ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE MAÍZ FRENTE A LA BACTERIOSIS CAUSADA POR *XANTHOMONAS VASICOLA PV. VASCULORUM*

Trabajo Final de Grado
de la alumna

YAMILA SLEIMAN

Este trabajo ha sido presentado como requisito
para la obtención del título de

Licenciada en Genética

Carrera

Licenciatura en Genética

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

Pergamino, 14 de marzo de 2025

ESTUDIO DE LA RESISTENCIA DE MAÍZ FRENTE A LA BACTERIOSIS CAUSADA POR *XANTHOMONAS VASICOLA PV. VASCULORUM*

Trabajo Final de Grado

de la alumna

YAMILA SLEIMAN

Aprobada por el Tribunal Evaluador

Dra. Nicole Pretini
Evaluador/a

Dra. Luciana Galizia Galizia
Evaluador/a

Dra. Agostina Arias
Evaluador/a

Lic. Del Dago Daiana Alejandra Ayelén
Lic. Peñas Ballesteros Andrea
Co-Director/a

Dra. Iglesias Juliana
Director/a

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

Pergamino, 14 de marzo de 2025

RESUMEN

El maíz (*Zea mays L.*) es uno de los cultivos de cereales de mayor importancia para la alimentación mundial y su industria; siendo Argentina uno de los cinco países con mayor producción a nivel global. En los últimos años, se ha observado un notable incremento en la incidencia y severidad del estriado foliar bacteriano (BLS, del inglés *bacterial leaf streak*) causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv), registrándose severidad de hasta el 80% del daño foliar. El objetivo de este trabajo consistió en la búsqueda de fuentes de resistencia frente al BLS causado por Xvv, en un *set* variado de 71 líneas endocriadas de maíz pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino (EEA INTA Pergamino).

En primera instancia se realizó un fenotipado del panel en estudio para la severidad de BLS. Para ello, se realizó la inoculación artificial de las líneas en estadío de plántula (V3-V4), en condiciones de invernáculo. Se registró la severidad de cada hoja inoculada, a los 7, 9 y 12 días post-infección utilizando una escala modificada propuesta por Braga *et al.* (2020), la cual comprende cinco niveles: 1 (1% de área foliar afectada), 2 (5%), 3 (25%), 4 (50%) y 5 (<50%). A partir de estos datos, se ajustó un modelo lineal mixto y se calcularon los *rankings* BLUP y BLUE. Los resultados demostraron que un 30% de los genotipos evaluados se comportó como resistente (L5665, LP116, LP1411, LP1512, LP1513, LP199, LP223, LP29, LP521, LP612, LP869, P465), mientras que el 34,3% se mostró susceptible (133, 53, 67, 83538, 83556, 9, AX888IT-B, LP128, LP236, LP453, LP4703, LP579, LP580, LP581, LP59, LP598, LP662, LP916, LP923, LPB2, P1338, Z9801A y ZN6). Por su parte, los genotipos restantes presentaron un comportamiento moderado. Adicionalmente, se compararon estos resultados en invernáculo con los registros de resistencia frente a Xvv evaluados a campo en planta adulta, realizado por el equipo de investigación. Se determinó que más de la mitad de las líneas evaluadas no mostraron el mismo comportamiento en ambas condiciones experimentales, lo que sugiere diferencias en los mecanismos de resistencia involucrados frente a este patógeno hemibiótrofo (resistencia cualitativa y resistencia cuantitativa). Por último, se realizó un mapeo de asociación (GWAS, del inglés *Genome Wide Association Study*) utilizando los valores BLUE y el chip de *Illumina* "*Illumina MaizeSNP50 Beadchip*". Así se identificaron tres regiones génómicas (bins 1.11, 3.04 y 6.05) asociadas a la resistencia frente a Xvv.

Estos hallazgos proporcionan información clave sobre la interacción entre Xvv y el maíz, sentando las bases a futuras investigaciones y al desarrollo de estrategias para un programa de mejoramiento enfocado en generar una resistencia a BLS.

AGRADECIMIENTOS

En primer lugar, quiero agradecer a mis padres Paula y Carin, por todo el sacrificio que hicieron a lo largo de mi vida. Su amor, paciencia y esfuerzos para educarme y formarme tanto personal como profesionalmente, han rendido frutos y me han convertido en la persona que soy hoy. También quiero expresar un agradecimiento especial a mis abuelos, quienes, siempre orgullosos y expectantes, ahora pueden decir que su nieta es la primera universitaria de la familia, tanto en la tierra como en el cielo.

La universidad pública brinda al pueblo una oportunidad de igualdad, progreso y libertad. Agradezco a la Universidad Nacional del Noroeste de Buenos Aires (UNNOBA) por brindarme una educación gratuita, de gran excelencia y calidad. Sin su sede en la ciudad de Pergamino, acceder a un título universitario no habría sido posible.

A mi equipo de trabajo, mi directora Dra. Juliana Iglesias, mis co-directoras Lic. Andrea Peñas Ballesteros y Lic. Daiana Del Dago; y Lic. Nicolás Pinardi; quienes me integraron y contuvieron en todo momento a lo largo de estos dos años. Todas las semanas de inoculaciones hasta las 7 de la noche, la migración de las 200 plantas de un invernáculo a otro, los meses de incertidumbre con el análisis de datos y los días completos dedicados a las correcciones, entre miles de situaciones más. Su presencia y buena predisposición en cada uno de estos momentos fueron fundamentales para completar este trabajo. También, quiero agradecer a mis pasantes, Juli, Marti, Cache y Mai, cuyo profesionalismo y empeño hicieron de estos experimentos posible. Además, una mención especial a la Dra. Cecilia Bruno y al Ing. Agr. Franco Suarez, por su colaboración clave en el desarrollo del modelo estadístico.

A las futuras licenciadas Maca y Juli, quienes, sin saberlo, me guiaron y fueron un pilar primordial a lo largo de todos estos años de estudio (y de vida). Desde aquella invitación a colaborar en los trabajos prácticos de Química Biológica en segundo año, la vida universitaria comenzó a tomar color. El día de hoy puedo decir cuento con dos hermanas de una calidad humana y profesional excepcional. Probablemente, uno de los mejores regalos que la universidad me dejó.

A mi compañero de vida, Brai, quien, con paciencia y amor, supo sobrellevar un mundo totalmente desconocido para él y, aun así, decidió esperar, confiar y quedarse. "Lento pero seguro", después de tantos meses, el momento de la entrega final llegó. Tu fe y esperanza fueron esenciales en los últimos tramos donde el cansancio y las frustraciones abundaban. Gracias por no rendirte.

Por último, gracias a Fungi, a Oscar y su familia, a Ariel, a Estelita y a todos aquellos que me acompañaron a lo largo de este trayecto ayudando y brindando momentos inolvidables.

Nadie llega solo a esta instancia, y yo tuve la fortuna de contar con cientos de personas quienes contribuyeron, en la medida de sus posibilidades, para cumplir con este objetivo. Este trabajo va dedicado a todos ellos.

ÍNDICE

1 INTRODUCCIÓN 6
1.1 Cultivo de maíz 6
1.1.1 Importancia a nivel global y local 6
1.1.2 Relevancia del cultivo en Argentina 6
1.2 Rayado o estriado foliar bacteriano 7
1.2.1 *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* 7
1.2.2 Impacto de BLS en el mundo 9
1.2.3 Resistencia genética del maíz frente a Xvv 9
1.2.4 Investigación en la EEA INTA Pergamino 10
1.3 Variabilidad genética y heredabilidad 10
1.4 Estudios de mapeo de asociación del genoma completo 11
1.4.1 *Genome-wide association studies* (GWAS) 11

2 HIPÓTESIS 12

3 OBJETIVO GENERAL 12

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS 12

5 MATERIALES Y MÉTODOS 13
5.1 Fenotipado 13
5.1.1 Material Vegetal 13
5.1.2 Condiciones de cría y diseño experimental 13
5.1.3 Preparación del inóculo 15
5.1.4 Inoculación y evaluación 15
5.1.5 Análisis estadístico 17
5.1.6 Heredabilidad y Componentes de la Varianza 18
5.2 Evaluación del comportamiento frente a Xvv y comparación invernáculo-campo 18
5.3 Genotipado 19
5.3.1 SNPs 19
5.3.2 Filtrado de los datos 20
5.3.3 Estructuración poblacional 20
5.4 GWAS 21
5.4.1 Tassel 21

5.4.2 GAPIT 22
5.4.3 Desequilibrio de Ligamiento 23

6 RESULTADOS 24
6.1 Fenotipado 24
6.2 Comparación de la respuesta frente a Xvv de los genotipos evaluados en invernáculo y a campo 4
6.3 Heredabilidad y Componentes de la Varianza 8
6.4 Genotipado 9
6.4.1 Filtrado de los datos 9
6.4.2 Estructuración poblacional 9
6.5 GWAS 11
6.5.1 Tassel 11
6.5.2 GAPIT 13
6.6 Desequilibrio de ligamiento 15
6.7 Marcadores Significativos 16

7 DISCUSIÓN 20

8 REFERENCIAS 24

9 ANEXO 33

1 INTRODUCCIÓN

1.1 Cultivo de maíz

1.1.1 Importancia a nivel global y local

El maíz (*Zea mays L.*) es uno de los cultivos de cereales de mayor importancia para la alimentación mundial y su industria. Según la página *web* FAOSTAT de la Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación, se estima que en la campaña 2023/24 se han cosechado 2846,1 millones de toneladas en el mundo, de las cuales el 30,9% son destinado a la utilización por parte de la humanidad (FAOSTAT, 2024).

Argentina, con una superficie de 7 millones de hectáreas y una producción anual de 53 millones de toneladas en la campaña 2023/24 (rendimiento de 7,57 toneladas por hectárea), se sitúa entre los cinco países con mayor producción de maíz a nivel global (USDA, 2024). Por otro lado, se ha estimado para la campaña 2024/25 una producción de 51 millones de toneladas, con un rendimiento de 8 toneladas por hectárea; convirtiéndose en uno de los principales cultivos del país, junto a la soja (IPAD, 2024).

1.1.2 Relevancia del cultivo en Argentina

Alrededor del 80% de la producción de maíz se concentra en el norte de la provincia de Buenos Aires, el sudeste de Córdoba y el sur de Santa Fe, zona conocida tradicionalmente como “Zona Maicera Núcleo” (Bolsa de Comercio de Rosario, 2024).

Las enfermedades que afectan al cultivo son importantes ya que producen una gran brecha entre el rendimiento potencial y el real (Eyhérabide, 2012). Esto puede llegar a afectar tanto a la producción para el consumo interno como a las exportaciones.

Cabe destacar que las pérdidas debidas a enfermedades varían según el año y la región donde se desarrollen. La aparición de enfermedades del maíz depende de muchos factores, incluidas las condiciones ambientales, el genotipo del hospedante, el estadío fenológico de la planta, las prácticas de manejo del cultivo y el historial previo de enfermedades del lote. También, el cambio climático puede causar cambios impredecibles

en la distribución, ocurrencia y gravedad de las enfermedades en diferentes regiones (Yang *et al.*, 2010).

En los últimos años en nuestro país, se ha observado un notable incremento en la incidencia y severidad de la bacteriosis causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* (Xvv) llegando a registrarse casos con valores de severidad de hasta el 80% del área foliar afectada (Giménez Pecci *et al.*, 2018).

1.2 Rayado o estriado foliar bacteriano

1.2.1 *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*

Xanthomonas vasicola pv. *vasculorum* (Xvv) es una bacteria hemibiótrofica, de crecimiento intercelular, que produce lesiones acuosas en el parénquima foliar de la hoja de maíz. Estas lesiones inicialmente son cloróticas y de bordes irregulares, que luego se hacen más alargadas, hasta dar el aspecto de rayado o estriado. De aquí el nombre de la enfermedad “rayado o estriado foliar bacteriano” (BLS, del inglés *Bacterial Leaf Streak*) (Munkvold & White, 2018). En el campo, la enfermedad se manifiesta como lesiones paralelas a las nervaduras de las hojas y están restringidas a los espacios intervenales (Figura 1a y b). Bajo condiciones de alta humedad, se forman pequeñas gotas amarillas de exudado bacteriano en las áreas infectadas de la hoja, denominadas zoogleas (Coutingo & Wallis, 1991).

