

**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO PARA DETECTAR RESISTENCIA
A PODREDUMBRES DE ESPIGA EN LÍNEAS ENDOCRIADAS DE MAÍZ**

Trabajo Final de Grado
de la alumna



**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales.
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires.**

Pergamino, 21 Junio de 2022

**ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO PARA DETECTAR RESISTENCIA
A PODREDUMBRES DE ESPIGA EN LÍNEAS ENDOCRIADAS DE MAÍZ**

Trabajo Final de Grado

de la alumna

LUCIA DANIELA MONTENEGRO

Aprobada por el Tribunal Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Evaluador

(Nombre y Apellido)
Co-Director

(Nombre y Apellido)
Director

**Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales,
Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires**

Pergamino, 21 de Junio de 2022

AGRADECIMIENTOS

A mi directora Juliana Iglesias y a mi co-director Agustín Baricalla, por haber estado acompañándome siempre en todo el proceso de formación.

Al INTA y a todo el equipo de trabajo del área de mejoramiento genético de maíz, en especial a Belén Kistner.

A la UNNOBA, por estos años de aprendizaje y formación académica.

A mi familia por el apoyo incondicional. Sobre todo, a mis padres, les agradezco profundamente el esfuerzo que hicieron para brindarme educación.

A todos mis compañeros y amigos que se fueron sumando a lo largo de la carrera.

ÍNDICE

INTRODUCCIÓN	7
1.1 Importancia del maíz	7
1.2 Interacción maíz-patógeno	7
1.2.1 Respuesta inmune a nivel de membrana: PTI	9
1.2.2 Respuesta inmune a nivel intracelular: ETI	9
1.3 Podredumbre de espiga del maíz	10
1.3.1 <i>Fusarium verticillioides</i>	11
1.3.1.1 Ciclo de vida de <i>Fusarium verticillioides</i> :	12
1.3.1.2 Interacción maíz- <i>F. verticillioides</i>	14
1.3.2 <i>Fusarium graminearum</i>	15
1.3.2.1 Ciclo de vida de <i>F. graminearum</i> :	16
1.3.2.2 Interacción maíz- <i>F. graminearum</i>	18
1.3.3 <i>Ustilago maydis</i>	19
1.3.3.1 Ciclo de vida de <i>U. maydis</i>	20
1.3.3.2 Interacción maíz- <i>U. maydis</i>	22
1.4 Relevancia del problema y aportes desde el mejoramiento genético	23
1.5 Antecedentes genéticos del maíz	23
1.6 Mapeo de asociación de genoma completo: GWAS	24
HIPÓTESIS	27
OBJETIVO GENERAL	27
OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
MATERIALES Y MÉTODOS	28
2.1 Material vegetal	28
2.2 Fenotipado de líneas frente a los distintos patógenos	28
2.2.1 Evaluación de <i>Fusarium spp.</i>	28
2.2.1.1 Análisis estadístico de los datos de <i>Fusarium spp</i>	29
2.2.2 Evaluación del carbón común	30
2.2.2.1 Análisis estadístico de los datos de carbón común:	30
2.3 Análisis genotípico de las líneas endocriadas, a través del uso de marcadores moleculares SNPs	32
2.4 Establecer asociaciones entre síntomas visibles (fenotipo) y polimorfismos de marcadores genéticos (genotipo) de las líneas endocriadas de maíz	33
2.5 Desequilibrio de ligamiento	34

RESULTADOS	35
3.1.1 Caracterizar la respuesta de un grupo de líneas endocriadas de maíz frente a la infección con <i>Fusarium verticillioides</i>, <i>Fusarium graminearum</i> y <i>Ustilago maydis</i>	35
3.1.1 Fenotipado <i>Fusarium</i> spp.:	35
3.1.2 <i>Fusarium verticillioides</i> :	35
3.1.3 <i>Fusarium graminearum</i> :	38
3.1.4 Fenotipado carbón común:	41
3.1.5 Análisis de datos de las tres enfermedades	42
3.2 Análisis genotípico de las líneas endocriadas, a través del uso de marcadores moleculares SNPs.....	45
3.3 Establecer asociaciones entre síntomas visibles (fenotipo) y polimorfismos de marcadores genéticos (genotipo) de las líneas endocriadas de maíz.	45
3.4 Desequilibrio de ligamiento	50
3.5 SNPs significativos	51
3.5.1 Ideograma: SNPs significativos.....	51
3.5.1 <i>Fusarium verticillioides</i>	53
3.5.2 <i>Fusarium graminearum</i>	53
3.5.3 <i>Ustilago maydis</i>	55
3.5.2 Bins comunes entre patógenos	55
DISCUSIÓN	58
CONCLUSIÓN	66
BIBLIOGRAFÍA.....	67
ANEXO.....	77

RESUMEN

ESTUDIO DE ASOCIACIÓN DE GENOMA COMPLETO PARA DETECTAR RESISTENCIA A PODREDUMBRES DE ESPIGA EN LÍNEAS ENDOCRIADAS DE MAÍZ

El maíz (*Zea mays L.*) es uno de los cultivos más utilizados a nivel mundial para brindar alimento a la población y producir derivados como biocombustibles y bioproductos. Este cereal se ve afectado por distintas enfermedades fúngicas, entre ellas, las podredumbres de espiga, ocasionadas por *Fusarium verticillioides* (FV), *Fusarium graminearum* (FG) y *Ustilago maydis* (UM). Estas enfermedades no solo disminuyen el rendimiento de los granos, sino que también afectan la salud de las personas y los animales, debido a que producen micotoxinas perjudiciales. A la fecha, no existen métodos de control químico que resulten efectivos frente a estas enfermedades. Por lo tanto, una manera eficaz y sustentable de controlarlas es mediante el mejoramiento genético para resistencia a enfermedades. En este sentido, una de las herramientas más utilizadas actualmente es el mapeo de asociación de genoma completo (GWAS, del inglés *Genome Wide Association Study*) que se basa en la asociación genotipo (SNP)-fenotipo y resulta eficaz para identificar QTL de resistencia. El objetivo general del trabajo final de grado fue identificar regiones génicas de resistencia múltiple a FV, FG y UM, en 63 líneas endocriadas de maíz del programa de mejoramiento genético de INTA Pergamino, mediante un estudio de GWAS. El trabajo se realizó en tres etapas: 1) fenotipado, 2) genotipado y 3) asociación fenotipo-genotipo. Inicialmente, se obtuvieron datos de severidad de síntomas (FV y FG) e incidencia (UM) de la enfermedad a partir de ensayos sembrados en dos ambientes para *Fusarium spp.* y en cinco ambientes para UM. El genotipado se llevó a cabo utilizando un chip de SNPs 50K de Illumina; el cual contiene 56.110 SNPs validados con el genoma de referencia de maíz B73. Se utilizaron los valores BLUE (*Best linear unbiased estimator*) obtenidos del análisis de los datos fenotípicos para llevar a cabo la asociación. La misma se realizó con el programa Tassel (Bradbury *et al.*, 2007), utilizando un modelo lineal mixto: MLM (Q+K). A partir de los estudios de asociación realizados se obtuvieron 4 bins candidatos (segmentos cromosómicos) para resistencia: 2.05, 2.06, 2.09, 2.10 correspondientes a FV, 10 bins: 2.02, 2.05, 2.06, 2.09, 2.10, 3.04, 5.03, 6.07, 7.04, 8.08 para FG y 7 bins: 1.07, 2.05, 2.08, 2.09, 3.01, 5.03, 5.05 para resistencia a UM. Los bins 2.05 y 2.09 son regiones asociadas a resistencia para las 3 enfermedades. Los resultados obtenidos son muy alentadores ya que se hallaron SNPs significativos asociados a genes involucrados en el reconocimiento de patógenos y en vías de señalización que controlan diferentes moléculas y procesos que contribuyen a la resistencia genética a enfermedades. Este trabajo proporciona información altamente relevante ya que es la primera vez que se describe un bin candidato para resistencia múltiple a enfermedades en germoplasma argentino.

Palabras claves: GWAS, resistencia múltiple, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum*, *Ustilago maydis*, carbón común.

INTRODUCCIÓN

1.1 Importancia del maíz

El maíz (*Zea mays* L.), es uno de los tres cereales más importantes de los que depende la humanidad para proveerse de alimentos y derivados industriales como bioinsumos y bioproductos. Para la economía nacional, constituye uno de los rubros productivos más importantes, ya que es utilizado por diferentes áreas como el sector ganadero, los productores de etanol, las industrias procesadoras y el comercio exterior, generando empleo y riqueza nacional (Bolsa de comercio de Rosario, 2021).

En nuestro país ocupa el tercer lugar de importancia en cuanto a superficie cultivada con una participación mundial que, para la campaña 2021/22, se estima en 47 millones de toneladas (de 1189 millones de toneladas mundiales totales, USDA 2021).

1.2 Interacción maíz-patógeno

El maíz es afectado por diversos patógenos y plagas que disminuyen la productividad y la calidad de los granos aumentando la brecha entre el rendimiento potencial y el real (Eyhérbide, 2012).

Una enfermedad se desarrolla cuando se dan tres factores: un hospedante susceptible, un patógeno virulento y un ambiente favorable (triángulo de la enfermedad) (Ali y Yan, 2012). El entendimiento de cada uno de estos factores es fundamental para el desarrollo de técnicas que generen una solución sustentable al problema de la sanidad de cultivos.

Las plantas utilizan distintas estrategias para defenderse del daño provocado por patógenos. Comúnmente, la resistencia a enfermedades en maíz suele ser mayormente del tipo cuantitativo (herencia poligénica donde los rasgos fenotípicos están determinados por muchos genes de efecto parcial y por factores ambientales) que cualitativo (herencia monogénica, fenotipo controlado por uno o pocos genes de efecto mayor) (Wisser, 2006).

Si a esto sumamos la resistencia efectiva contra más de un patógeno, tenemos la resistencia a múltiples enfermedades, que de aquí en más llamaremos MDR, por sus siglas en inglés *Multiple Disease Resistance*) (Ali y Yan, 2012).

La resistencia MDR estaría condicionada por diversos mecanismos a nivel de locus y genes. Puede ser controlada por grupos de genes de resistencia (genes *R*), por genes patógeno-específico y/o por genes de efecto pleiotrópico (Wiesner-Hanks y Nelson, 2016). En maíz, por citar un ejemplo, Balint-Kurti *et al.* (2010) hallaron evidencias de este tipo de resistencia; observaron una alta correlación entre la resistencia a tres enfermedades (tizón sureño, tizón norteño y mancha gris de la hoja) en la población de maíz B73xMo17.

En líneas generales, las plantas poseen dos tipos de defensas; las constitutivas y las inducidas. Las defensas constitutivas, forman la primera línea de defensa contra factores bióticos y abióticos y son las barreras preformadas o existentes, tales como las paredes celulares, cutículas epidérmicas cerosas, corteza, tricomas, idioblastos, células pigmentadas, células cristalíferas y de sílice, así como compuestos antimicrobianos preformados; componentes químicos, ya presentes en la planta. Por otro lado, las defensas inducibles, constituyen el sistema inmune propiamente dicho de la planta y activan cascadas de señalización, muerte celular programada (HR *hipersensitive response*) y metabolitos secundarios de defensa. Estas defensas inducibles se dividen en dos niveles: PTI (del inglés *PAMP-triggered immunity*) y ETI (del inglés *effector-triggered immunity*), respuesta inmunitaria: a nivel de membrana e intracelular respectivamente (Bent y Mackey, 2007; Jones y Dangl, 2006). Cuando los patógenos intentan invadir las plantas pueden ser reconocidos por el sistema inmune de las mismas y desencadenar respuestas locales (LAR: *local acquired resistance*) o sistémicas (SAR: *systemic acquired resistance*) (Lanver *et al.*, 2017).

Por otra parte, los patógenos poseen distintos estilos de vida patogénicos, es decir formas de invadir y nutrirse de las plantas. Los patógenos biótrofos se nutren de células viables del hospedante y suelen suprimir las defensas del huésped colonizando tejidos sanos. Los necrótrofos en cambio, inducen la muerte de las células del huésped a través de toxinas o enzimas degradativas (Labunile *et al.*, 2014). Los patógenos (hemi) biotrófos combinan el estilo biótrofo y el necrótrofo, es decir, pasan por una fase biótrofa donde colonizan al huésped ingresando a las células y luego desarrollan una fase necrotrófica (Audenaert *et al.*, 2013). Estas fases pueden tener distinta duración, según el patógeno del que se trate.

1.2.1 Respuesta inmune a nivel de membrana: PTI

Se trata de la inmunidad activada por patógenos y funciona a través de receptores de reconocimiento de patrones transmembrana (PRR, del inglés, *Pattern Recognition Receptor*) que reconocen patrones moleculares asociados a patógenos (PAMP, *Pathogen-associated Molecular Pattern*) o también llamados patrones moleculares asociados a microbios (MAMP, *Microbe-associated Molecular Patterns*) y / o patrones moleculares asociados a peligro / daño (DAMP, *Damage-associated Molecular Patterns*) (Iglesias, 2015).

La estimulación de los PRRs conlleva a la activación de la inmunidad activada por PAMP. Esto provoca la inducción de las proteínas quinasas activadas por mitógeno (MAPKs) y activación de la vía de calcio, transcripción de genes de respuesta a patógenos, producción de especies reactivas de oxígeno (ROS, del inglés *Reactive oxygen species*) y deposición de calosa a modo de reforzar la pared celular en los sitios de infección (Lanubile *et al.*, 2014).

1.2.2 Respuesta inmune a nivel intracelular: ETI

Las plantas poseen un mecanismo de respuesta más especializada, la inmunidad activada por efectores: ETI. Actúa de manera intracelular e involucra el reconocimiento de efectores (proteínas producidas por los patógenos para provocar infección) por parte de las proteínas de resistencia específica (Lanubile *et al.*, 2014). Los genes R codifican proteínas de dominio repetido rico en leucina / unión de nucleótidos polimórficos (NB-LRR) que reconocen a los efectores (Dodds y Rathjen, 2010).

ETI es una respuesta acelerada y amplificada de PTI, que finaliza en resistencia completa a la enfermedad y usualmente genera una respuesta de muerte celular hipersensitiva (HR, *Hypersensitive response*) en el sitio de infección (Balint-Kurti, 2019). ETI es una respuesta contra patógenos adaptados, eficaz solo para patógenos que tienen un estilo de vida (hemi)biotrófico. El receptor (planta) y los efectores (patógeno) de ETI están diversificados y en constante coevolución. ETI es cualitativamente más fuerte y más rápida que PTI (Jones y Dangl, 2006; Dodds y Rathjen, 2010).

Los efectores pueden suprimir PTI y ETI, algunos poseen funciones estructurales, mientras que otros tienen funciones de nutrición, dispersión o logran imitar las hormonas vegetales. Además, suelen amplificar moléculas secundarias de señalización como ácido salicílico (AS), etileno (ET) y jasmonato (JA). Las defensas tipo AS suelen ser eficientes contra patógenos biotrófos y las respuestas de tipo JA se activan frente a patógenos necrótrofos (Audenaert *et*

al., 2013). Se sabe que muchas veces se produce interacción y efectos sinérgicos entre las vías de AS y JA en infecciones provocadas por patógenos, por un lado, esto es importante para la defensa, pero al mismo tiempo proporciona múltiples oportunidades para la interferencia del patógeno (Audenaert *et al.*, 2013, Lanubile *et al.*, 2014).

1.3 Podredumbre de espiga del maíz

Dentro de las enfermedades que se encuentran presentes en la región; las podredumbres de espiga producen consecuencias no solo sobre el rinde de los granos (Presello *et al.*, 2006, 2016), sino también sobre la salud de las personas y los animales, debido a la acumulación de micotoxinas perjudiciales (Presello *et al.*, 2016; Wang *et al.*, 2014; Warburton *et al.*, 2015; Iglesias, 2008; Iglesias *et al.*, 2008). Las micotoxinas son sustancias tóxicas naturales de bajo peso molecular producidas como metabolitos secundarios por algunos hongos filamentosos, que al ser ingeridas por humanos o animales inducen micotoxicosis (Bennet y Klich, 2003; Botta y Gonzalez, 2012). La acumulación de toxinas ocurre antes de la cosecha y se incrementa cuando las condiciones de almacenamiento no son las adecuadas. Las altas temperaturas y la humedad propia de los ambientes subtropicales generan un hábitat favorable para los hongos toxigénicos (Thompson y Raizada, 2018).

Dentro del complejo fúngico que produce la podredumbre de la espiga del maíz, se encuentran ***Fusarium verticillioides*** (Saccardo) Nirenberg [(= *F. moniliforme* (Sheldon), teleomorfo *Gibberella moniliformis* (Wineland) (=G. fujikuroi (Sawadalto in Ito & Kimura, mating type A)], ***Fusarium graminearum*** Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae* Schwein) y ***Ustilago maydis*** (Persoon) Roussel.

Aunque estos patógenos presentan grandes diferencias, comparten algunas características; como el modo de ingreso a la espiga, los mecanismos de evasión a la respuesta inmune del hospedante y pueden potenciar su proceso de infección interactuando entre ellos, como ocurre con *F. verticillioides* y *U. maydis* (Blacutt *et al.*, 2017). Además, estudios previos identificaron genotipos resistentes a ambas especies de *Fusarium* (*F. verticillioides* y *F. graminearum*) en maíz (Presello *et al.*, 2004, Presello *et al.*, 2006, Reid *et al.*, 2009, Mesterházy *et al.*, 2011, Montenegro *et al.*, 2018).

1.3.1 *Fusarium verticillioides*

Es un hongo patógeno necrótrofo, causante de podredumbre de espiga FER (del inglés *Fusarium ear rot*), que se encuentra asociado al maíz en la mayoría de los estadios del ciclo del crecimiento de la planta (Labunile *et al.*, 2014). Se lo denomina necrótrofo por su capacidad de inducir muerte en el tejido celular del hospedante para nutrirse.

Sobrevive como saprófito en el rastrojo y durante los períodos tempranos de infección, el hongo se comporta como endófito infectando la semilla o el tallo sin provocar daños visibles. Cuando las condiciones ambientales son favorables (clima cálido y húmedo), infecta los tejidos de la planta provocando pudrición en raíz, tallo o mazorca (Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Una de las principales características de esta enfermedad es la producción de metabolitos secundarios tóxicos, conocidos como micotoxinas, que pueden acumularse en los alimentos causando daños a los animales y potencialmente a los humanos (Blacutt *et al.*, 2017). Dentro de las micotoxinas que produce este hongo se encuentran las fumonisinas (FB), el ácido fusárico, la fusarina y la moniliformina (Reynoso *et al.*, 2004). Las fumonisinas (FB1, FB2, FB3, y FB4), son las más estudiadas debido a que se presentan frecuentemente y se las detectó en altas concentraciones en maíz, siendo FB1 la mejor caracterizada (Mansson *et al.*, 2010). Esta toxina, tiene la capacidad de interrumpir la biosíntesis de componentes principales de la membrana plasmática de las células (esfingolípidos), generando muerte celular y alteraciones de los procesos celulares (SCF, 2000; Voss *et al.*, 2007), que facilitan la supervivencia y progreso de este necrótrofo.

En humanos, las fumonisinas son consideradas factores de riesgo predisponentes para el cáncer de esófago y defectos en el tubo neural (Bennett y Klich, 2003). En animales, causan leucoencefalomalacia en caballos, edema pulmonar en cerdos, reduce el crecimiento en aves de corral y provoca desordenes inmunes y hepáticos en cabras (Logrieco *et al.*, 2003; Voss *et al.*, 2007).

1.3.1 1Ciclo de vida de *Fusarium verticillioides*:

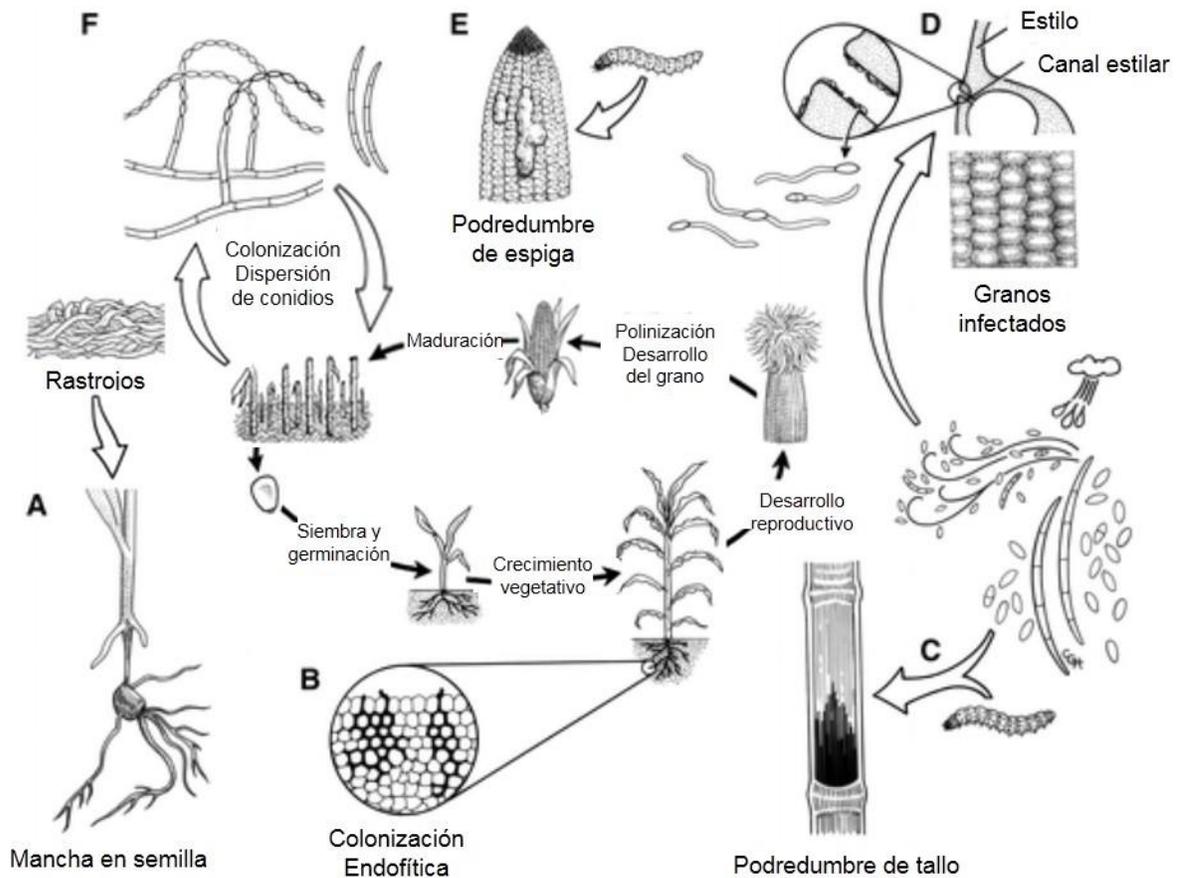


Figura 1: El ciclo de la enfermedad por *Fusarium verticillioides*, centrado en el ciclo de vida del maíz. A. Las semillas que germinan en suelos infestados con *Fusarium* pueden desarrollar una pudrición agresiva y tizón en las plántulas (también llamado *Damping-off*). B. La colonización endofítica ocurre de manera asintomática. C. Las heridas del tallo por daño mecánico o por la alimentación de insectos se convierten en campos de infección para *F. verticillioides* y pueden resultar en pudrición del tallo y vuelco de la planta. D. En estadio de prolongación de los estigmas florales, el hongo puede colonizar los granos de maíz a través del canal estilar, dando lugar al patrón estriado en granos y podredumbre de espiga. E. Las larvas de la polilla europea del barrenador del maíz (*Diatraea saccharalis*) se alimentan de hojas, tallos, mazorcas y tejidos del cogollo, proporcionando lugares de infección para la pudrición del tallo y las mazorcas de *F. verticillioides*. F. Después de la cosecha, el hongo es capaz de sobrevivir y esporular sobre los residuos del cultivo, proporcionando inóculo para infecciones posteriores. Tomada y modificado/traducido de Blacutt *et al.*, 2017

El patógeno sobrevive en los rastrojos de la superficie del suelo; siendo esta la principal fuente de inóculo de *F. verticillioides*. La germinación de la semilla infectada puede desarrollar una pudrición importante en plántulas o producirse de manera asintomática a través de una infección endófitica por medio del crecimiento de hifas formadoras de conidióforos (Blacutt *et al.*, 2017). *F. verticillioides* utiliza múltiples rutas de entrada a la planta las cuales generan

diferentes vías de infección (de plántulas, de mazorca vía estigmas y por daño mecánico) (Torre-Hernández *et al.*, 2014). La infección sistémica de las plántulas ocurre durante la germinación de la semilla y se establece a lo largo del crecimiento de la planta. La infección de la mazorca a través de los estigmas es la vía más común y ocurre cuando los conidios transportados por el aire y el agua de lluvia, se depositan en los estigmas. De esta manera las esporas germinan y las hifas fúngicas crecen a través de la parte inferior del canal estilar, incluso en ausencia de lesiones mecánicas (Duncan y Howard, 2010). Por último, la infección del tallo y la mazorca por daño mecánico, sucede cuando insectos plagas que se alimentan del maíz perforan las espigas y/ o tallos (Torre-Hernández *et al.*, 2014).

La sequía y el calor generan las condiciones óptimas para el crecimiento de *F. verticillioides*. Los síntomas de enfermedad se pueden observar en granos individuales con crecimiento algodonoso del hongo o con estrías blancas en el pericarpio y en áreas limitadas de la mazorca (Figura 2) (Mesterházy y Reid, 2011).



Figura 2: Síntomas de *Fusarium verticillioides*. Figuras gentileza del grupo de mejoramiento de maíz (GMM) del INTA Pergamino. A: Se observa el típico síntoma de estriado de color blanco sobre los granos de la mazorca. B: granos con podredumbre formados por colonias del hongo de color blanco.

Después de la cosecha, el hongo sobrevive y esporula en los rastrojos, proveyendo inóculo para futuras infecciones (Blacutt *et al.*, 2017). De esta manera, el ciclo comienza nuevamente. Entender el ciclo de vida e infección de *F. verticillioides* es fundamental para el desarrollo de estrategias de control exitosas. Hasta el momento, el control químico para *Fusarium* es descrito como “exitosamente fallido” (Blacutt *et al.*, 2017).

1.3.1.2 Interacción maíz- *F. verticillioides*

F. verticillioides no genera estructuras especializadas que le permitan el ingreso al hospedante, por lo tanto, produce enzimas líticas y toxinas, como las micotoxinas FB1 que contribuyen al proceso de infección (Torre-Hernández *et al.*, 2014). Aunque los niveles de FB1 varían dependiendo la cepa de *F. verticillioides*, estudios muestran que existe correlación entre síntomas visibles de la enfermedad y la toxicidad de las micotoxinas (Iglesias *et al.*, 2010; Presello *et al.*, 2006).

La capacidad de sintetizar fumonisinas depende del locus génico FUM. Evidencias sugieren que las fumonisinas son el factor de virulencia de *F. verticillioides* en los procesos de infección y colonización de plántulas de maíz (Torre-Hernández *et al.*, 2014), aunque existe disenso en la infección en estigmas.

