuerdan con los informados por Dinesh *et al.* (2016), quienes evaluaron la diversidad y la estructura en una población de 64 líneas de maíz de CIMMYT que representaba al germoplasma del programa tropical. También, Semagn *et al.* (2012) informan valores similares en su estudio de caracterización molecular de 450 líneas de maíz de CIMMYT pertenecientes a los programas de mejoramiento de África. Por otro lado, la distancia genética observada en el presente estudio es levemente superior a la informada por Dao *et al.* (2014) quienes mediante 1.057 SNPs evaluaron la diversidad genética en una población de 100 líneas de maíz que representaban el germoplasma del Instituto de Investigaciones Ambientales y Agrícolas (INERA), del Instituto Internacional de Agricultura Tropical (IITA) y del Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT).

La medida del desequilibrio de ligamiento en cualquier población utilizada para asociación tiene influencia en los resultados de mapeo debido a la existencia de grandes bloques de ligamiento y a la presencia de una baja tasa de disminución del DL, que disminuyen la resolución del mapeo (Suwarno *et al.*, 2015). En las líneas de maíz de este estudio, el DL se dio principalmente entre marcadores adyacentes, indicando que el ligamiento es predominante en la determinación del DL en comparación con otras posibles causas. Los resultados concuerdan con lo informado por Zhao *et al.* (2014) quienes al analizar el DL presente en una población de 329 genotipos de algodón con 212 marcadores microsatélites (SSR) encontraron que el ligamiento físico era la principal causa del DL observado.

#### 5.6 Modelo para el mapeo por asociación

Los efectos de la interacción genotipo-ambiente pueden influir en los resultados del mapeo de QTL, y en el mapeo de asociación. Por ello, se requiere que se calcule el efecto de las regiones genómicas significativas en cada ambiente (Suwarno *et al.*, 2015). En el presente trabajo, los coeficientes de correlación entre ambientes fueron bajos (Anexo, Cuadros 13, 14 y 15), lo cual indica la existencia de interacción genotipo-ambiente. Debido a esto, el análisis de mapeo por asociación se realizó individualmente para cada uno de los tres ambientes más afectados por la enfermedad y con los BLUP a través de ambientes de SEV, INC e ISE de la enfermedad MRC. 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. Gutierrez *et al.* (2011) plantean que el modelo de mapeo es dependiente del carácter fenotípico y del ambiente de evaluación. De acuerdo con esto, en el presente trabajo se evaluó la totalidad de modelos posibles y se seleccionó el modelo de mejor ajuste para cada combinación entre carácter y ambiente. Así, el modelo Q (Pritchard *et al.*, 2000b), el modelo PCA (Price *et al.*, 2006) el modelo K (Parsseaux y Bernardo, 2004) y el modelo PCA + K (Zhao *et al.*, 2007) fueron los de mejor ajuste en las distintas combinaciones.

## 5.7 Mapeo por asociación

El mapeo por asociación permitió identificar 54 SNPs asociados a los caracteres SEV, INC e ISE de la enfermedad MRC en ambientes individuales, así como a los BLUP a través de ambientes. Estos marcadores se agruparon en 46 regiones genómicas y no presentaron estabilidad a través de los ambientes de evaluación. Esto puede deberse a la interacción genotipo-ambiente observada ya que al ser distintos los genotipos que presentaron resistencia en los diferentes ambientes pueden aportar diferentes QTL de resistencia a MRC. Los 54 SNPs asociados a SEV, INC e ISE de la enfermedad MRC se distribuyeron en los 10 cromosomas del genoma del maíz. Si bien se identificaron marcadores asociados en todos los cromosomas, algunos de ellos se encuentran en regiones en las que Redinbaugh y Pratt (2009) reportaron genes agrupados y QTL para resistencia a enfermedades virales. En el presente estudio, en el bin 1.03 se identificó el marcador S1\_44343943 asociado a INC e ISE del MRC en el ambiente E9. En ese bin, Di Renzo *et al.* (2004) informaron un QTL de efecto mayor para la misma enfermedad viral. En el bin 6.01, el marcador S6\_34889640 se presentó asociado al carácter INC en el ambiente E1. En esta región han sido identificados previamente varios genes de resistencia para enfermedades virales. McMullen y Louie (1989) reportaron el gen de resistencia *Mdm1* para la enfermedad *Maize dwarf mosaic virus*. McMullen (1994) informó el gen de resistencia *Wsm1* en maíz para la enfermedad *Wheat streak mosaic virus*. Otro gen reportado en esta región es el gen de resistencia *Scm1* para *Sugarcane mosaic virus* (Xia *et al.*, 1999; Xu *et al.*, 2000). En el bin 10.06, donde previamente Dintinger *et al.* (2005) informaron un QTL de efecto menor para *Maize stripe virus*, se identificó el marcador S10\_138027166 asociado a los caracteres SEV e ISE en el ambiente E1.

## 5.8 Regresión lineal múltiple

El análisis de regresión lineal múltiple, usando los valores fenotípicos de cada carácter como variable respuesta y los marcadores moleculares SNPs como predictores, permitió estimar la proporción de la variación fenotípica explicada por una acotada combinación de SNPs significativos, obtenidos en el mapeo por asociación. Suwarno *et al.* (2015) utilizaron la regresión lineal múltiple y lograron explicar hasta un 61% de la variación fenotípica del contenido de carotenoides en maíz con la combinación de un reducido número de SNPs. Los resultados del presente estudio permitieron explicar entre 21 y 44% de la variación fenotípica, según carácter y ambiente. Esto potencialmente es de utilidad, ya que sugiere que un pequeño número de marcadores podrían emplearse para seleccionar

líneas de maíz de CIMMYT con alelos favorables para la resistencia a la enfermedad MRC. Luego, una posible estrategia podría ser realizar cruzamientos entre las líneas seleccionadas y generar una población segregante para seleccionar genotipos que agrupen la mayor cantidad de QTL favorables.

## CAPÍTULO 6: CONCLUSIONES

La revisión sistemática permite recopilar de manera objetiva los estudios de QTL para resistencia a enfermedades virales en maíz.

El meta-análisis indica que las chances de aportar QTL de efecto mayor para resistencia a enfermedades virales son significativas en tres de los cromosomas de maíz.

Las diferencias fenotípicas para la reacción a la enfermedad MRC presentes en las líneas de maíz de CIMMYT indican distinto grado de resistencia.

Las líneas de maíz de CIMMYT utilizadas en este estudio constituyen un grupo diverso de genotipos, adecuado para estudios de mapeo por asociación.

La estructura genética poblacional de las líneas de maíz de CIMMYT consiste de tres grupos de genotipos, concordantes a su adaptación ambiental.

El mapeo por asociación indica 46 regiones genómicas que aportan a la resistencia para la enfermedad MRC. Estos loci se localizan principalmente en los cromosomas 2 y 5, y explican entre 6% y 24% de la variación fenotípica observada en las líneas de maíz de CIMMYT.

Los resultados obtenidos brindan información sobre regiones genómicas de resistencia a la virosis más importante del cultivo en Argentina, la cual permite eficientizar los programas de mejoramiento de maíz.

## REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 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.
- Ali, F., Pan, Q., Chen, G., Zahid, K.R., Yan, J. (2013). Evidence of multiple disease resistance (MDR) and implication of meta-analysis in marker assisted selection. *PLoS ONE* 8(7): e68150. doi:10.1371/journal.pone.0068150.
- Balzarini, M., Bruno, C., Peña, A., Teich, I., Di Rienzo, J. (2010). Estadística en Biotecnología. Aplicaciones en Info-Gen Ed. Grupo de Editores. Córdoba, Argentina.
- Balzarini, M., Di Rienzo J. (2017). InfoGen versión 2017. FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.info-gen.com.ar>
- Bonamico, N.C., Di Renzo, M.A., Borghi, M.L., Ibañez, M.A., Diaz, 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. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 24(2):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. *The Journal of Agricultural Science*, 150(05):619–629. <https://doi.org/10.1017/S0021859611000943>
- Borenstein, M.J., Hedges, L.V., Higgins, J.P.T., Rothstein, H.R. (2009). Introduction to meta-analysis. Chichester, UK: Wiley.
- Botstein, D., White, R.L., Skolnick, M., Davis, R.W. (1980). Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *American Journal of Human Genetics*, 32(3):314–331.
- Botta, G., Gonzalez, M. (2010). Enfermedades fúngicas, bacterianas y abióticas del maíz. En Bases para el manejo del cultivo de maíz. pp. 125-150. (Ed. Eyhérbide, G.). Buenos Aires, INTA.
- 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>
- Centro Cochrane Iberoamericano. (2012). Manual Cochrane de Revisiones Sistemáticas de Intervenciones, versión 5.1.0. Barcelona: Centro Cochrane Iberoamericano.

- 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(11):1–13. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0142001>.
- 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>
- Dao, A., Sanou, J., Mitchell, S.E., Gracen, V., Danquah, E.Y. (2014). Genetic diversity among INERA maize inbred lines with single nucleotide polymorphism (SNP) markers and their relationship with CIMMYT, IITA, and temperate lines. *BMC Genetics* 15:127
- de Souza, P., Schuelter, A.R., Guimarães, C.T., Schuster, I., De Oliveira, E., Redinbaugh, M. (2008). Mapping QTL contributing to SCMV resistance in tropical maize. *Hereditas*, 145(4):167–173. <https://doi.org/10.1111/j.0018-0661.2008.02006.x>
- Di Renzo, M.A., Bonamico, N.C., Díaz, D.D., Salerno, J.C., Ibañez, M.M., Gesumaria, J.J. (2002). Inheritance of resistance to Mal de Río Cuarto (MRC) disease in *Zea mays* (L.). *The Journal of Agricultural Science*, 139(01):47–53. <https://doi.org/10.1017/S0021859602002241>.
- 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. *Journal of Agricultural Science*, 142(3):289–295. <https://doi.org/10.1017/S0021859604004307>.
- Di Rienzo, J.A., Casanoves, F., Balzarini, M.G., Gonzalez, L., Tablada, M., Robledo, C.W. InfoStat versión 2018. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>
- Dinesh, A., Patil, A., Zaidi, P.H., Kuchanur, P.H., Vinayan, M.T., Seetharam, K. (2016). Genetic diversity, linkage disequilibrium and population structure among CIMMYT maize inbred lines, selected for heat tolerance study. *Maydica*, 61(3):M29.
- Dintinger, J.A., Salgon, S., Reynaud, B. (2014). QTL mapping of a partial resistance to the corn delphacid-transmitted viruses in Lepidopteran-resistant maize line Mp705. *Plant Breeding*, 133(1):19–27. <https://doi.org/10.1111/pbr.12135>.