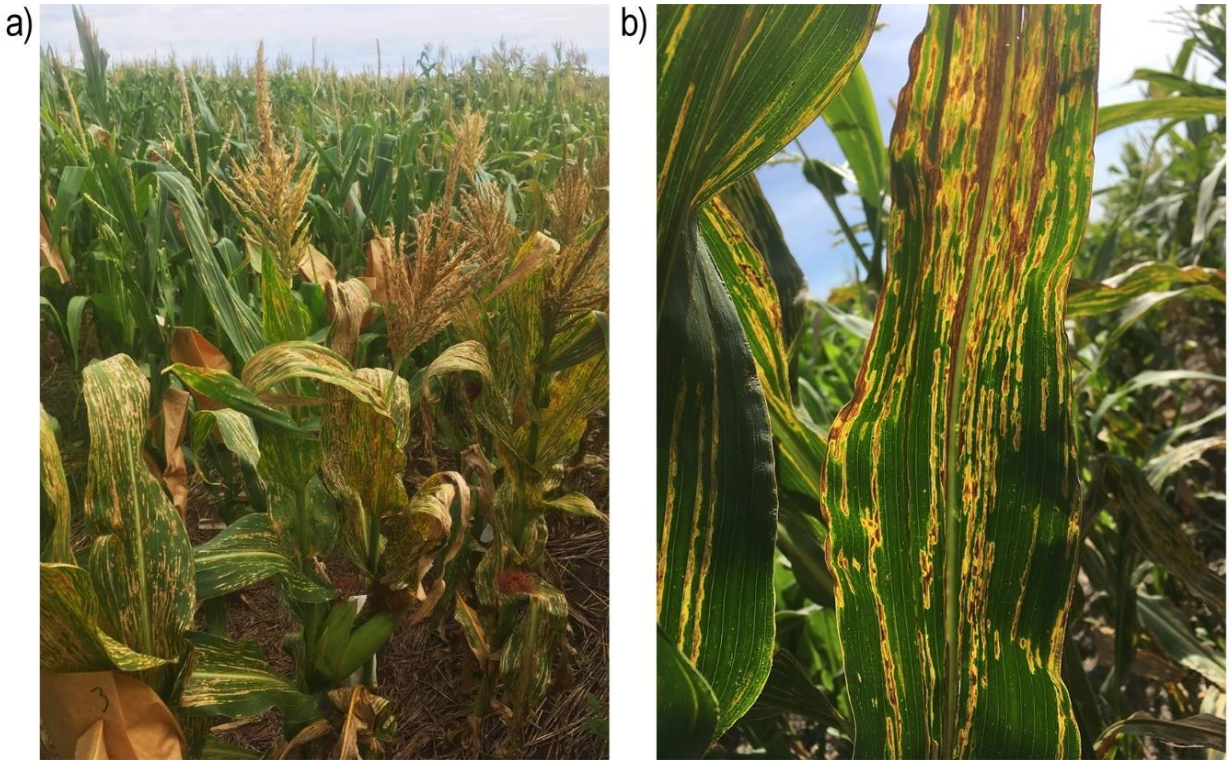


Figura 1. (a) Fotografía de un genotipo susceptible bajo infección natural, mostrando altos niveles de síntomas de BLS en la Campaña 2018/19, Pergamino, Buenos Aires, Argentina. **(b)** Detalle de lesiones en testigo susceptible LP509 (usado en esta tesis) con síntomas de bacteriosis causada por Xvv. Campaña 2018/19, Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Fuente: Laboratorio Dra. Iglesias.

Xvv suele ser más frecuente en ambientes subhúmedos y semiáridos a secos, en los que la producción de maíz generalmente se lleva adelante bajo riego por aspersión. En el caso de Argentina, si bien gran parte del maíz se cultiva sin riego, se cree que los veranos calurosos y la abundancia de tormentas eléctricas que producen vientos fuertes y granizo, pueden ser importantes factores para la propagación y avance de esta enfermedad (Broders, 2017). Esto es así porque las bacterias no poseen estructuras de penetración, como los patógenos fúngicos, por lo que dependen de la apertura estomática y de heridas causadas por el viento, granizo y agua como vía de entrada para colonizar a sus hospedantes (Kistner *et al.* 2022; Zhang *et al.*, 2013). En este sentido, el maíz sembrado sobre residuos de maíz tiene un mayor riesgo de contraer la enfermedad, ya que el patógeno puede sobrevivir en los residuos infectados. La humedad también parece ser importante para que Xvv ingrese a la planta. En experimentos preliminares, se demostró que las células de Xvv se agrupaban alrededor de los estomas de las hojas de maíz y parecían entrar y salir a través de los mismos (Ortiz-Castro *et al.*, 2020).

1.2.2 Impacto de BLS en el mundo

En el mundo, sólo se conocía su presencia en Sudáfrica hasta que en 2016 fue reportada en Estados Unidos (Broders, 2017). En nuestro país, el primer reporte de BLS se dio a conocer en 2018 en la provincia de Córdoba (Plazas *et al.*, 2018).

A la fecha, no se conocen estrategias de control efectivas. Estas enfermedades en cultivos extensivos tienen limitadas estrategias de control químico, ya que el uso de bactericidas y/o antibióticos no es una opción ambiental y/o económicamente viable (Vilaró, 2014). Por otro lado, cabe destacar que esta enfermedad causa gran preocupación por tratarse de una enfermedad cuarentenaria de semilla; lo que limita el potencial de exportación de granos. En este sentido, el desarrollo de resistencia genética a través del mejoramiento constituye una alternativa efectiva, sustentable y durable (Ali *et al.*, 2012; Mesterházy *et al.*, 2012).

Xvv infecta una amplia gama de genotipos de maíz, incluidos híbridos/cultivares, maíces dulce y pisingallo, entre otros. Sin embargo, es incipiente todavía la información disponible a nivel local y mundial, sobre fuentes de resistencia, mecanismos de resistencia y genes de resistencia a esta enfermedad. En este sentido, se destacan dos publicaciones: Kistner *et al.* 2022, del grupo de trabajo que alberga esta tesis y Qiu *et al.*, 2020, del grupo de trabajo de Dr. Balint-Kurti en USDA, Estados Unidos.

1.2.3 Resistencia genética del maíz frente a Xvv

En el contexto de la resistencia genética a enfermedades, se considera resistencia a la habilidad del hospedante para detener o reducir el crecimiento de un patógeno tras establecerse el contacto entre ambos (Kistner, 2021). Las respuestas de resistencia a las enfermedades en las plantas son complejas debido a que contienen múltiples niveles de interacción entre genes, proteínas y metabolitos.

La resistencia a enfermedades se puede dividir en resistencia cualitativa y cuantitativa. La resistencia cualitativa, también llamada <u>oligogénica, vertical o de plántula</u>; es controlada mediante el efecto de uno o pocos genes mayores y se encuentra presente en interacciones de plantas con patógenos biótrofos o hemibiótrofos. La resistencia cuantitativa, también llamada <u>poligénica, horizontal o de planta adulta</u> es la resistencia

debida al efecto de genes múltiples con efectos menores (mayormente aditiva). Este tipo de resistencia se encuentra involucrada en la respuesta de defensa frente a los patógenos hemibiótrofos y necrótrofos (Kistner, 2021).

1.2.4 Investigación en la EEA INTA Pergamino

Actualmente, el grupo de trabajo de Mejoramiento Genético de Maíz de la Estación Experimental Agropecuaria INTA Pergamino (EEA INTA Pergamino) lleva adelante estudios sobre resistencia a enfermedades en maíz.

En este sentido, tres aspectos son fundamentales para llevar adelante un programa de búsqueda y desarrollo de fuentes de resistencia a Xvv. En primer lugar, se debe contar con aislamientos bacterianos de probada capacidad patogénica, debidamente caracterizados y conservados para que mantengan intactas sus características de origen. En segundo lugar, se debe contar también con técnicas de infección ajustadas y probadas. El uso de técnicas de infección artificial que simulen la manera de infectar del patógeno es el método más apropiado para la identificación de germoplasma resistente. Siguiendo estos lineamientos, es posible controlar las condiciones ambientales que favorecen el desarrollo de la enfermedad minimizando la ocurrencia de “escapes” (Iglesias, 2008). Y, en tercer lugar, es importante contar con genotipos testigos susceptibles debidamente caracterizados.

El grupo de investigación sede de esta tesis, ha llevado adelante la puesta a punto del protocolo de infección artificial de maíz con Xvv (Del Dago & Iglesias, 2022).

1.3 Variabilidad genética y heredabilidad

El éxito de un programa de mejoramiento depende en gran medida de la elección del germoplasma. Idealmente, se selecciona un germoplasma que cuente con gran variabilidad genética para incrementar las probabilidades de seleccionar el carácter de interés. Sin embargo, no sólo es importante identificar y fijar genes candidatos para el carácter en cuestión, sino también determinar la proporción de la variabilidad que se debe a factores genéticos. A partir de la heredabilidad, el mejorador puede estimar la proporción de la variabilidad fenotípica (observable) explicada por factores genotípicos (heredabilidad

en sentido amplio, H). Adicionalmente, puede estimar qué proporción de esta variabilidad observable puede ser heredada (heredabilidad en sentido estricto, h^2) (Nazar, 2020).

Comprender la base genética de la resistencia al estriado foliar bacteriano es crucial para controlar la enfermedad. Con la heredabilidad, se puede identificar en qué proporción influyen los factores genéticos o genotípicos y ambientales en la variabilidad del carácter en estudio (Nazar, 2020; Rossi *et al.*, 2018).

1.4 Estudios de mapeo de asociación del genoma completo

1.4.1 *Genome-wide association studies* (GWAS)

La mayoría de los rasgos de importancia agrícola o evolutiva están controlados por múltiples *loci* de rasgos cuantitativos. El mapeo genético y la caracterización molecular de estos genes, que contribuyen a la variación de caracteres complejos, tiene el potencial de facilitar el mejoramiento asistido por marcadores (Stich, 2010). En los últimos años, los estudios de mapeo de asociación del genoma completo (GWAS) y el mapeo de loci de rasgos cuantitativos biparentales (QTL) se han convertido en enfoques valiosos para identificar la función de los genes.

En años previos, el grupo de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino evaluó un panel de líneas endocriadas frente a Xvv en condiciones de campo y bajo infección natural (Kistner *et al.*, 2022). Además, se llevó a cabo un análisis de GWAS y se identificaron regiones candidatas para la resistencia a Xvv, entre otros patógenos.

El presente trabajo de investigación tiene como objetivo caracterizar fenotípicamente este mismo panel de líneas, pero bajo infección artificial de plántulas en invernáculo. Posteriormente, se abordará la identificación de regiones génicas asociadas a la resistencia a Xvv mediante de mapeo de asociación del genoma completo (GWAS). Por último, se propone establecer comparaciones entre los resultados obtenidos en ambas instancias: campo vs. invernáculo.

El equipo de investigación busca poner a punto un protocolo de diagnóstico temprano del estriado foliar bacteriano bajo condiciones de invernáculo, de forma tal de disminuir los tiempos y recursos de evaluación. No obstante, es objetivo de esta tesis

determinar si el fenotipado en invernáculo, así como la resistencia detectada se correlaciona y/o es representativa de lo observado previamente a campo y en planta adulta. Es a destacar que Xvv es un patógeno hemibiotrófico y, por ende, es posible que en cada instancia se esté evaluando un tipo de resistencia diferente.

2 HIPÓTESIS

H1 - La inoculación artificial de plantas de maíz (*Zea mays*) con Xvv en estadíos fenológicos tempranos (V3-V4) y en invernáculo permite predecir su comportamiento de planta adulta a campo.

H2 - Existen regiones génicas candidatas asociadas a la resistencia frente BLS causado por Xvv en un panel de líneas endocriadas del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino.

3 OBJETIVO GENERAL

Caracterizar fenotípicamente un panel de líneas endocriadas del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino en condiciones controladas de invernáculo e identificar regiones génicas asociadas a la resistencia a Xvv, mediante GWAS.