En maíz, la FB1 actúa inhibiendo:

1. La enzima esfinganina N-acil transferasa, la cual participa en la biosíntesis *de novo* de esfingolípidos. Estos forman parte de la endomembrana en plantas, proporcionando integridad estructural y son mediadores de procesos celulares como la muerte celular programada y la transducción de señales dependientes del ácido abscísico (ABA).

La inhibición de esta enzima provoca la acumulación de moléculas como las bases esfingoideas de cadena larga (BCL), que están implicadas en la generación de ceramidas. La acumulación de BCL activa de la vía del ácido salicílico (AS) implicado en estimulación de respuestas inmunes de defensa y consecuente muerte celular del tejido del hospedante, lo cual favorece al hongo necrótrofo.

2. La ATPasa de protones de membrana plasmática:

La inhibición de esta enzima membranal transportadora de protones, provoca acidificación del espacio apoplástico, acortamiento de la elongación de la raíz y tallo y evita la interacción con proteínas involucradas en la respuesta de defensa.

3. Las β -1,3-glucanasas básicas:

Las β -1,3-glucanasas son enzimas hidrolíticas que actúan durante la respuesta inmune de defensa, hidrolizando proteínas como glucanos presentes en la pared celular de hongos filamentosos, inhibiendo el crecimiento celular. Además, las glucanasas liberan de la pared celular oligosacáridos que actúan como elicitores y activan respuestas de defensa. Las fumonisinas inhiben directamente a las glucanasas básicas y ácidas involucradas en la activación de la vía del AS (Torre-Hernández *et al.*, 2014).

Fusarium verticillioides representa una seria amenaza económica para la producción y la calidad del maíz, por lo tanto, es de gran importancia generar conocimiento sobre la interacción de este patógeno con el maíz, para llevar a cabo un manejo eficiente de la enfermedad.

1.3.2 *Fusarium graminearum*

Es un hongo patógeno hemibiótrofo que emprende la colonización del huésped de manera biotrófica e intercelular y luego muta hacia una fase necrotrófica de mayor agresividad (Audenaert *et al.*, 2013).

Este patógeno produce micotoxinas, especialmente deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA), que causan contaminación del grano de maíz afectando a humanos y animales. Aunque DON no posee gran toxicidad, es considerada la micotoxina más importante económicamente (Audenaert *et al.*, 2013). DON es un inhibidor de la síntesis proteica en los eucariotas, interfiriendo en las etapas de inicio, la elongación y terminación de proteínas (Bennett y Klich, 2003). Cuando los animales de granja ingieren altas dosis de DON, les genera náuseas, vómitos y diarrea; inflamación gastro-intestinal, necrosis del tracto intestinal, de la médula ósea y de los tejidos linfoides (Audenaert *et al.*, 2013). Los cerdos pierden el apetito y consecuentemente bajan de peso (Bennett y Klich, 2014).

ZEA, es un análogo estrogénico (fitoestrógeno) altamente tóxico. La forma reducida de ZEA: zearalenona, incrementa la actividad estrogénica. Trabajos realizados en cerdos, demostraron

que, en bajas concentraciones, ZEA genera síndrome hiperestrogénico y altas concentraciones de ZEA provocan interrupción en la concepción y abortos. En otros estudios realizados en cabras y ovejas se observaron problemas reproductivos (Bennett y Klich, 2003).

1.3.2.1 Ciclo de vida de *F. graminearum*:

1- Fase saprófita:

F. graminearum puede sobrevivir en residuos orgánicos en ausencia del hospedante vivo. Esta fase es muy importante ya que determina la carga de inóculo inicial.

2- Fase infectiva:

La infección es una de las fases más importantes del ciclo y se produce con la formación de las estructuras reproductivas: conidios (anamorfo) y ascosporas (teleomorfo). Estos entran en contacto con el hospedante a través de las salpicaduras provocadas por la lluvia o son dispersadas por el viento. Las rutas de entrada son las mismas anteriormente mencionadas para *F. verticillioides*. El momento más susceptible de infección ocurre durante o después de la antesis, donde los conidios o ascosporas pueden germinar y penetrar al hospedante (Audenaert *et al.*, 2013).

F. graminearum produce una podredumbre generalizada de la espiga que avanza desde el extremo terminal hacia la base de la misma (Figura 3) (Botta y Gonzalez, 2012). DON actúa como un factor de virulencia esencial para el desarrollo de síntomas luego del proceso de infección (Audenaert *et al.*, 2013). La podredumbre comúnmente comienza como un micelio blanco que se mueve hacia abajo, y luego se vuelve de color rosa rojizo en los granos infectados, debido a la presencia de pigmentos. La velocidad a la que se desarrollan los síntomas depende del ambiente, siendo 26°C la temperatura óptima para su desarrollo y requiere de prolongados períodos de humedad (Mesterházy *et al.*, 2012).



Figura 3: Síntomas *Fusarium graminearum*. A: micelio rosa de *F. graminearum* sobre la chala de una mazorca. B: podredumbre de espiga causada por *F. graminearum*, se observa que el micelio rosa se distribuye desde la punta de la mazorca hasta la base. Figura gentileza GMM del INTA Pergamino.

3- Fase biotrófica:

Crecimiento de las hifas de manera superficial e intercelular durante la fase biotrófica.

4- Fase necrotrófica:

El hongo ingresa a la fase necrotrófica y comienza a crecer de forma intracelular, generando muerte celular y consecuentemente necrosis. En esta fase es de vital importancia la producción de DON (factor de virulencia).

5- Después de la cosecha, los conidios subsisten en los rastrojos como fuente de inóculo para un nuevo ciclo.

1.3.2.2 Interacción maíz- *F. graminearum*

Los patógenos manipulan el metabolismo de su hospedante para completar su ciclo de vida. Activan la biosíntesis de fitohormonas (citoquininas (CQ) y ácido abscísico (ABA)) de la planta y utilizan sus nutrientes para su crecimiento. Además, suprimen la respuesta de defensa de las plantas e incrementan la susceptibilidad del hospedante (Morrison *et al.*, 2015).

La inducción de muerte celular (HR) es conocida como defensa contra los patógenos biótrofos, pero no resulta eficaz contra necrótrofos. Altas concentraciones de DON mostraron desencadenar la síntesis de ROS y consecuentemente muerte celular. La primera respuesta de defensa del hospedante se basa en la producción de ROS y por consiguiente la activación de la vía AS que conlleva a la activación de genes que codifican proteínas involucradas en mecanismos de defensa como PR10, quitinasas, peroxidasas y PR5. Por otra parte, la fase necrotrófica de *F. graminearum* utiliza las ROS para la activación de la vía del JA (antagónica a la de AS activada por la planta) y elevar así la concentración de DON que provoca muerte celular (via ROS) e inhibe las proteínas de defensa anteriormente activadas. Es decir que se produce una retroalimentación positiva que incrementa a DON y ROS (Audenaert *et al.*, 2013).

1.3.3 *Ustilago maydis*

U. maydis causa lo que se denomina carbón común del maíz. Es un hongo basidiomicete biótrofo (parásito obligado que se nutre de las células vivas del hospedante) y es reconocido por la planta a través de sus PAMP (defensas PTI). Su presencia impulsa defensas dependientes del AS en la planta, mientras que el hongo por su parte sintetiza citoquininas y ABA en los tejidos infectados. El carbón se identifica fácilmente por las agallas con aspecto de tumor (Figura 4), que se forman en tejidos en activo crecimiento (Montenegro *et al.*, 2018). Al principio son de color blanco y luego se tornan gris a la madurez debido a su alta concentración



Figura 4: Síntoma de *Ustilago maydis*. Se pueden observar las agallas en los granos de la espiga. Inicialmente son blancos y luego se tornan grises debido a la gran concentración de teliosporas, que posteriormente rompen el tejido, se liberan y son transportadas por el viento. Foto gentilmente GMM del INTA Pergamino.

de melanina (Covas, 2010). Éstas contienen una masa oscura, pulverulenta de teliosporas (esporas del carbón) y se forman frecuentemente en las espigas femeninas y masculinas, tallos, nudos y hojas.

U. maydis afecta severamente los rendimientos en años favorables y aunque no produce micotoxinas, la formación de agallas puede facilitar la infección de otros patógenos que producen micotoxinas como *F. verticillioides* y *F. graminearum* (Thompson y Raizada, 2018).

1.3.3.1 Ciclo de vida de *U. maydis*

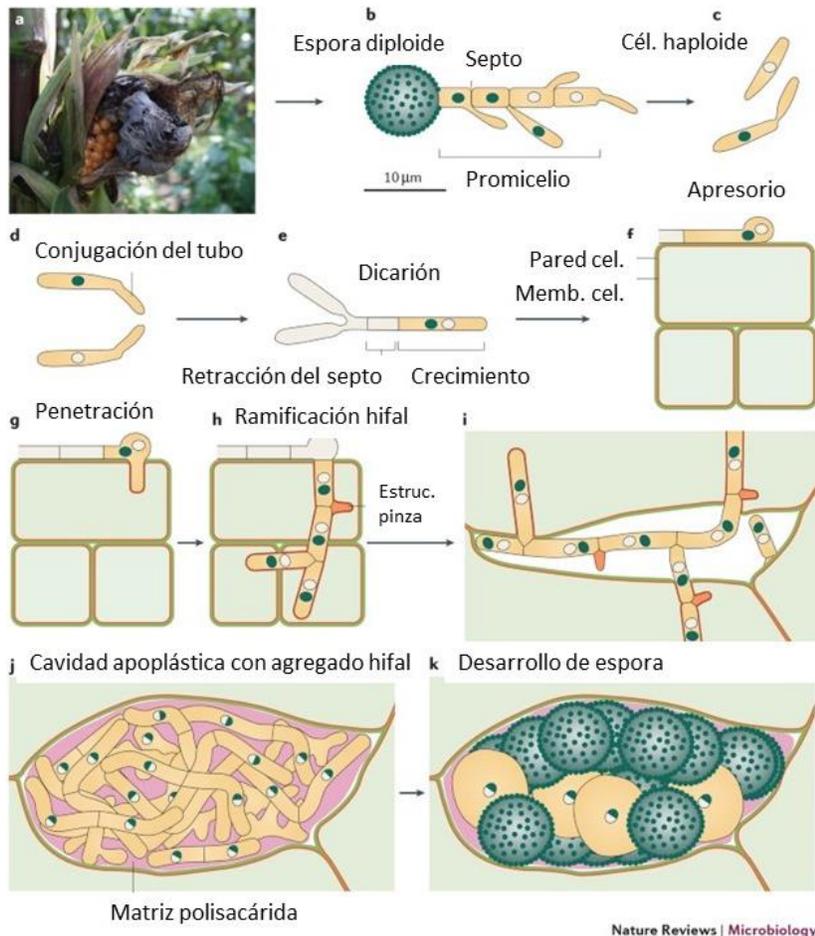


Figura 5: Ciclo de vida de *U. maydis*. a. Síntomas de una infección en mazorcas por UM. b. Las esporas diploides se liberan cuando los tumores se abren. La meiosis ocurre en esporas en germinación; los cuatro núcleos haploides resultantes migran a un promicelio, en el que quedan delineados por un septo. c. Después de las divisiones mitóticas, las células haploides brotan de estos compartimentos. d. Tras la detección de un buen apareamiento, el programa de gemación cesa y las células desarrollan tubos de conjugación que se dirigen entre sí. e. Después de la fusión celular, se produce una hifa con dos núcleos (Dicarion) y el crecimiento hifal se detiene. Solo la punta creciente de este filamento está llena de citoplasma (amarillo), mientras que las partes más viejas están vacuoladas (grises) y se sellan mediante septos espaciados regularmente. f., g. Las células de la punta hifal desarrollan apresorios en lugares específicos de la superficie de la hoja y luego penetran células vegetales. h. Las hifas comienzan a ramificarse y estructuras en forma de pinzas (naranja) aseguran la correcta segregación de los dos núcleos. i. Hifas intercelulares. j. Células diploides forman enormes agregados en cavidades apoplásticas. k. Las hifas luego se fragmentan y experimentan el desarrollo de esporas. En todos los paneles, los núcleos blancos y gris oscuro indican que son haploides y tienen diferentes genes de apareamiento. Núcleos mitad blancos y mitad gris oscuro indican núcleos diploides. Figura tomada y modificado/traducido de Lanver *et al.*, 2017.

El modo de reproducción de este patógeno puede ser sexual o asexual.

Reproducción sexual (Figura 5):

Se pueden observar 4 fases:

1. Proliferación de células haploides
2. Apareamiento (*mating*)
3. Producción de filamentos
4. Infección

Inicialmente, las esporas diploides se desarrollan dentro de los tumores, y son liberadas cuando estos se abren. Las esporas germinan y por meiosis generan cuatro núcleos haploides. Las esporas diploides antes de germinar, pueden pasar a un estado de latencia esperando que las condiciones sean adecuadas.

Las células haploides sufren mitosis formándose así una espora uninucleada llamada esporidio. Ésta al germinar, produce un micelio uninucleado que vive sobre la planta; si se desarrollan micelios compatibles (+ y -), su fusión origina un micelio dicariótico, que es el que parasita partes de la planta (Banuett yHerskowitz, 1988).

Cuando la unión se vuelve estable, comienza el crecimiento de las hifas de manera intracelular, estableciendo una zona de interacción biotrófica, que facilita el intercambio de nutrientes y moléculas de señalización, incluyendo varios factores proteicos. Esto genera una supresión del sistema inmune innato y logra la manipulación del metabolismo del hospedante a través de la producción de proteínas efectores por parte del patógeno (Matei y Doehlemann, 2016). Las células de la punta hifal desarrollan apresorios en lugares específicos de la superficie de la hoja y luego penetran células vegetales. Una vez que atraviesa la membrana celular de la planta, establece una interacción directa con el hospedante para el comienzo de la colonización. El crecimiento de las hifas se da de manera intercelular. El micelio comienza a crecer y luego de una masiva colonización, las células del hospedante comienzan a dividirse irregularmente generando tumores en las partes aéreas de la planta (Vollmeister *et al.*, 2012). Posteriormente, los dos núcleos del dicarion se fusionan y las células diploides proliferan

formando enormes agregados en el apoplasto. Luego, se fragmentan y se generan las esporas.

Se estima que una sola agalla contiene más de 200 billones de esporas (teliosporas) que pueden permanecer viables por varios años y ser diseminadas por el viento o gotas de lluvia. Las mismas se forman frecuentemente en las inflorescencias femeninas y masculinas, tallos, nudos y hojas (Covas, 2010).

Reproducción asexual

Asexualmente, se reproduce mediante la formación de conidios y conidiósporas en la superficie del hospedante (Banuett yHerskowitz, 1988).

1.3.3.2 Interacción maíz- *U. maydis*

Los patógenos fúngicos biotróficos de las plantas, como *U. maydis*, establecen una relación íntima con su hospedante para desarrollar una infección exitosa. Para esta estrategia es fundamental la secreción de una variedad de efectores de proteínas que permiten al patógeno evadir las defensas inmunitarias de las plantas y modular el metabolismo del hospedante para satisfacer sus necesidades (Lanver *et al.*, 2017).

Estudios transcriptómicos realizados en maíces infectados indicaron que *U. maydis* es reconocido por los genes relacionados con patogénesis de la planta de maíz en las primeras 24 horas después de la infección. Aunque, en estadios posteriores, la defensa de la planta parece apagarse (Vollmeister *et al.*, 2012). Un mecanismo posible podría ser la interferencia con las vías de señalización de la planta. La vía del JA parece estar inducida en los tejidos infectados, el cual es un antagonista del AS, un componente esencial en la defensa contra patógenos biotróficos. Estudios previos muestran que esto podría relacionarse con el cluster bW/bE en el cual se encuentran genes asociados a virulencia (Vollmeister *et al.*, 2012). Mutantes carentes de genes asociados a virulencia como *pep1*, fallaron en la inducción de la señalización de JA, generando que no se supriman las respuestas de defensa de la planta en las primeras etapas de infección (Vollmeister *et al.*, 2012).

1.4 Relevancia del problema y aportes desde el mejoramiento genético

Las enfermedades fúngicas de las plantas representan una de las amenazas más importantes para la agricultura. Los conocimientos generados en aspectos toxicológicos de las micotoxinas del maíz han llevado a un incremento en la demanda de productos con niveles mínimos de contaminación (Blacutt *et al.*, 2017). En maíz, la contaminación puede ocurrir durante el almacenamiento o procesamiento de los granos, tal es el caso para géneros como *Aspergillus* y *Penicillium*, o a campo. Para las especies de *Fusarium*, el mayor problema se presenta a campo, con niveles favorables de humedad y/o temperatura, que favorecen el desarrollo fúngico y la consecuente contaminación con toxinas (Iglesias, 2008).

A la fecha no existen métodos de control químico que sean efectivos para estas enfermedades (Montenegro *et al.*, 2018); trabajos previos y recientes confirman que *F. verticillioides* y *F. graminearum* no responden favorablemente ante la utilización de fungicidas (Bonilla *et al.*, 2017, 2020; Masiello *et al.*, 2019). Por lo tanto, una manera eficaz y sustentable de controlar las podredumbres de espiga es mediante el mejoramiento genético (Ali y Yan, 2012; Mesterházy *et al.*, 2012). Los efectos que provocan la contaminación con micotoxinas, han desencadenado la búsqueda de formas duraderas y eficaces de controlar estas enfermedades en el maíz (Gaikpa y Miedaner, 2019).

La identificación y uso de progenitores resistentes constituye el punto de partida para desarrollar híbridos resistentes (Wang *et al.*, 2014; Ali y Yan, 2012). Sin embargo, con los métodos clásicos de mejoramiento, la selección de estas fuentes de resistencia resulta costosa, en términos de tiempo y dinero, y requiere, además, de un ojo entrenado y experto. Por ello, los programas de mejoramiento actuales tratan constantemente de encontrar alternativas de selección más prácticas, precisas y rápidas (Jamann *et al.*, 2014; Ali y Yan, 2012; Wisser *et al.*, 2006).

1.5 Antecedentes genéticos del maíz

El maíz tiene una larga historia en el desarrollo de herramientas genéticas y genómicas, experimentando ahora un renacimiento en la era molecular, y se considera uno de los sistemas de plantas superiores más accesibles, ya que posee un genoma completamente secuenciado y marcadores moleculares caracterizados (Dawe y Nannas, 2015).

Se sabe que la resistencia a enfermedades está dada mayormente por caracteres cuantitativos (Wisser *et al.*, 2006; Balint-Kurti y Johal, 2009). La resistencia a podredumbres de espiga son rasgos complejos que se heredan cuantitativamente a través de un largo número de genes de efectos pequeños dispersos a lo largo de todo el genoma de maíz y depende en gran medida de efectos ambientales. Mapear caracteres cuantitativos es complejo, ya que el fenotipo está dado por la sumatoria de efectos génicos producto de la acción conjunta de dos o más genes, su interacción y la interacción con el ambiente (Ali y Yan, 2012). Por lo tanto, su estudio se realiza a través de QTL, del inglés *quantitative trait loci* que son regiones genómicas asociadas a la variación de caracteres cuantitativos (Gaikpa y Miedaner, 2019).

Como se mencionó anteriormente, los métodos tradicionales de mejoramiento requieren procesos lentos y laboriosos. Recientemente, el uso de marcadores moleculares, el alto rendimiento brindado por las tecnologías de secuenciación y la disponibilidad de bases de datos online, han hecho posible obtener información sobre genes candidatos. Los genes candidatos (GC) son genes que poseen alelos que controlan un complejo de rasgos con una función bioquímica asociada previamente a esos genes (Gaikpa y Miedaner, 2019). El conocimiento de GC permite un mejor entendimiento de los mecanismos moleculares de la resistencia a podredumbre de espiga, ya que se conoce que existen genes que regulan vías que controlan el crecimiento de la planta o la activación de respuestas de defensa contra patógenos (Ali y Yan, 2012, Gaikpa y Miedaner, 2019).

1.6 Mapeo de asociación de genoma completo: GWAS

Recientemente, se comenzaron a utilizar nuevos métodos, como el mapeo de asociación de genoma completo (GWAS) para detectar genes implicados en resistencia a enfermedades (Li *et al.*, 2011). Este método es una herramienta eficaz para identificar QTL, ya que se basa en la asociación entre la variación fenotípica y polimorfismos genéticos de una población dada (Ali y Yan, 2012). Es decir, identifica las bases genéticas de la variación fenotípica. Estos estudios se han convertido en enfoques valiosos para identificar genes vinculados a funciones específicas o genes de efectos más sutiles, así como genes que comprenden alelos segregantes responsables de la variación fenotípica (Burghardt *et al.*, 2017).

Una de las ventajas del mapeo de asociación es que utiliza poblaciones con muchas generaciones sometidas a eventos de recombinación. Esto le permite basarse en el principio de desequilibrio de ligamiento (LD), el cual plantea que solo permanecerán aquellas

asociaciones entre los marcadores moleculares y genes que estén altamente ligados al carácter de interés. Toda asociación entre QTL-marcador que no esté estrechamente ligada habrá sido eliminada a través de las recombinaciones producidas en cada generación; permitiendo una buena resolución en la localización de QTL (Oraguzie *et al.*, 2007, Stich y Melchinger, 2010, Burghardt *et al.*, 2017).

El desequilibrio de ligamiento se refiere a la asociación no al azar de alelos en diferentes loci. En el mapeo de asociación, LD no solo está influenciada por la recombinación génica, sino que también lo está por el tipo de apareamiento, la deriva genética, la selección, mutación, la estructura poblacional y el grado de parentesco y por la verificación de la asociación entre QTL-marcadores (Stich y Melchinger, 2010, Remington *et al.*, 2001). La caída del LD con el aumento de la distancia entre loci es un factor muy importante en estudios de asociación, ya que interviene en la resolución y precisión del mapeo, determinando la densidad de marcadores moleculares necesaria. Por ejemplo, si la caída del LD es rápida, se logrará una alta resolución en las asociaciones identificadas, pero a la vez, se requerirá un gran número de marcadores moleculares para identificar regiones génicas (Yu y Buckler, 2006).

En un mapeo de asociación exitoso se requiere un buen genotipado (secuenciación de porciones variantes del genoma) para inferir la estructura poblacional y el grado de parentesco subyacente en el material utilizado, así como también para obtener buenas asociaciones marcador-fenotipo (Stich y Melchinger, 2010). El genotipado del material debe contar con marcadores moleculares que abarquen todo el genoma de maíz. Se pueden utilizar diferentes marcadores, pero los marcadores del tipo de polimorfismo de nucleótido único (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*) son más estables, con baja tasa de mutación, cubren el genoma densamente y son capaces de estimar eficazmente la estructura poblacional y el parentesco. El primer paso del GWAS es identificar SNPs en una cantidad que refleje la estructura de LD en todo el genoma y la diversidad de haplotipos disponible (Stich y Melchinger, 2010).

Por otro lado, con el mismo nivel de importancia, es necesario tener buenos datos fenotípicos para evaluar correctamente el comportamiento de los genotipos y lograr localizar genes de interés relacionados con la resistencia a enfermedades.

El poder del mapeo de asociación para identificar genes de interés recae en cinco factores importantes: la complejidad genética del rasgo evaluado, el modo de herencia del rasgo, la

cantidad de repeticiones, el grado de parentesco del material evaluado, y la densidad de las variantes genómicas (Burghardt *et al.*, 2017).

Como ya se expresó anteriormente en este texto, la resistencia genética a podredumbres de espiga en maíz es de carácter cuantitativo y complejo lo que ha dificultado notablemente el desarrollo de la selección asistida por marcadores (Han *et al.*, 2018; Zila *et al.*, 2014). En este sentido, el uso de la técnica de mapeo de asociación facilitará identificar QTL de resistencia, contribuyendo a reducir pérdidas económicas y a desarrollar variedades genéticamente resistentes (Ali y Yan, 2012).

HIPÓTESIS

Existe variabilidad genética para la resistencia a *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum*, y *Ustilago maydis* en las líneas endocriadas del programa nacional de mejoramiento de maíz (PNMM).

OBJETIVO GENERAL

Identificar regiones génicas de resistencia múltiple a *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum* y *Ustilago maydis*, en líneas endocriadas del PNMM de INTA Pergamino, mediante el estudio de asociaciones genómicas (GWAS).

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1) Caracterizar la respuesta de un grupo de líneas endocriadas de maíz frente a la infección con *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum* y *Ustilago maydis*.
- 2) Realizar un análisis genotípico de las líneas endocriadas, a través del uso de marcadores moleculares SNPs.
- 3) Establecer asociaciones entre síntomas visibles (fenotipo) y polimorfismos de marcadores genéticos (genotipo) de las líneas endocriadas de maíz.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1 Material vegetal

Se evaluó un set diverso de 63 líneas endocriadas de maíz pertenecientes al programa de mejoramiento genético de maíz de la E.E.A INTA-Pergamino. Este set incluye materiales de endosperma flint y dentado desarrollados localmente a partir de variedades nativas y/o germoplasma exótico. Por otra parte, se cuenta con datos de pedigrí e información del origen genético de estas líneas (Olmos *et al.*, 2014; 2016); con el valor de las heredabilidades de resistencia en sentido amplio, H^2 , (proporción de la varianza fenotípica total que se atribuye a la varianza genotípica) de *Fusarium verticillioides* (0,84) y de *Fusarium graminearum* (0,78) (Nazar, 2020) y con información sobre la estructuración genética de las líneas ($Q=3$). Esta información fue proporcionada por la alumna Sofía Perdomo (estudiante avanzada de la Lic. en genética), quien realizó el análisis de estructuración como parte de su tesina de grado (en proceso de finalización al momento de la escritura de este trabajo).

2.2 Fenotipado de líneas frente a los distintos patógenos

2.2.1 Evaluación de *Fusarium spp.*

Los datos de la evaluación de las podredumbres de espiga causadas por *Fusarium spp.* fueron obtenidos previamente por el grupo de mejoramiento de maíz de la EEA INTA-Pergamino. Los ensayos fueron sembrados en las campañas 2002/2003 y 2016/17 bajo un diseño de parcelas divididas con dos repeticiones. El inóculo para la inoculación artificial de *F. verticillioides* fue desarrollado en base al aislamiento monospórico P364 (Iglesias *et al.*, 2010) y el inóculo de *F. graminearum* (Presello *et al.*, 2011) a partir del monospórico IVII3, ambos de capacidad toxicogénica y agresividad conocida.

La evaluación de la severidad de síntomas se estimó en base a un ranking del porcentaje del área de la espiga afectada donde: 1 = sin síntomas; 2 = 1- 3%; 3 = 4-10%; 4 = 11-25%; 5 = 26-50%; 6 = 51-75% y 7 = 76-100% (Reid *et al.*, 1996) (Figura 6).