- Dintinger, J., Verger, D., Caiveau, S., Risterucci, A.M., Gilles, J., Chiroleu, F., Curtois, B., Reynaud, B., Hamon, P. (2005). Genetic mapping of maize stripe disease resistance from the Mascarene source. *Theoretical and Applied Genetics*, 111(2):347–359. <https://doi.org/10.1007/s00122-005-2027-3>.
- Duñle, C.M., Melchinger, A.E., Kuntze, L., Stork, A., Lübberstedt, T. (2000). Molecular mapping and gene action of Scm0 and Scm1, two major QTL contributing to SCMV resistance in maize. *Plant Breeding*, 119:299–303. <https://doi.org/10.1046/j.1439-0523.2000.00509.x>.
- Earl, D., vonHoldt, B. (2012). STRUCTURE HARVESTER: a website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. *Conservation Genetics Resources*, 4:359–361. <http://doi:10.1007/s12686-011-9548-7>.
- Eckermann, P.J., Verbyla, A.P., Cullis, B.R., Thompson, R. (2001). The analysis of quantitative traits in wheat mapping populations. *Australian Journal of Agricultural Research*, 52(12):1195–1206. <https://doi.org/10.1071/AR01039>.
- Edwards, J., McCouch, S. (2007). Molecular markers for use in plant molecular breeding and germplasm evaluation. In Marker-assisted selection. pp. 29-50. (Eds. Guimaraes, Ruane, Scherf, Sonnino, Dargie). Roma, FAO.
- Evanno, G., Regnaut, S., Goudet, J. (2005). Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. *Molecular Ecology*, 14(8):2611–2620. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x>.
- Excoffier, L., Smouse, P.E., Quattro, J.M. (1992). Analysis of molecular variance inferred from metric distances among DNA haplotypes: Application to human mitochondrial DNA restriction data. *Genetics*, 131(2):479–491. <https://doi.org/10.1007/s00424-009-0730-7>.
- Federer, W.T. (1961). Augmented designs with one-way elimination of heterogeneity. *Biometrics*, 17(3):447–473. <http://www.jstor.org/stable/2527837>.
- Ferreira González, I., Urrútia, G., Alonso-Coello, P. (2011). Revisiones sistemáticas y metaanálisis: bases conceptuales e interpretación. *Revista Española de Cardiología*, 64(8):688–696. <https://doi.org/10.1016/j.recesp.2011.03.029>

- Flint-Garcia, S.A., Thornsberry, J.M., Buckler, E.S. (2003). Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annual Review of Plant Biology*, 54(1):357–374. <https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134907>.
- Flint-Garcia, S.A., Thuillet, A.C., Yu, J., Pressoir, G., Romero, S.M., Mitchell, S.E., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M.M., Buckler, E.S. (2005). Maize association population: A high-resolution platform for quantitative trait locus dissection. *Plant Journal*, 44(6):1054–1064. <https://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2005.02591.x>.
- Gardiner, J., Coe, E., Melia-Hancock, S., Hoisington D., Chao, S. (1993). Development of a core RFLP map in maize using an immortalized F2 population. *Genetics*, 134:917–930.
- González, J., Cobo, E., Vilaró, M. (2014). Revisión sistemática y meta-análisis. Universitat Politècnica de Catalunya. BarcelonaTech
- Gowda, M., Das, B., Makumbi, D., Babu, R., Semagn, K., Mahuku, G., Olsen, M., Bright, J., Beyene, J., Prasanna, B. (2015). Genome-wide association and genomic prediction of resistance to maize lethal necrosis disease in tropical maize germplasm. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(10):1957–1968. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2559-0>.
- 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. doi: 10.3835/plantgenome2011.07.0020
- Hallauer A.R., Filho J.B.M., Carena M.J. (2010) Breeding Plans. In: Quantitative Genetics in Maize Breeding. Handbook of Plant Breeding, vol 6. Springer, New York, NY
- Hansey, C.N., Johnson, J.M., Sekhon, R.S., Kaeppler, S.M., de Leon, N. (2011). Genetic diversity of a maize association population with restricted phenology. *Crop Science*, 51(2):704–715. <https://doi.org/10.2135/cropsci2010.03.0178>.
- 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(1):109–120. <https://doi.org/10.1007/s10681-014-1277-z>

- Horn, F., Habekuß, A., Stich, B. (2014). Genes involved in barley yellow dwarf virus resistance of maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(12):2575–2584. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2400-1>
- Horn, F., Habekuß, A., Stich, B. (2015). Linkage mapping of Barley yellow dwarf virus resistance in connected populations of maize. *BMC Plant Biology*, 15(1):29. <https://doi.org/10.1186/s12870-015-0420-x>
- Hossard, L., Archer, D.W., Bertrand, M., Colnenne-David, C., Debaeke, P., Ernfors, M., Jeuffroy, M.H., Munier-Jolain, N., Nilsson, C., Sanford, G.R., Snapp, S.S., Jensen, E.S., Makowski, D. (2016). A meta-analysis of maize and wheat yields in low-input vs. conventional and organic systems. *Agronomy Journal*, 108(3):1155–1167.
- Ji, Q., Yang, B., Lee, M., Chen, Y., Lübberstedt, T. (2010). Mapping of quantitative trait loci/locus conferring resistance to foxtail mosaic virus in maize using the intermated B73-x-Mo17 population. *Plant Breeding*, 129(6):721–723. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2009.01751.x>
- Jones, M.W., Redinbaugh, M.G., Anderson, R.J., Louie, R. (2004). Identification of quantitative trait loci controlling resistance to maize chlorotic dwarf virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 110(1):48–57. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1757-y>
- Kreff, E., Pacheco, M., Díaz, D., Robredo, C., Puecher, D., Céliz, A., Salerno, J. (2006). Resistance to Mal de Río Cuarto virus in maize: A QTL mapping analysis. *Journal of Basic and Applied Genetic*, 17:41-50.
- Krishnareddy, M. (2013). Impact of climate changes on insect vectors and vector-borne plant viruses and Phytoplasma. In: *Climate-Resilient Horticulture: Adaptation and Mitigation Strategies*. pp 255-277. (Eds. Singh, Krishnamurthy, Shivashankara) Springer, New York.
- Kyeterere, D.T., Ming, R., McMullen, M.D., Pratt, R.C., Brewbaker, J., Musket, T. (1999). Genetic analysis of tolerance to maize streak virus in maize. *Genome*, 26(42):20–26. <https://doi.org/10.1139/gen-42-1-20>
- Lagat, M., Danson, M., Kimani, M., Kuria, A. (2008). Quantitative trait loci for resistance to maize streak virus in maize genotypes used in hybrid development. *African Journal of Biotechnology*, 7(14):573–2577.

- Laguna, I., Giménez Pecci, M. (1997). El Mal de Río Cuarto. PROMARC. Hoja informativa n° 1.
- Lenardón, S. (2007). Enfermedades causadas por virus y mollicutes en maíz. Disertación en Jornadas Manejo integrado de plagas, enfermedades, artrópodos y malezas en soja, maíz y girasol. INTA-FAUBA (<http://agro.faua.info/es/node/165>).
- Lenardón, S., March, G., Nome, S., Ornaghi, J. (1998). Recent outbreak of “Mal de Río Cuarto” virus on corn in Argentina. *Plant Disease*, 82:448.
- Li, J., Ji, L. (2005). Adjusting multiple testing in multilocus analyses using the eigenvalues of a correlation matrix. *Heredity*, 95(3):221–227. <https://doi.org/10.1038/sj.hdy.6800717>
- Li, Z., Chen, J., Han, L., Wen, J., Chen, G., Li, H., Wang, Y., Zhao, R., Zhang, X., Xia, Z., Yan, J., Wu, J., Ding, J. (2016). Association mapping resolving the major loci Scmv2 conferring resistance to sugarcane mosaic virus in maize. *European Journal of Plant Pathology*, 145(2):385–391. <https://doi.org/10.1007/s10658-015-0852-z>
- Liu, K., Goodman, M., Muse, S., Smith, J., Buckler, E., Doebley, J. (2003). Genetic structure and diversity among maize inbred lines as inferred from DNA microsatellites. *Genetics*, 165(4):2117–2128. <https://doi.org/10.1007/s001220051632>
- Liu, X.H., Tan, Z.B., Rong, T.Z. (2009). Molecular mapping of a major QTL conferring resistance to SCMV based on immortal RIL population in maize. *Euphytica*, 167(2):229–235.
- Liu, Y., Guo, J., Zhang, D., Zhao, Y., Zhu, L., Huang, Y., Chen, J. (2014). Genetic diversity and linkage disequilibrium estimation among the maize breeding germplasm for association mapping. *International Journal of Agriculture and Biology*, 16(5):851–861.
- Luan, J., Wang, F., Li, Y., Zhang, B., Zhang, J. (2012). Mapping quantitative trait loci conferring resistance to rice black-streaked virus in maize (*Zea mays* L.). *Theoretical and Applied Genetics*, 125(4):781–791. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1871-1>
- Lucas, J.A. (2011). Foresight project on global food and farming futures: Advances in plant disease and pest management. *Journal of Agricultural Science*, 149(S1):91–114. <https://doi.org/10.1017/S0021859610000997>