4 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Fenotipar un panel de 71 líneas endocriadas de maíz en estadio fenológico V3-V4 bajo infección artificial en invernáculo.
2. Ajustar modelos estadísticos para analizar los valores fenotípicos del panel de genotipos evaluados en invernáculo.
3. Estimar los componentes de varianza y calcular la heredabilidad en sentido amplio del carácter de resistencia a Xvv en el panel de genotipos en estudio.
4. Identificar regiones génicas de resistencia a Xvv en el panel en estudio, mediante GWAS.
5. Establecer comparaciones entre los resultados obtenidos de este trabajo de tesis y los datos previos obtenidos a campo, en planta adulta, por el grupo de trabajo.

5 MATERIALES Y MÉTODOS

5.1 Fenotipado

5.1.1 Material Vegetal

Se evaluó un *set* variado de 71 líneas endocriadas de maíz pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Este *set* cuenta con información sobre su origen genético, pedigrí y se encuentra mapeado con el chip *Illumina MaizeSNP50 Beadchip* (Anexo 9.1.1).

5.1.2 Condiciones de cría y diseño experimental

El ensayo se desarrolló en el invernáculo de maíz y forrajes de la EEA INTA Pergamino, entre los meses de septiembre 2022 y diciembre 2023. Durante el desarrollo del experimento, se mantuvo un 75% de humedad relativa y una temperatura promedio de 30°C.

El diseño experimental consistió en bloques incompletos completamente aleatorizados. Se realizaron ocho tandas apareadas con un testigo susceptible, siete tandas fueron desarrolladas en el 2022 y la última se llevó a cabo a fines del 2023 (Anexo 9.2.1). En cada tanda, se utilizaron genotipos diferentes, asignados a las tandas al azar y se empleó la línea LP509 como testigo susceptible (Figura 1a y b), genotipo que ya fue estudiado a campo para la resistencia a Xvv (Español *et al.*, 2019; Kistner *et al.*, 2022).

Se realizaron siete repeticiones (macetas) por genotipo. Para cada repetición, se sembraron cuatro semillas en una maceta de 2 litros. Tras una semana de crecimiento, se ralearon dos plántulas dejando otras dos para constituir la unidad experimental (Figura 2a). Del total de 7 macetas por genotipo (con dos plántulas cada una), seis fueron destinadas al tratamiento de infección y una al control no infectado (inoculado con *buffer* $MgCl_2$ sin patógeno). Debido a la relevancia del testigo susceptible para validar las tandas en los análisis estadísticos, el mismo contó con dos macetas en todas las tandas; ambas dedicadas al tratamiento de infección (Figura 2b y c).

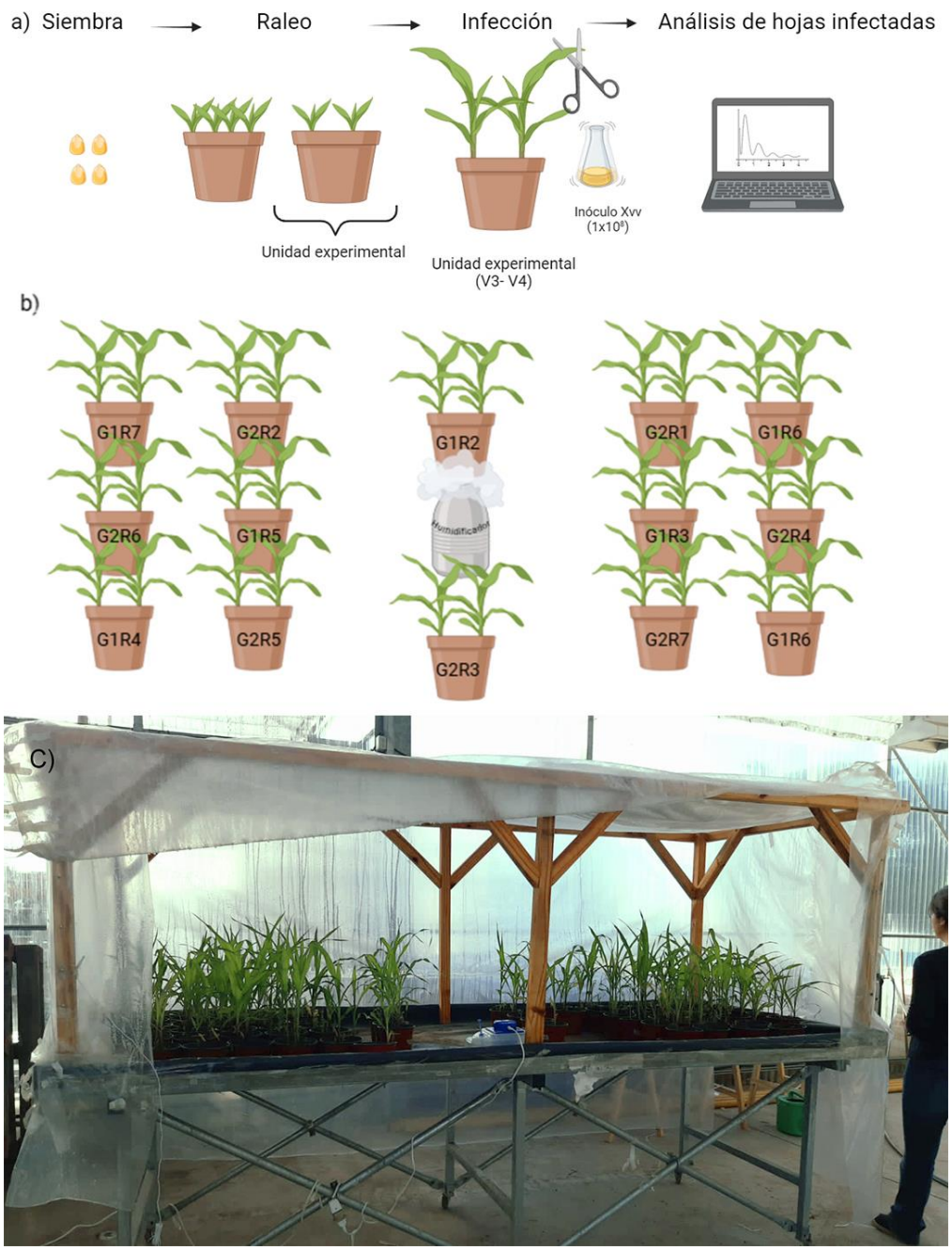


Figura 2. Experimentos en invernáculo. ***(a)** Flujo de trabajo para cada repetición. Inicialmente se sembró en una maceta de 2 litros, cuatro semillas de un mismo genotipo. Tras una semana de crecimiento, se llevó a cabo el raleo, dejando sólo dos plántulas por maceta. Una vez alcanzado el estadío V3-V4, se realizó la infección artificial de las hojas con el inóculo de Xvv (tratamiento infectado) o $MgCl_2$ (tratamiento control). Finalmente, a los 12 días *post*-infección se analizó cada hoja infectada utilizando el programa ImageJ ***(b)** Diagrama ilustrativo de distribución de macetas por tanda para dos genotipos (G). En dicha tanda, cada genotipo contó con seis repeticiones (R) en tratamiento de infección distribuidas al azar y una repetición control en el centro del infectario. **(c)** Fotografía del infectario momentos previos a infectar. Tras finalizar el proceso de infección, se realizó un cierre hermético de las paredes para alcanzar los niveles de humedad óptimos de infección. *Imágenes creadas con *BioRender.com*.

5.1.3 Preparación del inóculo

El inóculo de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum* se realizó a partir de una cepa debidamente caracterizada y validada. La misma fue recolectada a partir de material enfermo en Argentina durante la campaña de cultivo 2018/2019 y se encuentra conservada a -20° en stock 50% glicerol en el laboratorio de la Dra. Iglesias (respaldo en Universidad Católica de Córdoba, Córdoba, Argentina).

Para la preparación del inóculo, en primera instancia se sembró la cepa en placas de Petri con medio *Luria-Bertani* (LB) agar a 25±1°C durante 48-72 horas. Posteriormente, se transfirió a medio LB líquido en agitación (180 rpm) durante 21-22 horas a 28°C y oscuridad.

Antes de su uso, se realizó una prueba de viabilidad utilizando el colorante azul de tripano y se verificó la viabilidad de las bacterias bajo microscopio óptico. En este paso, se constató que las bacterias se hallaban en óptimas condiciones previo a su uso.

Por último, para llevar a la concentración deseada se midió la absorbancia (Abs) del medio líquido inoculado, a una longitud de onda de λ=600 nm empleando espectrofotometría UV-visible. Luego se diluyó en $MgCl_2$ (10 mM) hasta obtener una Abs=0,10-0,15. De esta forma, el inóculo final contó con una concentración de $1x10^8$ UFC/mL (Del Dago & Iglesias, 2022).

5.1.4 Inoculación y evaluación

Tras tres semanas de crecimiento (estadío fenológico V3-V4), se seleccionaron seis macetas por genotipo de forma aleatoria, para aplicar el tratamiento de infección artificial. La maceta restante de cada genotipo se designó como tratamiento control.

En trabajos previos del equipo de investigación de la Dra. Iglesias, fueron evaluadas diferentes técnicas de inoculación que imitan la colonización bacteriana a campo a través de cortes y heridas generadas de manera artificial (Lang *et al.*, 2017). En este trabajo, la técnica de infección artificial consistió en el corte del ápice, de al menos dos hojas de cada planta, con una tijera cubierta del inóculo descripto previamente. Por su parte, en el tratamiento control también se cortó el ápice foliar, pero con una solución de $MgCl_2$ (10mM).

Para favorecer la apertura estomática y la proliferación de la bacteria, las plantas fueron expuestas a condiciones de humedad relativa >60% utilizando un humidificador (Humidificador Ultrasónico Gadnic K6) durante 24 horas pre-infección y post-infección.

Para evaluar la severidad y su progresión en el tiempo, se evaluaron los síntomas a los 7, 9 y 12 días post infección. En las primeras dos instancias de evaluación se realizó un registro fotográfico; mientras que en el día 12, el registro se realizó mediante el escaneo de las hojas infectadas (Escáner Canon Canoscan Lide 300). En cuanto a la evaluación *per se*, se determinó el área total y el área foliar afectada, de las imágenes escaneadas, con el programa ImageJ (Rasband & *National Institute of Health*, 2024). En esta instancia se utilizó como guía la escala publicada por Esker *et al.* (2008; Figura 3a), la cual fue previamente validada a campo por el grupo de investigación en las campañas de cultivo 2017/2018 y 2018/2019 (Kistner *et al.*, 2022). Luego, se realizó el cociente entre las áreas calculadas y se obtuvo el porcentaje de severidad en cada hoja. A continuación, se categorizó dicho valor empleando una escala diagramática modificada compuesta por cinco puntos; donde 1 corresponde al 1%, 2 al 5%, 3 al 25%, 4 al 50% y 5 más del 50% de severidad (Braga *et al.,* 2020; Figura 3b).

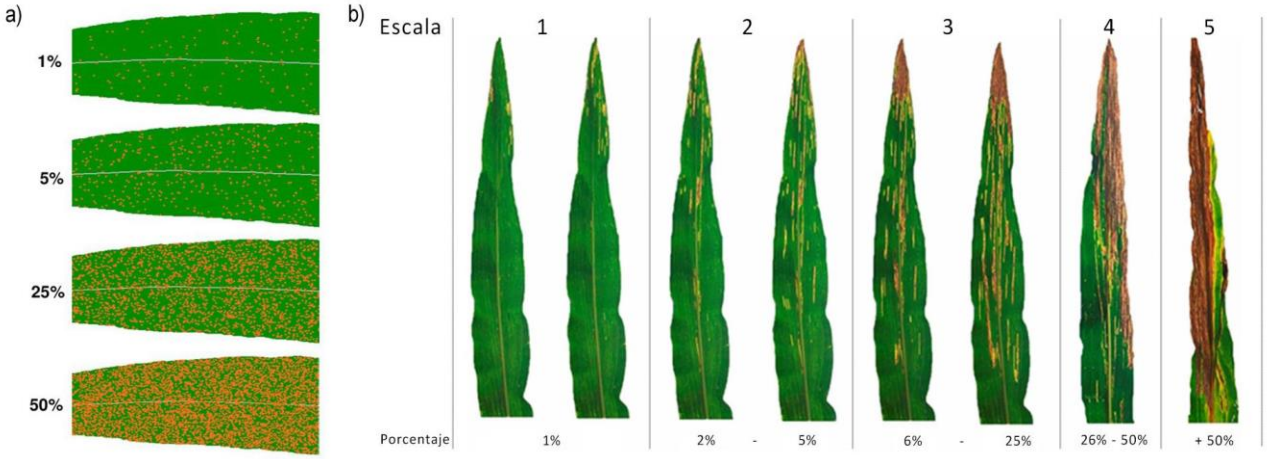


Figura 3. Escalas de severidad utilizadas para la evaluación de los síntomas de bacteriosis en invernáculo, causados por infección artificial con Xvv. **(a)** Diagrama guía utilizado para el análisis del área foliar afectada (Esker *et al., 2008)*. **(b)** Escala adaptada de Braga *et al.* (2020) para la categorización de los datos de severidad; donde 1 corresponde al 1%, 2 al 5%, 3 al 25%, 4 al 50% y 5 más del 50% de severidad.