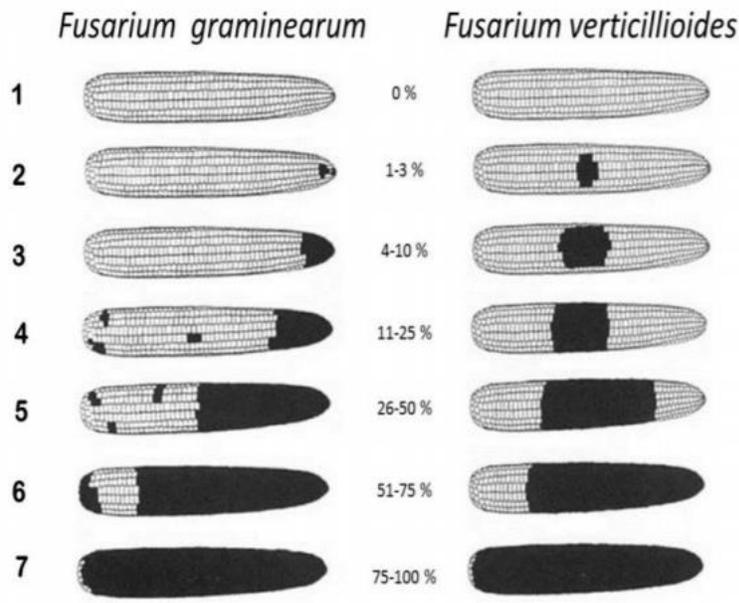


Figura 6: Escala diagramática de severidad de síntomas de fusariosis de la espiga de maíz. Imagen tomada de Papst *et al.*, 2007, basado en Enerson y Hunter, 1980.

2.2.1.1 Análisis estadístico de los datos de *Fusarium* spp.

Para ambas especies de *Fusarium* se contó con datos provenientes de dos ambientes: 2002/2003 y 2016/2017.

Los datos de severidad de la enfermedad no suelen cumplir con los supuestos de normalidad de modelos estadísticos lineales. Por lo tanto, se llevaron a cabo los análisis correspondientes para comprobar si los residuos de los datos cumplen con los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de varianza requeridos por los métodos lineales convencionales. Los análisis fueron realizados en el software InfoStat y ambos ambientes fueron analizados conjuntamente (Di Rienzo *et al.*, 2017).

El análisis de los datos se llevó a cabo utilizando un Modelo Lineal General Mixto en InfoStat, y se obtuvieron los valores BLUE y BLUP para ambas especies de *Fusarium*. Solo se utilizaron los valores BLUE, porque son estimadores, a diferencia de los valores BLUP que son predictores.

Estos valores se utilizaron posteriormente para el estudio de asociación fenotipo-genotipo. Se seleccionó el efecto de ambiente y de repetición dentro de ambiente como aleatorio y el efecto de genotipo como fijo para obtener el mejor estimador lineal insesgado (BLUE) de cada

genotipo. Y para la obtención de los BLUP se utilizó el efecto de ambiente y de repetición dentro de ambiente como fijo y el efecto de genotipo como aleatorio. El modelo estadístico utilizado fue:

Plantas enfermas= Ambiente + Repeticiones/Ambientes + Genotipo + Genotipo x Ambiente + Error.

Los dos ambientes se analizaron de forma conjunta.

2.2.2 Evaluación del carbón común

Los datos del carbón fueron obtenidos por el grupo de mejoramiento de maíz de la E.E.A. INTA-Pergamino, durante las campañas agrícolas 2016/17, 2017/18 y 2018/2019. En la última campaña, la tesista formó parte de la toma de datos junto al grupo de trabajo. Los ensayos fueron sembrados en un diseño de bloques completos aleatorizados, con dos repeticiones. Las parcelas constaron de 2 surcos de 5 m. separados por 0,7m. y sembrados a una densidad de 5 pl/m.

2.2.2.1 Análisis estadístico de los datos de carbón común:

Los datos de incidencia de carbón se obtuvieron contabilizando la cantidad de plantas con síntomas en espiga sobre el número total de plantas de la parcela.

Se tomaron datos fenotípicos de las 63 líneas testeadas en 5 ambientes, con sus respectivas repeticiones. Los ambientes se designaron de acuerdo al año y época en que fueron sembrados los genotipos:

1. segunda época de siembra en el año 2017
2. segunda época de siembra en el año 2018
3. tercera época de siembra en el año 2018
4. segunda época de siembra en el año 2019
5. tercera época de siembra en el año 2019

Al contar con una variable discreta que no se comporta de manera normal, se ajustó un Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM). Otro de los desafíos que plantea este tipo de variable es que se obtienen grandes cantidades de ceros, ya que corresponden a las plantas sanas dentro de la parcela. Por lo tanto, es necesario identificar el origen de esos ceros, es decir si son ceros

falsos (genotipos sin enfermedad porque no estuvieron expuestos a la enfermedad o por falta de errores en la toma de datos) o si son “ceros auténticos” (genotipos resistentes).

El modelo utilizado fue el mismo que el planteado para *Fusarium*, pero en este contexto, para abordar de la mejor manera posible el análisis de los datos fenotípicos obtenidos se ajustaron cuatro distribuciones: MLGM Poisson (MP), MLGM Binomial Negativa 1 y Binomial Negativa 2 (MNB1 y MNB2, respectivamente), Modelo Poisson Inflado en Cero (ZIP) y Modelo Binomial Negativa Inflado en Cero (ZINB) (trabajo desarrollado en conjunto con una doctorante del equipo y publicado en Videla *et al.* (2018)).

Los modelos se corrieron en el software estadístico RStudio (R Team, 2013), analizando los 5 ambientes en forma conjunta. Se obtuvieron los valores BLUE y BLUP para cada modelo. Para la obtención de los BLUE, se contempló el efecto de ambiente y de repetición dentro de ambiente como aleatorio y el efecto de genotipo como fijo. Para obtener los BLUP, en cambio se contempló el efecto de ambiente y de repetición dentro de ambiente como fijo y el efecto de genotipo como aleatorio.

Para poder optar por el mejor modelo, se utilizaron los indicadores con criterio de información. Estos indicadores nos permiten analizar la complejidad y la capacidad predictiva de un modelo. Cuanto más complejo es un modelo, peor será su capacidad para predecir, por lo tanto, es esencial hallar el modelo que realice las mejores predicciones de la manera más parsimoniosa posible. Para ello, se debe contar con un indicador que sea capaz de medir la capacidad explicativa de un modelo y a su vez, penalizar por su grado de complejidad. Esto es lo que hacen los indicadores con criterio de información como AIC (Criterio de información Akaike) y BIC (Criterio de información Bayesiano). Ambos criterios utilizan *Maximum Likelihood* como criterio de bondad de ajuste y el número de parámetros como medida de complejidad.

AIC es el primero y el más utilizado en estudios biológicos. BIC generalmente selecciona el modelo más abstracto, más sencillo y que hace predicciones a menor detalle, mientras que el AIC dará con un modelo más complejo y pragmático que hace predicciones con mayor detalle pero dentro de nuestros propios datos (Grubalcaba, 2017). Mientras más pequeño sea el valor de estos estimadores mejor será el modelo. Por lo tanto, se ejecutaron los modelos mencionados anteriormente en el software RStudio y se obtuvieron los valores de los criterios AIC y BIC.

2.3 Análisis genotípico de las líneas endocriadas, a través del uso de marcadores moleculares SNPs.

El análisis genotípico se llevó a cabo a partir de un chip de SNPs de 50k desarrollado por Illumina junto con la colaboración de TraitGenetics, el Instituto Nacional Francés de Investigación Agrícola (INRA) y Syngenta. Este chip cuenta con SNPs seleccionados de varias fuentes públicas y privadas, y contiene 56.110 marcadores moleculares validados con el genoma de referencia de maíz B73, conocido y secuenciado en su totalidad (<http://www.maizegdb.org/>).

El chip posee SNPs altamente polimórficos y fue sometido a rigurosas pruebas funcionales en más de 30 líneas de maíz diferentes para garantizar un rendimiento sólido. Presenta en promedio más de 25 marcadores por megabase (Mb), proporcionando una amplia densidad de SNPs para estudios de GWAS, siendo sumamente útil en la mejora genética asistida por marcadores (Illumina, 2020).

Los datos del chip se complementaron con información de la estructura genética y relaciones de parentesco genético de las 63 líneas endocriadas consideradas en este trabajo.

Todas las bases de ADN fueron modificadas al código de dos dígitos tal como lo requiere Tassel (Bradbury *et al.*, 2007) programa utilizado posteriormente para realizar el GWAS.

El proceso de filtración (criterios sugeridos en Riedelsheimer *et al.*, 2012) de los datos del chip, estuvo dado por:

- La eliminación de SNPs con información faltante del 20 % de las secuencias de los marcadores en las líneas endocriadas.
- Eliminación de SNPs monomórficos.
- La frecuencia de alelo menor (MAF) fue mayor al 5%
- Se eliminaron aquellos SNPs que no se encuentran correctamente asignados a un cromosoma, es decir que no tienen una ubicación predeterminada en el cromosoma y por ende, no se puede predecir el ligamiento entre SNP y regiones génicas.

Respecto al último punto, se disminuyó el número de SNPs faltantes/no correctamente asignados en versiones previas del ensamble del genoma de maíz, realizando un MegaBlast de las secuencias de los marcadores moleculares del chip contra el ensamblaje del genoma

de referencia B73 más reciente, actualizado a enero de 2020 ([Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0](#)).

2.4 Establecer asociaciones entre síntomas visibles (fenotipo) y polimorfismos de marcadores genéticos (genotipo) de las líneas endocriadas de maíz.

Para llevar a cabo la asociación genotipo-fenotipo, fue esencial el uso del software Tassel (Bradbury *et al.*, 2007). Inicialmente, se evaluaron los distintos modelos disponibles en el programa, con el fin de encontrar el modelo que cumpla con las siguientes condiciones:

1. Existencia de regiones candidatas (p -valores por encima del valor de corte establecido).
2. Ajuste correcto. Es decir, un modelo resultará mejor o peor dependiendo de la cantidad de variables con las que analiza los datos. A mayor número de variables mejor ajuste.

Los modelos evaluados difieren en la forma en que procesan los datos y esto depende de las matrices o covariables que utilicen.

-Q se refiere a la estructuración genética presente en los datos y debe ser incorporada al análisis por el usuario. Fue calculada previamente por el grupo de trabajo mediante Structure como se detalla más adelante.

-K es una matriz *Kinship* (parentesco) generada por el programa, basada en los datos genotípicos cargados. Esta matriz se basa en la utilización de cálculos matemáticos para estimar la probabilidad de que los alelos de los SNPs sean idénticos por estado (IBS “*Identity by state*”) y de esa forma poder evaluar la varianza genética presente en los datos.

-La covariable PCA, incluye los valores de las componentes principales calculadas a partir de los datos genéticos.

Modelos:

- **MLM (Q+K)**: Modelo Lineal Mixto, utiliza dos matrices: Q y K.
- **MLM (PCA+K)**: Modelo Lineal Mixto, usa la matriz *Kinship* más la cantidad de Componentes Principales (PCA) que sea asignada en el programa; en nuestro caso fueron 10 CP.
- **GLM (PCA)**: Modelo Lineal General, utiliza únicamente componentes principales.
- **GLM (Q)**: Modelo Lineal General, se basa en la estructura poblacional.

Inicialmente, se corrieron los modelos con diferentes subnúmeros de individuos (K) de la matriz Q, para determinar el número de subpoblaciones que mejor resuelva la estructuración genética de las líneas endocriadas. Se corrieron modelos con K=0, K=3, K=5, y K=12.

- Q0: sin estructuración
- Q3: líneas con estructura poblacional = 3
- Q5: líneas con estructura poblacional = 5
- Q12: líneas con estructura poblacional = 12

Al mismo tiempo, se corrieron los modelos con los distintos coeficientes BLUE y BLUP de los 63 genotipos para las 3 enfermedades.

2.5 Desequilibrio de ligamiento

Para estimar la proporción de variabilidad genética alcanzada por el conjunto 50k, se midió el desequilibrio de ligamiento (DL) entre todos los pares de SNPs para todo el genoma a través del coeficiente de determinación (r^2) con el software TASSEL v5.

RESULTADOS

3.1.1 Caracterizar la respuesta de un grupo de líneas endocriadas de maíz frente a la infección con *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum* y *Ustilago maydis*.

3.1.1 Fenotipado *Fusarium* spp.:

3.1.2 *Fusarium verticillioides*:

Luego de obtener los datos del comportamiento de las líneas frente a *F. verticillioides*, estos se analizaron en InfoStat para comprobar si cumplían con los parámetros de normalidad. La primera evaluación fue el análisis de Q-Q Plot (Figura 7).

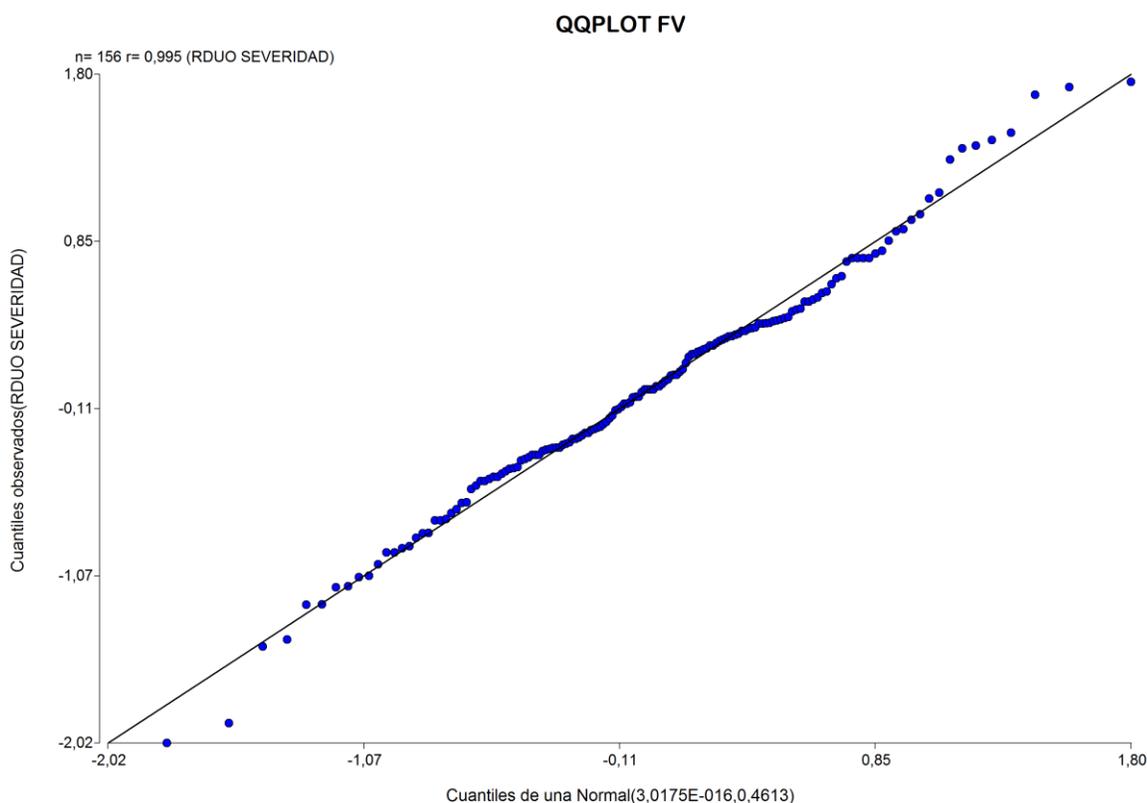


Figura 7: Q-Q Plot de los residuos de la variable severidad de síntomas pertenecientes a *Fusarium verticillioides* proveniente de la evaluación de 63 líneas endocriadas de maíz, en 2 ambientes en la E.E.A. INTA-Pergamino.

Se puede observar que los residuos de la variable severidad de síntomas de *F. verticillioides* de las 63 líneas endocriadas se ubican sobre la recta diagonal, es decir que se encuentran sobre la línea de distribución normal, por lo que podemos decir que los datos se distribuyen normalmente.

Luego, se realizó la prueba de dispersión (Figura 8), donde se observó que los datos cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza.

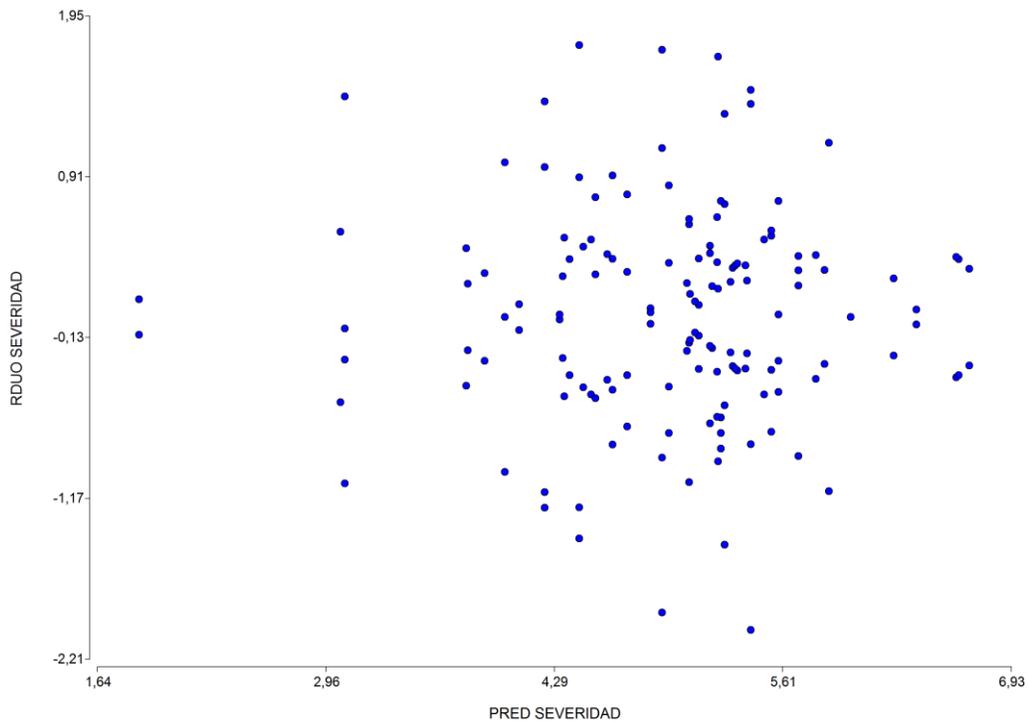


Figura 8: Residuos vs. Predichos de la variable severidad de síntomas pertenecientes a *Fusarium verticillioides* proveniente de la evaluación de 63 líneas endocriadas de maíz, en dos ambientes en la E.E.A. INTA-Pergamino.

Por último, se realizó el histograma (Figura 9), donde se observa que los datos se distribuyen de manera normal.

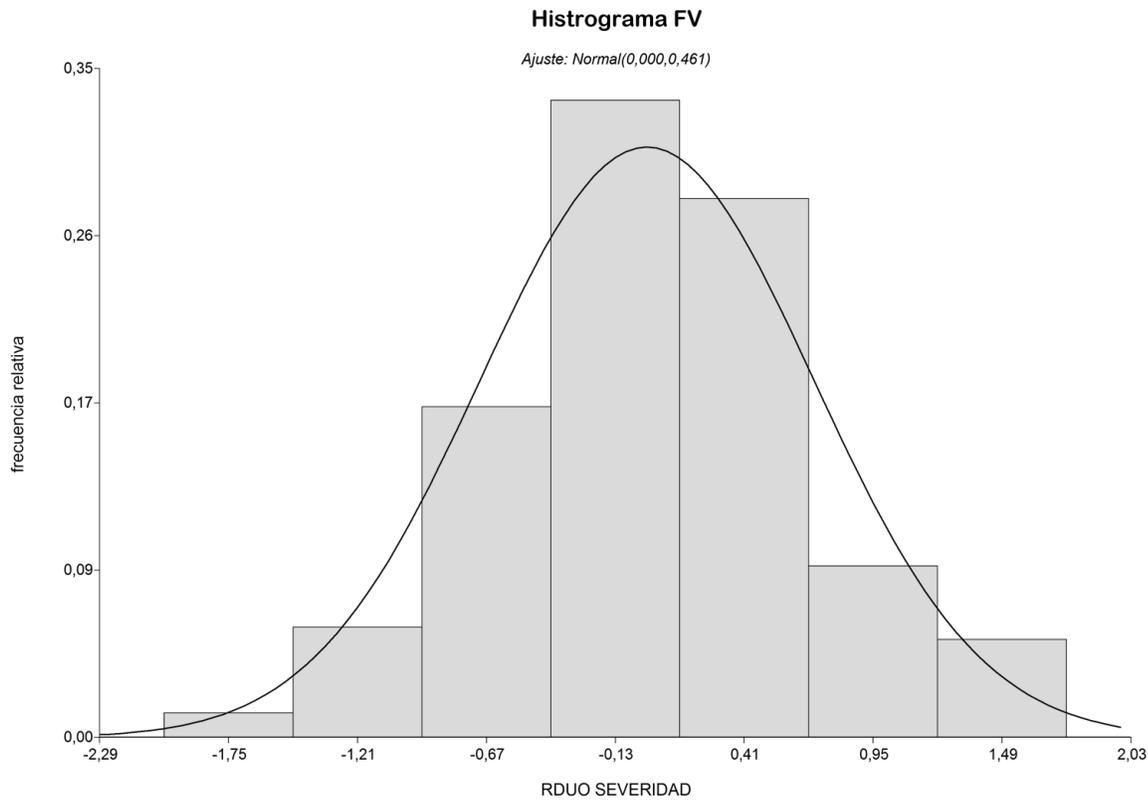


Figura 9: Histograma de los residuos de la variable severidad de síntomas pertenecientes a *Fusarium verticillioides* proveniente de la evaluación de 63 líneas endocriadas de maíz, en dos ambientes en la E.E.A. INTA-Pergamino.

Se realizó el test de Shapiro Wilks modificado en InfoStat en el cual se observó que los residuos se comportan de manera normal (Tabla 1).

Tabla 1: Prueba de normalidad: Test de Shapiro Wilks modificado por Mahibbur y Govindarajulu (1997), realizado con los residuos de la variable severidad de síntomas de *Fusarium verticillioides* proveniente de la evaluación de 63 líneas endocriadas de maíz, en dos ambientes en la E.E.A. INTA-Pergamino.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO SEVERIDAD	156	0	0,68	0,98	0,5614

Referencias: n: número total de datos, D.E: desvío estándar, W*: coeficiente de Wilks, p (Unilateral D): si $p > 0.05 =$ acepta H_0 (los residuos tienen distribución normal).

3.1.3 *Fusarium graminearum*:

Luego de la inoculación artificial de las líneas con el inóculo de *F. graminearum*, se obtuvieron los datos del comportamiento de las líneas, utilizando una escala de evaluación de severidad de síntomas de 7 puntos. Los datos se analizaron en InfoStat para comprobar si cumplían con los parámetros de normalidad. La primera evaluación fue el análisis de Q-Q Plot (Figura 10).

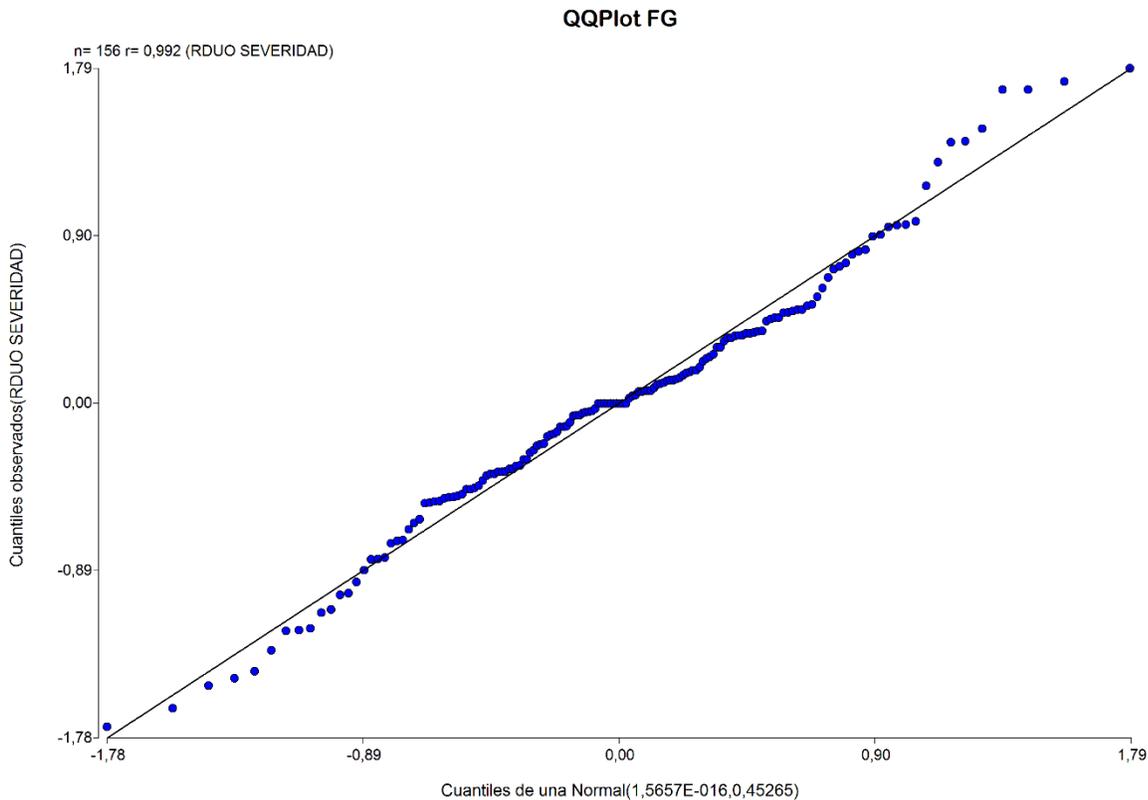


Figura 10: Q-Q Plot de los residuos de la variable severidad de síntomas pertenecientes a *Fusarium graminearum* proveniente de la evaluación de 63 líneas endocriadas de maíz, en 2 ambientes en la E.E.A. INTA-Pergamino.

Se puede observar que los residuos de la variable severidad de síntomas de *F. graminearum* de las 63 líneas endocriadas se ubican sobre la recta diagonal, es decir que se encuentran sobre la línea de distribución normal, por lo que podemos decir que los datos se distribuyen normalmente.

Luego, se realizó la prueba de dispersión (Figura 11), donde se vio que los datos cumplen con el supuesto de homogeneidad de varianza.