- March, G., Ornaghi, J., Beviacqua, J., Lenardón, S. (1997). Manual Técnico del Mal de Río Cuarto. Editores Morgan-Mycogen. p 41.
- March, G., Ornaghi, J., Beviacqua, J., Rago, A., Lenardón, S. (2002). Systemic insecticides for control of *Delphacodes kuscheli* and the Mal de Río Cuarto virus on maize. *Internacional Journal Pest Manage*, 48:127-132.
- McMullen, M.D., Louie, R. (1989). The linkage of molecular markers to a gene controlling the symptom response in maize to maize dwarf mosaic virus. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-2-309>
- McMullen, M.D., Simcox, K.D. (1995). Genomic organization of disease and insect resistance genes in maize. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. <https://doi.org/10.1094/MPMI-8-0811>
- McMullen, M.D., Jones, M.W., Simcox, K.D., Louie, R. (1994) 3 genetic-loci control resistanceto Wheat streak mosaic virus in the maize inbred Pa405. *Molecular Plant-Microbe Interactions*. 7:708–712.
- Ming, R., Brewbaker, J.L., Pratt, R.C., Musket, T.A., McMullen, M.D. (1997). Molecular mapping of a major gene conferring resistance to maize mosaic virus. *Theoretical and Applied Genetics*, 95(1–2):271–275. <https://doi.org/10.1007/s001220050559>
- Nair, S.K., Babu, R., Magorokosho, C., Mahuku, G., Semagn, K., Beyene, Y., Das, B., Makumbi, D., Lava Kumar, P., Olsen, M., Boddupalli, P.M. (2015). Fine mapping of Msv1, a major QTL for resistance to Maize Streak Virus leads to development of production markers for breeding pipelines. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(9):1839–1854. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2551-8>
- Nei, M. (1972). Genetic distance between populations. *The American Naturalist*, 106:283-292. <https://doi.org/10.1086/282771>
- Nelson, R., Wiesner-Hanks, T., Wisser, R., Balint-Kurti, P. (2018). Navigating complexity to breed disease-resistant crops. *Nature Reviews Genetics*, 19:21–33. <http://dx.doi.org/10.1038/nrg.2017.82>
- Nome, S.F., Lenardon, S.L., Raju, B.C., Laguna, I.G., Lowe, S.K., Docampo, D. (1981). Association of reovirus-like particles with “Enfermedad de Rio IV” of maize in Argentina. *Journal of Phytopathology*, 101(1):7–15. <https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1981.tb03315.x>

- Ornaghi, J., Boito, G., Sanchez, G., March, G., Beviacqua, J. (1993). Studies on the populations of *Delphacodes kuscheli* Fennah in different years and agricultural areas. *Journal of Genetic and Breeding*, 47:277-282.
- Ornaghi, J., March, G., Boito, G., Marinelli, A., Beviacqua, J., Giuggia, J., Lenardón, S. (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. *Theoretical and Applied Genetics*, 109(3):508–514. <https://doi.org/10.1007/s00122-004-1666-0>
- Peña Malavera, A., Gutierrez, L., Balzarini, M. (2014). Componentes principales en mapeo asociativo. *Journal of Basic and Applied Genetics*, 25(2):32–40.
- Pernet, A., Hoisington, D., Dintinger, J., Jewell, D., Jiang, C., Khairallah, M., Letourmy, P., Marchand, J., Glaszman, J., Gonzalez De Leon, D. (1999a). Genetic mapping of maize streak virus resistance from the mascarene source. *Theoretical and Applied Genetics*, 99:540–553.
- Pernet, A., Hoisington, D., Franco, J., Isnard, M., Jewell, D., Jiang, C., Marchand, J., Reynaud, B., Glaszman, J., González de León, D. (1999b). Genetic mapping of maize streak virus resistance from the Mascarene source. I. Resistance in line D211 and stability against different virus clones. *Theoretical and Applied Genetics*, 99(3–4):524–539. <https://doi.org/10.1007/s001220051266>
- Piepho, H.P., Möhring, J. (2007). Computing heritability and selection response from unbalanced plant breeding trials. *Genetics*, 177(3):1881–1888. <https://doi.org/10.1534/genetics.107.074229>
- Pittelkow, C.M., Linquist, B.A., Lundy, M.E., Liang, X., van Groenigen, K.J., Lee, J., van Gestel, N., Six, J., Venterea, R.T., van Kessel, C. (2015). When does no-till yield more? A global meta-analysis. *Field Crops Research*, 183:156–168.
- Prasanna, B.M. (2012). Diversity in global maize germplasm: Characterization and utilization. *Journal of Biosciences*, 37(5):843–855. <https://doi.org/10.1007/s12038-012-9227-1>
- Presello, D., Alvarez, M., Colazo, J., Damilano, A., Eyhéribide, G., Fernández, A., Hourquescos, M. (1997). Comportamiento de cultivares de maíz en el norte de la

- provincia de Buenos Aires y área endémica del Mal de Río Cuarto. Ciclo 1996/97. Tecnología Agropecuaria INTA Pergamino II: 1-6.
- 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. *Nature Genetics*, 38(8):904–909. <https://doi.org/10.1038/ng1847>
- Pritchard, J.K., Rosenberg, N.A. (1999). Use of unlinked genetic markers to detect population stratification in association studies. *The American Journal of Human Genetics*, 65(1):220–228. <https://doi.org/10.1086/302449>
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Donnelly, P. (2000a). Inference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics*, 155(2):945–959. <https://doi.org/10.1111/j.1471-8286.2007.01758.x>
- Pritchard, J.K., Stephens, M., Rosenberg, N.A., Donnelly, P. (2000b). Association mapping in structured populations. *American Journal of Human Genetics*, 67(1):170–181. <https://doi.org/10.1086/302959>
- R Development Core Team (2005). A language and environment for statistical computing, reference index version 2.2.1. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0. (verified 05 May 2011). <http://www.R-project.org>
- Redinbaugh, M., Pratt, R. (2009). Virus resistance. In *Handbook of Maize: Its Biology*. pp. 251-270. (Eds. Bennetzen J., S. Hake). New York: Springer Verlag.
- Remington, D.L., Thornsberry, J.M., Matsuoka, Y., Wilson, L.M., Whitt, S.R., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M., Buckler, E.S. (2001). Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 98(20):11479–11484. <https://doi.org/10.1073/pnas.201394398>
- Romay, M.C., Millard, M.J., Glaubitz, J.C., Peiffer, J.A., Swarts, K.L., Casstevens, T.M., Elshire, R.J., Acharya, C.B., Mitchel, S.B., Flint-Garcia, S.A., McMullen, M.D., Holland, J.B., Buckler, E.S., Gardner, C.A. (2013). Comprehensive genotyping of the USA national maize inbred seed bank. *Genome Biology*, 14(6):R55. <https://doi.org/10.1186/gb-2013-14-6-r55>
- 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. *The Open Agriculture Journal*, 9:48–55.

- Rossi, E.A., Ruiz, M., Rueda Calderón, M.A., Bruno, C.I., Bonamico, N.C., Balzarini, M.G. (2018). Meta-analysis of QTL studies for resistance to fungi and viruses in maize. *Crop Science*, 58:1–15. doi: 10.2135/cropsci2018.05.0330
- Rotundo, J.L., Westgate, M.E. (2009). Meta-analysis of environmental effects on soybean seed composition. *Field Crops Research*, 110:147–156.
- Sargeant, J., Rajic, A., Read, S., Ohlsson, A. (2005). The process of systematic review and its application in agri-food public-health. *Preventive Veterinary Medicine*, 75:141–151.
- Semagn, K., Magorokosho, C., Vivek, B.S., Makumbi, D., Beyene, Y., Mugo, S., Prasanna, B., Warburton, M. (2012). Molecular characterization of diverse CIMMYT maize inbred lines from eastern and southern Africa using single nucleotide polymorphic markers. *BMC Genomics*, 13(1):113. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-13-113>
- Shi, L., Hao, Z. fang, Weng, J., Xie, C., Liu, C., Zhang, D., Li, M., Bai, L., Li, X., 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. *Molecular Breeding*, 30(2):615–625. <https://doi.org/10.1007/s11032-011-9652-0>
- Soldanova, M. (2012). Molecular mapping of quantitative trait loci (QTLs) determining resistance to Sugarcane mosaic virus in maize using simple sequence repeat (SSR) markers. *African Journal of Biotechnology*, 11(15):3496–3501. <https://doi.org/10.5897/AJB11.027>
- Suwarno, W.B., Pixley, K.V., Palacios-Rojas, N., Kaeppler, S.M., Babu, R. (2015). Genome-wide association analysis reveals new targets for carotenoid biofortification in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 128(5):851–864. <https://doi.org/10.1007/s00122-015-2475-3>
- Tao, Y., Liu, Q., Wang, H., Zhang, Y., Huang, X., Wang, B., Lai, J., Ye, J., Liu, B., Xu, M. (2013). Identification and fine-mapping of a QTL, qMrdd1, that confers recessive resistance to maize rough dwarf disease. *BMC Plant Biology*, 13(1):145. <https://doi.org/10.1186/1471-2229-13-145>
- Teissier, M., Sanchez, M.P., Boussaha, M., Barbat, A., Hoze, C., Robert-Granie, C., Croiseau, P. (2018). Use of meta-analyses and joint analyses to select variants in whole