5.1.5 Análisis estadístico

El análisis de severidad se realizó en función del porcentaje de área foliar dañada. Cada maceta fue considerada como unidad experimental y su valor se obtuvo promediando la severidad de las hojas infectadas en ambas plantas.

En primera instancia se ajustó un modelo lineal mixto, donde se utilizó la variable ¨*genotipos*¨ como un efecto fijo. No es frecuente que los datos relacionados a la severidad de enfermedades cumplan con los supuestos de la distribución normal; en consecuencia, se validaron los supuestos de normalidad y homocedasticidad de los residuos del modelo. Debido a la presencia de heterocedasticidad entre genotipos, fue necesario utilizar la función *VarIdent* para corregir la misma.

Debido a que se trabajó con un diseño experimental con bloques incompletos, dividido en tandas con condiciones ambientales distintas, fue necesario un paso adicional para relativizar los resultados de las mismas. Se incorporó al modelo una nueva covariable calculada como el cociente entre la severidad de cada repetición y la severidad presentada por LP509 (testigo apareado, susceptible) en cada tanda del ensayo. Esta nueva covariable, denominada ¨*testigo*¨, es de suma importancia, ya que refleja el daño foliar causado por Xvv, sin la interferencia de factores ambientales; y permite comparar los resultados de cada tanda. Por último, se utilizó a ¨*Bloque*¨ (que surge de la combinación de tanda y repetición) como un efecto aleatorio. Por lo cual el modelo quedó definido de la siguiente forma:

$$y_{ijk} = \mu + G_i + B_j + T_k + \varepsilon_{ijk}$$

donde, y_{ijk} representa la severidad (%) del i-ésimo genotipo dentro del j-ésimo bloque y k -ésimo testigo, μ representa la media general del modelo, $G_i$representa el efecto del genotipo i (efecto fijo), $B_j$representa el efecto aleatorio de la repetición dentro de cada tanda, T_k representa el efecto aleatorio de la severidad relativa al testigo apareado en cada tanda y ε_{ijk}es el termino de error aleatorio.

A partir de este modelo se obtuvieron los valores del mejor estimador lineal insesgado (BLUE, del inglés, *Best Linear Unbiased Estimator*).

Para obtener los valores del mejor predictor lineal insesgado (BLUP, del inglés, *Best Linear Unbiased Predictor)* se ajustó otro modelo lineal, donde se consideraron todos los factores como efectos aleatorios.

Todos los análisis desarrollados en este trabajo fueron realizados con el *software* InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2020).

5.1.6 Heredabilidad y Componentes de la Varianza

En base al Criterio de Información de Akaike (AIC, del inglés, *Akaike Information Criterion*) y el Criterio de Información Bayesiano (BIC, del inglés, *Bayesian Information Criterion*) obtenidos en las medidas de ajuste de los modelos (Anexo 9.3.2), se seleccionó el modelo estadístico que considera como factores aleatorios al Genotipo y al Bloque. Así, se obtuvieron los valores de desvío de la variancia genotípica (σ_G) y el desvío de la varianza ambiental (σ_E). Teniendo en cuenta que:

$$\sigma^2_G=(\sigma_G)^2$$

$$\sigma^2_E = (\sigma_E)^2$$

Y siguiendo los lineamientos planteados por Peñas Ballesteros (2018), se calculó la heredabilidad en sentido amplio (*H*) utilizando el método estándar:

$$H = \sigma^2_G / [\sigma^2_G + (\sigma^2_E/r)]$$

donde σ^2_G es el componente de la varianza genotípica, σ^2_E es el componente de la varianza ambiental y r es el número de repeticiones planteados en el diseño experimental (r= 6 repeticiones con tratamiento de infección).

5.2 Evaluación del comportamiento frente a Xvv y comparación invernáculo-campo

A partir de los valores BLUE y BLUP obtenidos en este ensayo, se llevó a cabo un análisis de *Clusters* con el paquete *factoextra* (Kassambara & Mundt, 2020) en R Studio v4.4.1 (RStudio Team, 2024), utilizando el lenguaje de programación R (R Core Team 2024). De esta forma, se categorizó el comportamiento de los genotipos evaluados en: “Susceptibles”, “Moderadamente Susceptibles”, “Moderadamente Resistentes” y “Resistentes”.

Por su parte, para investigar la consistencia de los comportamientos en ambos ambientes, se realizó una comparación entre los valores BLUP en invernáculo y los BLUP calculados en el ensayo a campo de Kistner *et al*. (2022). En esta comparación, se implementaron los mismos criterios en ambos ambientes (Tabla 1). Además, a partir de estos valores BLUP, se realizó un Análisis de Componentes Principales (PCA, del inglés, *Principal Component Analysis*) con el objetivo de encontrar una asociación entre el comportamiento de los genotipos y los ambientes. En tal sentido, se utilizó la función *prcomp*() del paquete stats, perteneciente a R; y se lo graficó con los paquetes *ggplot2* (Wickham, 2016) y *ggrepel* (Slowikowski, 2023).

Tabla 1. Criterios utilizados para la comparación entre los resultados de severidad de síntomas de BLS registrados en invernáculo (esta tesis) y registrados a campo (Kistner *et al.,* 2022). Los parámetros: fenotipo de respuesta a la enfermedad, escala de evaluación y porcentaje de daño foliar observado, se mantuvieron constantes en ambos trabajos.

Fenotipo de respuesta a la enfermedad	***Escala***	**% de daño foliar observado**
Resistente	1	Hasta un 10% del área foliar dañada
Moderadamente Resistente	2	11 a 25% del área foliar dañada
Moderadamente susceptible	3	26 a 50% de área foliar dañada
Susceptible	4	51 a 75% de área foliar dañada
	5	76 a 100% de área foliar dañada

5.3 Genotipado

5.3.1 SNPs

Como material de partida se utilizó el chip de *Illumina* "*Illumina MaizeSNP50 Beadchip*" (*Illumina*, 2016), personalizado por *TraitGenetics*, el Instituto Nacional Francés de Investigación Agrícola (INRA) y Syngenta. Este *array* cuenta con información de 56110 marcadores polimórficos de nucleótido único (SNP, del inglés *Single Nucleotide Polymorphism*), validados con el genoma de referencia de la línea B73 (http://www.maizegdb.org).

La elección de este *array* se basó en las características del mismo. Por un lado, presenta una alta densidad génica, con al menos 25 SNPs por megabase. Por otro lado, se destaca su gran cobertura, captando 19350 genes dentro del genoma de *Zea mays*. Además, cuenta con un alto nivel de polimorfismo e información funcional (49585 SNPs son

informativos). Todo esto nos asegura un rendimiento eficaz y efectivo a la hora de detectar SNPs relevantes para el mejoramiento genético (Ganal *et al.*, 2011).

5.3.2 Filtrado de los datos

Del total de las 71 líneas evaluadas fenotípicamente, 53 líneas se encuentran genotipadas en el *chip* previamente mencionado. No obstante, dado a que LP509 se utilizó como testigo apareado, se trabajó con 52 líneas (Anexo 9.5.1). En consecuencia, primero, se filtró el archivo en base a los genotipos en estudio. A continuación, se realizó un filtrado en base a los SNPs, de forma tal que solo quedaran presentes aquellos marcadores que fueran polimórficos, contaran con una frecuencia de alelo menor (MAF, del inglés *Minor Allele Frequency*) mayor al 5% y estuvieran presentes en al menos el 80% de los genotipos (Montenegro, 2022). Por último, se transformó el archivo en formato Hapmap (.hmp).

Este curado de datos se realizó utilizando el programa Tassel v5.2.94 (Bradbury *et al.,* 2007).

5.3.3 Estructuración poblacional

Para el análisis de la estructuración poblacional, se empleó el programa STRUCTURE v2.3.4 (Pritchard *et al.*, 2000). Originalmente, el archivo de SNPs se encontraba en formato Hapmap (.hmp), codificado en nucleótidos. Sin embargo, STRUCTURE utiliza un formato numérico. En consecuencia, se debió realizar una sucesión de conversiones para llegar al formato adecuado.

Primero se transformó el archivo Hapmap a formato VCF (.vcf), utilizando Tassel v5.2.94. Este es el formato input necesario para trabajar con el conversor de archivos PDG Spider v3.0.0 (Lischer & Excoffier, 2012), el cual es capaz de generar el formato STRUCTURE (.str) necesario. Para la conversión del formato .vcf al .str, se trabajó con los parámetros por default y se aclaró que el archivo .vcf contaba con una codificación nucleotídica. En consecuencia, se le asignó a cada base nucleotídica un número arbitrario, donde A→1, T→2, C→3, G→4. De esta forma se obtuvo finalmente el archivo con el formato .str, para continuar con el cálculo de la estructuración.

A continuación, se llevó a cabo el análisis de estructuración poblacional. Para calcular la matriz de estructuración Q, se probaron 10 subpoblaciones diferentes (K=1 hasta K=10), con 3 iteraciones por K. El resto de los parámetros se especifican en Anexo 9.5.2.

Para determinar el valor de K con mayor verosimilitud, se analizaron las matrices Q resultantes con STRUCTURE Harvester (Earl & vonHoldt, 2012), mediante el método de Evanno (Evanno *et al.*, 2005).

5.4 GWAS

El GWAS se realizó empleando Tassel v5.2.94 y GAPIT v3.4.0 (Wang & Zhang, 2021). Los objetivos principales que guiaron esta etapa fueron:

1. Encontrar el modelo que mejor se ajuste a los datos.
2. Determinar cuáles marcadores son significativos; es decir, que presenten un valor *p* (*p-value*) menor al umbral de significancia.

El análisis se realizó a partir de los valores obtenidos en el fenotipado (valores BLUE y BLUP de los genotipos). Se utilizaron Tassel v5.2.94 y GAPIT v3.4.0 con la finalidad de explorar todos los modelos disponibles.

Para determinar el umbral de significancia se utilizó la corrección de Bonferroni (Bonferroni, 1936). Por consiguiente, para obtener un valor de corte con valor p= 0,05, se calculó el cociente entre dicho valor de significancia y el número final de marcadores considerados.

5.4.1 Tassel

Dentro de su versión v5.2.94, Tassel presenta dos modelos: Modelo Lineal General (GLM, del inglés *General Linear Model*) y Modelo Lineal Mixto (MLM, del inglés *Mixed Linear Model*).

Por su parte, GLM es un modelo en el que tanto los mínimos cuadrados, como cualquier covariable incluida se consideran efectos fijos. Inicialmente, el modelo considera sólo a los mínimos cuadrados como efectos fijos; sin embargo, se pueden incluir covariables

como la estructuración de la población (Q) y componentes principales calculadas a partir de los valores genéticos (PCA).

En cambio, MLM se trata de un modelo que añade a la ecuación los efectos aleatorios, lo que nos permite un mayor ajuste frente a la variabilidad observada. Este modelo no solo considera la matriz Q y PCA, sino también una matriz de parentesco (K). Esta última es calculada por el propio programa y utiliza los datos genotípicos para estimar la probabilidad de que los alelos de los marcadores sean idénticos por estado (IBS, del inglés *Identity by state*).