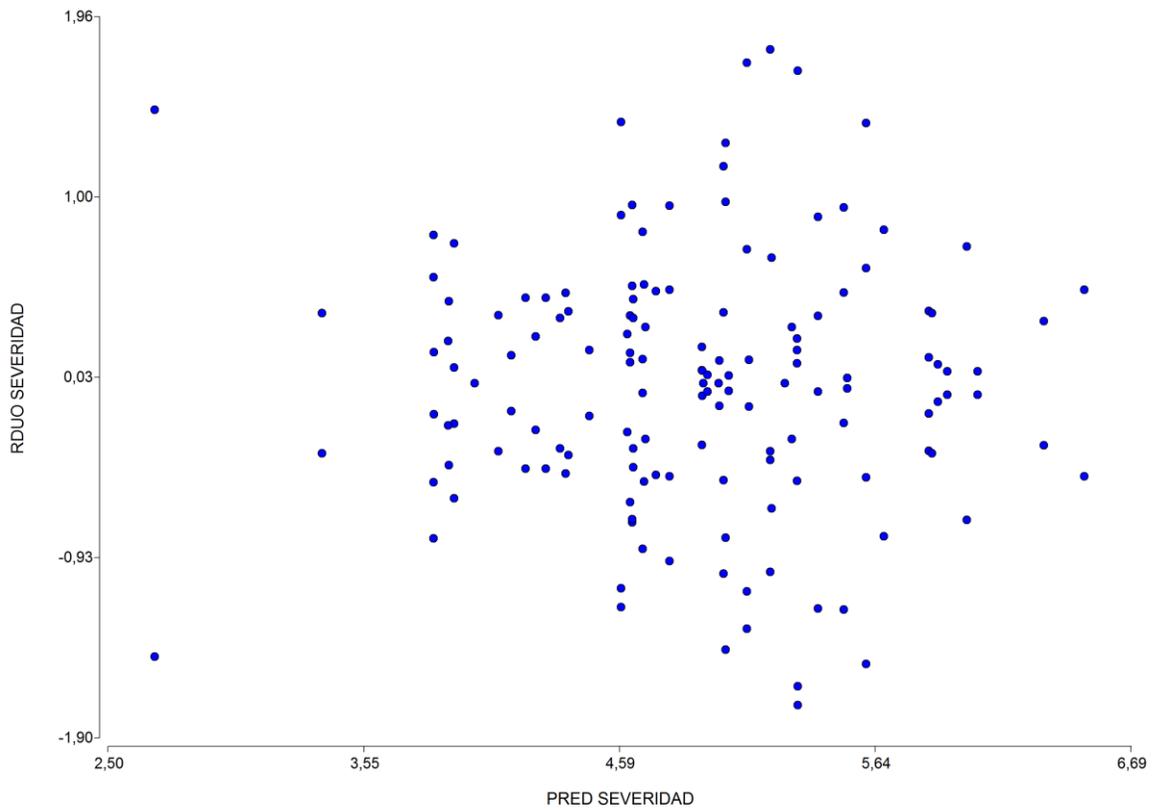


Figura 11: Residuos vs. Predichos de la variable severidad de síntomas pertenecientes a *F. graminearum*. proveniente de la evaluación de 63 líneas endocriadas de maíz, en dos ambientes en la E.E.A. INTA-Pergamino.

Por último, se realizó el histograma (Figura 12), donde se observa que los datos se distribuyen de manera normal.

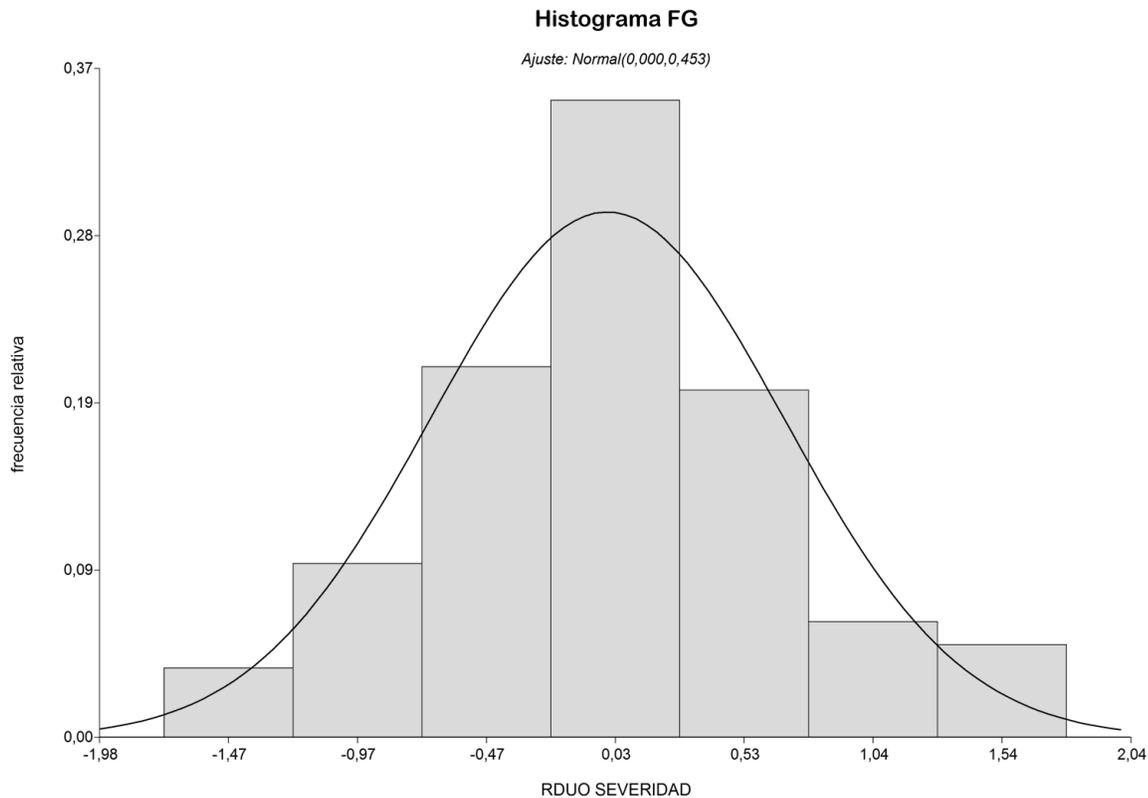


Figura 12: Histograma de los residuos de la variable severidad de síntomas pertenecientes a *F. graminearum*, proveniente de la evaluación de 63 líneas endocriadas de maíz, en dos ambientes en la E.E.A. INTA-Pergamino.

Se realizó el test de Shapiro Wilks modificado en InfoStat en el cual se observó que los residuos se comportan de manera normal (Tabla 2).

Tabla 2: Prueba de normalidad: Test de Shapiro Wilks modificado por Mahibbur y Govindarajulu (1997), realizado con los residuos de la variable severidad de síntomas de *Fusarium graminearum* proveniente de la evaluación de 63 líneas endocriadas de maíz, en dos ambientes en la E.E.A. INTA-Pergamino.

Variable	n	Media	D.E.	W*	p(Unilateral D)
RDUO SEVERIDAD	156	0	0,57	0,98	0,1417

Referencias: n: número total de datos, D.E: desvío estándar, W*: coeficiente de Wilks, p (Unilateral D): si $p > 0.05 =$ acepta H_0 (los residuos tienen distribución normal).

Las medias de severidad de síntomas de los tratamientos de inoculación artificial para *F. verticillioides* indicaron rangos de variación de síntomas de 1,77 a 7 y para *F. graminearum* de 1,22 a 7, indicando que los niveles de infección artificial fueron adecuados para la valoración de la intensidad de la podredumbre de espiga.

La obtención de los valores BLUE permitió identificar un comportamiento diferencial de las líneas frente a cada uno de los patógenos evaluados. Se comprobó para el caso de *F. verticillioides* que las líneas LP221, LP256-R y LP818 tuvieron los valores BLUE más altos, lo que demuestra que son líneas susceptibles frente a este hongo, lo cual coincide con un porcentaje mayor de severidad de síntomas.

Para *F. graminearum*, las líneas LP512, LP221 y LP579 tuvieron valores BLUE altos, indicando la susceptibilidad de las mismas al patógeno.

La línea LP521 fue el genotipo que mejor comportamiento tuvo frente a ambas especies de *Fusarium*, teniendo el valor BLUE más bajo en las dos evaluaciones. Podemos decir que es la línea LP521 es la línea más resistente a ambos *Fusarium*.

3.1.4 Fenotipado carbón común:

Se evaluó la resolución de los modelos MB, MP, MBN1, MBN2, ZIP, ZINB1 y ZINB2, a través del software RStudio y se obtuvieron valores de los criterios AIC y BIC, tanto para los valores BLUP como BLUE. El modelo ZINB1, resultó ser el modelo que mejor ajustó, ya que posee los valores más bajos de los AIC y BIC tanto para los BLUE como BLUP (Tabla 3).

Tabla 3: Criterios AIC y BIC de siete modelos estadísticos evaluados a partir de los valores BLUE y BLUP de 63 genotipos de maíz evaluados en 5 ambientes frente a carbón común.

Modelo	BLUP		BLUE	
	AIC	BIC	AIC	BIC
MB	1202,65	1224,47	1336,54	1620,81
MP	1200,28	1222,10	1304,98	1589,24
MBN1	1192,39	1218,57	1173,30	1461,90
MBN2	1194,00	1220,18	1167,50	1456,10
ZIP	1200,28	1222,10	1207,40	1500,40
ZINB1	1192,39	1218,57	1166,50	1463,80
ZINB2	1194,00	1220,18	1168,10	1465,40

Referencia: BLUP: best linear unbiased prediction, BLUE: best linear unbiased estimator. AIC: criterio de información Aikaike, BIC: criterio de información Bayesiano, MB: modelo binomial, MP: modelo de Poisson, MBN1: modelo binomial negativo1, MBN2: modelo binomial negativo 2, ZIP: Poisson inflado en cero, ZINB1: binomial negativo inflado en cero 1, ZINB2: binomial negativo inflado en cero 2.

Los valores BLUE del comportamiento de las líneas frente a *Ustilago maydis*, permitieron identificar un comportamiento diferencial de las líneas frente a este patógeno. Las líneas LP122, LP1512, LP168, LP2, LP214, LP2542, LP299-2 y LP509 tuvieron el valor BLUE más bajo indicando que son las líneas que mejor se comportan y se podría decir que son líneas resistentes a carbón común. Los genotipos LP579, LP605 y LP869 tienen los valores BLUE más altos, indicando que son líneas que no tuvieron un buen comportamiento frente a carbón común; se las podría clasificar como susceptibles.

3.1.5 Análisis de datos de las tres enfermedades

Se obtuvieron los coeficientes BLUE y BLUP luego del análisis de los datos para cada patógeno (Tabla 4).

Tabla 4: Resumen de los coeficientes BLUE y BLUP de las 63 líneas endocriadas de maíz, evaluados en distintos ambientes (carbón común: 5 ambientes, *Fusarium spp.*: 2 ambientes), correspondientes a la evaluación de las 3 enfermedades, en la E.E.A INTA-Pergamino.

Genotipo	<i>F. verticillioides</i>		<i>F. graminearum</i>		<i>U. maydis</i>	
	BLUP	BLUE	BLUP	BLUE	BLUP	BLUE
LP 304	0,9	6,04	-0,05	4,65	2,293	0,79
LP1032	0,3	-0,97	0,38	0,46	-1,941	-0,653
LP1044	-1,32	-2,96	-0,54	-0,74	0,697	-0,324
LP116	0,82	-0,19	0,61	0,91	1,434	-0,696
LP122	0,73	-0,32	0,77	1,18	-19,1	-1,128
LP122-2	0,12	-1,19	-0,04	-0,02	0,162	-0,515
LP124	0,1	-1,23	-0,35	-0,69	0,078	-0,696
LP125-R	0,47	-0,77	0,43	0,56	1,644	0,407
LP126	0,0039	-1,37	0,04	-0,03	1,656	0,47
LP128	0,02	-1,34	-0,26	-0,53	0,88	-0,005
LP1411	-0,1	-1,52	0,37	0,52	2,715	1,381
LP1512	0,21	-1	0,95	1,75	-19,1	-1,128
LP153	-0,59	-2,23	-0,46	-0,87	2,493	1,319
LP168	0,21	-1,09	0,27	0,37	-19,1	-1,128
LP178	-0,57	-2,2	-0,49	-0,91	-18,81	-0,733
LP179	0,09	-1,25	-0,22	-0,46	0,011	-0,638
LP197	0,69	-0,49	0,01	0,04	1,236	0,192
LP199	0,02	-1,34	-0,03	-0,16	1,363	0,155
LP1996	0,14	-1,17	0,28	0,37	1,462	0,028
LP2	-0,98	-2,79	-0,7	-1,26	-19,1	-1,128
LP212	0,59	-0,61	0,73	0,95	1,879	0,574
LP214	-0,77	-2,49	-0,64	-1,16	-19,1	-1,128
LP220	0,04	-1,32	0,15	0,14	1,551	0,83
LP221	0,99	0,05	0,87	1,34	1,15	0,107
LP223	0,44	-0,8	0,65	0,86	1,307	0,211
LP236	-0,79	-2,45	0,06	0,2	1,106	-0,096
LP2542	-0,9	-2,69	0,04	-0,03	-19,1	-1,128
LP256-R	1,03	0,12	0,1	0,06	-18,9	-1,042
LP29	0,14	-1,18	-0,01	-0,12	1,306	0,124
LP299-2	-0,06	-1,41	0,49	0,67	-19,1	-1,128
LP311	0,82	-0,34	0,55	0,75	2,646	1,445
LP317	0,4	-0,85	0,31	0,38	1,142	0,217
LP32	0,73	-0,32	0,53	0,78	2,076	1,008
LP3830	-0,82	-2,57	-0,19	-0,41	1,974	0,66
LP438	-0,07	-1,47	0,49	0,72	1,465	0,317
LP4703	-0,97	-2,79	-0,58	-1,06	-0,004	-0,638

LP509	-0,51	-2,12	-0,41	-0,77	-19,1	-1,088
LP521	-2,28	-4,69	-1,43	-2,47	0,672	-0,168
LP562	0,72	-0,45	0,19	0,28	0,543	-0,323
LP5708	0,1	-1,24	-0,51	-0,95	-17,67	-0,733
LP579	0,01	-1,33	0,89	1,21	3,483	2,2
LP580	0,08	-1,27	-0,07	-0,22	2,018	0,941
LP59	0,56	-0,57	-0,74	-1,32	2,543	1,462
LP598	-0,61	-2,26	-0,7	-1,26	1,132	-0,016
LP605	-0,82	-2,57	-0,64	-1,16	3,928	2,464
LP611	-0,22	-1,61	-0,0048	-0,05	1,554	0,235
LP612	0,45	-0,79	0,09	0,15	-0,025	-0,651
LP613	0,17	-1,13	0,56	0,67	2,199	0,923
LP662	0,35	-0,91	-0,03	-0,01	1,119	-0,067
LP818	0,98	0,04	0,58	0,86	2,177	0,654
LP869	0,42	-0,77	-0,22	-0,46	3,277	1,989
LP915	-0,14	-1,51	-0,0017	-0,0034	2,04	0,944
LP916	-0,41	-1,98	-0,03	-0,15	1,646	0,286
LP917	-0,08	-1,5	-0,08	-0,22	2,537	1,319
LP918	0,45	-0,72	0,13	0,12	0,251	-0,466
LP923	-0,59	-2,24	-1,01	-1,78	0,946	-0,374
LPB2	0,47	-0,7	-0,41	-0,78	0,358	0,193
P465	-0,38	-1,8	-0,6	-0,82	0,627	-0,308
ZN6	-0,77	-2,49	-0,06	-0,2	0,961	0,002
LP147					2,595	1,125
LP661					1,124	0,207
P1338					-17,12	-0,577
P21					-17,12	-0,577

Referencia: BLUP: Mejor predictor lineal inesgado del inglés best linear unbiased prediction, BLUE: Mejor estimador lineal inesgado del inglés best linear unbiased estimator.

3.2 Análisis genotípico de las líneas endocriadas, a través del uso de marcadores moleculares SNPs.

Del filtrado de datos se obtuvieron los siguientes resultados:

- Se eliminaron 331 SNPs con información faltante en más del 20 % de las secuenciaciones de los marcadores para las líneas endocriadas analizadas.
- Eliminación de SNPs monomórficos y SNPs sin ubicación en cromosomas (SNPs ubicados en *scaffolds*): 6.710
- Se eliminaron 5.756 SNPs con una frecuencia de alelo menor (MAF) fue menor al 5%.

Con estos criterios se eliminaron un total de 14.524 SNPs.

Con la realización del alineamiento múltiple de la base de datos del chip contra el genoma de referencia de B73 (v5) se logró recuperar información de aproximadamente 3000 SNPs que en versiones previas del genoma estaban asignadas a *scaffolds* y actualmente poseen una posición en cromosomas correctamente ensamblados.

El número final de SNPs con el que se realizaron los análisis fue 41.586.

3.3 Establecer asociaciones entre síntomas visibles (fenotipo) y polimorfismos de marcadores genéticos (genotipo) de las líneas endocriadas de maíz.

Se observó que el modelo que mejor explicó la estructura poblacional en los 63 genotipos fue el modelo que usó la matriz Q3, ya que los p-valores del análisis de asociación se distribuían mejor sobre la línea de la distribución ideal en el Q-Q Plot, en comparación con las otras matrices Q. Por lo tanto, se procedió a correr todos los modelos con la matriz Q3.

Luego de realizar los análisis correspondientes se observó que el modelo que proporcionó los mejores resultados fue el MLM Q3K, utilizando los valores BLUE (Figura 13).

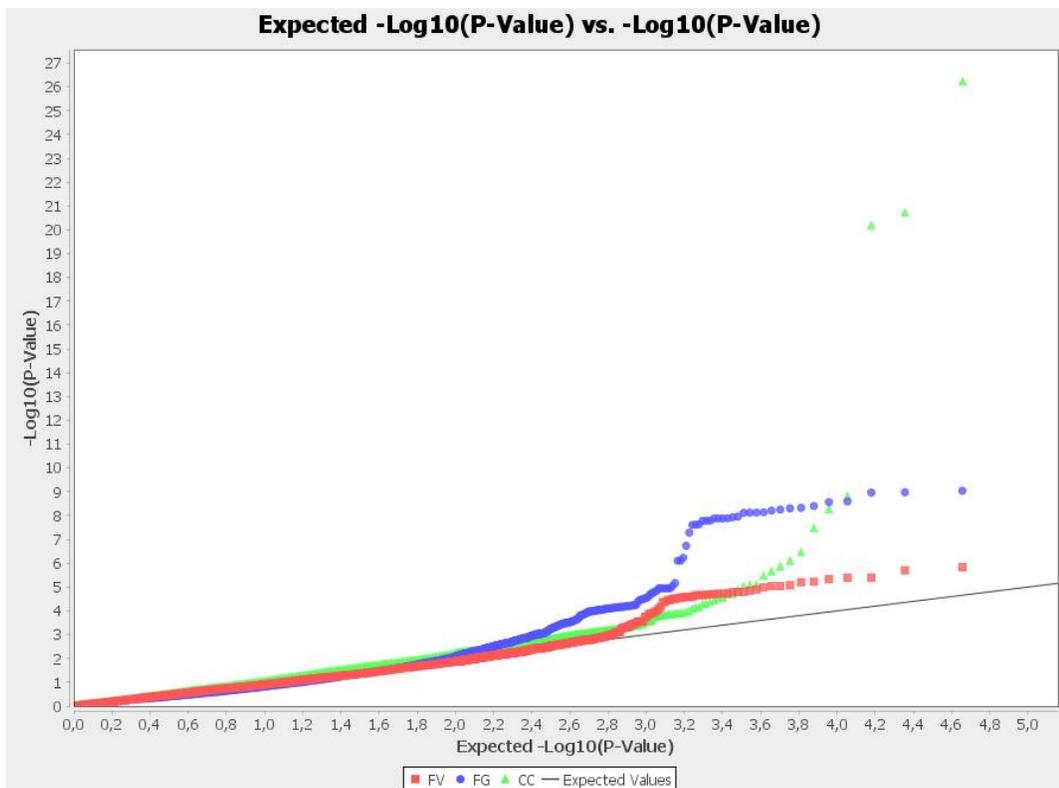


Figura 13: Q-Q Plot de los p-valores observados de las 63 líneas endocriadas de maíz perteneciente a las 3 enfermedades evaluadas vs. los p-valores esperados del MLM(Q+K) modelo lineal mixto.

Como resultado del análisis de asociación, Tassel arroja gráficos de dispersión (Manhattan Plot), donde se observan los p-valores de cada patógeno evaluado ubicados dentro de los 10 cromosomas del maíz. A continuación, se muestran los gráficos de *F. verticillioides* (Figura 14), *F. graminearum* (Figura 15) y *U. maydis* (figura 16).

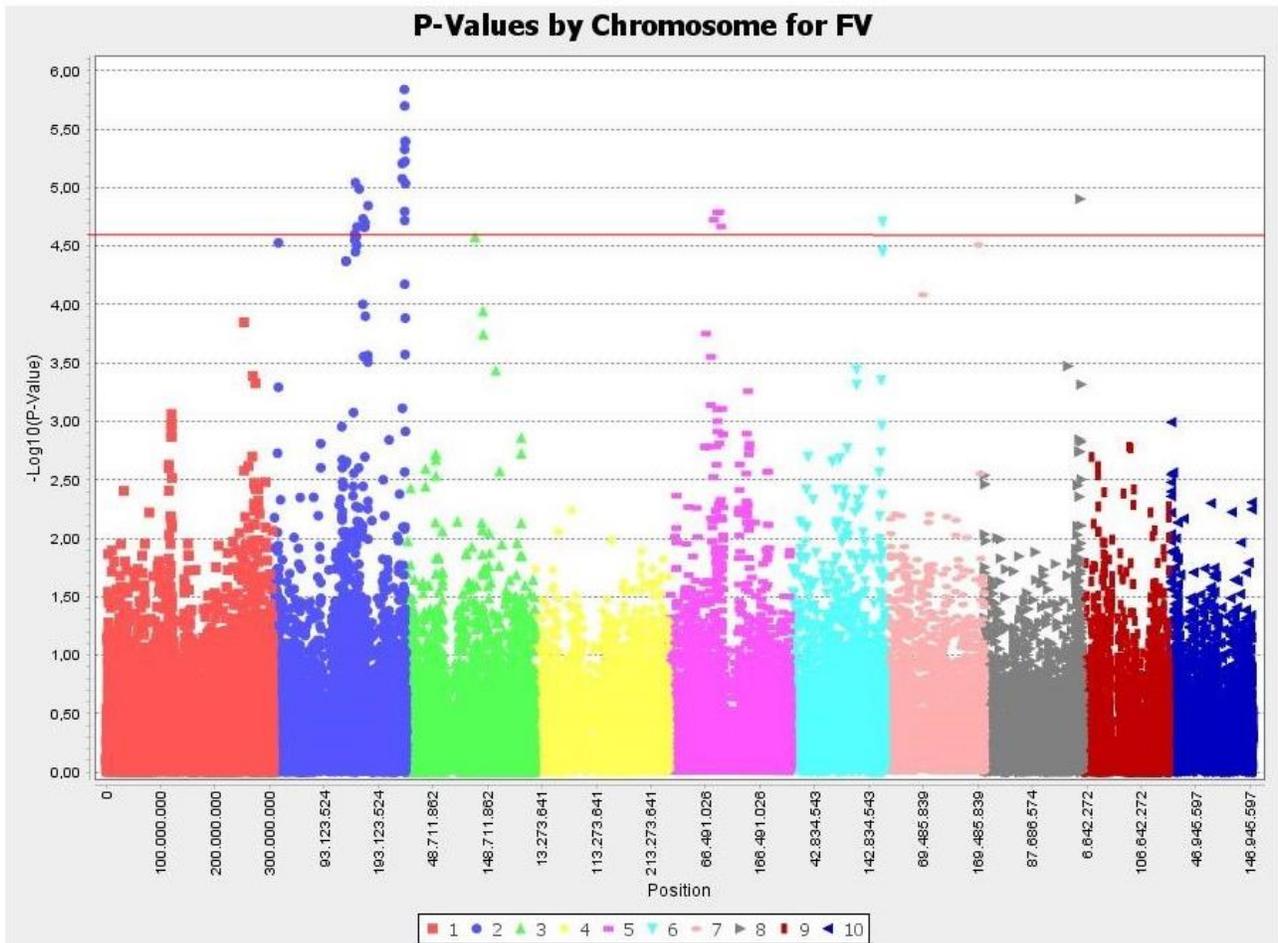


Figura 14: Manhattan Plot de los p-valores para el análisis de asociación (MLM (Q+K) genotipo-fenotipo). La asociación se llevó a cabo a partir de la evaluación de los datos provenientes de las 63 líneas endocriadas evaluadas frente *F. verticillioides* en 5 ambientes en la E.E.A INTA-Pergamino y los datos genéticos provenientes del Chip de SNPs 50k. Los SNPs fueron asignados a los respectivos 10 cromosomas, diferenciados con distintos colores, en orden del 1 al 10 (eje X). El eje Y indica la probabilidad en una escala logarítmica negativa.

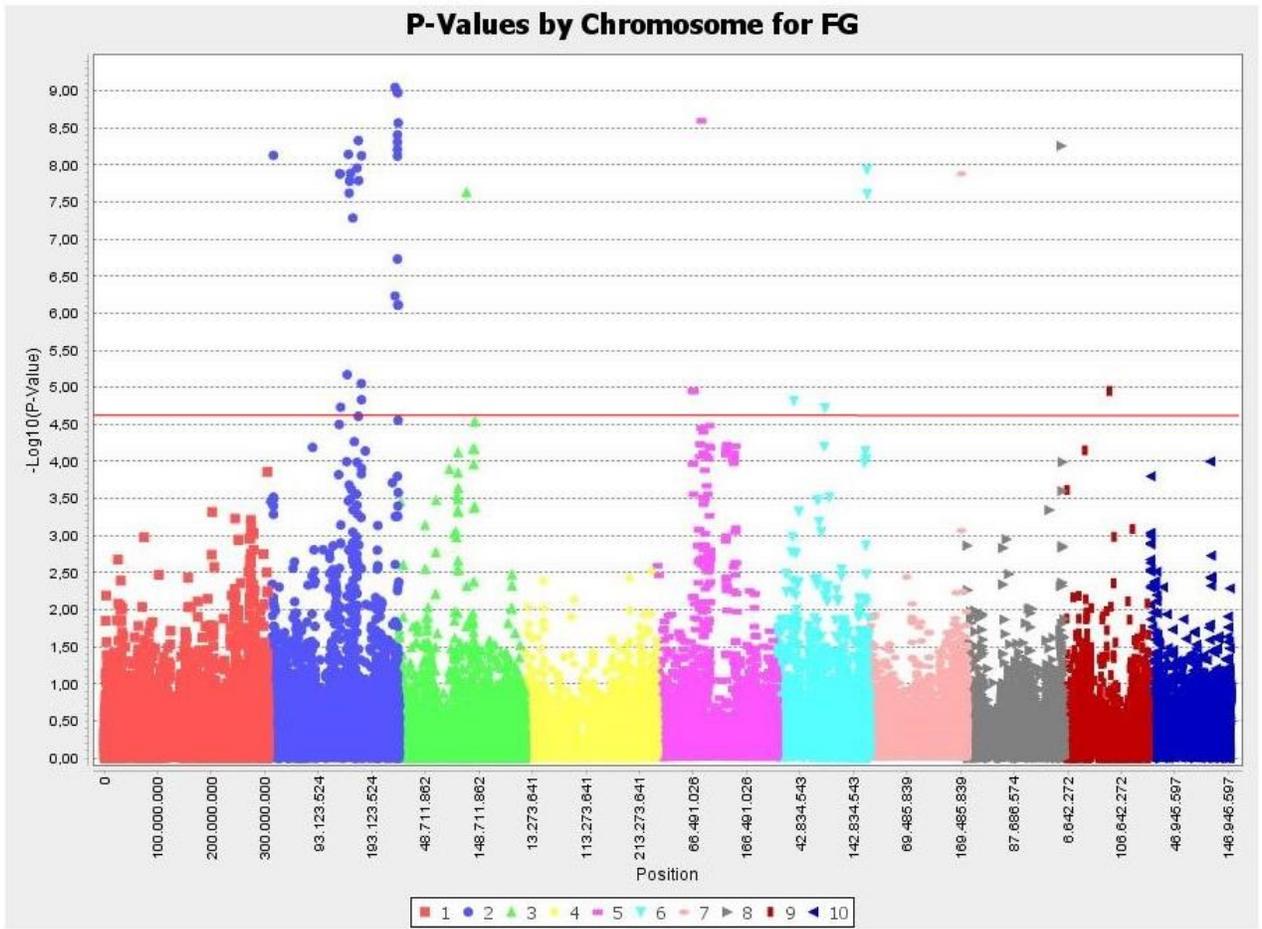


Figura 15: Manhattan Plot de los p-valores para el análisis de asociación (MLM (Q+K) genotipo-fenotipo). La asociación se llevó a cabo a partir de la evaluación de los datos provenientes de las 63 líneas endocriadas evaluadas frente a *F. graminearum* en 2 ambientes en la E.E.A INTA-Pergamino y los datos genéticos provenientes del Chip de SNPs 50k. Los SNPs fueron asignados a los respectivos 10 cromosomas, diferenciados con distintos colores, en orden del 1 al 10 (eje X). El eje Y indica la probabilidad en una escala logarítmica negativa.