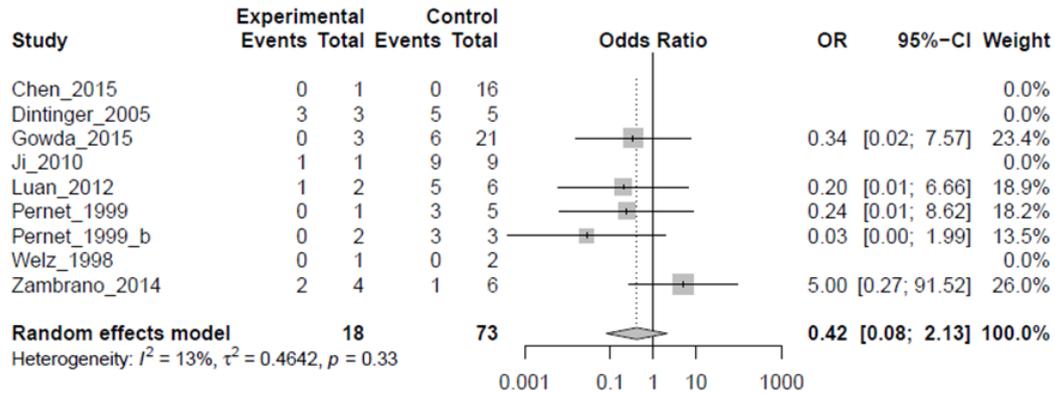
- genome sequences for genomic evaluation: An application in milk production of French dairy cattle breeds. *Journal of Dairy Science*, 101:3126–3139.
- Wallace, J.G., Bradbury, P.J., Zhang, N., Gibon, Y., Stitt, M., Buckler, E.S. (2014). Association mapping across numerous traits reveals patterns of functional variation in maize. *PLoS Genetics*, 10(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1004845>
- Warburton, M.L., Tang, J.D., Windham, G.L., Hawkins, L.K., Murray, S.C., Xu, W., Boykin, D., Perkins, A., Williams, W.P. (2015). Genome-wide association mapping of aspergillus flavus and aflatoxin accumulation resistance in maize. *Crop Science*, 55(5):1857–1867. <https://doi.org/10.2135/cropsci2014.06.0424>
- Welz, H.G., Schechert, A., Pernet, A., Pixley, K.V, Geiger, H.H. (1998). A gene for resistance to the maize streak virus in the African CIMMYT maize inbred line CML. *Molecular Breeding*, 4:147–154.
- Williams, E., Piepho, H.P., Whitaker, D. (2011). Augmented p-rep designs. *Biometrical Journal*, 53(1):19–27. <https://doi.org/10.1002/bimj.201000102>
- Wu, Y., San Vicente, F., Huang, K., Dhliwayo, T., Costich, D.E., Semagn, K., Sudha, N., Olsen, M., Prasanna, B., Zhang, X., Babu, R. (2016). Molecular characterization of CIMMYT maize inbred lines with genotyping-by-sequencing SNPs. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(4):753–765. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2664-8>
- Würschum, T. (2012). Mapping QTL for agronomic traits in breeding populations. *Theoretical and Applied Genetics*, 125(2):201–210. <https://doi.org/10.1007/s00122-012-1887-6>
- Xia, X., Melchinger, A.E., Kuntze, L., Lübberstedt, T. (1999). Quantitative trait loci mapping of resistance to Sugarcane Mosaic Virus in maize. *Phytopathology*, 89(8):660–667.
- Xu, M.L., Melchinger, A.E., Lübberstedt, T. (2000). Origin of Scm1 and Scm2 two loci conferring resistance to Sugarcane Mosaic Virus (SCMV) in maize. *Theoretical and Applied Genetics*, 100(6):934–941. <https://doi.org/10.1007/s001220051373>
- Yan, J., Shah, T., Warburton, M.L., Buckler, E.S., McMullen, M.D., Crouch, J. (2009). Genetic characterization and linkage disequilibrium estimation of a global maize collection using SNP markers. *PLoS ONE*, 4(12). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0008451>

- Yu, J., Pressoir, G., Briggs, W.H., Bi, I.V., Yamasaki, M., Doebley, J.F., McMullen, M.D., Gaut, B.S., Nielsen, D.M., Holland, J.B., Kresovich, S., Buckler, E.S. (2006). A unified mixed-model method for association mapping that accounts for multiple levels of relatedness. *Nature Genetics*, 38(2):203–208. <https://doi.org/10.1038/ng1702>
- Yuan, L., Duple, C.M., Melchinger, A.E., Utz, H.E., Lübberstedt, T. (2003). Clustering of QTL conferring SCMV resistance in maize. *Maydica*, 48:55–62.
- Zambrano, J.L., Jones, M.W., Brenner, E., Francis, D.M., Tomas, A., Redinbaugh, M.G. (2014a). Genetic analysis of resistance to six virus diseases in a multiple virus-resistant maize inbred line. *Theoretical and Applied Genetics*, 127(4):867–880. <https://doi.org/10.1007/s00122-014-2263-5>
- Zambrano, J.L., Jones, M.W., Francis, D.M., Tomas, A., Redinbaugh, M.G. (2014b). Quantitative trait loci for resistance to Maize Rayado Fino Virus. *Molecular Breeding*, 34(3):989–996. <https://doi.org/10.1007/s11032-014-0091-6>
- Zeggini, E., Ioannidis, J.P.A. (2009). Meta-analysis in genome-wide association studies. *Pharmacogenomics*, 10(2):191–201.
- Zhang, X., Warburton, M.L., Setter, T., Liu, H., Xue, Y., Yang, N., Yan, J., Xiao, Y. (2016). Genome-wide association studies of drought-related metabolic changes in maize using an enlarged SNP panel. *Theoretical and Applied Genetics*, 129(8):1449–1463. <https://doi.org/10.1007/s00122-016-2716-0>
- Zhao, K., Aranzana, M.J., 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 Genetics*, 3(1):71–82. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.0030004>
- Zhao, L., Liu, H.J., Zhang, C.X., Wang, Q.Y., Li, X.H. (2015). Meta-analysis of constitutive QTLs for disease resistance in maize and its synteny conservation in the rice genome. *Genetics and Molecular Research*, 14(1):961–970. <https://doi.org/10.4238/2015.February.3.3>
- Zhao, Y., Wang, H., Chen, W., Li, Y. (2014). Genetic structure, linkage disequilibrium and association mapping of verticillium wilt resistance in elite cotton (*Gossypium hirsutum* L.) germplasm population. *PLoS ONE*, 9(1). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0086308>

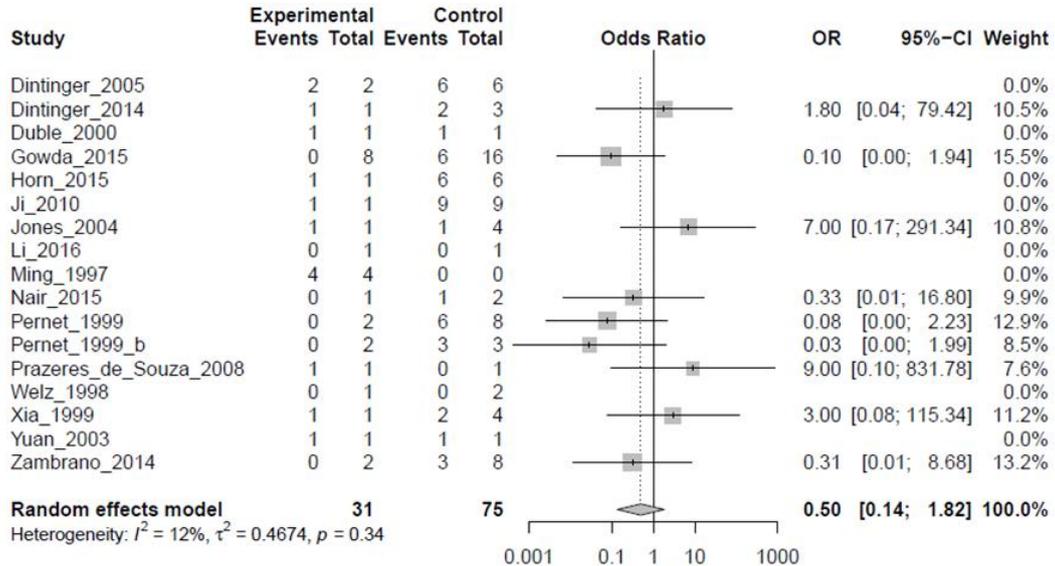
## ANEXO

### Figuras

#### Cromosoma 2



#### Cromosoma 3



#### Cromosoma 4

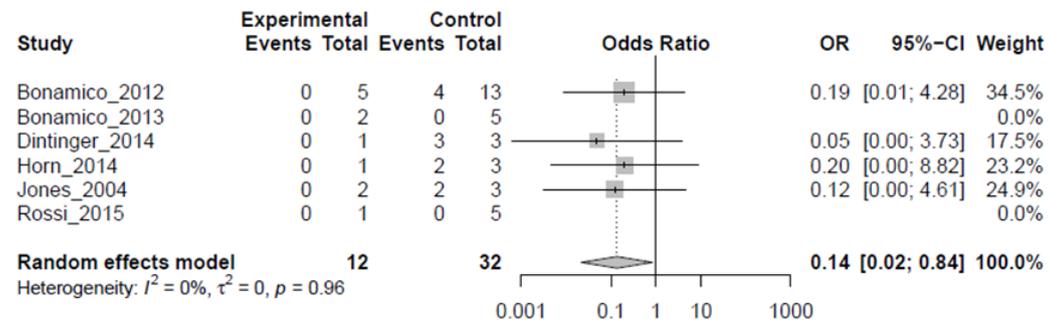
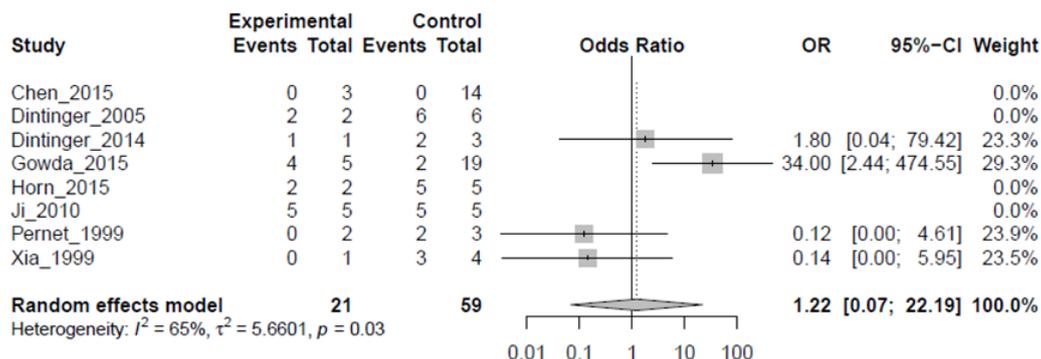
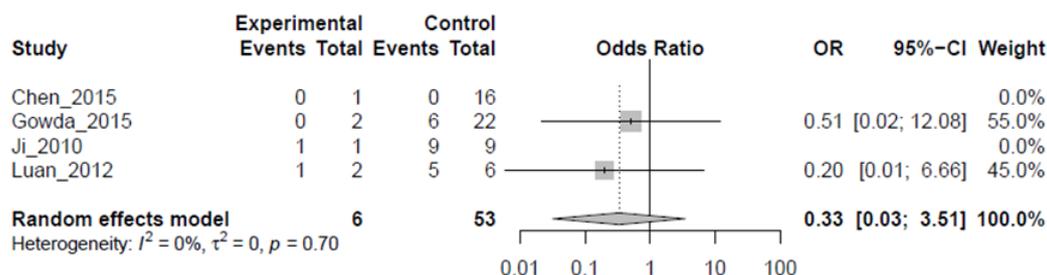


Figura 16: Gráficos *Forest Plot* del meta-análisis realizado con 31 estudios donde se identifican QTL para resistencia a enfermedades virales en maíz. Se presentan los *odds ratio* entre la cantidad de QTL de efecto mayor de los cromosomas 2, 3 y 4 y la cantidad de QTL de efecto mayor en el resto del genoma de maíz.