Agregar las covariables al modelo permite identificar los efectos que no pertenecen a los SNPs, ubicados dentro del error (e). De esta forma, se permite reducir la posibilidad de obtener falsos positivos.

Así, se corrieron los siguientes modelos:

- GLM (PCA)
- GLM (Q)
- MLM(Q+K)
- MLM(PCA+K)

En cuanto a las covariables, si bien la matriz K se mantuvo constante, se testearon las diferentes matrices de Q seleccionadas durante el cálculo de estructuración (Q2, Q3, Q7, Q9). Siguiendo este lineamiento, también se realizó el análisis de mapeo con PCA=2, PCA=3, PCA=7 y PCA=9. *(Nota: en* *6.4.2 Estructuración poblacional* Q2, Q3, Q7, Q9 aparecen denominados como K=2, K=3, K=7, K=9 porque Evanno los designa con K en vez de Q. En dicho caso no es la K de *Kinship).*

5.4.2 GAPIT

GAPIT (*Genome Association and Prediction Integrated Tool*) es un paquete de R diseñado para realizar GWAS y selección genómica. Además de los modelos previamente mencionados (GLM y MLM), tiene una amplia variedad de modelos para realizar el estudio de mapeo. Por ejemplo, MLMM (*Multi-Locus Mixed Model*) se trata de una variante del modelo MLM, donde se realiza un análisis iterativo de varios marcadores a la vez. Este

enfoque permite detectar si existe una influencia combinatoria de múltiples SNPs sobre el carácter en estudio (Segura *et al.*, 2012).

SUPER (del inglés *Settlement of MLM Under Progressively Exclusive Relationship*) es otro modelo dentro de GAPIT, que optimiza el proceso de asociación al trabajar con una relación de parentesco individual para cada marcador en lugar de utilizar una matriz de parentesco entre todos los SNPs. Esto permite aumentar la potencia estadística, ya que resuelve el problema de colinealidad entre marcadores y disminuye el sesgo en la vinculación (Wang *et al.*, 2014). Por su parte FarmCPU (del inglés *Fixed and Random Model Circulating Probability Unification*), se trata de un modelo de dos fases: primero se itera entre los efectos fijos y los aleatorios, y luego realiza una división del genoma y selecciona al marcador con el menor valor p de dicha región. De esta forma, logra enfocar al análisis en la significancia de los SNPs y disminuir la redundancia en la selección (Liu *et al.*, 2016). Por último, contamos con BLINK (del inglés *Bayesian-information and Linkage-disequilibrium Iteratively Nested Keyway*), un modelo que combina el método bayesiano y la iteración en su procesamiento, para dar lugar a una selección que no solo tiene en cuenta a los efectos de los marcadores individuales sino también al desequilibrio de ligamiento (LD, del inglés *Linkage Disequilibrium*) en el genoma (Huang *et al.*, 2019).

Al igual que en Tassel, se corrió el análisis con las matrices Q2, Q3, Q7 y Q9 y con PCA=2, PCA=3, PCA=7 y PCA=9.

5.4.3 Desequilibrio de Ligamiento

Para calcular la caída del desequilibrio de ligamiento primero se calcularon los coeficientes r^2, con una ventana de 50 SNPs y un MAF=0,5 mediante Tassel. A partir de ello, se ejecutó un *script* de R para calcular el desequilibrio de ligamiento ajustado por las distancias del cromosoma. En este código, se utilizó la ecuación de Hill y Weir (1988) ajustada por Remington *et al.* (2001).

El cálculo de desequilibrio se realizó para la mitad del valor máximo de r^2 ajustado por el modelo y para el r^2 igual a 0,1.

6 RESULTADOS

6.1 Fenotipado

La técnica de infección artificial de plántulas con Xvv en invernáculo demostró ser adecuada para fenotipar los genotipos en términos de su resistencia. Esto fue evidenciado por la aparición de síntomas característicos, un nivel de infección significativa y la reproducibilidad de los resultados.

Los niveles de infección obtenidos permitieron discriminar los diferentes grados de resistencia presentes en el panel en estudio, en un rango que abarcó desde valores cercanos a 0-1%=Grado 1 en el testigo control hasta valores >75%=Grado 5 en el testigo susceptible. Así, la escala de evaluación utilizada demostró ser adecuada para medir la severidad de los síntomas y cuantificar la enfermedad (Figura 4).

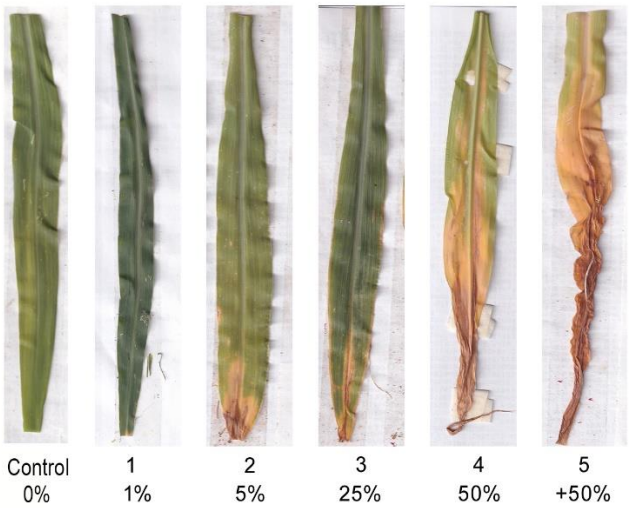


Figura 4. Escala de severidad utilizada para la evaluación de los síntomas de bacteriosis a partir de plántulas en invernáculo. La fotografía ilustra los niveles de severidad alcanzados en diversos genotipos con la infección artificial. Por ejemplo, el grado 5 corresponde al testigo susceptible. Escala adaptada de Braga *et al.* (2020) donde 1 corresponde al 1%, 2 al 5%, 3 al 25%, 4 al 50% y 5 más del 50% de severidad. La hoja control (0%) corresponde a la hoja inoculada con $MgCl_2$.

A continuación, se analizó la distribución de los datos y se verificaron los supuestos de normalidad, independencia y homogeneidad de varianzas del porcentaje de severidad del daño foliar. Los datos de severidad de enfermedades frecuentemente no se ajustan a la distribución normal. En este sentido, se observó una distribución de los datos similar a la distribución normal (Anexo 9.3.1) y se incluyó en el análisis una corrección de heterocedasticidad de los genotipos mediante la función "*varIdent*". Posteriormente, se calcularon los valores BLUE y BLUP.

Los valores BLUE y BLUP obtenidos permitieron discriminar exitosamente a los genotipos de acuerdo a su respuesta frente a BLS (Tabla 2). Un 30% de los genotipos presentó un buen comportamiento, mientras que el 34,3% se mostró susceptible.

Tabla 2. Valores BLUE y BLUP obtenidos a partir de la severidad de síntoma de BLS causado por la infección artificial de Xvv. El fenotipado se llevó a cabo en condiciones de invernáculo, en un grupo de 71 líneas endocriadas de maíz pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino en estadio de plántulas.

Genotipo	BLUE	BLUP
133*	0,6572	0,3002
39*	0,2838	-0,0635
53*	1,1074	0,2206
67*	0,8619	0,2784
83525	2,3489	-0,0075
83538	1,0761	0,2131
83556	0,7073	0,0384
9*	0,8049	0,1558
91*	0,3413	0,1805
AX888IT-B	1,6405	0,1816
B73	0,1712	-0,1706
L5605	0,3395	-0,0071
L5632	0,2457	-0,0962
L5665	0,0587	-0,2863
LP1032	0,2044	-0,1408
LP1044	0,4435	0,0740
LP116	0,0796	-0,2634
LP1222	0,2724	-0,0608
LP124	0,3510	0,0024
LP125R	0,4359	0,0528
LP126	0,2654	-0,0599
LP128	0,6657	0,2402
LP1411	0,0573	-0,2878
LP1512	0,1065	-0,2397

Genotipo	BLUE	BLUP
LP1513	0,0815	-0,2639
LP153	0,2818	-0,0597
LP168	0,4010	0,0435
LP178	0,1961	-0,1223
LP179	0,1852	-0,1567
LP197	0,4091	0,0554
LP199	0,0526	-0,2923
LP1996	0,4350	0,0799
LP212	0,2868	-0,0534
LP214	0,1985	-0,1216
LP223	0,0252	-0,3217
LP236	1,7763	0,1733
LP25421	0,2838	-0,0601
LP256-R	0,4053	0,0435
LP29	0,1199	-0,2230
LP311	0,2373	-0,1053
LP317	0,2669	-0,0795
LP3830	0,3478	0,0004
LP438	0,5093	0,1096
LP453	0,6437	0,1445
LP4703	0,5992	0,2022
LP521	0,0611	-0,2849
LP562	0,3087	-0,0367
LP579	1,6656	0,1638

Genotipo	BLUE	BLUP
LP580	0,7033	0,1342
LP581	1,4207	0,1607
LP59	0,8734	0,2970
LP598	0,5162	0,1300
LP605	0,1738	-0,1699
LP611	0,1659	-0,1287
LP612	0,0984	-0,2454
LP613	0,1803	-0,1584
LP661	0,3363	-0,0063
LP662	0,5892	0,1958
LP818	0,2465	-0,0895
LP869	0,0437	-0,3028
LP915	0,4524	0,0812
LP916	0,5917	0,1843
LP917	0,4328	0,0758
LP918	0,1510	-0,1848
LP923	0,6353	0,2721
LPB2	0,6312	0,2510
P1338	0,6555	0,2433
P465	0,0995	-0,2443
Z9801A	0,9246	0,2760
ZN6	0,5216	0,1390

** el nombre de estos genotipos fue reducido para simplificar su lectura. Ver Anexo 9.1.1.*

A partir de estos valores BLUE y BLUP se realizó un análisis de *Cluster* mediante el algoritmo *k-means* y utilizando la distancia Euclídea. Esta metodología permitió detectar cuatro grupos según su nivel de resistencia/susceptibilidad a la enfermedad: “Susceptibles”,

“Moderadamente Susceptibles”, “Moderadamente Resistentes” y “Resistentes”. En la Figura 5 se observa el análisis de *Cluster* obtenidos utilizando los valores BLUP.

En base a los *rankings* BLUE y BLUPS resultantes, los genotipos L5665, LP116, LP1411, LP1512, LP1513, LP199, LP223, LP29, LP521, LP612, LP869, P465 se destacaron como los de mejor comportamiento (resistentes) con los valores más bajos (0,052 ≥ BLUE ≤ 0,1199; -0,223 ≥ BLUP ≤ -0,3217). Por el contrario, los genotipos 133, 53, 67, 83538, 83556, 9, AX888IT-B, LP128, LP236, LP453, LP4703, LP579, LP580, LP581, LP59, LP598, LP662, LP916, LP923, LPB2, P1338, Z9801A y ZN6 fueron los genotipos de mayor susceptibilidad (0,5216 ≥ BLUE ≤ 2,3489; -0,0075 ≥ BLUP ≤ -0,1733). Los genotipos restantes, presentaron un comportamiento moderado.