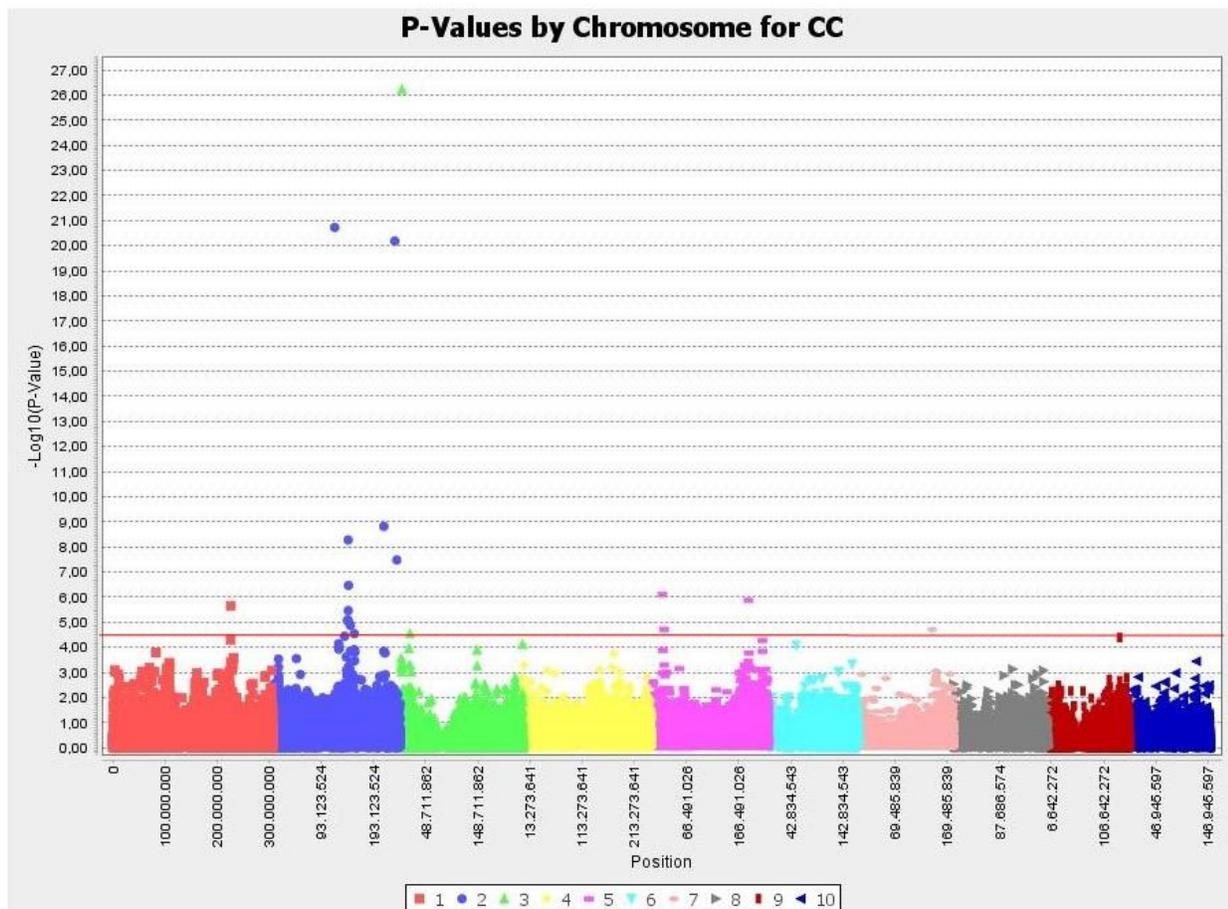


Figura 16: Manhattan Plot de los p-valores para el análisis de asociación (MLM (Q+K)) genotipo-fenotipo. La asociación se llevó a cabo a partir de la evaluación de los datos provenientes de las 63 líneas endocriadas evaluadas frente a UM en 2 ambientes en la E.E.A INTA-Pergamino y los datos genéticos provenientes del Chip de SNPs 50k. Los SNPs fueron asignados a los respectivos 10 cromosomas, diferenciados con distintos colores, en orden del 1 al 10 (eje X). El eje Y indica la probabilidad en una escala logarítmica negativa.

Luego de analizar los datos obtenidos en la asociación, procedimos a identificar los SNPs que resultaron significativos, es decir los SNPs con un valor mayor a $2,4 \times 10^{-5}$. Estos SNPs se encuentran por encima de la línea de corte que está situada en el valor 4,6 (corrección Benjamini-Hochberg).

Se obtuvieron 4 bins (segmentos cromosómicos) candidatos para *Fusarium verticillioides*: 2.05, 2.06, 2.09, 2.10; 10 bins para *Fusarium graminearum*: 2.02, 2.05, 2.06, 2.09, 2.10, 3.04, 5.03, 6.07, 7.04, 8.08 y 7 bins para *Ustilago maydis*: 1.07, 2.05, 2.08, 2.09, 3.01, 5.03, 5.05.

Es decir que *F. verticillioides* y *F. graminearum* comparten los bins 2.05, 2.06, 2.09 y 2.10, *F. verticillioides* y *U. maydis* tienen en común los bin 2.05 y 2.09, *F. graminearum* y *U. maydis* los bins 2.05, 2.09 y 5.03 y los 3 patógenos comparten los bins 2.05 y 2.09.

3.4 Desequilibrio de ligamiento

Con el software Tassel se calcularon los valores de LD para todos los marcadores analizados. Los valores de r^2 fueron calculados dentro de cada cromosoma y graficados en función de la distancia genética (pb= pares de bases) (Figura 17).

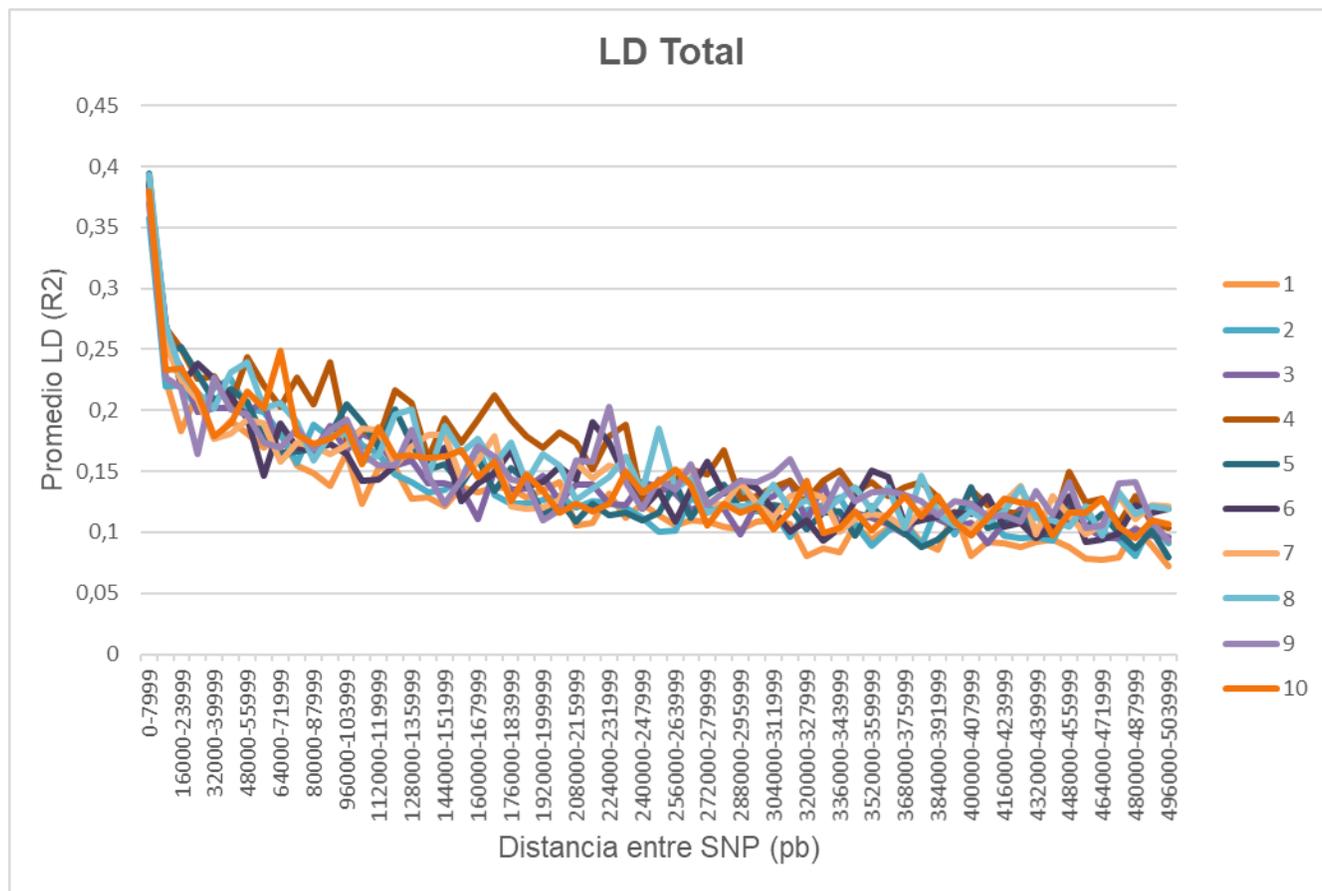


Figura 17: LD genoma completo de las 63 líneas endocriadas hasta medio millón de pares de bases de distancia. Cada cromosoma se encuentra representado con distintas líneas de colores.

El tamaño del genoma de maíz tiene una extensión total de alrededor de 2.400Mb, por lo tanto, al tener una cobertura de 41k de SNPs, podemos decir que encontramos en promedio un SNP cada 58,54 kb. El valor de desequilibrio de ligamiento común a todos los cromosomas cayó por debajo de 0,1 al superar las 262Kb.

3.5 SNPs significativos

3.5.1 Ideograma: SNPs significativos

Con la información de los SNPs significativos, se realizó un ideograma (Figuras 18 y 19) a través de la página de la Universidad de Pensilvania (<http://visualization.ritchielab.org/phenograms/plot>) para sintetizar la información provista en la tabla 9. En este gráfico se observan las posiciones de los SNPs significativos para el análisis, como se detalla en las secciones anteriores.

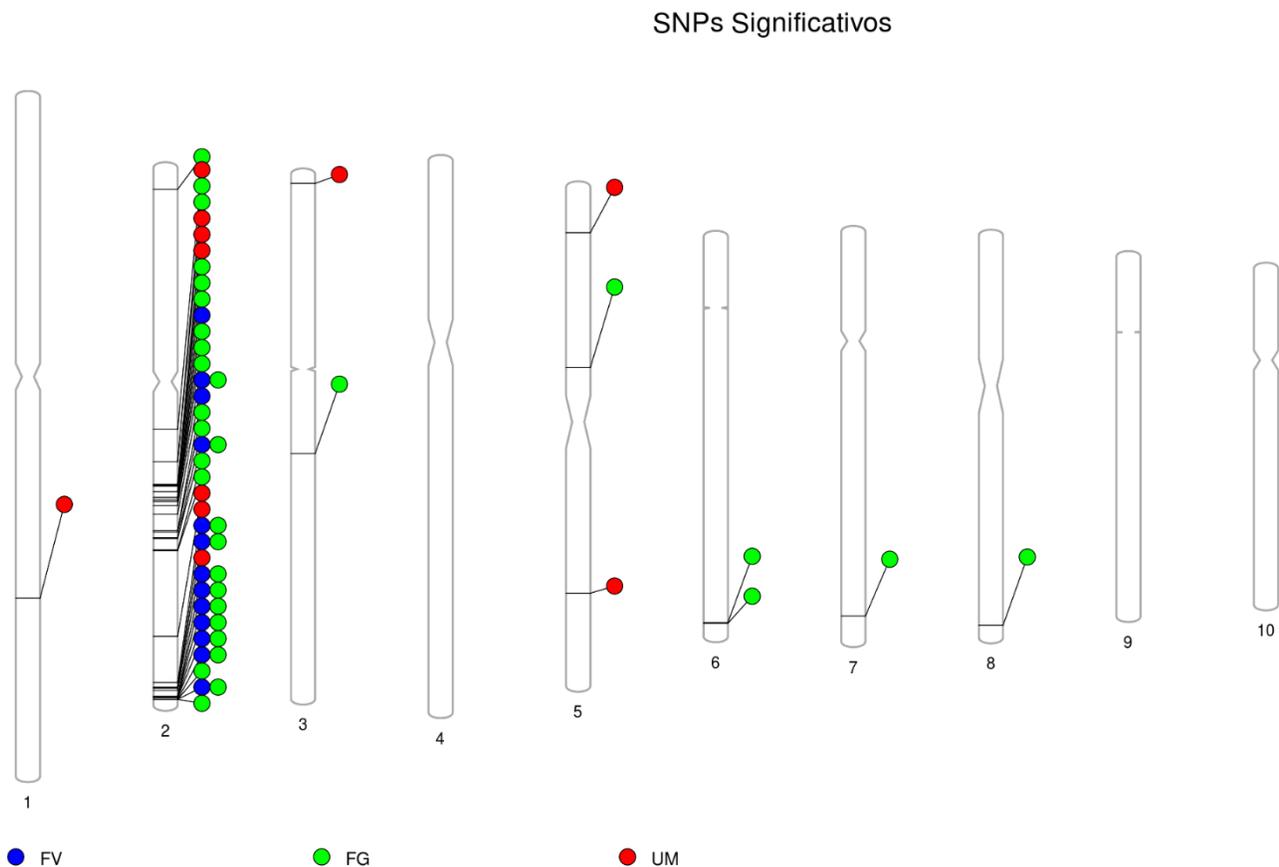


Figura 18: Ideograma de SNPs significativos en los 10 cromosomas de maíz. Los sitios marcados en color azul, se corresponden a los SNPs significativos asociados a *F. verticillioides*, en verde los de *F. graminearum* y en rojo los de *U. maydis*. Los puntos que se observan en 2 columnas están ubicados en la misma posición física del cromosoma.

SNPs Significativos Cromosoma 2

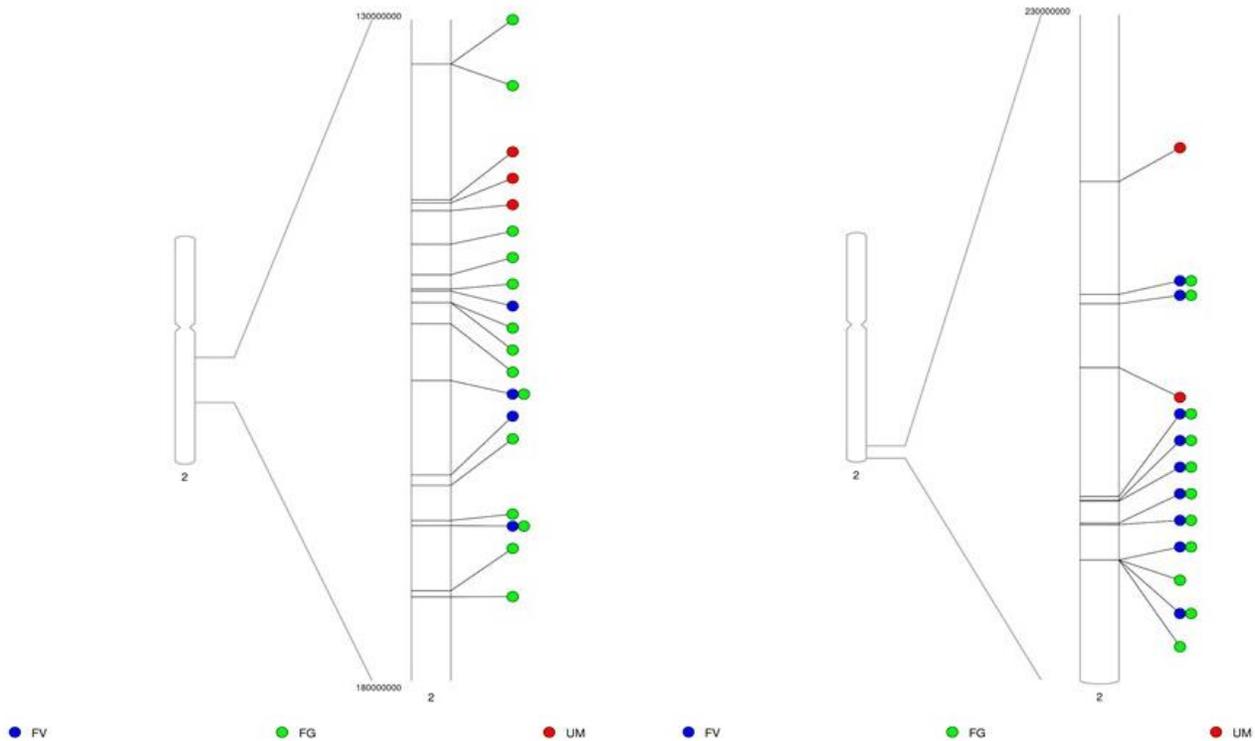


Figura 19: Ideograma de los SNPs significativos del cromosoma 2 de maíz. Se muestra el cromosoma 2, pero con una visión ampliada de los segmentos cromosómicos: de 130 millones de pb- 180 millones de pb (izquierda) y de 230 millones pb-250 millones pb (imagen derecha).

En base al genoma de referencia de maíz (B73), se pudo establecer que los 60 SNPs significativos (valor $-\log(p) > 4.6 \approx 2.5 \times 10^{-5}$) obtenidos a través del estudio de asociación realizado en Tassel, se ubican en 21 bins (Tabla 9).

Un número importante de genes asociados a los marcadores aquí mencionados resultaron ser genes codificantes de proteínas reportadas previamente en investigaciones de búsqueda de regiones génicas de resistencia a los patógenos estudiados (Ali *et al.*, 2005, Baumgarten *et al.* 2007, Ding *et al.*, 2008, Martin *et al.*, 2011, Martin *et al.*, 2012, Li *et al.*, 2015, Han *et al.*, 2018, Coan *et al.*, 2018, Butrón *et al.*, 2019, Gaikpa y Miedaner, 2019, Maschietto *et al.*, 2017, Sutimantanapi *et al.*, 2014).

Como se observa en la tabla 9, cada SNP está asociado a un gen codificante.

3.5.1 *Fusarium verticillioides*

Se identificaron 4 bins para *F. verticillioides*. El SNP PZE-102112413 se encuentra en el bin 2.05, y esta región génica codifica para una proteína con dominio ARM.

Tres SNPS (PZE-102115604, SYN6639 y PZE-102120297) están situados en el bin 2.06. Cada uno de los SNPS está ubicado en una región génica diferente que codifica 3 proteínas distintas: proteína que contiene el dominio DUF295, proteína de unión a DNA y el factor de alargamiento Tu.

El bin 2.09 tiene asociados 7 SNPS (SYN6350, PZE-102185814, SYN31203, SYN20261, SYN6449, SYN28674 y PZE-102191781), los cuales cada uno se encuentra en regiones que codifican 7 proteínas diferentes: proteína RPS2, proteína Oberon, proteína que contiene repetición pentatricopeptídica, enzima glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, enzima conjugadora de ubiquitina E2, ubiquitina E3-ligasa (familia RHF2) y la proteína trimetiltridecatetraeno sintasa.

Por último, los SNPS PZE-102194208 y PZE-102194305 están asociados al bin 2.10 y se encuentran en la región génica que codifica para la proteína pangloss2.

3.5.2 *Fusarium graminearum*

El bin 2.02, está asociado al SNP SYN1130 que se encuentra en la región génica que codifica para la proteína transportadora ABC.

Ocho SNPS están contenidos en el bin 2.05. Dos SNPS (PZE-102104321 y PZE-102104343) se encuentran en una región cromosómica que codifica para la proteína NAD quinasa 2 cloroplástica. Otros 2 SNPS (PZE-102110378 y PZE-102111838) están en la región que codifica para la producción de la proteína de unión a carbohidratos. Adicionalmente, un SNP (PZE-102112313) se encuentra en la región codificadora del citocromo P450. Los SNPs SYN27837 y SYN27838 están asociados a la región para la producción de la subunidad reguladora TAP46 y el SNP SYN34892 se encuentra en la región génica que codifica para la producción del péptido transportador de nitrato.

El bin 2.06 (también presente en *F. verticillioides*) presenta 6 SNPS exclusivos asociados a *F. graminearum* (PZE-102115604, PZE-102119077, PZE-102119908, PZE-102120297, SYN7203 y PZE-102122508), los cuales cada uno se encuentra en regiones que codifican 6 proteínas diferentes. Algunas relacionadas a mecanismos de expresión génica tales como: proteína ARN Polimerasa I, II, III, proteína de unión a DNA y otras tales como proteína quinasa rica en leucina (receptor RLK-LRR por *receptor like kinase, leucine rich repeats*), proteína con dominio DUF295 y el pro-péptido inhibidor de proteínasa.

Al igual que para el patógeno *F. verticillioides*, el bin 2.09 está asociado a 7 SNPS (SYN6350, PZE-102185814, SYN31203, SYN20261, SYN6449, SYN28674 y PZE-102191781) los cuales cada uno se encuentra en regiones que codifican 6 proteínas diferentes: RPS2, proteína Oberon, proteína que contiene repetición pentatricopeptídica, proteína glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, enzima conjugadora de ubiquitina E2, ubiquitina E3-ligasa (familia RHF2) y la proteína trimetiltridecatetraeno sintasa.

En el bin 2.10, además de los SNPS PZE-102194208 y PZE-102194305 mencionados para *F. verticillioides*, se encuentran los SNPS SYN6923 y PZE-102194244 para *F. graminearum*. Esta región génica se corresponde con la proteína pangloss2.

El SNP PZE-103075495 está asociado al bin 3.04 el cual se encuentra en una región que codifica para una proteína aún no caracterizada.

El bin 5.03 tiene al SNP PZE-105073648 asociado; este SNP se encuentra en la región que codifica para la proteína quinasa activada por mitógeno (MAPK *mitogen activated protein kinase*).

Los SNPS PZE-106121450 y PZE-106121977 se asocian al bin 6.07 y se encuentran en la región codificante para la proteína homóloga AFP2 y para una proteína no caracterizada.

El bin 7.04 está asociado al SNP SYN13037 que se encuentra en la región génica para la producción de la proteína del factor de alargamiento 1-beta.

El SNP PUT-163a-86469720-4496 está asociado al bin 8.08 y se encuentra en la región génica que codifica para la proteína similar al pliegue OB (*OB-fold*).

3.5.3 *Ustilago maydis*

Luego de realizar el mapeo de asociación, se obtuvieron 7 bins: 1.07, 2.05, 2.08, 2.09, 3.01, 5.03, 5.05, asociados a marcadores moleculares para el carbón común.

Dentro del bin 1.07, el SNP SYN13006 se encuentra en la región génica que codifica para la proteína portadora de azúcar C.

Cuatro marcadores (PZE-102098315, PZE-102108725, PZE-102108880 y PZE-102109050) están asociados al bin 2.05, en la zona lindante a la detectada para *F. verticillioides* y *F. graminearum*. Cada marcador se encuentra en regiones génicas que codifican 4 proteínas distintas: proteína inducida por JA, la proteína ARNr N-glucosidasa, una proteína no caracterizada y el factor de transcripción VIP1.

El SNP PZE-102159404 está asociado al bin 2.08, y se encuentra en una región génica que codifica para la proteína inhibidora de poligalacturonasa 1.

Se observaron 2 SNPS (PZE-102184289 y PZE-102186772) asociados al bin 2.09, cada uno de estos se encuentra en una región génica que codifica una proteína. Las proteínas asociadas a este bin fueron: proteína fosfatasa 2C y la ubiquitina E3 de tipo RBR.

Para el bin 3.01 asociado al SNP SYNGENTA13503; y el bin 5.05 asociado al SNP SYN5396 se observó una región que codifica para la proteína fosfatasa 2C (como se mencionó para el bin 2.09).

Para finalizar, el bin 5.03 está asociado al SNP SYN2288 que se encuentra en una región génica que codifica para una proteína no caracterizada.

3.5.2 Bins comunes entre patógenos

Tabla 8: Bins que se comparten entre patógenos. FV: *Fusarium verticillioides*, FG: *Fusarium graminearum*, UM: *Ustilago maydis*.

Bin	FV	FG	UM
2.05	x	x	x
2.06	x	x	
2.09	x	x	x
2.10	x	x	
5.03		x	x

Se encontraron 5 bins (2.05, 2.06, 2.09, 2.10, 5.03) que son comunes entre los patógenos estudiados (Tabla 8).

Ambos *Fusarium* spp. comparten los bins 2.05, 2.06, 2.09 y 2.10 y unos 11 SNPs comunes (PZE-102194208, SYN6449, SYN31203, PZE-102115604, SYN28674, PZE-102194305, PZE-102185814, PZE-102191781, PZE-102120297, SYN20261).

F. verticillioides y *U. maydis* tienen en común los bins 2.05 y 2.09, pero no comparten ningún SNP entre ellos.

F. graminearum y *U. maydis* comparten 3 bins: 2.05, 2.09 y 5.03 que están asociados a diferentes SNPs.

Los tres patógenos, *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *U. maydis*, tienen en común los bins 2.05 y 2.09. Estos bins se encuentran en regiones que codifican para varias proteínas de entre las que se destacan: proteína de resistencia a enfermedades RPS2, proteína Oberon, pangloss2 y las enzimas glucano endo-1,3-beta-glucosidasa, conjugadora de ubiquitina E2 y trimetiltridecatetraeno sintasa.

Tabla 9: Nombre, ubicación, valor-p, R², ID gen y proteína codificada a los SNPs significativos de los 3 hongos, FV: *Fusarium verticillioides*, FG: *Fusarium graminearum*; UM: *Ustilago maydis*.