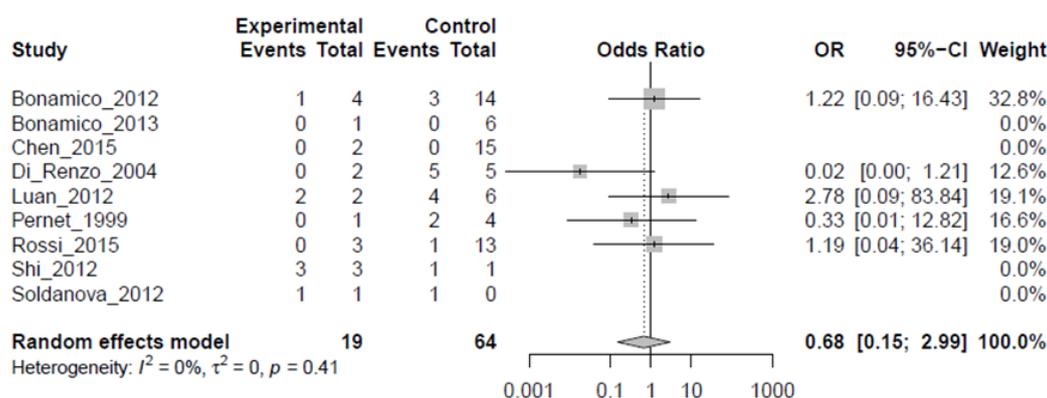
### Cromosoma 5



### Cromosoma 7



### Cromosoma 8



### Cromosoma 9

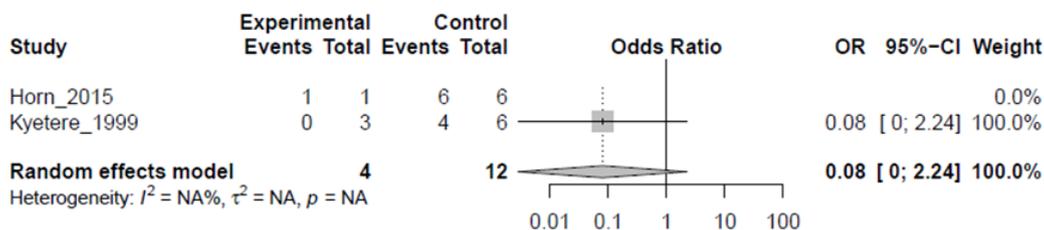


Figura 17: Gráficos *Forest Plot* del meta-análisis realizado con 31 estudios donde se identifican QTL para resistencia a enfermedades virales en maíz. Se presentan los *odds ratio* entre la cantidad de QTL de efecto mayor de los cromosomas 5, 7, 8 y 9 y la cantidad de QTL de efecto mayor en el resto del genoma de maíz.

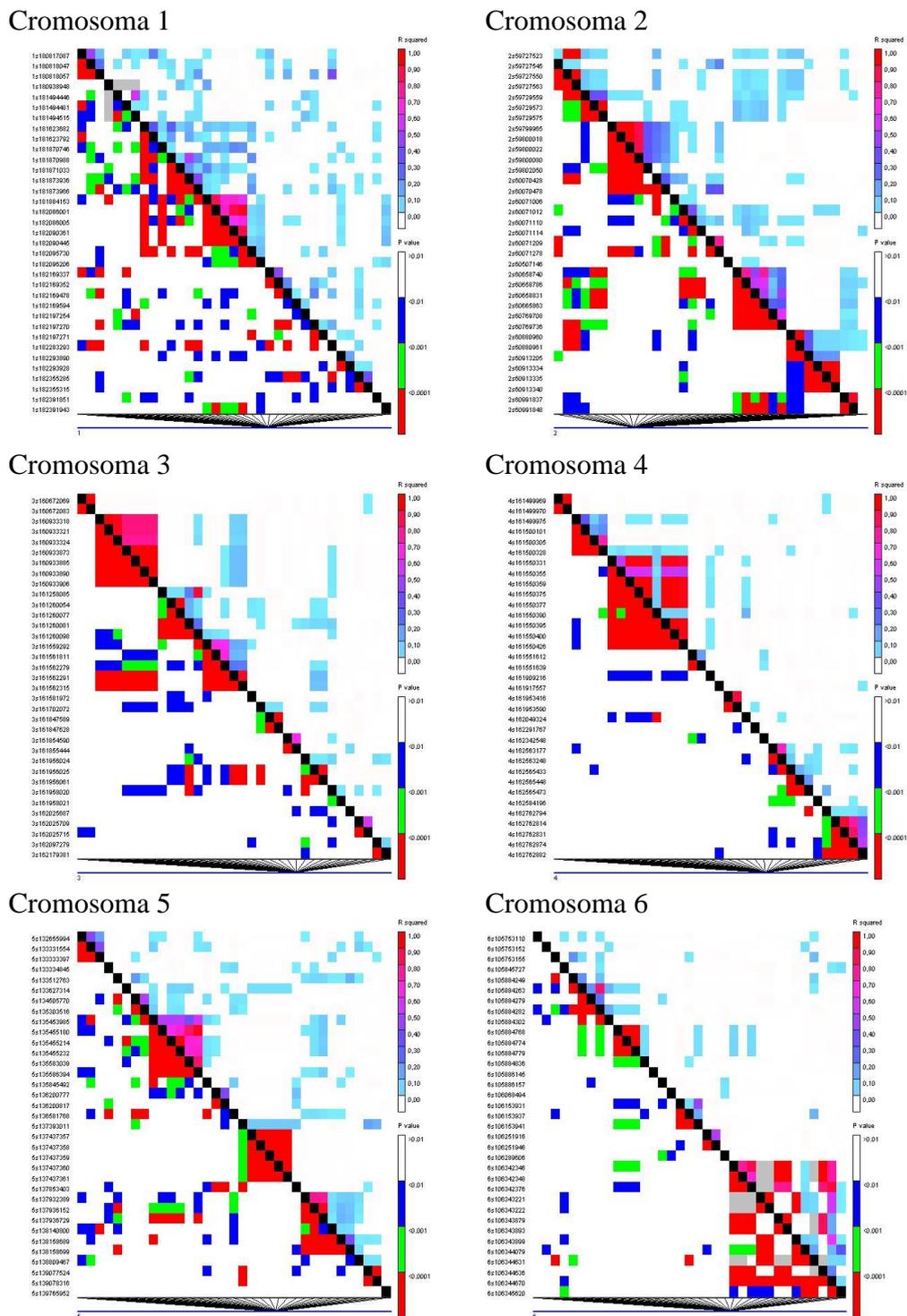
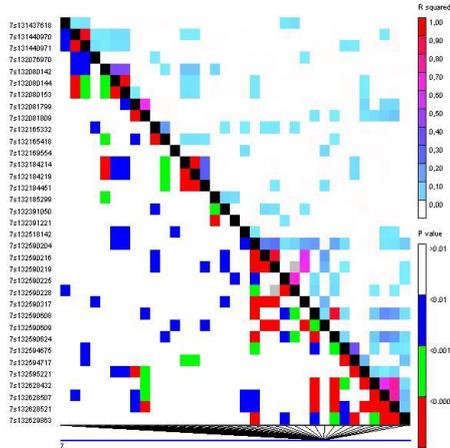
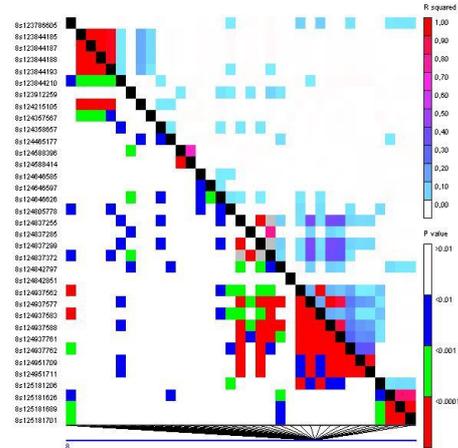


Figura 18. Desequilibrio de ligamiento entre 45.925 SNPs para los cromosomas 1, 2, 3, 4, 5 y 6. En el eje X se indica la posición del marcador y en el eje Y el nombre del marcador.