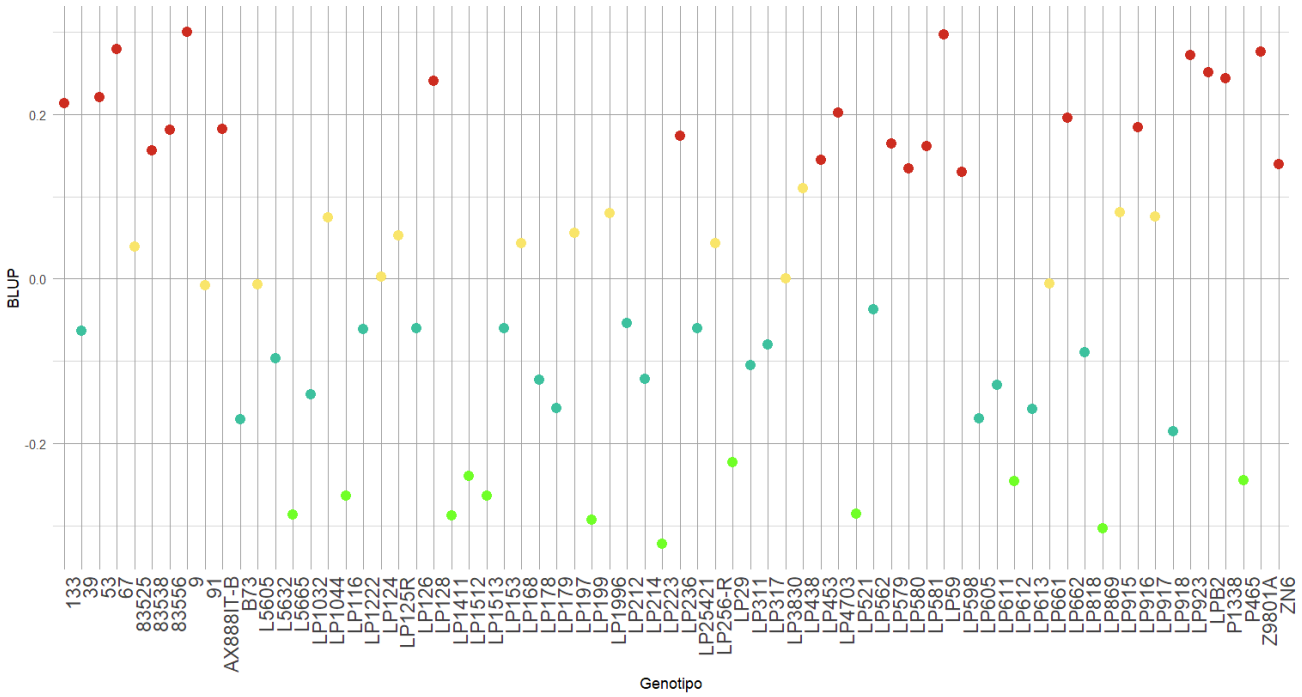


Figura 5. Agrupamiento del comportamiento bajo infección artificial de Xvv en invernáculo de un panel de 71 líneas endocriadas del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino (Ver Anexo 9.1.1). Los agrupamientos se calcularon partir de los valores BLUP utilizando el *software* R v4.4.1 (R Core Team 2024), mediante *k-means* y distancia Euclídea. En el eje de las abscisas se representan los genotipos y en el eje de las ordenadas, los valores BLUP. Cada color de punto indica el comportamiento de cada genotipo frente a la enfermedad: ●Rojo: genotipos susceptibles, ●Amarillo: genotipos moderadamente susceptibles, ●Turquesa: genotipos moderadamente resistentes y ●Verde: genotipos resistentes.

6.2 Comparación de la respuesta frente a Xvv de los genotipos evaluados en invernáculo y a campo

Los resultados obtenidos de los experimentos de infección de plántulas en invernáculo (Sección 6.1), arrojaron resultados insospechados. La hipótesis inicial de este trabajo era que, mediante la inoculación artificial en estadio V3-V4 en invernáculo, se podría predecir el comportamiento de planta adulta a campo. Sin embargo, se observó que los resultados no eran totalmente extrapolables debido a que ambas resistencias, cualitativa y cuantitativa, estaban operando.

Más de la mitad de los genotipos evaluados (43/71) mostraron un comportamiento contrapuesto en ambas situaciones experimentales, mientras que 28/71 genotipos mostraron el mismo comportamiento (Figura 6, Tabla 3 y Anexo 9.4.1).

Tabla 3. Resultados del comportamiento* frente a Xvv de las 71 líneas endocriadas del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino, en experimentos llevados a cabo en estadio de plántulas en invernáculo bajo infección artificial vs plantas adultas bajo infección natural a campo. Los resultados de comportamiento a campo fueron obtenidos previamente por Kistner *et al.* (2022).

Genotipo	Comportamiento en invernáculo	Comportamiento a campo
133**	Resistente	Resistente
39**	Resistente	Susceptible
53**	Resistente	Susceptible
67**	Resistente	Susceptible
83525	Resistente	Susceptible
83538	Resistente	Resistente
83556	Resistente	Resistente
9**	Resistente	Moderadamente Resistente
91**	Resistente	Moderadamente Resistente
AX888IT-B	Resistente	Moderadamente Resistente
B73	Moderadamente Resistente	Moderadamente Susceptible

Genotipo	Comportamiento en invernáculo	Comportamiento a campo
LP236	Susceptible	Moderadamente Resistente
LP2542	Moderadamente Resistente	Moderadamente Susceptible
LP256R	Resistente	Susceptible
LP29	Resistente	Moderadamente Resistente
LP311	Resistente	Resistente
LP317	Resistente	Resistente
LP3830	Moderadamente Susceptible	Moderadamente Resistente
LP438	Moderadamente Resistente	Resistente
LP453	Moderadamente Resistente	Resistente
LP4703	Moderadamente Resistente	Resistente
LP521	Resistente	Resistente

L5605	Moderadamente Susceptible	Resistente
L5632	Moderadamente Resistente	Resistente
L5665	Resistente	Resistente
LP1032	Moderadamente Resistente	Susceptible
LP1044	Resistente	Moderadamente Resistente
LP116	Resistente	Resistente
LP1222	Resistente	Resistente
LP124	Resistente	Susceptible
LP125R	Resistente	Resistente
LP126	Resistente	Resistente
LP128	Resistente	Resistente
LP1411	Resistente	Resistente
LP1512	Resistente	Moderadamente Resistente
LP1513	Resistente	Moderadamente Susceptible
LP153	Resistente	Resistente
LP168	Resistente	Resistente
LP178	Resistente	Resistente
LP179	Resistente	Resistente
LP197	Moderadamente Resistente	Resistente
LP199	Resistente	Resistente
LP1996	Moderadamente Resistente	Resistente
LP212	Resistente	Moderadamente Resistente
LP214	Resistente	Moderadamente Resistente
LP223	Resistente	Resistente

LP562	Moderadamente Resistente	Moderadamente Susceptible
LP579	Susceptible	Moderadamente Susceptible
LP580	Moderadamente Resistente	Susceptible
LP581	Susceptible	Susceptible
LP59	Moderadamente Susceptible	Moderadamente Susceptible
LP598	Moderadamente Resistente	Resistente
LP605	Resistente	Resistente
LP611	Resistente	Moderadamente Resistente
LP612	Resistente	Moderadamente Resistente
LP613	Resistente	Moderadamente Resistente
LP661	Resistente	Resistente
LP662	Moderadamente Susceptible	Resistente
LP818	Resistente	Resistente
LP869	Resistente	Resistente
LP915	Resistente	Resistente
LP916	Moderadamente Resistente	Moderadamente Susceptible
LP917	Moderadamente Resistente	Moderadamente Resistente
LP918	Resistente	Moderadamente Resistente
LP923	Moderadamente Resistente	Moderadamente Susceptible
LPB2	Moderadamente Resistente	Susceptible
P1338	Moderadamente Resistente	Resistente
P465	Resistente	Resistente
Z9801A	Moderadamente Susceptible	Resistente
ZN6	Moderadamente Resistente	Resistente

*Según

Tabla 1 *donde: Resistente= Grado 1, Moderadamente Resistente= Grado 2, Moderadamente susceptible=Grado 3, Susceptible=Grado 4-5. ** El nombre de estos genotipos fue reducido para simplificar su lectura. Ver Anexo 9.1.1.*

De estos 28 genotipos con comportamientos iguales en ambos experimentos (40%), un 35,7% fue resistente mientras que un 1,4% fue susceptible (Anexo 9.4.2). Es decir que un 35,7% de los genotipos evaluados (igual resistencia en plántula y planta adulta) mostraron una resistencia que se mantiene a lo largo del ciclo de vida de la planta. Por otra parte, 5/71 genotipos (7,1%; 67, 53, LP124, LP256R, 83525) fueron resistentes en condiciones de infección de invernáculo, pero susceptibles a campo, indicando la presencia únicamente de resistencia cualitativa o como también se conoce ¨de plántula¨, no prevalente a campo. De manera opuesta no hubo ningún genotipo que fuera susceptible en plántula y resistente en planta adulta a campo, demostrando la presencia de resistencia cuantitativa. Este resultado también señala que los niveles de síntomas causados mediante la infección artificial de los genotipos fueron adecuados y no excesivos, para imitar las condiciones de infección natural sin quebrar la resistencia (por exceso de presión de inoculo o concentración).

El bajo valor de porcentaje de plantas susceptibles detectadas en invernáculo (1,4%, correspondiente al genotipo LP581) indica que el fenotipado o evaluación de genotipos en estadio de plántulas no es determinante para descartar materiales susceptibles.

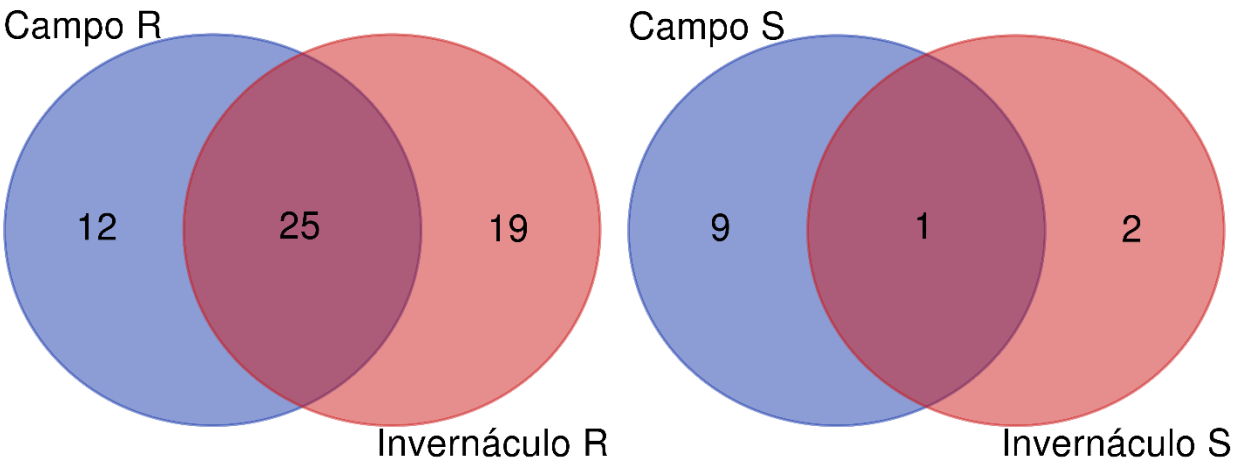


Figura 6. Diagrama de Venn generado a partir de los valores BLUP de severidad de síntomas del panel de 71 líneas endocriadas del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino. La comparación incluye condiciones de infección artificial de plántulas en invernáculo

vs condiciones de infección natural de planta adulta a campo. **a)** Representación del número de genotipos que se comportaron como resistentes en ambas situaciones experimentales. Se destacan 25 genotipos con igual comportamiento de resistencia en ambas instancias de fenotipado (LP818, LP661, LP199, LP915, LP1411, LP223, LP311, L5665, 133, LP153, LP116, LP869, LP605, LP128, LP178, LP1222, LP317, LP179, 83556, P465, LP521, LP168, LP126, 83538, LP125R). **b)** Representación del número de genotipos que se comportaron como susceptibles en ambas situaciones experimentales. Sólo 1 genotipo (LP581) fue susceptible en ambas instancias. Los dos genotipos que fueron moderadamente susceptibles en invernáculo, LP579 y LP236, se comportaron de manera particular a campo. Mientras que LP579 fue moderadamente susceptible, LP236 fue moderadamente resistente. Este último genotipo fue el único que se comportó diametralmente opuesto. Por otra parte, 9 genotipos mostraron buen comportamiento en invernáculo, pero en planta adulta fueron susceptibles: (39, LPB2, 53, 83525, LP580, LP124, LP1032, 67, LP256R)

En el PCA se puede observar que la PC1 permitió separar a los genotipos resistentes de los susceptibles (Figura 7). Al mismo tiempo, la PC2 proporciona información para discriminar aquellos genotipos que presentaron igual comportamiento a campo e invernáculo.

Los vectores representan las condiciones de invernáculo y campo. Los puntos representan los genotipos. La cercanía de los puntos a los vectores implica asociación entre genotipo y condiciones del experimento de fenotipado*, i.e* plántula evaluada bajo infección artificial en invernáculo vs. planta adulta evaluada a campo bajo infección natural.