Hongo	SNP	Cromosoma (Bin)	Valor-p	R ²	ID gen	Proteína codificada
FV	PZE-102112413	2.05	9.07537E-06	0.3488	GRMZM2G391673_T01	Prot. de superfamilia repetida ARM
FV	PZE-102115604	2.06	1.02883E-05	0.3749	Zm00001e009282	Prot. que contiene el dominio DUF295
FV	SYN6639	2.06	1.85379E-05	0.3267	Zm00001e009387	Factor de alargamiento Tu
FV	PZE-102120297	2.06	2.01511E-05	0.3267	Zm00001e009447	Prot. de unión a DNA
FV	SYN6350	2.09	0.000006223	0.3530	Zm00001e011318	Prot. de resistencia a enfermedades RPS2
FV	PZE-102185814	2.09	8.3816E-06	0.3350	Zm00001e011323	Prot. OBERON
FV	SYN31203	2.09	1.4468E-06	0.3768	Zm00001e011467	Prot. con repetición pentatricopeptídica
FV	SYN20261	2.09	4.0338E-06	0.3562	Zm00001e011474	Glucano endo-1,3-beta-glucosidasa 5
FV	SYN6449	2.09	5.9723E-06	0.3463	Zm00001e011475	Enzima conjugadora de ubiquitina E2 3
FV	SYN28674	2.09	0.000009214	0.3549	Zm00001e011495	Prot. ubiquitina E3- ligasa RHF2
FV	PZE-102191781	2.09	4.0338E-06	0.3562	Zm00001e011496	Trimetiltridecatetraeno sintasa
FV	PZE-102194208	2.10	2.0012E-06	0.3650	Zm00001e011520	Pangloss2
FV	PZE-102194305	2.10	4.7095E-06	0.3792	Zm00001e011520	Pangloss2
FG	SYN1130	2.02	7.43356E-09	0.4639	Zm00001e006905	Transportador ABC
FG	PZE-102104321	2.05	1.32032E-08	0.4353	Zm00001e008976	NAD quinasa 2 cloroplástica
FG	PZE-102104343	2.05	1.32032E-08	0.4353	Zm00001e008976	NAD quinasa 2 cloroplástica
FG	PZE-102110378	2.05	6.75535E-06	0.3420	Zm00001e009160	Prot. de unión a carbohidratos
FG	PZE-102111838	2.05	7.22426E-09	0.4625	Zm00001e009160	Prot. de unión a carbohidratos
FG	PZE-102112313	2.05	2.40983E-08	0.4331	Zm00001e009182	Citocromo P450
FG	SYN27837	2.05	1.64478E-08	0.4403	Zm00001e009191	Subunidad reguladora TAP46
FG	SYN27838	2.05	1.64478E-08	0.4403	Zm00001e009191	Subunidad reguladora TAP46
FG	SYN34892	2.05	1.30083E-08	0.4237	Zm00001e009212	Péptido transportador de nitrato
FG	PZE-102115604	2.06	5.19225E-08	0.4379	Zm00001e009282	Prot. con dominio DUF295
FG	PZE-102119077	2.06	1.10506E-08	0.4452	Zm00001e009396	ARN Polimerasa II
FG	PZE-102119908	2.06	4.71399E-09	0.4848	Zm00001e009442	Prot. quinasa rica en leucina
FG	PZE-102120297	2.06	1.63011E-08	0.4481	Zm00001e009447	Prot. De unión a DNA
FG	SYN7203	2.06	8.8828E-06	0.3235	Zm00001e009548	ARN Polimerasas I, II y III
FG	PZE-102122508	2.06	7.54E-09	0.4904	Zm00001e009556	Propéptido inhibidor de proteinasa
FG	SYN6350	2.09	5.8806E-07	0.3788	Zm00001e011318	Prot. de resistencia a enfermedades RPS2
FG	PZE-102185814	2.09	9.0095E-10	0.5030	Zm00001e011323	Prot. OBERON
FG	SYN31203	2.09	1.0442E-09	0.5060	Zm00001e011467	Prot. con repetición pentatricopeptídica
FG	SYN20261	2.09	7.783E-07	0.3485	Zm00001e011474	Glucano endo-1,3-beta-glucosidasa 5
FG	SYN6449	2.09	1.07E-09	0.4719	Zm00001e011475	Enzima conjugadora de ubiquitina E2 3
FG	SYN28674	2.09	2.7239E-09	0.4663	Zm00001e011495	Prot. ubiquitina E3- ligasa RHF2
FG	PZE-102191781	2.09	7.783E-07	0.3485	Zm00001e011496	Trimetiltridecatetraeno sintasa
FG	SYN6923	2.10	1.8614E-07	0.4619	Zm00001e011520	Pangloss2
FG	PZE-102194208	2.10	3.9436E-09	0.4573	Zm00001e011520	Pangloss2
FG	PZE-102194244	2.10	7.6217E-09	0.4478	Zm00001e011520	Pangloss2
FG	PZE-102194305	2.10	4.9412E-09	0.5234	Zm00001e011520	Pangloss2
FG	PZE-103075495	3.04	2.3278E-08	0.4329	Zm00001e018144	Prot. no caracterizada
FG	PZE-105073648	5.03	2.5547E-09	0.4619	Zm00001e013659	Quinasa activada por mitógeno
FG	PZE-106121450	6.07	1.166E-08	0.4516	Zm00001e032377	Prot. no caracterizada
FG	PZE-106121977	6.07	2.4664E-08	0.4516	Zm00001d038978_T001.mma1	Prot. Homólogo AFP2
FG	SYN13037	7.04	1.32207E-08	0.4686	Zm00001e035548	Factor de alargamiento 1-beta
FG	PUT-163a-86469720-4496	8.08	5.5575E-09	0.5016	Zm00001e028847	Prot. De unión a ADN
UM	SYN13006	1.07	2.20738E-06	0.3714	Zm00001e004324	Prot. portadora de azúcar C
UM	PZE-102098315	2.05	1.8737E-21	0.8572	Zm00001e008838	Prot. inducida por jasmonato
UM	PZE-102108725	2.05	5.30283E-09	0.4864	Zm00001e009071	ARNr N-glucosidasa
UM	PZE-102108880	2.05	9.2E-06	0.3411	Zm00001e009078	Prot. no caracterizada
UM	PZE-102109050	2.05	3.39276E-07	0.4091	Zm00001e009082	Factor de transcripción VIP1
UM	PZE-102159404	2.08	1.5152E-09	0.6008	Zm00001e010581	Inhibidor de poligalacturonasa 1
UM	PZE-102184289	2.09	6.5118E-21	0.9013	Zm00001e011253	Proteína-serina / treonina fosfatasa
UM	PZE-102186772	2.09	3.3146E-08	0.4587	Zm00001e011364	Ubiquitina transferasa E3 de tipo RBR
UM	SYNGENTA13503	3.01	5.7796E-27	0.9144	Zm00001e011253	Proteína-serina / treonina fosfatasa
UM	SYN2288	5.03	7.9608E-07	0.4491	Zm00001e012484	Prot. no caracterizada
UM	SYN5396	5.05	1.3651E-06	0.4169	Zm00001e015014	Prot. Serina / treonina-quinasa AFC2

DISCUSIÓN

Las enfermedades de espiga son una amenaza a la seguridad alimentaria mundial porque afectan el producto a cosechar. El mejoramiento genético para la resistencia a enfermedades es una estrategia sustentable, durable y económica para mitigar el impacto negativo de las enfermedades. Por este motivo, en este trabajo nos propusimos identificar regiones genómicas asociadas a resistencia a múltiples enfermedades de espiga en un panel de 63 líneas endocriadas de maíz del PNMM de INTA Pergamino.

El primer objetivo planteado fue caracterizar el comportamiento de las líneas frente a las tres enfermedades. Mediante la inoculación artificial con *F. verticillioides* y *F. graminearum*, y la evaluación bajo infección natural de las líneas frente a *U. maydis*, se pudo realizar una valoración adecuada del nivel de resistencia o susceptibilidad de las mismas y asignar valores de severidad y/o incidencia. Los genotipos mostraron una amplia variabilidad en su respuesta frente a las enfermedades consideradas, lo cual es fundamental para poder identificar asociaciones fenotipo-genotipo que permitan encontrar regiones de resistencia.

Dentro de los resultados obtenidos del análisis de datos fenotípicos, logramos identificar tanto líneas resistentes como susceptibles para cada enfermedad. En este sentido, analizando el germoplasma evaluado, podemos decir que posee gran potencial para su estudio y como fuente de resistencia a enfermedades de espiga.

El GWAS permitió identificar 56 SNPs significativos ubicados en 21 segmentos cromosómicos (bins), que contienen regiones génicas que codifican moléculas implicadas en vías de reconocimiento de patógenos y defensa.

Para la obtención de un buen mapeo de asociación fue necesario analizar el desequilibrio de ligamiento dentro del panel de estudio. En este trabajo, el decaimiento del desequilibrio de ligamiento fue rápido un $R^2=0,1$ de 262Kb por lo que se logró una alta resolución en las asociaciones identificadas. En Wu *et al.* (2013) realizaron un GWAS en germoplasma de maíz elite utilizando el mismo chip de SNPs que utilizamos en este estudio y obtuvieron una caída del LD de un $R^2=0,1$ de 391 kb. Que en este trabajo se haya obtenido un decaimiento del LD que sea más bajo puede estar relacionado a que las líneas estudiadas estén más emparentadas, lo que reduce la caída (Remington *et al.*, 2001). Se obtuvo una buena cobertura

del genoma y se observó un decaimiento rápido del LD, por lo que es posible identificar regiones candidatas a resistencia múltiple en este panel de líneas endocriadas.

Para *F. verticillioides* se encontraron cuatro regiones génicas, ubicadas en los bin 2.05, 2.06, 2.09 y 2.10. El bin 2.05 fue previamente estudiado como región de resistencia para *F. verticillioides* por Maschietto *et al.* 2017, quienes observaron que en esta región se encuentran tres genes (YPTM1, LOX8 y 22 kDa HSP) relacionados a respuesta frente a estrés. YPTM1 está involucrado en la protección de los tejidos vegetales contra daños oxidativos provocados por ROS, el gen LOX8 es responsable de la producción de JA para la respuesta contra patógenos necrótrofos y el gen 22 kDa HSP está involucrado en el plegado y la estabilización de las proteínas (Maschietto *et al.* 2017).

El bin 2.05 incluye una región génica que codifica para una proteína rica en dominios ARM (ARM por armadillo) altamente conservados. Presentes en los proteomas de todos los eucariotas, estas proteínas se caracterizan por sus roles en diversos procesos celulares tales como transducción de señales, transporte nuclear, regulación transcripcional y ubiquitinación a través de interacciones proteína-proteína (Acosta *et al.* 2016). Estudios recientes en plantas superiores, han demostrado su rol como ligasa E3 de ubiquitina, señalización hormonal y resistencia a enfermedades (Shu y Yang, 2017).

En el bin 2.06 se sintetizan tres proteínas distintas; proteína que contiene el dominio DUF295 (DUF por *domain of unknown function*), proteína de unión a DNA y el factor de alargamiento Tu. Este último, presente en plástidos, cumple roles esenciales en síntesis de proteínas plastídicas a la vez que se desempeña independientemente como chaperona en respuestas al estrés por temperatura (*Arabidopsis* sp y maíz) (Ristic *et al.*, 2004, Xifeng *et al.*, 2018). Si bien en la literatura no se menciona nada específico sobre su rol en interacciones maíz-patógenos, hay estudios que dan cuenta de su rol dual tanto para la síntesis y plegamiento de proteínas del estroma (chaperona) como así también en la regulación de la expresión de genes nucleares necesarios para la respuesta al estrés térmico vía señales retrogradadas (Ristic *et al.*, 2004).

Continuando con la lista de bins candidatos, el bin 2.09 está asociado a un gen R (*RPS2*), 1,3-beta-glucosidasa y ubiquitinas E2 y E3 (familia RHF2). A *RPS2* y a la proteína beta-glucosidasa nos referiremos más adelante. En cuanto a las ubiquitinas E2 y E3 es conocido su rol en mantener la homeostasis del proteoma. Las ubiquitinas E3 son abundantes y altamente

variables, y es la especificidad de la unión de E3 con el sustrato lo que condiciona el contexto y tipo de respuesta (Craig *et al.*, 2009). En general las E3 de la familia RHF2 han sido largamente asociadas a respuestas de defensa en planta, regulando procesos como engrosamiento de pared (callosa), síntesis de hormonas, muerte celular y autofagia (Craig *et al.*, 2009, Su *et al.*, 2020).

Finalmente, el bin 2.10 abarca la región génica que codifica para la proteína pangloss2 citada por Sutimantanapi *et al.*, 2014 y de la que se hablará en los párrafos subsiguientes, cuando se detallen los bins candidatos para MDR.

Cómo se mencionó hasta ahora, existe información previamente publicada para los bins 2.05 y 2.09, no obstante, los bin 2.06 y 2.10 no han sido reportados en la bibliografía hasta el momento y este trabajo es la primera mención para maíz y patógenos.

Para *F. graminearum* se hallaron 10 bins (2.02, 2.05, 2.06, 2.09, 2.10, 3.04, 5.03, 6.07, 7.04 y 8.08). El bin 2.02 abarca una región génica que codifica para la proteína transportadora ABC. Del bin 2.05 ya se habló en párrafos anteriores y se discutirá más adelante en bins candidatos a MDR. Los bins 2.06 y 2.09 fueron previamente estudiados por Martin *et al.* 2011 y 2012 como región de resistencia tanto para podredumbre de la espiga causada por *F. graminearum* como para la reducción de contaminación con DON. En este trabajo se destaca la presencia de un marcador asociado a una proteína tipo RLK-LRR conocidos receptores de plantas en respuestas ETI.

En el bin 2.10 aparece nuevamente pangloss2 (ver abajo). El bin 3.04 se encuentra en una región que codifica para una proteína aún no caracterizada, aunque estudios previos realizados por Coan *et al.* 2018 mostraron a este bin como una región de resistencia a *F. graminearum*. También aparece mencionado en resistencia a otras enfermedades como roya (*Puccini sorghi*) y *F. verticillioides* en Yao *et al.* 2020.

En el bin 5.03 se encuentra una MAP quinasa (importantísimas en cascadas de señales) y en el bin 6.07 una proteína homologa a AFP2. AFP2 es una proteína de tipo PR de bajo peso molecular (5 KDa) a las que suelen denominarse “defensinas”. Las defensinas forman parte de un grupo de péptidos antimicrobianos de gran conservación estructural y funcional. Forman

parte esencial de la inmunidad innata de plantas y se caracterizan por ser liberadas rápidamente en respuesta a un patógeno (Arias y Zamora Espitia, 2010). Pueden inhibir el crecimiento de un amplio rango de microorganismos e insectos fitopatógenos. Forman parte de este grupo las beta-1,3-glucanasas, quitinasas, endoproteasas, peroxidasa, oxalato oxidasas, transferasas de lípidos, tiorinas, etc, muchas de ellas mencionadas a lo largo del presente manuscrito. Martin *et al.* 2011 caracterizaron una población de 150 dobles haploides derivados de líneas moderadamente resistentes a *F. graminearum*, donde detectaron al bin 6.07 como región de resistencia a este patógeno.

Finalmente, Ali *et al.* 2005 y Butrón *et al.* 2019 describieron el bin 7.04, que contiene la región génica del factor de alargamiento 1-beta, como región de resistencia a *F. graminearum* relacionada a resistencia de grano.

Por lo tanto, mientras que si existen reportes para los bins 2.06, 2.09, 3.04, 6.07, 7.04; los bins 2.02, 2.05, 2.10, 5.03 y 8.08 no han sido reportados aún como regiones de resistencia y en este trabajo se hace su primera mención.

Con respecto a *U. maydis*, se hallaron 7 bins (1.07, 2.05, 2.08, 2.09, 3.01, 5.03 y 5.05).

El bin 1.07, se encuentra en la región génica que codifica para la proteína portadora de azúcar C. Este bin fue anteriormente asociado a resistencia a carbón en tejido de la espiga por Baumgarten *et al.* 2007.

En el bin 2.05, se asocian 4 SNP, cada uno de los cuales se asocian a 4 proteínas distintas: proteína inducida por JA, la proteína ARNr N-glucosidasa, una proteína no caracterizada y el factor de transcripción VIP1. Desde ya que es interesante la mención de una proteína inducida por JA, ya que como se dijo en la introducción, estudios transcriptómicos realizados en maíces infectados con *U. maydis* mostraron una importante inducción de la vía del JA en los tejidos infectados (Vollmeister *et al.*, 2012). El JA es un antagonista importante del AS, hormona esencial en la defensa contra patógenos biotróficos (Audenaert *et al.*, 2013). Esto podría ser indicativo de la manipulación ejercida por el patógeno, biótrofo obligado, en su lucha por invadir a su hospedante y doblegar sus defensas (moduladas por el AS del hospedante).

Con respecto a VIP1 (*VirE2-interacting protein 1*), es un conocido factor de transcripción del tipo bZIP implicado en respuestas a estreses hídricos y salinos mediados por ABA (Lapham *et*

al., 2018). Dado que *U. maydis* induce la síntesis de ABA en los tejidos infectados (Covas *et al.*, 2010) no resulta tan sorprendente su mención aquí. De hecho, también se ha publicado su rol en respuestas de defensa en *Arabidopsis sp* y tomate contra *Botrytis cinerea*. De hecho, la susceptibilidad a *B. cinerea* depende ampliamente de la presencia de ABA (Lapham *et al.*, 2018).

El bin 2.08 incluye una región génica que codifica para la proteína inhibidora de poligalacturonasa 1 (PGIP1 por *polygalacturonase-inhibiting proteins 1*). Estas proteínas se encuentran ampliamente distribuidas en el reino vegetal, usualmente como una manera de contraponerse a las poligalacturonasas que los patógenos usan para atravesar la pared celular y avanzar la enfermedad (He *et al.*, 2019). Cuando las plantas sintetizan estas PGIP1 no solo limitan la degradación de la pared, sino que también favorecen la síntesis de oligogalacturónidos (OGs) conocidos elicitores de defensa en plantas (Haeger *et al.*, 2020).

En el bin 2.09 se encuentra una región génica que codifica la proteína fosfatasa 2C y la ubiquitina E3 de tipo RBR. La proteína fosfatasa 2C también aparece asociada a los bins 3.01 y 5.05. La fosfatasa 2C (PP2C *protein phosphatase 2C*) pertenece a un grupo de fosfatasas altamente conservadas, con roles preponderantes en respuestas a estrés (Funchs *et al.*, 2012). Su función se lleva a cabo mediante sus efectos contrapuestos sobre cascadas de MAPK y/o en vías dependientes de ABA (en este caso también afectando la síntesis de ABA, que es mediada por quinasas) (Mine *et al.*, 2017). Por ejemplo, trabajos publicados sobre *Arabidopsis* describen como la planta inicia la síntesis de estas fosfatasas como manera de inhibir o frenar, cascadas hormonales dependientes de MAPK que favorecerían la entrada de *Pseudomonas syringae* (Mine *et al.*, 2017). Esta bacteria hemibiotrófica promueve la colonización del huésped imitando a JA (contrapuesto a AS) a través de la coronatina justamente mediante la activación de cascadas MAPK (Minea *et al.*, 2017). Los patógenos muchas veces imitan o hackean el metabolismo de JA y ABA de sus hospedantes para promover su virulencia. Por lo que es posible que el ABA sintetizado por *U. maydis* en la planta sea el disparador de la PP2C, inhibidora necesaria de las respuestas de defensa dependientes de MAPK.

Con respecto a la ubiquitina E3 RBR, como se mencionó en párrafos anteriores, cumplen roles fundamentales en mantenimiento del proteasoma y han sido frecuentemente asociadas a mecanismos de defensas en plantas.

Los bins 1.07 y 5.03 fueron reportados por Baumgarten *et al.*, 2007 y Ding *et al.* 2018 respectivamente, como regiones de resistencia genética a este patógeno. El bin 1.07 se encontró asociado a la frecuencia de infección de espiga (Baumgarten *et al.*, 2007). Mientras que los bins 2.05, 2.08, 2.09 y 5.05 no se habían reportado hasta ahora y este trabajo constituye su primera mención.

Por lo antes expuesto, la mayoría de los SNPs significativos están asociados a regiones génicas que codifican para moléculas que ya han sido previamente involucradas en vías de defensa de la planta por estudios previos.

Este trabajo destaca dos regiones génicas (bin 2.05 y 2.09) de resistencia múltiple a *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *U. maydis* en líneas endocriadas de maíz del PNMM de INTA Pergamino. Ningún estudio previo encontró regiones comunes para estas enfermedades y es la primera vez que se explora la resistencia múltiple en germoplasma argentino.

La mayoría de las regiones génicas encontradas se ubican en el cromosoma 2 por lo que no es indiferente que este cromosoma codifique genes de resistencia. Wisser *et al.* (2006) realizaron un meta-análisis de la arquitectura genética de la resistencia a enfermedades en maíz, donde observaron que el cromosoma 2 se encuentra dentro de los cromosomas que tienen más regiones de resistencia. Se observó una región (≈ 315 a 375 cM del cromosoma 2) que resultó resistente para 9 de las 11 enfermedades estudiadas (Podredumbre de espiga: *Fusarium moniliforme*, *Aspergillus flavus*, *Gibberella zea*, *Colletotrichum graminicola*; *Peronosclerospora* spp.; *Erwinia stewartii*; múltiples patógenos virales: *High plains virus*, *Maize chlorotic dwarf virus*, *Maize dwarf mosaic virus*, *Maize mosaic virus*, *Maize streak virus*, *Sugarcane mosaic virus*, and *Wheat streak mosaic virus*; *Puccinia sorghi*, *P. polysora*; *Cercospora zea-maydis*; *Exserohilum turcicum* y *Cochliobolus heterostrophus*). En Ali *et al.* (2013) encontraron regiones de resistencia para *Exserohilum turcicum*, *Bipolaris maydis*, y *Cercospora zea-maydis* (cromosoma 2).

En el bin 2.05 Machietto *et al.* (2017) encontró para *F. verticillioides* una región que contiene 3 genes (YPTM1, LOX8 y 22 kDa HSP), anteriormente mencionados, que están completamente relacionados con la respuesta frente a estrés. LOX8 es un gen que codifica para la producción de oxilipinas, principalmente el JA. En este trabajo se observó que el marcador PZE102098315 asociado al bin 2.05 que se encontró para *U. maydis*, se encuentra en la región génica que

codifica para la proteína inducida por JA, es decir que es probable que el bin 2.05 aloje una región génica de resistencia múltiple que podría destacarse por codificar JA (la planta sintetiza JA para responder a los necrótrofos como *F. verticillioides* por ej).

En el bin 2.09 se alojan regiones de síntesis para diversas proteínas, como ya se mencionó, donde se destacan por su relevancia en interacción maíz-patógenos: la proteína RPS2 y una enzima glucano endo-1,3-beta-glucosidasa.

RPS2 corresponde a un gen de resistencia (genes R) de la familia NLR (*nucleotide-binding domain leucine-rich repeat*), receptores proteicos típicos de respuestas inmunes de tipo ETI (Dodds y Rathjen, 2010). Se ha publicado que RPS2 cumple importantes roles en respuesta de defensa frente a *Pseudomonas spp* en *Arabidopsis thaliana* y resistencia amplia a patógenos en arroz (Li *et al.*, 2019). Por otra parte, las enzimas de tipo beta-glucosidasa, como la que aquí se menciona, son de gran relevancia en la síntesis de fitoanticipinas, compuestos de defensa preformados que pueden almacenarse glucosilados, y que son bioactivados por estas enzimas ante la presencia de un patógeno (Li *et al.*, 2019).

Con respecto a interacciones entre pares de patógenos, se hallaron 4 regiones (bin 2.05, 2.06, 2.09 y 2.10) de resistencia múltiple a ambas especies de *Fusarium*, 2 regiones (bin 2.05 y 2.09) de resistencia común entre *F. verticillioides* y *U. maydis* y 3 regiones (bin 2.05, 2.09 y 5.03) de resistencia común para *F. graminearum* y *U. maydis*. Es a destacar el bin 2.10, donde se ubica la región génica que codifica para la proteína pangloss 2 (PAN2) (Sutimantanapi *et al.*, 2014). PAN2 es un receptor tipo RLK (receptor *like kinase*) con repeticiones ricas en leucina (LRR *Leucine-rich repeat receptor*). Resumiendo, un receptor RLK de la familia LRR, una de las más abundantes y mejor caracterizadas en plantas (Rubio, 2018). PAN2 posee un dominio extracelular que percibe directamente las señales extracelulares (PAMPs), un dominio transmembrana, y un dominio quinasa citoplasmático que transduce estas señales dentro de la célula. Sutimantanapi *et al.* (2014) postula que PAN2 podría estar implicado en el desarrollo estomático y por ende relacionado a mecanismos de defensa mediados por la regulación de la apertura estomática. En un sentido más amplio incluso, este gen candidato también abre la posibilidad de pensar en una resistencia que incluya también respuesta a estreses abióticos.

Finalmente, sería de gran importancia seguir estudiando con mayor detalle la función de los genes que se encuentran dentro de éstas regiones de resistencia múltiple, para un mejor

entendimiento de los mecanismos de defensa y para aportar a la búsqueda y desarrollo de genotipos de maíz con resistencia a múltiples enfermedades.

CONCLUSIÓN

Dentro del germoplasma estudiado, hallamos una amplia variabilidad fenotípica y genotípica para resistencia a *F. verticillioides*, *F. graminearum* y *U. maydis*, que nos permitió llevar a cabo un estudio de asociación de genoma completo. En este análisis se identificaron 21 segmentos cromosómicos asociados a las distintas enfermedades evaluadas, a través de 60 SNPs significativos. Dos de estos segmentos cromosómicos son comunes a las tres enfermedades consideradas, es decir son regiones MDR (bin 2.05 y 2.09).

Los resultados presentados proporcionan información sumamente valiosa para llevar adelante un mapeo más fino de genes y regiones candidatas, con miras a profundizar el entendimiento de los mecanismos moleculares asociados a la MDR en enfermedades de espiga en este y otros paneles de germoplasma de maíz.

Esta tesis se constituye en un trabajo pionero que explora modelos y rutinas de análisis por primera vez para estas variables y para este set de datos proveniente de germoplasma argentino del PNMM de INTA. El mismo aporta datos inéditos y desconocidos hasta ahora no solo en cuanto a regiones candidatas sino también arroja luz sobre la estructuración de este panel de genotipos y sus valores de LD.