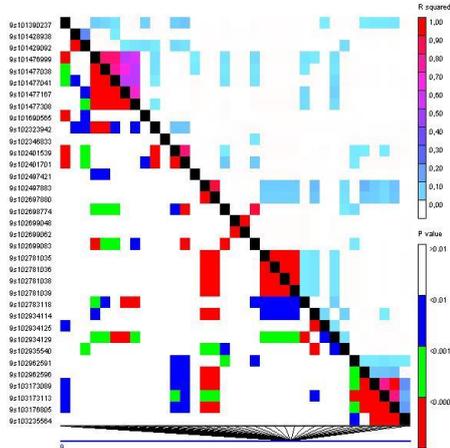
Cromosoma 7



Cromosoma 8



Cromosoma 9



Cromosoma 10

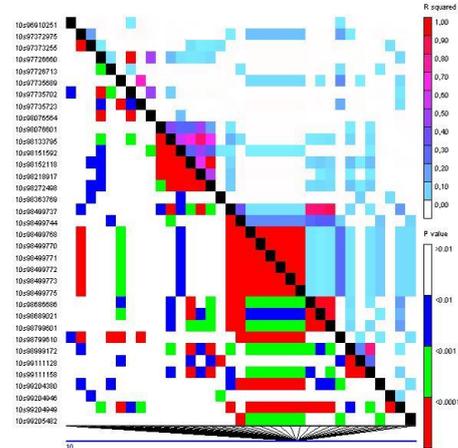
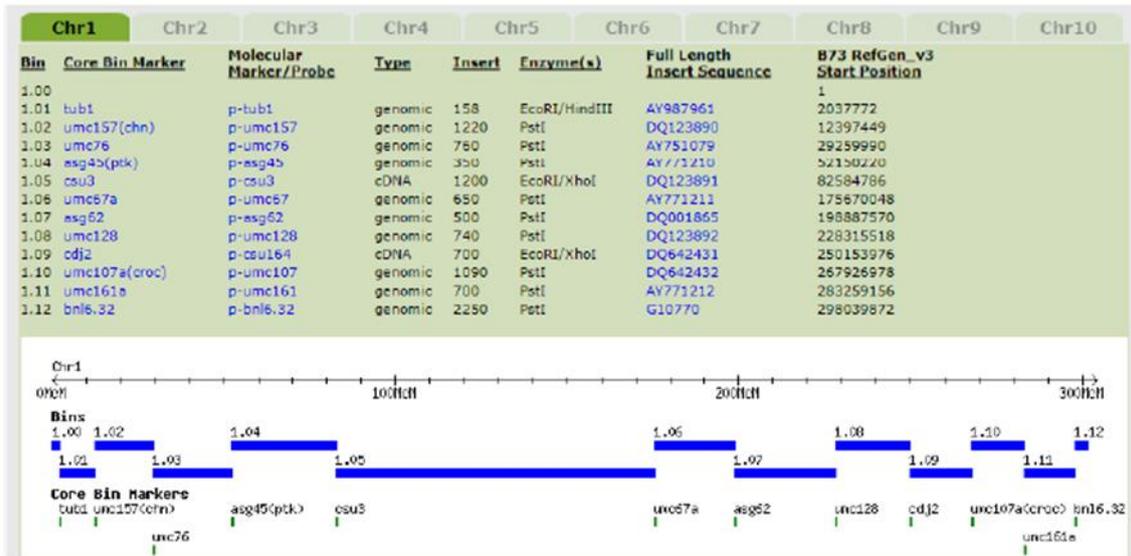


Figura 19. Desequilibrio de ligamiento entre 45.925 SNPs para los cromosomas 7, 8, 9 y 10. En el eje X se indica la posición del marcador y en el eje Y el nombre del marcador.

## Cromosoma 1



## Cromosoma 2

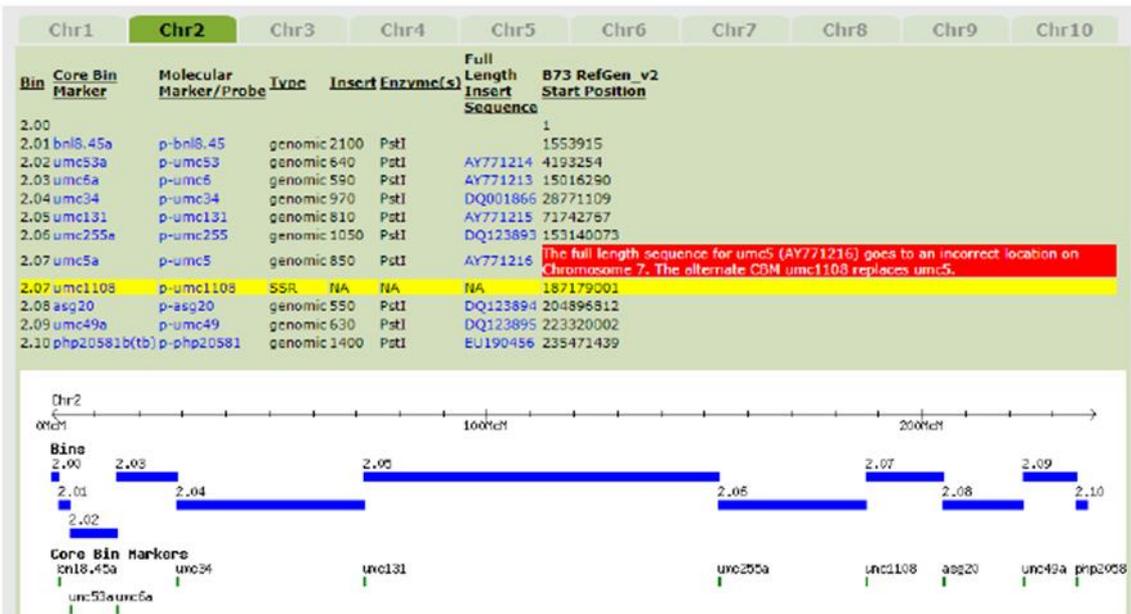
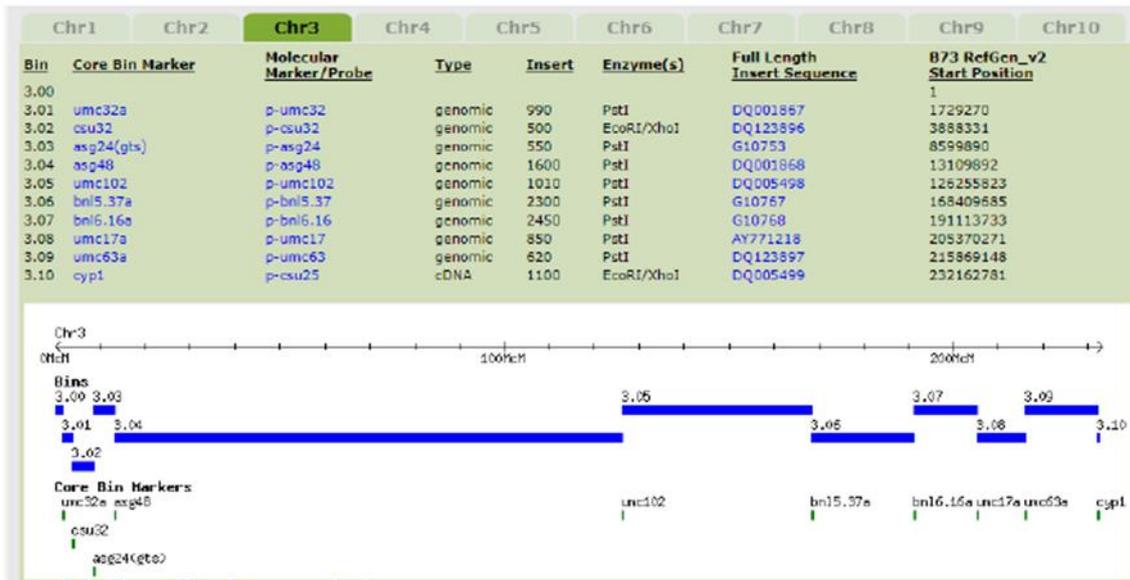


Figura 20. Mapa físico de los cromosomas 1 y 2 donde se muestra la posición en pares de bases de inicio y finalización de cada bin.

### Cromosoma 3



### Cromosoma 4

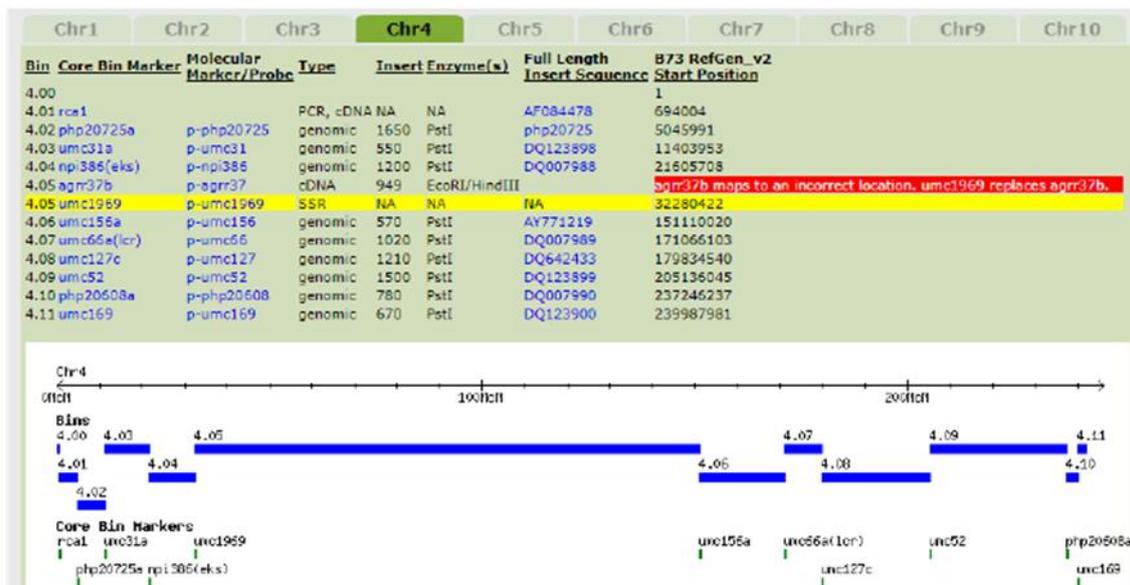
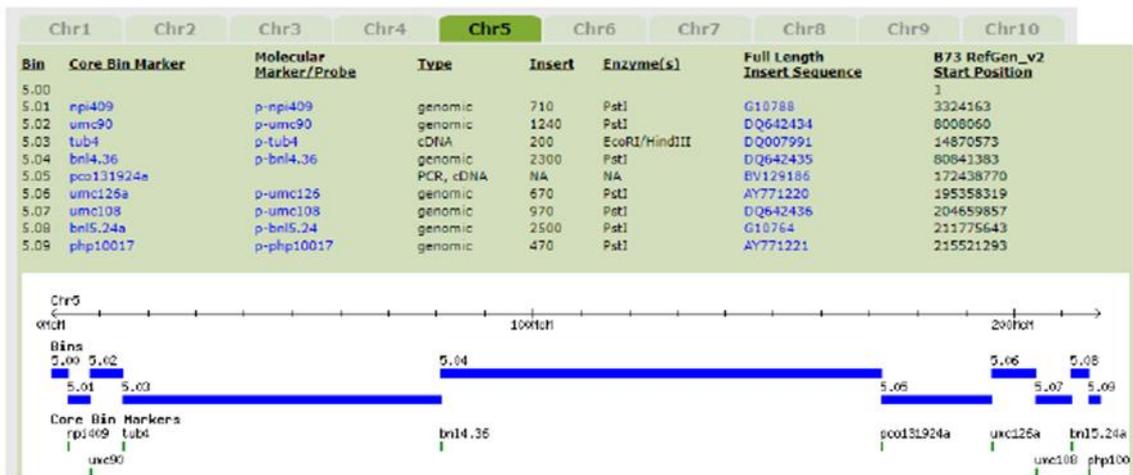


Figura 21. Mapa físico de los cromosomas 3 y 4 donde se muestra la posición en pares de bases de inicio y finalización de cada bin.