Los genotipos que presentan el mejor comportamiento se sitúan sobre el margen derecho; mientras que los más afectados por la infección de Xvv se encuentran sobre el margen izquierdo. Genotipos con fenotipo de resistencia o susceptibilidad similares en ambas situaciones experimentales se sitúan sobre la región meridional del *biplot*. Por el contrario, mientras se encuentren más cerca de los bordes superior o inferior, más polarizado será el cambio de comportamiento entre el fenotipado de plántula en invernáculo y el de planta adulta a campo. Por ejemplo, el genotipo 67 presenta un fenotipo de susceptibilidad a campo, por lo cual se ubica cercano al vector ¨Campo¨ y del lado izquierdo del *biplot*. Este genotipo se comportó como resistente en estadio de plántula en invernáculo.

Los genotipos LP236, LP579 y LP581 se ubicaron notablemente alejados del resto de puntos y ejes, en el ángulo superior izquierdo. Los genotipos LP579 y LP581 fueron susceptible y moderadamente susceptible en los experimentos de plántulas en invernáculo y en los experimentos de planta adulta a campo, respectivamente. Notoriamente, el genotipo LP236 fue altamente susceptible en los experimentos de plántulas en invernáculo,

pero de muy buen comportamiento en los experimentos de planta adulta a campo. Este fue el único genotipo de comportamiento contrapuesto en ambas situaciones experimentales.

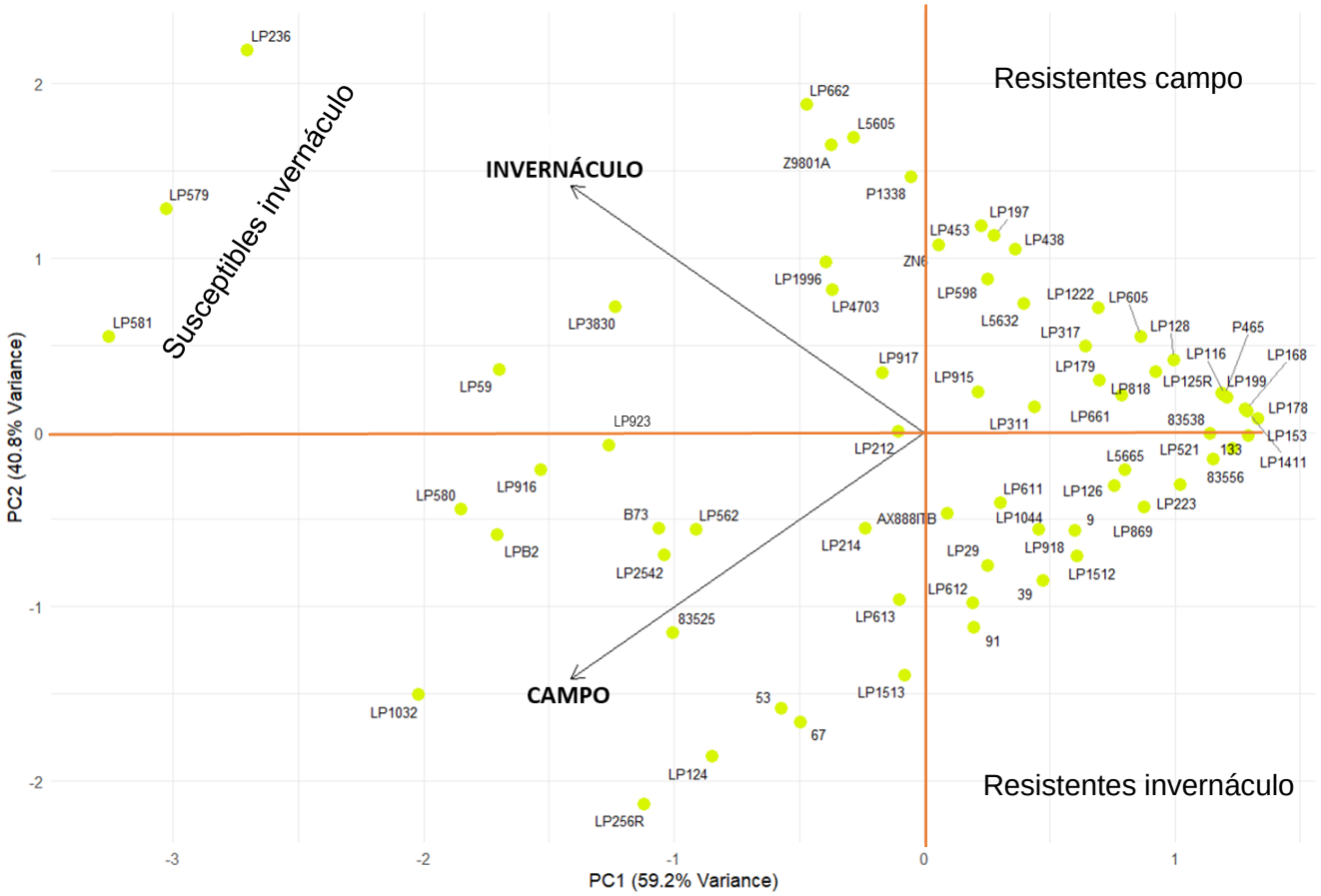


Figura 7. *Biplot* generado a partir de los valores BLUP de severidad de síntomas en un panel de 67 líneas endocriadas del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino (Tabla 2). La comparación incluye condiciones de infección artificial de plántulas en invernáculo y condiciones de infección natural de plantas adultas a campo. Los puntos representan los genotipos, mientras que los vectores indican los ambientes: invernáculo y campo, respectivamente. Los ejes destacados en color rojo denotan el valor cero de cada eje.

6.3 Heredabilidad y Componentes de la Varianza

En base al modelo estadístico que considera como factores aleatorios al *Genotipo* y al *Bloque*, se lograron calcular los valores de desvío estándar y varianza genotípica y ambiental (Tabla 4). A partir de estos valores, se determinó que la heredabilidad en sentido amplio *(H)* es igual a 0,6959, lo que indica que una gran proporción de la variación fenotípica; más concretamente un 69,6%, se debe a diferencias genotípicas.

Tabla 4. Componentes del desvío genotípico (σ_G), desvío ambiental (σ_E), de la varianza genotípica (σ^2_G) y la varianza ambiental (σ^2_E), estimados a partir del fenotipado de 71 genotipos de maíz del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino. Experimento bajo infección artificial de Xvv en estadio de plántula en invernáculo. Los cálculos se llevaron a cabo utilizando el *software* Infostat (2020) siguiendo un modelo lineal general mixto y considerando Genotipo y Bloque como factores aleatorios.

Desvíos		Componente de la Varianza	
σ_G	0,21	σ^2_G	0,044
σ_E	0,34	σ^2_E	0,115

6.4 Genotipado

6.4.1 Filtrado de los datos

A partir de la matriz inicial de 54376 SNPs, se filtraron:

- Marcadores monomórficos.
- Marcadores con un MAF mayor al 5%.
- Marcadores que no se encuentren presentes en, al menos, un 80% de los genotipos.

En total, se eliminaron 12140 SNPs; dejando 42236 SNPs para análisis posteriores.

6.4.2 Estructuración poblacional

Para determinar la estructuración poblacional, se estimaron las matrices Q con diferentes números de subpoblaciones K mediante el método de Evanno (Tabla 5). Se destacaron cuatro picos de delta K: 1578829, 444773, 130560 y 493602, para K=2, K=3, K=7 y K=9, respectivamente (Figura 8).

Tabla 5. Valores obtenidos mediante el método de Evanno para el cálculo del Delta K a partir de los valores de verosimilitud [LnP(K)] para el estudio de estructuración de los 52 genotipos en estudio. En negrita se destacan los valores K que demuestran picos en delta K (K=2, K=3, K=7 y K=9). *NA: dato faltante.

# K	Reps	Mean LnP(K)	Stdev LnP(K)	Ln'(K)	|Ln''(K)|	Delta K
1	3	-2327089	213,08	NA	NA	NA
2	**3**	**-2177000**	**254,10**	**150088,60**	**40118,53**	**157,88**
3	**3**	**-2067030**	**704,05**	**109970,10**	**31314,47**	**44,48**
4	3	-1988374	5448,29	78655,60	8653,37	1,59
5	3	-1901065	15029,37	87308,97	28334,87	1,89
6	3	-1842091	19914,19	58974,10	12715,10	0,64
7	**3**	**-1770402**	**5865,24**	**71689,20**	**76576,77**	**13,06**
8	3	-1775290	129976,50	-4887,57	113651,70	0,87
9	**3**	**-1666525**	**4220,65**	**108764,20**	**208332,20**	**49,36**
10	3	-1766093	173577,60	-99568	NA	NA

**NA: dato faltante*

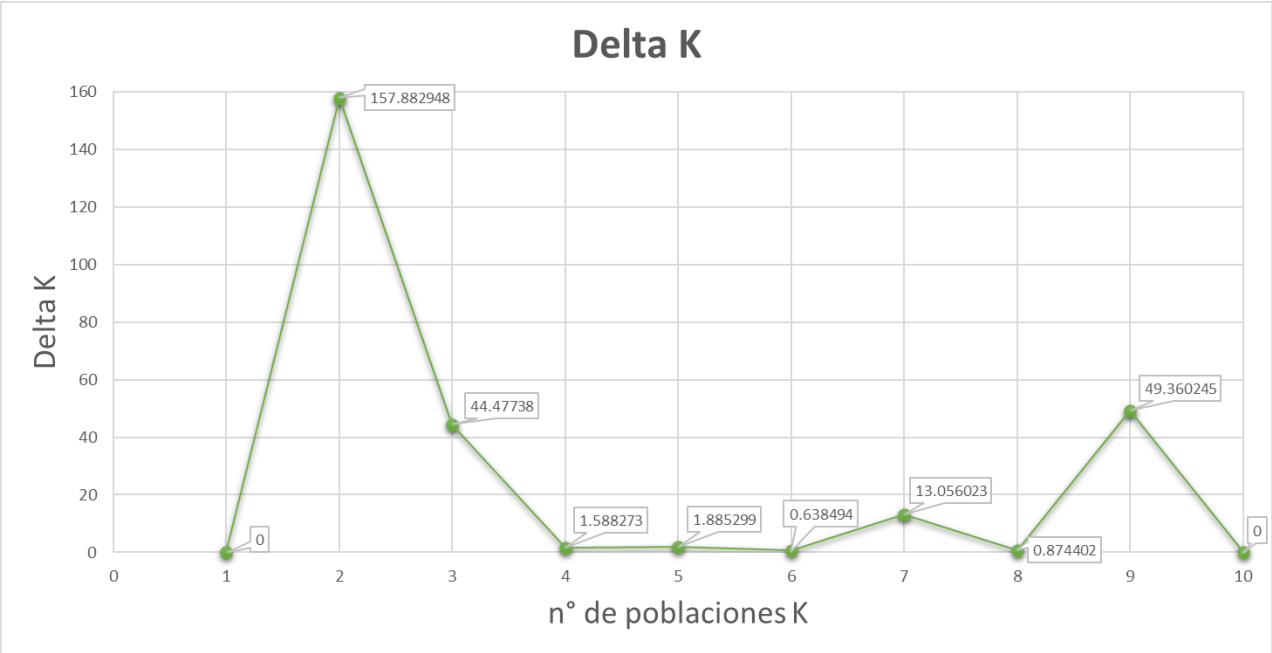


Figura 8. Representación gráfica de valores de Delta K obtenidos por el método de Evanno para cada subpoblación K de un panel de 52 líneas endocriadas de maíz pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de EEA INTA Pergamino. En el eje de las abscisas están