BIBLIOGRAFÍA

- Acosta, M. G.; Ahumada, M.; Mistrorigo Benintende, D.; Lassaga, S.; Casco, V. 2016. Proteínas con repeticiones arm en *Arabidopsis thaliana*: su papel biológico putativo en la interacción polen-estigma. *Ciencia, Docencia y Tecnología*, 6, 14-28.
- Akaike, H. 1974. A new look at the statistical identification model. *IEEE Transactions on Automatic Control*, 6, 716–723.
- Ali, M.L.; Taylor, J.H.; Jie, L.; Sun, G.; William, M.; Kasha, K.J.; Reid, L.M. y Pauls, K.P. 2005. Molecular mapping of QTLs for resistance to *Gibberella* ear rot, in corn, caused by *Fusarium graminearum*. *Genome*, 48 (3), 521-33. doi: 10.1139/g05-014. PMID: 16121248.
- Ali, F. y Yan, F. 2012. Disease resistance in maize and the role of molecular breeding in defending against global threat. *Journal of Integrative Plant Biology*, 54 (3), 134–151.
- Ali, F.; Pan, Q.; Chen, G.; Zahid, K. y Yan, J. 2013. Evidence of multiple disease resistance (MDR) and implication of meta-analysis in marker assisted selection. *PLoS ONE* 8 (7). doi:10.1371/journal.pone.0068150
- Arias, A. y Zamora Espitia, H. 2010. Defensinas de plantas y su uso potencial como controladores de plagas en la agricultura. *Acta biol. Colombiana*, 15 (3). 33-46
- Audenaert, K.; Vanheule, A.; Höfte, M. y Haesaert, G. 2013. Deoxynivalenol: a major player in the multifaceted response of *Fusarium* to its environment. *Toxins*, 6, 1-19.
- Bandera-Fernández, E. y Pérez-Pelea, L. 2018. Los modelos lineales generalizados mixtos. Su aplicación en el mejoramiento de plantas. *Cultivos Tropicales*, 39(1), 127-133. Recuperado en 03 de agosto de 2020, de http://scielo.sld.cu/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0258-59362018000100019&lng=es&tlng=es
- Balint-Kurti, P. J. y Johal, G. S. 2009. Maize disease resistance. En Bennetzen, J.L. y Hake, S.C. (Eds.), *Handbook of Maize: Its Biology* (pp.229-250). Carolina del Norte, Estados Unidos: Springer Science.
- Banuett, F. y Herskowitz, I. 1988. *Ustilago maydis*, smut of maize. *Advances in plant pathology*, 6, 427-455.
- Baumgarten, A.M.; Suresh, J.; May, G. y Phillips, R.L. 2007. Mapping QTLs contributing to *Ustilago maydis* resistance in specific plant tissues of maize. *Theor Appl Genet.*, 114 (7), 1229-38. doi: 10.1007/s00122-007-0513-5. Epub 2007 Feb 16. PMID: 17468806.

- Bennett, J.W. y Klich, M. 2003. Mycotoxins. *Clinical microbiology reviews*, 16 (3), 497–516.
- Bent, A. & Mackey, D. 2007. Elicitors, Effectors, and R Genes: The New Paradigm and a Lifetime Supply of Questions. *Annual review of phytopathology*, 45, 399-436. Doi: 10.1146/annurev.phyto.45.062806.094427.
- Blacutt, A.; Gold, S.; Voss, K.; Gao, M. y Glenn, A. 2017. *Fusarium verticillioides*: advancements in understanding the toxicity, virulence, and niche adaptations of a model mycotoxigenic pathogen of maize. *Phytopathology*, 1-63. doi:<http://dx.doi.org/10.1094/PHYTO-06-17-0203-RVW>.
- Bonilla, J.; Galdeano, E.; Cúndom, M.A. e Iglesias, J. 2017. Eficiencia de fungicidas sobre la podredumbre de la espiga y la concentración de fumonisinas en maíz en el Norte Argentino. Actas del 4to Congreso de la AAF. Mendoza, Mendoza, Argentina. Abril 2017.
- Bolsa de comercio de Rosario. (2021, 5 de marzo). Balance regional del maíz 2020/21. *Bolsa de comercio de Rosario*. <https://www.bcr.com.ar/es/mercados/investigacion-y-desarrollo/informativo-semanal/noticias-informativo-semanal/balance-7>
- Botta, G. y Gonzalez, M. 2012. Enfermedades fúngicas, bacterianas y abióticas del maíz. En G. H. Eyhérbide. (Ed.), *Bases para el manejo del Cultivo de Maíz* (p.127). Pergamino, Argentina: Ediciones INTA.
- Burghardt, L.T; Young, N.D. y Tiffin, P. 2017. A guide to genome-wide association mapping in plants. *Current Protocols in Plant Biology*. <https://doi.org/10.1002/cppb.20041>
- Butrón, A.; Santiago, R.; Cao, A.; Samayoa, L.F. y Malvar, R.A. 2019. QTLs for resistance to *Fusarium* ear rot in a multiparent advanced generation intercross (MAGIC) maize population. *Plant disease*, 103; 897-904.
- Bradbury, P.J.; Zhang, Z; Kroon, D.E.; Casstevens, T.M.; Ramdoss, Y. y Buckler, E.S. 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples. *Bioinformatics*, 23, 2633-2635.
- Ching, A.; Caldwell, K.S; Jung, M.; Dolan, M. y Smith, O.S. 2002. SNP frequency, haplotype structure and linkage disequilibrium in elite maize inbred lines. *BMC Genet*, 3, 19.
- Coan, M.; Senhorinho, H.J.; Pinto, R.B.; Scapim, C.A.; Tessmann, D.; Williams, W., y Warburton, M. 2018. Genome-wide association study of resistance to ear rot by *Fusarium verticillioides* in a tropical field maize and popcorn core collection. *Crop Science*, 58, 564-578.

- Covas, G. 2010. Carbón común del maíz. Consultado 29 mar. 2019. Disponible en <https://inta.gob.ar/sites/default/files/script-tmp-carbonmaizcialp.pdf>.
- Craig, A.; Ewan, R.; Mesmar, J.; Gudipati, V. y Sadanandom, A. 2009. E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. *Journal of Experimental Botany*, 60 (4), 1123–1132. <https://doi.org/10.1093/jxb/erp059>
- Dawe, K. y Nannas, N. 2015. Genetic and genomic toolbox of *Zea mays*. *Genetics*, 199, 655–669.
- Ding, J.Q.; Wang, X.M.; Chander, S. y Li; J.S. 2008. Identification of QTL for maize resistance to common smut by using recombinant inbred lines developed from the Chinese hybrid Yuyu22. *J Appl Genet.*, 49 (2),147-54. doi: 10.1007/BF03195608. PMID: 18436989.
- Di Rienzo, J.A.; Casanoves, F.; Balzarini, M.G.; Gonzalez, L.; Tablada, M. y Robledo, C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.
- Duncan, K.E. y Howard, R.J. 2010. Biology of maize kernel infection by *Fusarium verticillioides*. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 23, 6-16.
- Eyherabide, G.H. (Ed.). 2012. *Bases para el manejo del cultivo de maíz*. Pergamino, Buenos Aires. Ediciones INTA. Pp: 127.
- Flint-Garcia, S.A.; Thornsberry, J.M. Y Buckler, E.S. 2003. Structure of linkage disequilibrium in plants. *Annu Rev Plant Biol.*, 54, 357-374. doi: 10.1146/annurev.arplant.54.031902.134907. PMID: 14502995.
- Fuchs, S.; Grill, E.; Meskiene, I. y Schweighofer, A. 2012. Type 2C protein phosphatases in plants. *The febs journal*. 681-693. doi:10.1111/j.1742-4658.2012.08670.x
- Gaikpa, D.S. y Miedaner, T. 2019. Genomics-assisted breeding for ear rot resistances and reduced mycotoxin contamination in maize: methods, advances and prospects. *Theor Appl Genet*, 132 (10), 2721-2739. doi: 10.1007/s00122-019-03412-2.
- Grubalcaba J. 2016. Modelización y estadística en biología. Recuperado de: <https://jgrubalcaba.wordpress.com/2016/02/21/cosas-que-conviene-saber-al-usar-aic-dic-y-otros-criterios-de-informacion/>
- Haeger, W.; Henning, J.; Heckel, D.; Pauchet, Y y Kirsch, R. 2020. Direct evidence for a new mode of plant defense against insects via a novel polygalacturonase-inhibiting protein expression strategy. *Plant biology*, 295 (33).11833-11844.

- Han, S.; Miedaner, T.; Utz, H.F.; Schipprack, W.; Schrag, T. y Melchinger, A. 2018. Genomic prediction and GWAS of Gibberella ear rot resistance traits in dent and flint lines of a public maize breeding program. *Euphytica*, 214 (6). <https://doi.org/10.1007/s10681-017-2090-2> .
- He, Y.; Karre, S. y Johal, G.S. 2019. A maize polygalacturonase functions as a suppressor of programmed cell death in plants. *BMC Plant Biol*, 19. 310. <https://doi.org/10.1186/s12870-019-1897-5>
- Iglesias, J. 2008. Potencial de germoplasma nativo de maíz como donante de genes de resistencia a Fusarium asociado a bajo contenido de micotoxinas. Tesis Maestría: Genética Vegetal. Facultad de Cs. Agrarias. Universidad de Rosario (FCA, UNR), Santa Fe, Argentina / EEA INTA Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
- Iglesias, J.; Presello, D.; Fauguel, C. y Botta, G. 2008. Micotoxinas: ¿debemos preocuparnos? Jornada de Actualización Técnica de Maíz. Pergamino, Buenos Aires, Argentina. 17 de julio de 2008.
- Iglesias, J.; Presello, D.A.; Botta, G.L.; Lori, G. y Fauguel, C. 2010. Aggressiveness of Fusarium section Liseola isolates causing maize ear rot in Argentina. *Journal of Plant Pathology*, 92 (1), 205-211.
- Iglesias, J. 2015. Analyse fonctionnelle du rôle CYP76C2 dans les mécanismes de défense des plantes contre les agents pathogènes. Tesis doctoral, Université de Strasbourg, Docteur de l'Université de Strasbourg, Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie. Strasbourg. FR.
- Illumina. 2020. MaizeSNP50 DNA Analysis Kit. Recuperado de: <https://www.illumina.com/products/by-type/microarray-kits/maize-snp50.html>
- Jamann, T. M.; Poland, J.A.; Kolkman, J. M.; Smith, L.G. y Nelson R. J. 2014. Unraveling genomic complexity at a quantitative disease resistance locus in maize. *Genetics*, 198, 333–344.
- Jones, J. y Dangl, J. 2006. The plant immune system. *Nature*, 444, 323–329. <https://doi.org/10.1038/nature05286>
- Lapham, R.; Lee, L.; Daisuke, T.; Lee, S.; y Gelvin, S. 2018. Vip1 and its homologs are not required for agrobacterium-mediated transformation, but play a role in botrytis and salt stress responses. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2018.00749>
- Lanubile, A.; Ferrarini, A.; Maschietto, V.; Delledonne, M.; Marocco, A. y Bellin, D. 2014. Functional genomic analysis of constitutive and inducible defense responses to *Fusarium*

verticillioides infection in maize genotypes with contrasting ear rot resistance. *BMC Genomics* 15, 710. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-15-710>

- Lanver, D.; Tollot, M.; Schweizer, G.; Presti, L.; Reissmann, S.; Ma, L. S.; Schuster, M.; Tanaka, S.; Liang, L.; Ludwig, N.; Kahmann, R. 2017. *Ustilago maydis* effectors and their impact on virulence. *Nature Reviews Microbiology*, 15, DOI:10.1038/nrmicro.2017.33.
- Li, L.; Li, H.; Li, Q.; Yang, X.; Zheng, D.; Warburton, M.; Chai, Y.; Zhang, P.; Guo, Y.; Yan, J.B. y Li, J. 2011. An 11-bp Insertion in *Zea mays fat b* reduces the palmitic acid content of fatty acids in maize grain. *PLoS ONE*, e24699.
- Li, Y.X.; Wu, X.; Jaqueth, J.; Zhang, D.; Cui, D.; Li, C.; Hu, G.; Dong, H.; Song, Y.C.; Shi, Y.S.; Wang, T.; Li, B. y Li, Y. 2015. The identification of two head smut resistance-related qtl in maize by the joint approach of linkage mapping and association analysis. *PLoS One*, 10 (12). doi: 10.1371/journal.pone.0145549.
- Li, Z.; Huang, J.; Wang, Z.; Meng, F.; Zhang, S.; Wu, X.; Zhang, Z. y Gao, Z. 2019. Overexpression of arabidopsis nucleotide-binding and leucine-rich repeat genes RPS2 and RPM1(d505v) confers broad-spectrum disease resistance in rice. *Front. Plant Sci.* <https://doi.org/10.3389/fpls.2019.00417>
- Logrieco, A.; Bottalico, A.; Mule, G.; Moretti, A. y Perrone, G. 2003. Epidemiology of toxigenic fungi and their associated mycotoxins for some Mediterranean crops. *European Journal of Plant Pathology*, 109, 645–667.
- Mansson, M.; Klejnstrup, M.L.; Phipps, R.K.; Nielsen, K.F.; Frisvad, J.C.; Gottfredsen, C.H. y Larsen, T.O. 2010. Isolation and NMR characterization of fumonisin B2 and a new fumonisin B6 from *Aspergillus niger*. *J. Agric. Food Chem*, 58, 949-953.
- Martin, M.; Miedaner, T.; Dhillon, B.; Ufermann, U.; Kessel, B.; Ouzunova, M.; Schipprack, W. y Melchinger, A.E. 2011. Colocalization of qtl for *Gibberella* ear rot resistance and low mycotoxin contamination in early european maize. *Crop Science*, 51. 10.2135/cropsci2010.11.0664.
- Martin, M.; Miedaner, T.; Schwegler, D.D.; Kessel, B.; Ouzunova, M.; Dhillon, B.S.; Schipprack, W.; Utz, H.F. y Melchinger, A. E. 2012. Comparative quantitative trait loci mapping for gibberella ear rot resistance and reduced deoxynivalenol contamination across connected maize populations. *Crop Breeding & Genetic*, 5 (1). 32.43
- Maschietto, V.; Colombi, C.; Pirona, R.; Pea, G.; Strozzi, F.; Marocco, A.; Rossini, L. y Lanubile, A. 2017. QTL mapping and candidate genes for resistance to *Fusarium* ear rot

and fumonisin contamination in maize. *BMC Plant Bio*, 17. <https://doi.org/10.1186/s12870-017-0970-1>

- Masiello, M.; Somma, S.; Ghionna, V. y Logrieco, A.F. 2019. In vitro and in field response of different fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* species causing ear rot disease of maize. *Toxins*, 11(11). 10.3390/toxins11010011.
- Matei, A. y Doehlemann, G. 2016. Cell biology of corn smut disease-*Ustilago maydis* as a model for biotrophic interactions. *Curr Opin Microbiology*, 34, 60-66. doi: 10.1016/j.mib.2016.07.020.
- Mesterházy, Á.; Lemmens, M. y Reid, L.M. 2012. Breeding for resistance to ear rots caused by *Fusarium* spp. in maize - A review. *Plant Breeding*, 131(1), 1-19.
- Minea, A.; Berensa, M.; Noboria, T.; Anvera, S.; Fukumotoa, K.; Winkelmüllera, T.; Beckera, A y Tsuda, K. 2017. Pathogen exploitation of an abscisic acid- and jasmonate-inducible MAPK phosphatase and its interception by Arabidopsis immunity. PNAS early edition.
- Montenegro, L.; Buzzetti, G.; Tesei, I.; Zelada, V.; Videla, M. E.; Kistner, B.; Bruno, C. e Iglesias, J.2018. Evaluación de líneas endocriadas de maíz frente a podredumbres de espiga, causadas por *Fusarium spp.* y *Ustilago maydis*. In XI Congreso Nacional de Maíz. 21-24 de agosto, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
- Morrison, E.N.; Emery, R.J. Y Saville, B.J. 2015. Phytohormone Involvement in the *Ustilago maydis*- *Zea mays* Pathosystem: Relationships between Abscisic Acid and Cytokinin Levels and Strain Virulence in Infected Cob Tissue. *PLoS One.*,10, (6). doi: 10.1371/journal.pone.0130945.
- Murillo, I.; Cavallarin, L. y San Segundo, B. 1999. Cytology of infection of maize seedlings by *Fusarium verticillioides* and immuno localization of the pathogenesis-related PRms protein. *Phytopathology*, 89, 737-747.
- Nazar, L. 2020. Heredabilidad para la resistencia a múltiples enfermedades en líneas de maíz (*Zea mays*) (Tesis de grado para optar por el título de Lic. En Genética). UNNOBA. Pergamino, Buenos Aires.
- Olmos, S.; Delucchi, C.; Ravera, M.; Negri, M.; Mandolino, C. y Eyherabide, G.H. 2014. Genetic relatedness and population structure within the public Argentinean collection of maize inbred lines. *Maydica*, 59, 16-31.
- Olmos, S.; Lia, V. y Eyherabide, G.H. 2016. Genetic diversity and linkage disequilibrium in the Argentine public maize inbred line collection. *Plant Genetic Resources*, 1-12.

- Oraguzie, N.C.; Rikkerink, E.; Gardiner, S. y De Silva, H. (Ed.). 2007. Association mapping in plants. Auckland, Nueva Zelanda: Springer.
- Pechanova, Olga y Tibor Pechan. 2015. Maize-Pathogen interactions: an ongoing combat from a proteomics perspective. *International Journal of Molecular Sciences*, 16 (12). 28429-28448. <https://doi.org/10.3390/ijms161226106>
- Portwood J.L. II, Woodhouse M.R., Cannon E.K., Gardiner JM, Harper LC, Schaeffer ML, Walsh JR, Sen TZ, Cho KT, Schott DA, Braun BL, Dietze M, Dunfee B, Elsik CG, Manchanda N, Coe E, Sachs M, Stinard P, Tolbert J, Zimmerman S, Andorf CM. MaizeGDB 2018: the maize multi-genome genetics and genomics database. *Nucleic Acids Research* 47: 1146 – 1154. doi: 10.1093/nar/gky1046.
- Pritchard, J.K.; Stephens M. y Donnelly, P. 2000. Interference of population structure using multilocus genotype data. *Genetics* 155: 945-959.
- Presello, D.A.; Iglesias, J.; Botta, G.; Lori, G. y Eyherábide G.H. 2006. Stability of maize resistance to the ear rots caused by *Fusarium graminearum* and *F. verticillioides* in Argentinian and Canadian environments. *Euphytica*, 147 (3), 403-407.
- Presello, D.A.; Pereyra, A.O.; Iglesias, J.; Fauguel, C.M.; Sampietro D.A. y Eyherábide, G.H. 2011. Responses to selection of S5 inbreds for broad-based resistance to ear rots and grain mycotoxin contamination caused by *Fusarium spp.* in maize. *Euphytica* 178 (1), 23-29.
- Presello, D.A.; Oviedo, S.; Fernández, M. e Iglesias J. Copia P.A. 2016. Resistencia a podredumbres de espiga y acumulación de micotoxinas en maíz. *Revista de Tecnología Agropecuaria* ,10 (32), 29-32.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>.
- Reid, L.M.; Hamilton, R.I. y Mather, D.E. 1996. Screening maize for resistance to *Gibberella ear rot*. Agriculture and Agri-Food Canada, Ottawa, ON. Technical Bulletin Publication, 1996-5E.
- Reid, L.M., Zhu, X., Parker, A., Yan, W. 2009. Increased resistance to *Ustilago zaeae* and *Fusarium verticillioides* in maize inbred lines bred for *Fusarium graminearum* resistance, 165(3), 567-578. <http://dx.doi.org/10.1007/s10681-008-9782-6>.

- Remington, D.L.; Thornsberry, J.M.; Matsuoka, Y.; Wilson, L.M. y Whitt, S.R. 2001. Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 11479–11484.
- Reynoso, M.M.; Torres, A.M. y Chulze, S.N. 2004. Fusaproliferin, beauvericin and fumonisin production by different mating population among the *Gibberella fujikuroi* complex isolated from maize. *Mycological Research*, 108, 154-160.
- Riedelsheimer, C.; Lisec, J.; Czedik-Eysenberg, A.; Sulpice, R.; Flis, A.; Grieder, C.; Altmann, T.; Stitt, M.; Willmitzer, L. y Melchinger, A.E. 2012. Genome-wide association mapping of leaf metabolic profiles for dissecting complex traits in maize. *Proceedings of the Natural Academy of Sciences*, 109, 8872–8877.
- Ristic, Z.; Wilson, K.; Nelsen, C.; Momčilović, I.; Kobayashi, S.; Meeley, R., Muszynski, M. y Habben, J. 2004. A maize mutant with decreased capacity to accumulate chloroplast protein synthesis elongation factor (EF-Tu) displays reduced tolerance to heat stress. *Plant Science*. 167. 1367 - 1374. 10.1016/j.plantsci.2004.07.016.
- Rubio, A. 2018. Expresión del dominio quinasa de un receptor de membrana plásmatica de la planta de papa, *Solanum tuberosum*. Tesis doctoral. Universidad de la República Uruguay.
- SCF, 2000. Opinion of the Scientific Committee on Food on Fusarium Toxins Part 3: Fumonisin B1. Comisión Europea, Bruselas.
- Schwarz, G. 1978. Estimating the dimension of a model. *Annals of Statistics*, 6, 461-464.
- Shu, K. y Yang, W. 2017. E3 ubiquitin ligases: ubiquitous actors in plant development and abiotic stress responses. *Plant Cell Physiol*, 58(9). 1461–1476. doi:10.1093/pcp/pcx071
- Su, T.; Yang, M.; Wan, P.; Zhao, Y. y Ma, C. 2020. Interplay between the Ubiquitin Proteasome System and Ubiquitin-Mediated autophagy in plants. *Cells*. 9(10). 2219. doi: 10.3390/cells9102219. PMID: 33019500; PMCID: PMC7600366.
- Sutimantanapi, D.; Pater, D. Y Smith, L.G. 2014. Divergent roles for maize pan1 and pan2 receptor-like proteins in cytokinesis and cell morphogenesis. *Plant Physiology*, 164, 1905–191.
- Stich, B. y Melchinger, A. 2010. An introduction to association mapping in plants. *Cab Reviews: Perspectives in Agriculture, Veterinary Science, Nutrition and Natural Resources*, 5, 1-9.

- Tenailon, M.I.; Sawkins, M.C.; Long, A.D.; Gaut, R.L.; Doebley, J.F. 2001. Patterns of DNA sequence polymorphism along chromosome 1 of maize (*Zea mays ssp. mays* L.). *Proc Natl Acad Sci USA*, 98, 9161–9166.
- Thompson, M.E.H. Y Raizada, M.N. 2018. Fungal pathogens of maize gaining free passage along the silk road. *Pathogens*, 7 (4). doi: 10.3390/pathogens7040081. PMID: 30314351; PMCID: PMC6313692.
- Torre-Hernández, M.E.; Sánchez-Rangel, D.; Galeana-Sánchez, E. y Plasencia-de la Parra, J. 2014. Fumonisin–síntesis y función en la interacción *Fusarium verticillioides*-maíz. *TIP Revista Especializada en Ciencias Químico-Biológicas*, 17(1), 77-91.
- USDA. 2021. Disponible en: <https://www.bancopiano.com.ar/Inversiones/servicios/noticias/nota/maiz-usda-indica-produccion-2020-21-y-2021-22-de-argentina-en-47-mi-ton> [Visitado junio 2021].
- Videla M. E.; Kistner B.; Iglesias J. y Bruno C. 2018. Evaluación del carbón de la espiga del maíz (*Ustilago maydis*) con modelos estadísticos inflados en cero. In XI Congreso Nacional de Maíz. 21-24 de agosto, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.
- Voss, K.A.; Smith, G.W.; Haschek, W.M.; 2007. Fumonisin: toxicokinetics, mechanism of action and toxicity. *Animal Feed Science and Technology*, 137, 299–325.
- Wang, X. ; Zhang, Y. ; Xu, X. ; Li, H. ; Wu, X. ; Zhang, S. y Li, X. 2014. Evaluation of maize inbred lines currently used in Chinese breeding programs for resistance to six foliar diseases. *The Crop Journal*, 2, 213-222.
- Warburton, M.L.; Tang, J.D.; Windham, G.L.; Hawkins, L.K.; Murray, S.; Xu, W.; Boykin, D.L.; Perkins, A. y Williams, W.P. 2015. Genome wide association mapping of *Aspergillus flavus* and aflatoxin accumulation resistance in maize. *Crop Science*, 55, 1-11.
- Wisser, R. J. ; Balint-Kurti, P. J. y Nelson, R. J. 2006. The genetic architecture of disease resistance in maize: A synthesis of published studies. *Phytopathology*, 96, 120-129.
- Wiesner-Hanks, T. y Nelson, R. 2016. Multiple disease resistance in plants. *The Annual Review of Phytopathology*, 54, 229–52.
- Xifeng, L; Chong, C.; Zhe, W.; Baofang. F.; Cheng, Z. y Zhixiang, C. 2018. Plastid translation elongation factor Tu is prone to heat-Induced aggregation despite Its critical role in plant heat tolerance. *Plant Physiology*, 176 (4), 3027–3045. <https://doi.org/10.1104/pp.17.01672>

- Yang, H.Y.; Kabahuma M.; Chaya T.; Kelly A.; Borrego E.; Bian Y.; Kasmi F.; Yang L.; Teixeira P.; Kolkman J.; Nelson R. J.; Kolomiets M.L.; Dangl J.; Wisser R.; Caplan J.; Li X.; Lauter N. y Balint-Kurti P. J. 2017. A gene encoding maize caffeoyl-CoA O-methyltransferase confers quantitative resistance to multiple pathogens. *Nature Genetics* 49:1364–1372. doi:10.1038/ng.3919.
- Lishan Yao, Yanmei Li, Chuanyu Ma, Lixiu Tong, Feili Du, Mingliang Xu. 2020. Combined genome-wide association study and transcriptome analysis reveal candidate genes for resistance to Fusarium ear rot in maize. *Plant-biotic Interactions*, 62 (10).
- Yu J. y Buckler E.S. 2006. Genetic association mapping and genome organization of maize. *Curr Opin Biotechnol* 17:155-160.
- Zila, C.T.; Ogut, F.; Romay, M.C.; Gardner, C.A.; Buckler, E.S. y Holland, J.B. 2014. Genome-wide association study of Fusarium ear rot disease in the U.S.A. maize inbred line collection. *BMC Plant Biology*, 14, 372. doi: 10.1186/s12870-014-0372-6.

ANEXO

- *Fusarium verticillioides*:

Medidas de resumen obtenidas luego de realizar el ANOVA en InfoStat

Medidas resumen

Variable	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx
SEVERIDAD	156	4,96	1,08	0,09	21,76	1,77	7,00

Para la obtención de los valores BLUP de las 63 líneas endocriadas de maíz evaluadas en dos ambientes frente a *F. verticillioides*, inicialmente se corrió en InfoStat el modelo lineal general mixto, seleccionando el efecto de ambiente y de repetición dentro de ambiente como fijo y el efecto de genotipo como aleatorio.

Tabla 1: medidas de ajuste del modelo lineal general mixto.

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
156	436,08	454,22	-212,04	0,72	0,12	0,72

Referencias: n: número total de individuos, AIC: criterio de información Aikaike, BIC: criterio de información Bayesiano, logLik: función logarítmica de verosimilitud, sigma: desvío estándar, R²: coeficiente de correlación.

Tabla 2: valores de los efectos fijos (ambiente y repeticiones) del modelo.