## Cromosoma 5



## Cromosoma 6

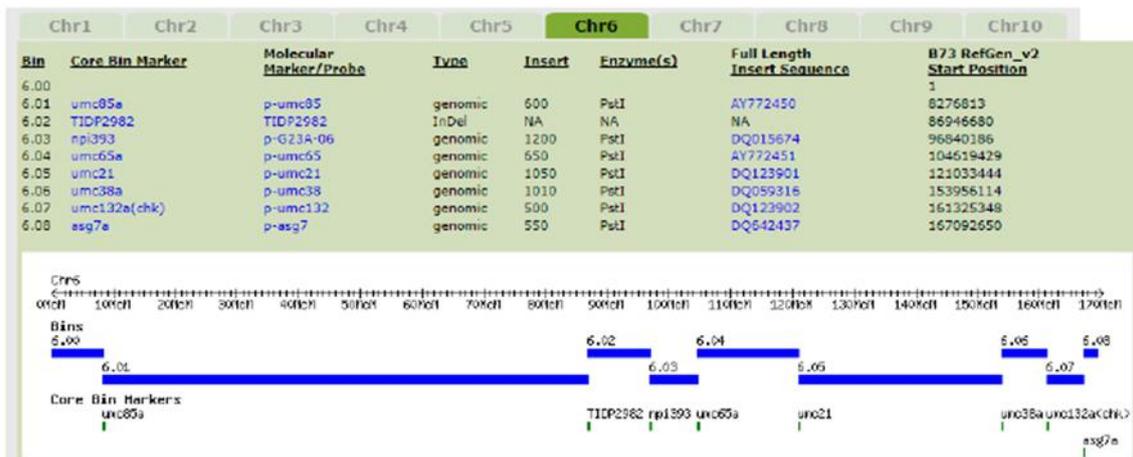
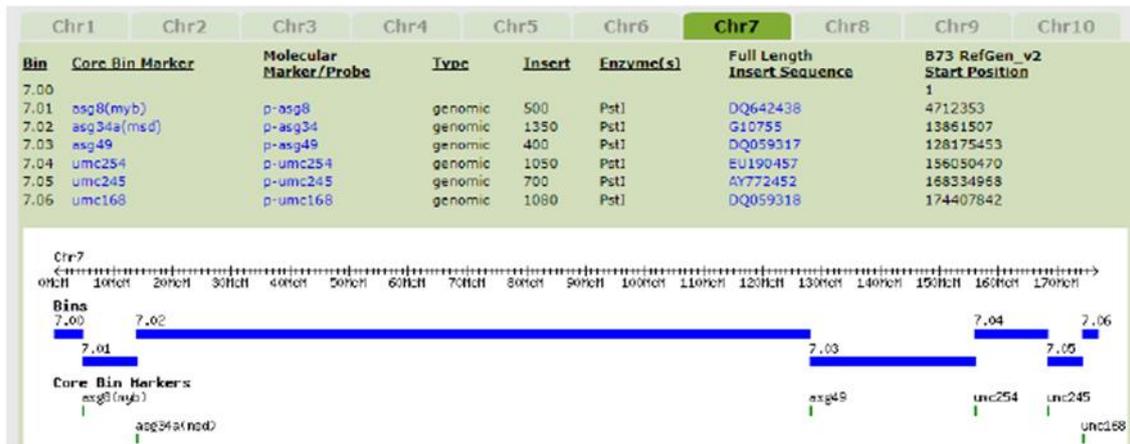


Figura 22. Mapa físico de los cromosomas 5 y 6 donde se muestra la posición en pares de bases de inicio y finalización de cada bin.

## Cromosoma 7



## Cromosoma 8

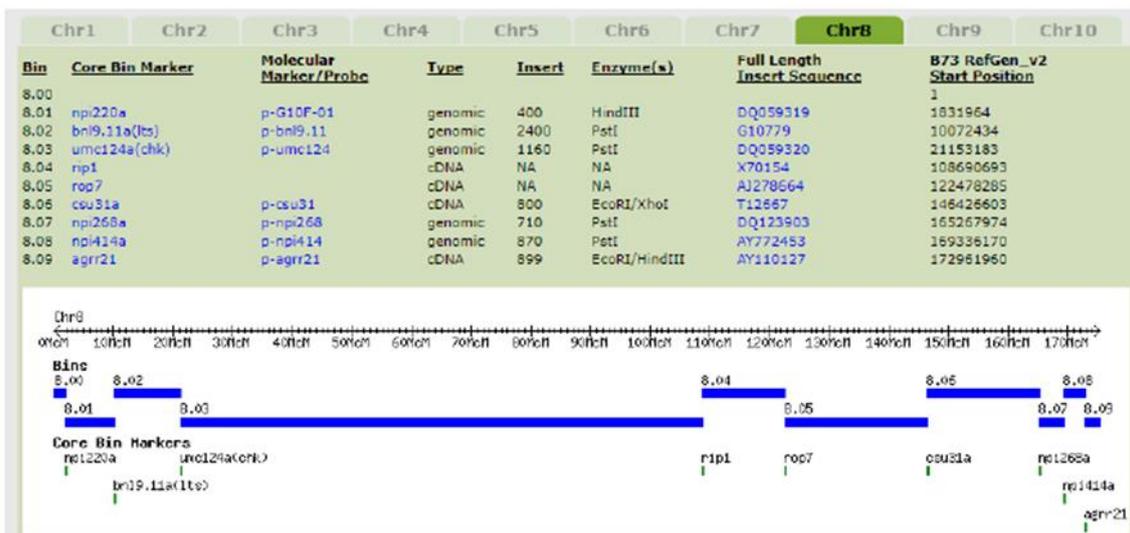
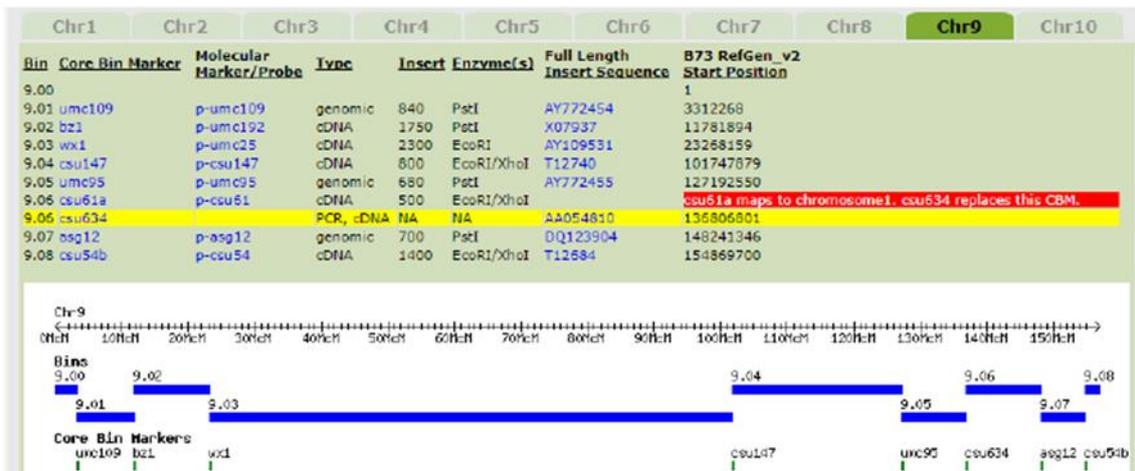


Figura 23. Mapa físico de los cromosomas 7 y 8 donde se muestra la posición en pares de bases de inicio y finalización de cada bin.

## Cromosoma 9



## Cromosoma 10

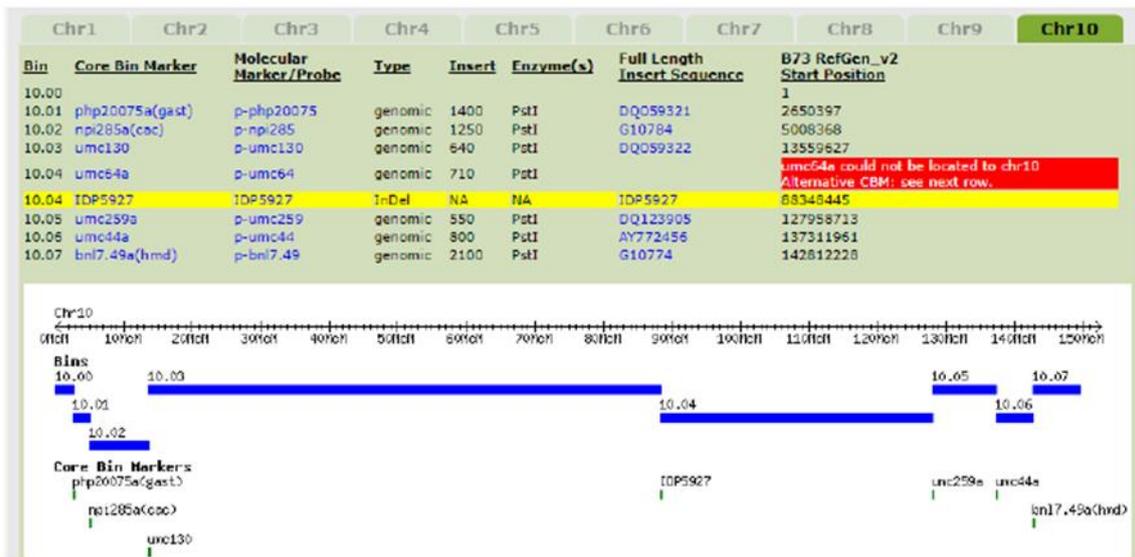


Figura 24. Mapa físico de los cromosomas 9 y 10 donde se muestra la posición en pares de bases de inicio y finalización de cada bin.