Efectos fijos	Estim	E.E.	gl	T	p-valor
(Intercept)	4,27	0,20	94	21,55	<0,0001
AMBIENTE2016/2017	0,97	0,20	94	4,85	<0,0001
AMBIENTE2002/2003:REP2	-0,15	0,22	94	-0,67	0,5059
AMBIENTE2016/2017:REP2	-0,09	0,14	94	-0,66	0,5130

Referencias: Estim: coeficiente de efectos fijos. E.E.: error experimental. gl: grados de libertad, T: t-valor; p-valor: valor de significancia.

Tabla 3: Coeficientes (BLUP) de los efectos aleatorios (GENOTIPOS) de los valores de severidad de síntomas de *F. verticillioides* en dos ambientes (2002/2003 y 2016/2017).

GENOTIPO	BLUP
LP 304	0,90
LP1032	0,30
LP1044	-1,32
LP116	0,82
LP122	0,73
LP122-2	0,12
LP124	0,10
LP125-R	0,47
LP126	3,9E-03
LP128	0,02
LP1411	-0,10
LP1512	0,21
LP153	-0,59
LP168	0,21
LP178	-0,57
LP179	0,09
LP197	0,69
LP199	0,02
LP1996	0,14
LP2	-0,98
LP212	0,59
LP214	-0,77
LP220	0,04
LP221	0,99
LP223	0,44
LP236	-0,79
LP2542	-0,90
LP256-R	1,03
LP29	0,14

LP299-2	-0,06
LP311	0,82
LP317	0,40
LP32	0,73
LP3830	-0,82
LP438	-0,07
LP4703	-0,97
LP509	-0,51
LP521	-2,28
LP562	0,72
LP5708	0,10
LP579	0,01
LP580	0,08
LP59	0,56
LP598	-0,61
LP605	-0,82
LP611	-0,22
LP612	0,45
LP613	0,17
LP662	0,35
LP818	0,98
LP869	0,42
LP915	-0,14
LP916	-0,41
LP917	-0,08
LP918	0,45
LP923	-0,59
LPB2	0,47
P465	-0,38
ZN6	-0,77

Obtención BLUE:

Para la obtención de los valores BLUE de las 63 líneas endocriadas de maíz evaluadas en dos ambientes frente a *F. verticillioides*, inicialmente se corrió en InfoStat el modelo lineal general mixto seleccionando la variable ambiente y la variable repetición dentro de ambiente como aleatorio y el efecto de genotipo como fijo.

Tabla 4: medidas de ajuste del modelo lineal general mixto.

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
156	391,21	550,84	-133,60	0,71	0,53	0,73

Referencias: n: número total de individuos, AIC: criterio de información Aikaike, BIC: criterio de información Bayesiano, logLik: función logarítmica de verosimilitud, sigma: desvío estándar, R²: coeficiente de correlación.

Tabla 5: valores de los efectos fijos (genotipos) del modelo.

Genotipos	Estim	E.E.	gl	T	p-valor
(Intercept)	6,04	0,74	94	8,11	<0,0001
LP1032	-0,97	0,62	94	-1,56	0,1222
LP1044	-2,96	0,62	94	-4,76	<0,0001
LP116	-0,19	0,73	94	-0,26	0,7936
LP122	-0,32	0,73	94	-0,44	0,6596
LP122-2	-1,19	0,62	94	-1,92	0,0581
LP124	-1,23	0,73	94	-1,68	0,0963
LP125-R	-0,77	0,62	94	-1,23	0,2214
LP126	-1,37	0,73	94	-1,88	0,0632
LP128	-1,34	0,73	94	-1,84	0,0689
LP1411	-1,52	0,73	94	-2,08	0,0401
LP1512	-1,00	0,71	94	-1,40	0,1634
LP153	-2,23	0,73	94	-3,05	0,0030
LP168	-1,09	0,62	94	-1,75	0,0839
LP178	-2,20	0,73	94	-3,01	0,0033
LP179	-1,25	0,73	94	-1,72	0,0890
LP197	-0,49	0,62	94	-0,80	0,4283
LP199	-1,34	0,73	94	-1,84	0,0689
LP1996	-1,17	0,73	94	-1,60	0,1120
LP2	-2,79	0,73	94	-3,83	0,0002
LP212	-0,61	0,62	94	-0,99	0,3259
LP214	-2,49	0,73	94	-3,41	0,0010
LP220	-1,32	0,73	94	-1,81	0,0732
LP221	0,05	0,73	94	0,07	0,9428
LP223	-0,80	0,62	94	-1,29	0,1997
LP236	-2,45	0,71	94	-3,44	0,0009
LP2542	-2,69	0,73	94	-3,68	0,0004
LP256-R	0,12	0,73	94	0,16	0,8751
LP29	-1,18	0,73	94	-1,62	0,1095
LP299-2	-1,41	0,62	94	-2,27	0,0253
LP311	-0,34	0,62	94	-0,54	0,5874
LP317	-0,85	0,62	94	-1,37	0,1751
LP32	-0,32	0,73	94	-0,44	0,6596
LP3830	-2,57	0,73	94	-3,52	0,0007

LP438	-1,47	0,73	94	-2,02	0,0465
LP4703	-2,79	0,73	94	-3,82	0,0002
LP509	-2,12	0,73	94	-2,90	0,0046
LP521	-4,69	0,73	94	-6,42	<0,0001
LP562	-0,45	0,62	94	-0,73	0,4681
LP5708	-1,24	0,73	94	-1,70	0,0929
LP579	-1,33	0,62	94	-2,14	0,0353
LP580	-1,27	0,73	94	-1,74	0,0858
LP59	-0,57	0,73	94	-0,78	0,4348
LP598	-2,26	0,73	94	-3,09	0,0026
LP605	-2,57	0,73	94	-3,52	0,0007
LP611	-1,61	0,62	94	-2,58	0,0113
LP612	-0,79	0,62	94	-1,26	0,2091
LP613	-1,13	0,62	94	-1,81	0,0730
LP662	-0,91	0,62	94	-1,47	0,1445
LP818	0,04	0,73	94	0,05	0,9579
LP869	-0,77	0,73	94	-1,06	0,2926
LP915	-1,51	0,62	94	-2,43	0,0170
LP916	-1,98	0,73	94	-2,71	0,0080
LP917	-1,50	0,73	94	-2,05	0,0427
LP918	-0,72	0,73	94	-0,99	0,3246
LP923	-2,24	0,73	94	-3,06	0,0028
LPB2	-0,70	0,73	94	-0,96	0,3417
P465	-1,80	0,62	94	-2,90	0,0046
ZN6	-2,49	0,73	94	-3,41	0,0010

Referencias: Estim: coeficiente de efectos fijos. E.E.: error experimental. gl: grados de libertad, T.:t-valor; p-valor: valor de significancia.

- Fusarium graminearum:

Medidas de resumen obtenidas luego de realizar el ANOVA en InfoStat:

Medidas resumen

Variable	n	Media	D.E.	E.E.	CV	Mín	Máx
SEVERIDAD	156	4,88	0,97	0,08	19,82	1,22	7,00

Para la obtención de los valores BLUP de las 63 líneas endocriadas de maíz evaluadas en dos ambientes frente a *F. graminearum*, inicialmente se corrió en InfoStat el modelo lineal general mixto, seleccionando el efecto de ambiente y de repetición dentro de ambiente como fijo y el efecto de genotipo como aleatorio.

Obtención BLUP:

Tabla 6: medidas de ajuste del modelo lineal general mixto.

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
156	425,91	447,08	-205,95	0,77	0,07	0,63

Referencias: n: número total de individuos, AIC: criterio de información Aikaike, BIC: criterio de información Bayesiano, logLik: función logarítmica de verosimilitud, sigma: desvío estándar, R²: coeficiente de correlación.

Tabla 7: valores de los efectos fijos (ambiente y repeticiones) del modelo.

	Estim	E.E.	gl	T	p-valor
(Intercept)	4,34	0,20	94	22,22	<0,0001
AMBIENTE2016/2017	0,70	0,20	94	3,44	0,0009
AMBIENTE2002/2003:REP2	-0,19	0,23	94	-0,83	0,4102
AMBIENTE2016/2017:REP2	0,03	0,14	94	0,19	0,8475

Referencias: Estim: coeficiente de efectos fijos. E.E.: error experimental. gl: grados de libertad, T: t-valor; p-valor: valor de significancia.

Tabla 8: Coeficientes (BLUP) de los efectos aleatorios (GENOTIPOS) de los valores de severidad de síntomas de *F. graminearum* en dos ambientes (2002/2003 y 2016/2017).

Genotipo	BLUP
LP 304	-0,05
LP1032	0,38
LP1044	-0,54
LP116	0,61
LP122	0,77
LP122-2	-0,04
LP124	-0,35
LP125-R	0,43
LP126	0,04
LP128	-0,26
LP1411	0,37
LP1512	0,95
LP153	-0,46
LP168	0,27
LP178	-0,49
LP179	-0,22
LP197	0,01
LP199	-0,03
LP1996	0,28
LP2	-0,70
LP212	0,73

LP214	-0,64
LP220	0,15
LP221	0,87
LP223	0,65
LP236	0,06
LP2542	0,04
LP256-R	0,10
LP29	-0,01
LP299-2	0,49
LP311	0,55
LP317	0,31
LP32	0,53
LP3830	-0,19
LP438	0,49
LP4703	-0,58
LP509	-0,41
LP521	-1,43
LP562	0,19
LP5708	-0,51
LP579	0,89
LP580	-0,07
LP59	-0,74

LP598	-0,70
LP605	-0,64
LP611	-4,8E-03
LP612	0,09
LP613	0,56
LP662	-0,03
LP818	0,58
LP869	-0,22

LP915	-1,7E-03
LP916	-0,03
LP917	-0,08
LP918	0,13
LP923	-1,01
LPB2	-0,41
P465	-0,60
ZN6	-0,06

Obtención BLUE:

Para la obtención de los valores BLUE de las 63 líneas endocriadas de maíz evaluadas en dos ambientes frente a *F. graminearum*, inicialmente se corrió en InfoStat el modelo lineal general mixto seleccionando la variable ambiente y la variable repetición dentro de ambiente como aleatorio y el efecto de genotipo como fijo.

Tabla 9: medidas de ajuste del modelo lineal general mixto.

n	AIC	BIC	logLik	Sigma	R2_0	R2_1
156	393.49	553.12	-134.75	0,72	0,45	0,66

Referencias: n:número total de individuos, AIC: criterio de información Aikaike, BIC: criterio de información Bayesiano, logLik: función logarítmica de verosimilitud, sigma: desvío estándar, R²: coeficiente de correlación.

Tabla 10: valores de los efectos fijos (genotipos) del modelo.

Genotipos	Estim	E.E.	gl	T	p-valor
(Intercept)	4,65	0,73	94	6,41	<0,0001
LP1032	0,46	0,63	94	0,74	0,4636
LP1044	-0,74	0,63	94	-1,17	0,2449
LP116	0,91	0,74	94	1,23	0,2234
LP122	1,18	0,74	94	1,59	0,1147
LP122-2	-0,02	0,63	94	-0,03	0,9799
LP124	-0,69	0,74	94	-0,93	0,3556
LP125-R	0,56	0,63	94	0,89	0,3775
LP126	-0,03	0,74	94	-0,04	0,9658
LP128	-0,53	0,74	94	-0,72	0,4747
LP1411	0,52	0,74	94	0,71	0,4819
LP1512	1,75	0,72	94	2,43	0,0171
LP153	-0,87	0,74	94	-1,17	0,2448
LP168	0,37	0,63	94	0,58	0,5612
LP178	-0,91	0,74	94	-1,23	0,2229

LP179	-0,46	0,74	94	-0,63	0,5331
LP197	0,04	0,63	94	0,06	0,9554
LP199	-0,16	0,74	94	-0,21	0,8325
LP1996	0,37	0,74	94	0,50	0,6168
LP2	-1,26	0,74	94	-1,71	0,0908
LP212	0,95	0,63	94	1,51	0,1338
LP214	-1,16	0,74	94	-1,57	0,1209
LP220	0,14	0,74	94	0,19	0,8467
LP221	1,34	0,74	94	1,82	0,0723
LP223	0,86	0,63	94	1,37	0,1750
LP236	0,20	0,72	94	0,28	0,7820
LP2542	-0,03	0,74	94	-0,04	0,9658
LP256-R	0,06	0,74	94	0,08	0,9350
LP29	-0,12	0,74	94	-0,16	0,8766
LP299-2	0,67	0,63	94	1,06	0,2904
LP311	0,75	0,63	94	1,20	0,2335
LP317	0,38	0,63	94	0,60	0,5522
LP32	0,78	0,74	94	1,06	0,2935
LP3830	-0,41	0,74	94	-0,56	0,5766
LP438	0,72	0,74	94	0,97	0,3336
LP4703	-1,06	0,74	94	-1,43	0,1551
LP509	-0,77	0,74	94	-1,04	0,2988
LP521	-2,47	0,74	94	-3,34	0,0012
LP562	0,28	0,63	94	0,44	0,6599
LP5708	-0,95	0,74	94	-1,28	0,2026
LP579	1,21	0,63	94	1,92	0,0578
LP580	-0,22	0,74	94	-0,30	0,7674
LP59	-1,32	0,74	94	-1,79	0,0766
LP598	-1,26	0,74	94	-1,71	0,0904
LP605	-1,16	0,74	94	-1,57	0,1209
LP611	-0,05	0,63	94	-0,08	0,9326
LP612	0,15	0,63	94	0,23	0,8175
LP613	0,67	0,63	94	1,07	0,2888
LP662	-0,01	0,63	94	-0,01	0,9905
LP818	0,86	0,74	94	1,17	0,2469
LP869	-0,46	0,74	94	-0,62	0,5381
LP915	-3,4E-03	0,63	94	-0,01	0,9957
LP916	-0,15	0,74	94	-0,21	0,8364
LP917	-0,22	0,74	94	-0,30	0,7631
LP918	0,12	0,74	94	0,16	0,8756
LP923	-1,78	0,74	94	-2,41	0,0179
LPB2	-0,78	0,74	94	-1,06	0,2917
P465	-0,82	0,63	94	-1,31	0,1948

ZN6	-0,20	0,74	94	-0,27	0,7850
-----	-------	------	----	-------	--------

Referencias: Estim: coeficiente de efectos fijos. E.E.: error experimental. gl: grados de libertad, T.:t-valor; p-valor: valor de significancia.

Fusarium verticillioides

Tabla 11: Coeficientes BLUP y BLUE de los 63 genotipos correspondientes a líneas endocriadas de maíz, evaluadas en 2 ambientes en la E.E.A INTA-Pergamino, frente a *F. verticillioides*.

Genotipo	BLUP	BLUE			
LP 304	0,90	6,04	LP221	0,99	0,05
LP1032	0,30	-0,97	LP223	0,44	-0,80
LP1044	-1,32	-2,96	LP236	-0,79	-2,45
LP116	0,82	-0,19	LP2542	-0,90	-2,69
LP122	0,73	-0,32	LP256-R	1,03	0,12
LP122-2	0,12	-1,19	LP29	0,14	-1,18
LP124	0,10	-1,23	LP299-2	-0,06	-1,41
LP125-R	0,47	-0,77	LP311	0,82	-0,34
LP126	0,0039	-1,37	LP317	0,40	-0,85
LP128	0,02	-1,34	LP32	0,73	-0,32
LP1411	-0,10	-1,52	LP3830	-0,82	-2,57
LP1512	0,21	-1,00	LP438	-0,07	-1,47
LP153	-0,59	-2,23	LP4703	-0,97	-2,79
LP168	0,21	-1,09	LP509	-0,51	-2,12
LP178	-0,57	-2,20	LP521	-2,28	-4,69
LP179	0,09	-1,25	LP562	0,72	-0,45
LP197	0,69	-0,49	LP5708	0,10	-1,24
LP199	0,02	-1,34	LP579	0,01	-1,33
LP1996	0,14	-1,17	LP580	0,08	-1,27
LP2	-0,98	-2,79	LP59	0,56	-0,57
LP212	0,59	-0,61	LP598	-0,61	-2,26
LP214	-0,77	-2,49	LP605	-0,82	-2,57
LP220	0,04	-1,32	LP611	-0,22	-1,61
			LP612	0,45	-0,79

LP613	0,17	-1,13
LP662	0,35	-0,91
LP818	0,98	0,04
LP869	0,42	-0,77
LP915	-0,14	-1,51
LP916	-0,41	-1,98

LP917	-0,08	-1,50
LP918	0,45	-0,72
LP923	-0,59	-2,24
LPB2	0,47	-0,70
P465	-0,38	-1,80
ZN6	-0,77	-2,49

Referencia: BLUP: Mejor predictor lineal insesgado del inglés best linear unbiased prediction, BLUE: Mejor estimador lineal insesgado del inglés best linear unbiased estimator.

Fusarium graminearum:

Tabla 12: Coeficientes BLUP y BLUE de los 63 genotipos correspondientes a líneas endocriadas de maíz, evaluadas en 2 ambientes en la E.E.A INTA-Pergamino, frente a *F. graminearum*.

Genotipo	BLUP	BLUE
LP 304	-0,05	4,65
LP1032	0,38	0,46
LP1044	-0,54	-0,74
LP116	0,61	0,91
LP122	0,77	1,18
LP122-2	-0,04	-0,02
LP124	-0,35	-0,69
LP125-R	0,43	0,56
LP126	0,04	-0,03
LP128	-0,26	-0,53
LP1411	0,37	0,52
LP1512	0,95	1,75
LP153	-0,46	-0,87
LP168	0,27	0,37
LP178	-0,49	-0,91
LP179	-0,22	-0,46
LP197	0,01	0,04
LP199	-0,03	-0,16
LP1996	0,28	0,37
LP2	-0,70	-1,26

LP212	0,73	0,95
LP214	-0,64	-1,16
LP220	0,15	0,14
LP221	0,87	1,34
LP223	0,65	0,86
LP236	0,06	0,20
LP2542	0,04	-0,03
LP256-R	0,10	0,06
LP29	-0,01	-0,12
LP299-2	0,49	0,67
LP311	0,55	0,75
LP317	0,31	0,38
LP32	0,53	0,78
LP3830	-0,19	-0,41
LP438	0,49	0,72
LP4703	-0,58	-1,06
LP509	-0,41	-0,77
LP521	-1,43	-2,47
LP562	0,19	0,28
LP5708	-0,51	-0,95
LP579	0,89	1,21
LP580	-0,07	-0,22
LP59	-0,74	-1,32
LP598	-0,70	-1,26
LP605	-0,64	-1,16
LP611	-0,0048	-0,05
LP612	0,09	0,15
LP613	0,56	0,67
LP662	-0,03	-0,01
LP818	0,58	0,86
LP869	-0,22	-0,46
LP915	-0,0017	-0,0034
LP916	-0,03	-0,15
LP917	-0,08	-0,22
LP918	0,13	0,12
LP923	-1,01	-1,78
LPB2	-0,41	-0,78
P465	-0,60	-0,82
ZN6	-0,06	-0,20

Referencia: BLUP: Mejor predictor lineal inesgado del inglés best linear unbiased prediction, BLUE: Mejor estimador lineal inesgado del inglés best linear unbiased estimator.

Tabla 13: Coeficientes BLUE y BLUP de 63 genotipos de maíz evaluados en 5 ambientes frente a carbón común.

Genotipo	BLUE	BLUP
L882	0,946	-0,374
LP1032	-1,941	-0,653
LP1044	0,697	-0,324
LP116	1,434	-0,696
LP122	-19,100	-1,128
LP122-2	0,162	-0,515
LP124	0,078	-0,696
LP125-R	1,644	0,407
LP126	1,656	0,470
LP128	0,880	-0,005
LP1411	2,715	1,381
LP147	2,595	1,125
LP1512	-19,100	-1,128
LP153	2,493	1,319
LP168	-19,100	-1,128
LP178	-18,810	-0,733
LP179	0,011	-0,638
LP197	1,236	0,192
LP199	1,363	0,155
LP1996	1,462	0,028
LP2	-19,100	-1,128
LP212	1,879	0,574
LP214	-19,100	-1,128
LP220	1,551	0,830
LP221	1,150	0,107
LP223	1,307	0,211
LP236	1,106	-0,096
LP2542	-19,100	-1,128
LP256-R	-18,900	-1,042
LP29	1,306	0,124
LP299-2	-19,100	-1,128
LP304	2,293	0,790
LP311	2,646	1,445
LP317	1,142	0,217
LP32	2,076	1,008
LP3830	1,974	0,660
LP438	1,465	0,317
LP4703	-0,004	-0,638
LP509	-19,100	-1,088
LP521	0,672	-0,168
LP562	0,543	-0,323
LP5708	-17,670	-0,733
LP579	3,483	2,200
LP580	2,018	0,941
LP59	2,543	1,462
LP598	1,132	-0,016
LP605	3,928	2,464
LP611	1,554	0,235
LP612	-0,025	-0,651
LP613	2,199	0,923
LP661	1,124	0,207

LP662	1,119	-0,067
LP818	2,177	0,654
LP869	3,277	1,989
LP915	2,040	0,944
LP916	1,646	0,286
LP917	2,537	1,319

LP918	0,251	-0,466
LPB2	0,358	0,193
P1338	-17,120	-0,577
P21	-17,120	-0,577
P465	0,627	-0,308
ZN6	0,961	0,002

Referencia: BLUP: best linear unbiased prediction, BLUE: best linear unbiased estimator

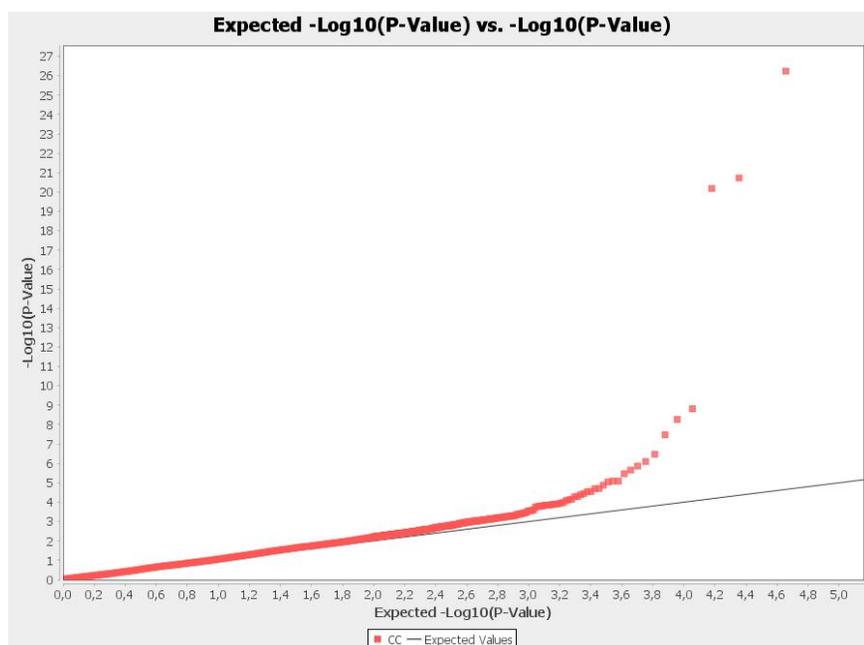


Gráfico 1: Q-Q Plot de los p-valores observados de las 63 líneas endocriadas de maíz perteneciente a carbón común vs. los p-valores esperados del MLM(Q+K) modelo lineal mixto.

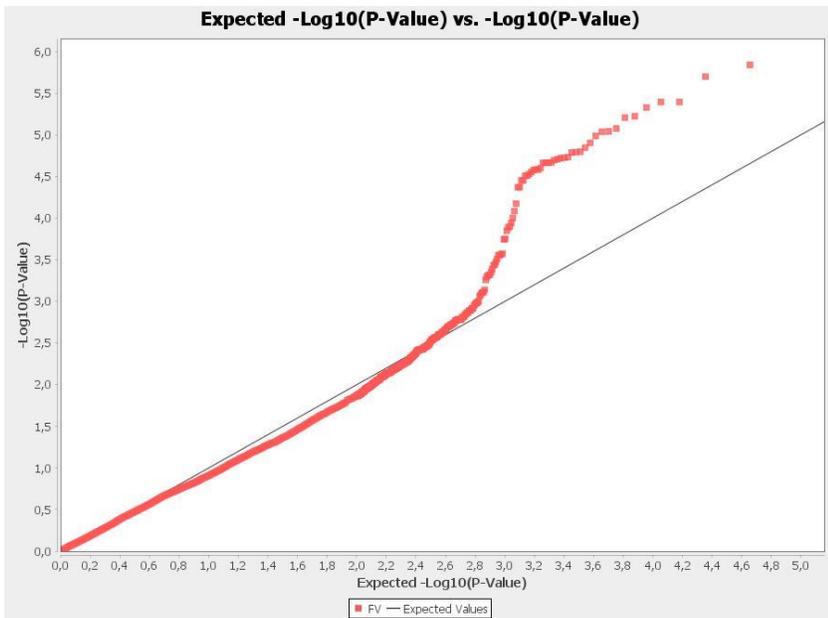


Gráfico 2: Q-Q Plot de los p-valores observados de las 63 líneas endocriadas de maíz perteneciente a *Fusarium verticillioides* vs. los p-valores esperados del MLM(Q+K) modelo lineal mixto.

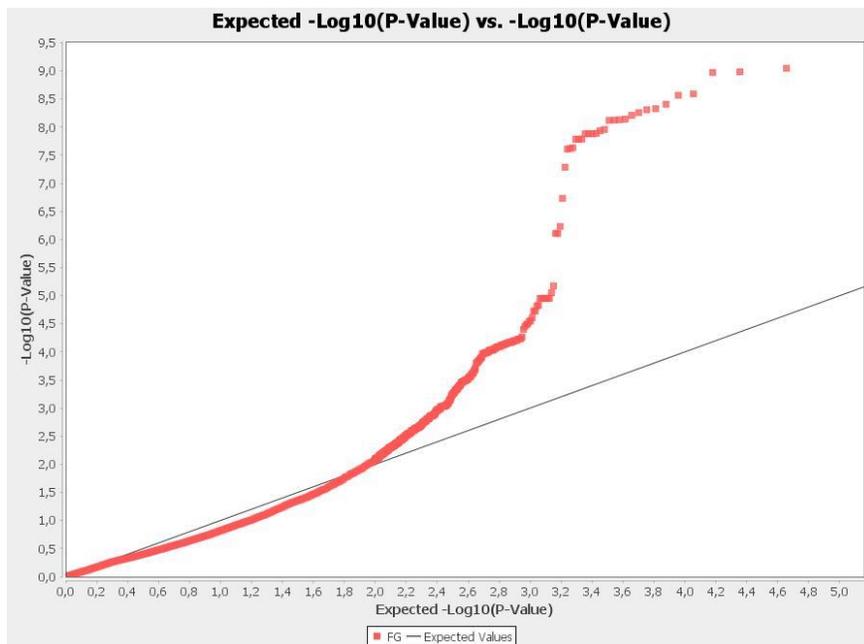


Gráfico 3: Q-Q Plot de los p-valores observados de las 63 líneas endocriadas de maíz perteneciente a *Fusarium graminearum* vs. los p-valores esperados del MLM(Q+K) modelo lineal mixto.