Cuadros

Cuadro 11. Regresión lineal múltiple de severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto, con los SNPs asociados en tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.

|              |    | Coefficiente de regresión | Est.      | E.E.   | Valor <i>p</i> |
|--------------|----|---------------------------|-----------|--------|----------------|
| SEV          |    | Constante                 | 1,26      | 0,17   | <0,0001        |
|              | E1 | S10_138027166             | -0,56     | 0,15   | 0,0003         |
|              |    | S5_216204537              | -0,38     | 0,16   | 0,0189         |
|              |    | S5_83859926               | -0,25     | 0,11   | 0,0260         |
|              |    | Constante                 | 1,41      | 0,15   | <0,0001        |
|              | E9 | S9_155585508              | -0,45     | 0,10   | <0,0001        |
|              |    | S2_14799241               | -0,60     | 0,13   | <0,0001        |
| S3_1967838   |    | -0,19                     | 0,08      | 0,0126 |                |
| INC          |    | Constante                 | 70,66     | 8,72   | <0,0001        |
|              | E1 | S2_102285645              | -23,74    | 6,97   | 0,0010         |
|              |    | S6_34889640               | -16,82    | 7,86   | 0,0348         |
|              |    | S10_87097244              | -16,45    | 6,22   | 0,0095         |
|              |    | S5_14468260               | -11,50    | 4,91   | 0,0212         |
|              |    |                           | Constante | 50,17  | 6,41           |
|              | E8 | S2_214063865              | -26,62    | 6,86   | 0,0002         |
|              |    | S10_80487888              | -14,78    | 4,43   | 0,0012         |
|              |    |                           | Constante | 58,03  | 6,29           |
|              | E9 | S10_126872937             | -20,11    | 4,99   | 0,0001         |
| S7_170990040 |    | -9,72                     | 4,28      | 0,0260 |                |
| S6_151485800 |    | -11,14                    | 3,25      | 0,0010 |                |
| S1_44343943  |    | -14,22                    | 4,99      | 0,0057 |                |
| ISE          |    | Constante                 | 40,14     | 5,70   | <0,0001        |
|              | E1 | S10_138027166             | -19,86    | 4,95   | 0,0001         |
|              |    | S5_216204537              | -10,40    | 5,09   | 0,0429         |
|              |    | S5_83859926               | -7,37     | 3,61   | 0,0434         |
|              |    | Constante                 | 49,72     | 6,71   | <0,0001        |
|              | E8 | S2_214063865              | -27,21    | 6,83   | 0,0002         |
|              |    | S1_274718677              | -16,24    | 5,86   | 0,0079         |
|              |    | Constante                 | 54,33     | 6,08   | <0,0001        |
|              | E9 | S10_126872937             | -17,67    | 4,25   | 0,0001         |
|              |    | S2_14799241               | -19,14    | 4,51   | 0,0001         |
| S9_155585508 |    | -11,46                    | 3,61      | 0,0020 |                |

n: número de observaciones; R<sup>2</sup>: Variación fenotípica explicada por el modelo; R<sup>2</sup> Aj: Variación fenotípica ajustada explicada por el modelo; Est.: Estimador; E.E: Error estándar E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018

Cuadro 12. Regresión lineal múltiple de severidad (SEV), incidencia (INC) e índice de severidad de la enfermedad (ISE) Mal de Río Cuarto, con los SNPs asociados a través de tres ambientes de la provincia de Córdoba, Argentina.

|     | Coefficiente de regresión | Est.  | E.E. | Valor <i>p</i> |
|-----|---------------------------|-------|------|----------------|
| SEV | Constante                 | 0,48  | 0,06 | <0,0001        |
|     | S2_841090                 | -0,10 | 0,03 | 0,0032         |
|     | S3_187339659              | -0,10 | 0,04 | 0,0245         |
|     | S2_197936779              | -0,12 | 0,06 | 0,0446         |
| INC | Constante                 | 15,26 | 1,03 | <0,0001        |
|     | S2_841090                 | -3,05 | 0,72 | <0,0001        |
|     | S2_207040885              | -1,87 | 0,66 | 0,0055         |
|     | S9_146872993              | -1,33 | 0,58 | 0,0245         |
|     | S2_151465806              | -2,36 | 0,78 | 0,0030         |
| ISE | Constante                 | 16,16 | 2,04 | <0,0001        |
|     | S2_841090                 | -3,34 | 1,05 | 0,0021         |
|     | S3_187339659              | -3,37 | 1,39 | 0,0175         |
|     | S2_197936779              | -4,01 | 1,90 | 0,0388         |

n: número de observaciones; R2: Variación fenotípica explicada por el modelo; R2 Aj: Variación fenotípica ajustada explicada por el modelo; Est.: Estimador; E.E: Error estándar.

Cuadro 13. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre ambientes para el carácter severidad de la enfermedad MRC.

| Ambiente | E1       | E2       | E3       | E4       | E5       | E6       | E7      | E8       | E9 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|----------|----|
| E1       | -        |          |          |          |          |          |         |          |    |
| E2       | 0,10 ns  | -        |          |          |          |          |         |          |    |
| E3       | 0,04 ns  | -0,02 ns | -        |          |          |          |         |          |    |
| E4       | -0,06 ns | -0,03 ns | -0,02 ns | -        |          |          |         |          |    |
| E5       | 0,20 **  | 0,03 ns  | 0,17 *   | 0,05 ns  | -        |          |         |          |    |
| E6       | -0,01 ns | 0,01 ns  | -0,03 ns | -0,04 ns | 0,08 ns  | -        |         |          |    |
| E7       | -0,02 ns | 0,14 ns  | -0,05 ns | -0,01 ns | 0,01 ns  | 0,09 ns  | -       |          |    |
| E8       | 0,14 ns  | -0,01 ns | 0,08 ns  | 0,04 ns  | 0,27 *** | 0,09 ns  | 0,17 *  | -        |    |
| E9       | 0,11 ns  | 0,08 ns  | 0,12 ns  | -0,05 ns | 0,21 *   | 0,30 *** | 0,15 ns | 0,32 *** | -  |

\*( $p < 0,05$ ); \*\*( $p < 0,001$ ); \*\*\*( $p < 0,0001$ ); ns (no significativo).

E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E2: Chaján 2° fecha de siembra 2015/2016; E3: Río Cuarto 2015/2016; E4: Río Cuarto 2016/2017; E5: Chaján 2016/2017; E6: Rodeo Viejo 1° fecha de siembra 2016/2017; E7: Rodeo Viejo 2° fecha de siembra 2016/2017; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018

Cuadro 14. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre ambientes para el carácter incidencia.

| Ambiente | E1       | E2       | E3       | E4       | E5      | E6      | E7      | E8       | E9 |
|----------|----------|----------|----------|----------|---------|---------|---------|----------|----|
| E1       | -        |          |          |          |         |         |         |          |    |
| E2       | 0,04 ns  | -        |          |          |         |         |         |          |    |
| E3       | 0,05 ns  | -0,02 ns | -        |          |         |         |         |          |    |
| E4       | -0,06 ns | -0,03 ns | -0,02 ns | -        |         |         |         |          |    |
| E5       | 0,18 **  | 0,05 ns  | 0,19 **  | 0,01 ns  | -       |         |         |          |    |
| E6       | -0,04 ns | -0,01 ns | -0,03 ns | -0,04 ns | 0,05 ns | -       |         |          |    |
| E7       | 0,03 ns  | 0,16 *   | -0,05 ns | -0,02 ns | 0,04 ns | 0,13 ns | -       |          |    |
| E8       | 0,11 ns  | 0,01 ns  | 0,05 ns  | 0,09 ns  | 0,25 ** | 0,07 ns | 0,14 ns | -        |    |
| E9       | 0,06 ns  | 0,06 ns  | 0,09 ns  | -0,07 ns | 0,18 *  | 0,21 ** | 0,12 ns | 0,26 *** | -  |

\*(p<0,05); \*\*(p<0,001); \*\*\*(p<0,0001); ns (no significativo).

E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E2: Chaján 2° fecha de siembra 2015/2016; E3: Río Cuarto 2015/2016; E4: Río Cuarto 2016/2017; E5: Chaján 2016/2017; E6: Rodeo Viejo 1° fecha de siembra 2016/2017; E7: Rodeo Viejo 2° fecha de siembra 2016/2017; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018

Cuadro 15. Coeficientes de correlación de *Pearson* entre ambientes para el carácter índice de severidad de la enfermedad.

| Ambiente | E1       | E2       | E3       | E4       | E5       | E6       | E7      | E8       | E9 |
|----------|----------|----------|----------|----------|----------|----------|---------|----------|----|
| E1       | -        |          |          |          |          |          |         |          |    |
| E2       | 0.10 ns  | -        |          |          |          |          |         |          |    |
| E3       | 0.04 ns  | -0.02 ns | -        |          |          |          |         |          |    |
| E4       | -0.06 ns | -0.03 ns | -0.02 ns | -        |          |          |         |          |    |
| E5       | 0.20 **  | 0.03 ns  | 0.17 **  | 0.05 ns  | -        |          |         |          |    |
| E6       | -0.01 ns | 0.01 ns  | -0.03 ns | -0.04 ns | 0.08 ns  | -        |         |          |    |
| E7       | -0.02 ns | 0.12 ns  | -0.05 ns | -0.01 ns | 0.00 ns  | 0.09 ns  | -       |          |    |
| E8       | 0.14 ns  | -0.01 ns | 0.08 ns  | 0.04 ns  | 0.25 *** | 0.09 ns  | 0.17 *  | -        |    |
| E9       | 0.11 ns  | 0.08 ns  | 0.12 ns  | -0.05 ns | 0.21 **  | 0.30 *** | 0.15 ns | 0.32 *** | -  |

\*(p<0,05); \*\*(p<0,001); \*\*\*(p<0,0001); ns (no significativo).

E1: Chaján 1° fecha de siembra 2015/2016; E2: Chaján 2° fecha de siembra 2015/2016; E3: Río Cuarto 2015/2016; E4: Río Cuarto 2016/2017; E5: Chaján 2016/2017; E6: Rodeo Viejo 1° fecha de siembra 2016/2017; E7: Rodeo Viejo 2° fecha de siembra 2016/2017; E8: Río Cuarto 2017/2018; E9: Sampacho 2017/2018