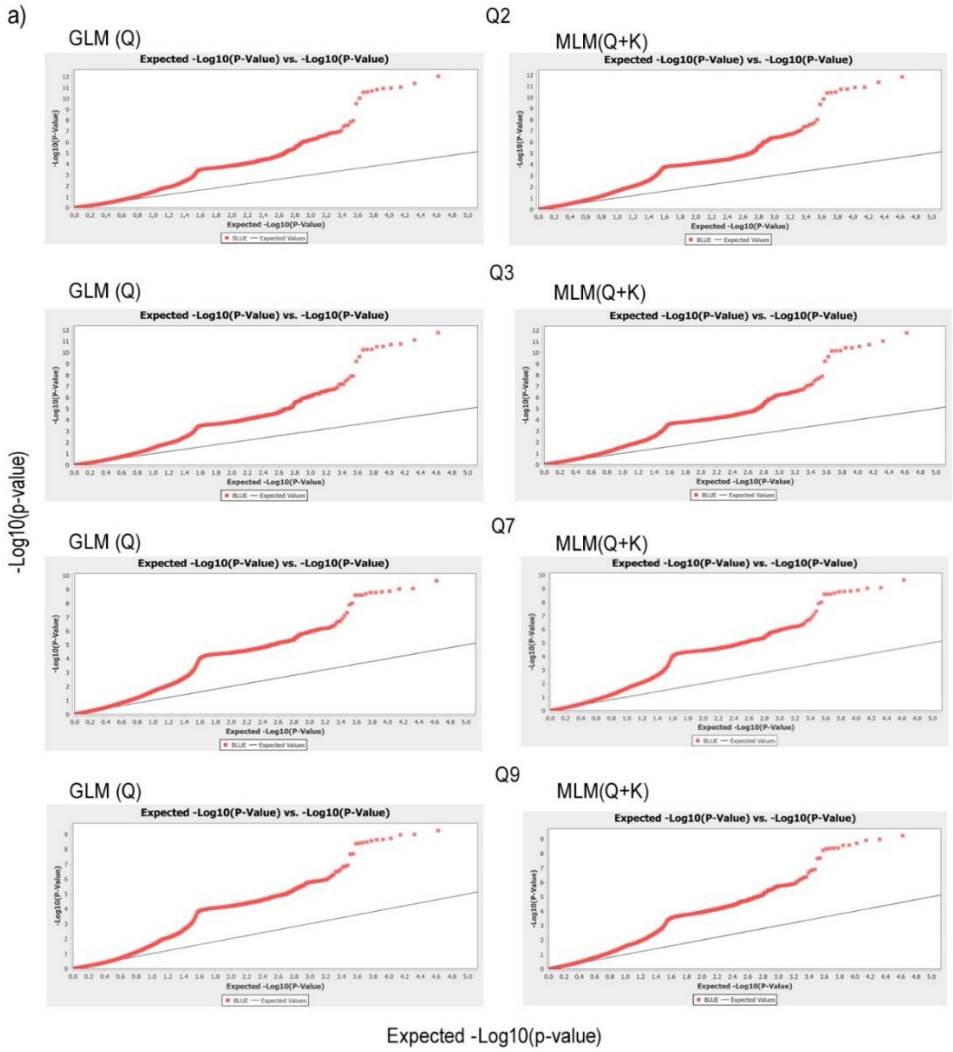
representados los valores K (subpoblaciones) y en el eje de las ordenadas los valores de Delta K, que se explicita sobre cada punto.

6.5 GWAS

6.5.1 Tassel

En cada caso, se analizó el Q-Q *plot* de los valores p observados y se buscó el modelo con el mejor ajuste sobre la línea de distribución ideal. En la Tabla 6 se presentan los Q-Q *plot* de los diferentes modelos analizados, obtenidos a partir de los valores BLUE. En Anexo 9.5.2, se adjuntan los resultados obtenidos con los valores BLUP (no mostrados).

La visualización de los Q-Q *plot*s reveló una distribución empírica de valores p que se desvía marcadamente de la esperada bajo la hipótesis nula (Figura 9). En consecuencia, se procedió a trabajar con GAPIT. Este paquete permite abordar posibles sesgos genéticos no capturados por Tassel, al realizar una corrección más robusta de la estructuración poblacional y la matriz de parentesco.


a)
Q2
GLM (Q)
MLM(Q+K)
Q3
GLM (Q)
MLM(Q+K)
Q7
GLM (Q)
MLM(Q+K)
Q9
GLM (Q)
MLM(Q+K)
Expected -Log10(P-Value) vs. -Log10(P-Value)
-Log10(p-value)
Expected -Log10(p-value)

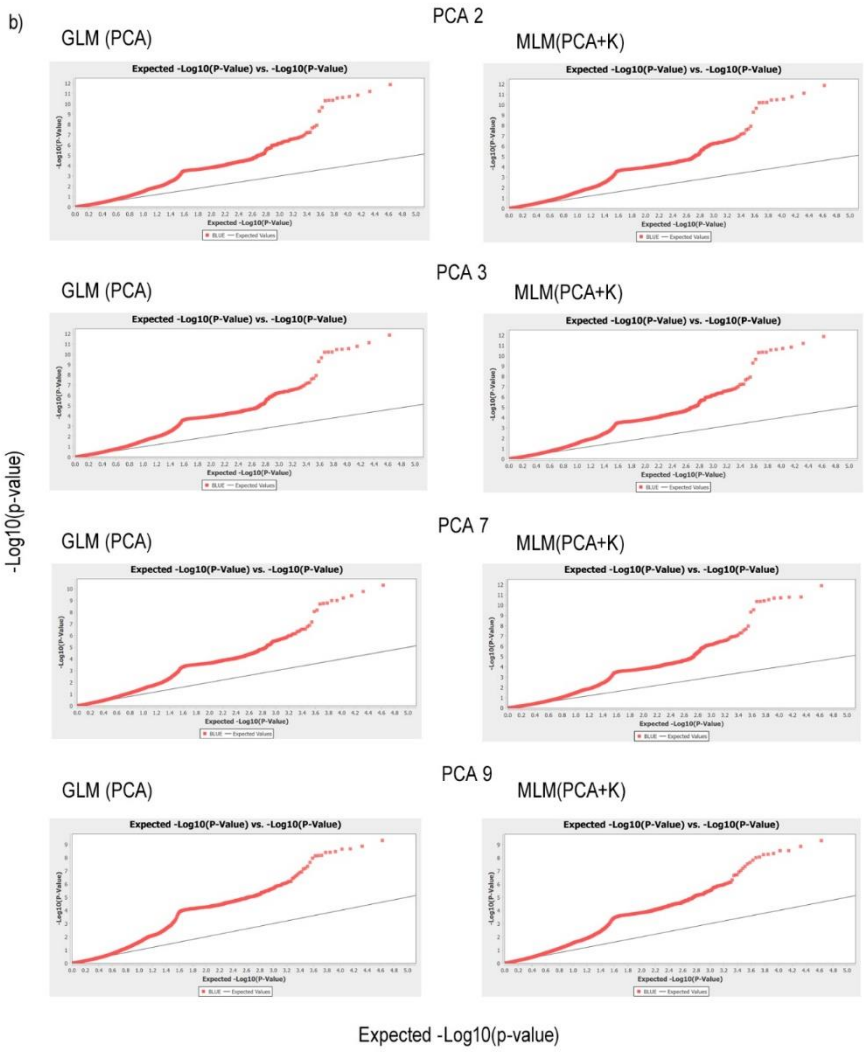
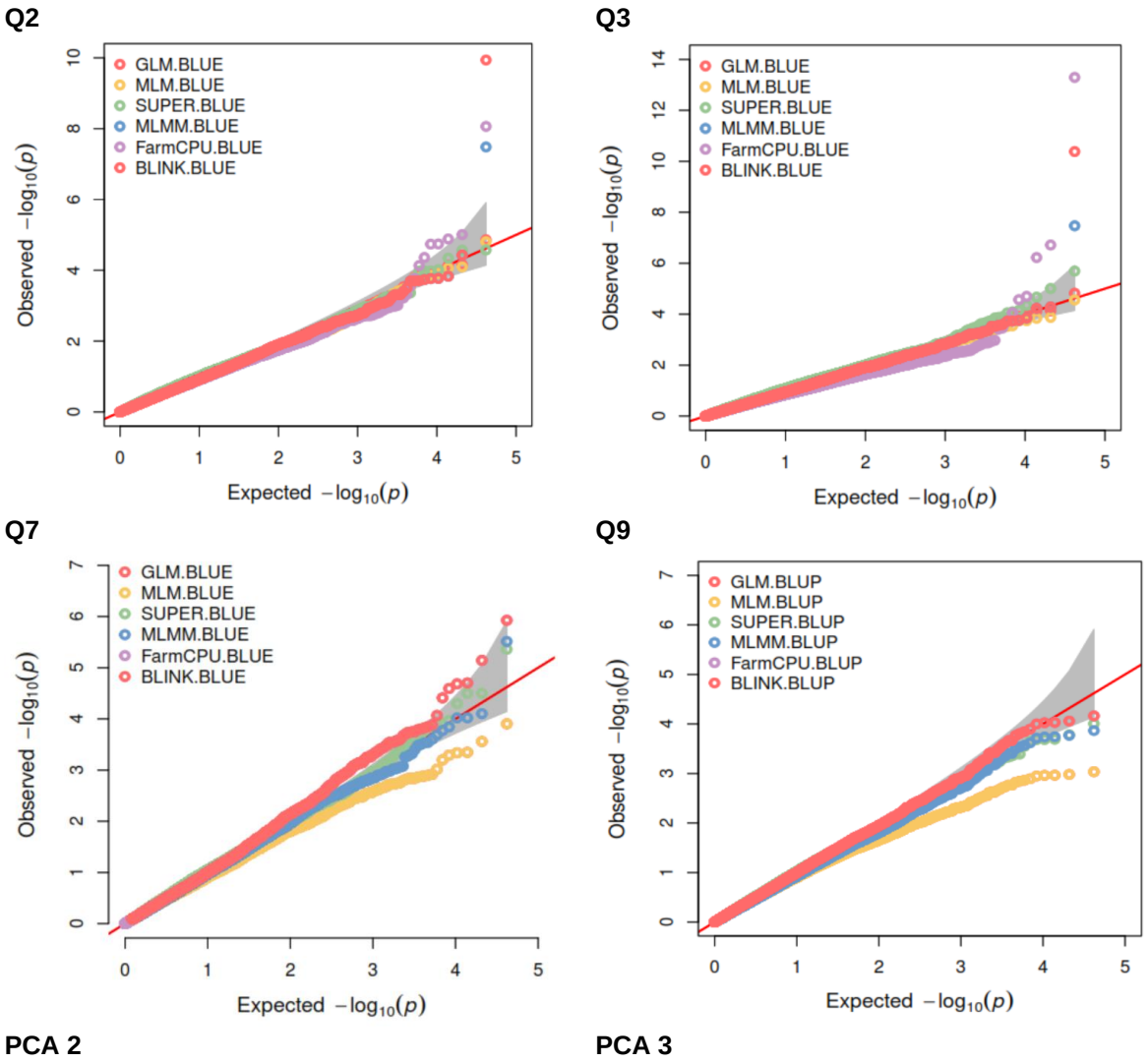


Figura 9. Q-Q plot de los valores p (p-values) obtenidos con Tassel utilizando los valores BLUE de severidad de síntomas de BLS y considerando las covariables (a) Q2, Q3, Q7, Q9 y (b) PCA 2, PCA 3, PCA 7 y PCA 9. Se implementaron cuatro modelos para el análisis: GLM (PCA), GLM (Q), MLM(Q+K), MLM(PCA+K). El eje de las ordenadas muestra el -log10 del valor p observado (-Log10(p-value)) y el eje de las abscisas muestra el -log10 del valor p esperado (Expected -Log10(p-value)). La línea roja indica la distribución observada de los valores p mientras que la línea gris representa la distribución según los valores p esperados.

6.5.2 GAPIT

Para el mapeo de asociación, se utilizaron los valores BLUE (Figura 10) y los valores BLUP (Anexo 9.5.3). Posteriormente, se analizaron los Q-Q *plot* correspondientes para determinar el modelo con la mejor distribución de los valores p observados.

En la Figura 10, se observa que la distribución empírica de los valores de p se desvía ligeramente de la línea de esperanza bajo la hipótesis nula, en la gran mayoría de los modelos y covariables ensayados. Estos resultados sugieren una mínima inflación de falsos positivos y, por ende, que las asociaciones genéticas identificadas son probablemente reales y no el resultado de estructuras poblacionales no controladas. La presencia de valores de p significativos en la cola derecha del QQ *plot*, por encima del umbral gris, indica la presencia de asociaciones genéticas genuinas entre los SNPs y la resistencia a BLS en el panel de genotipos evaluado.



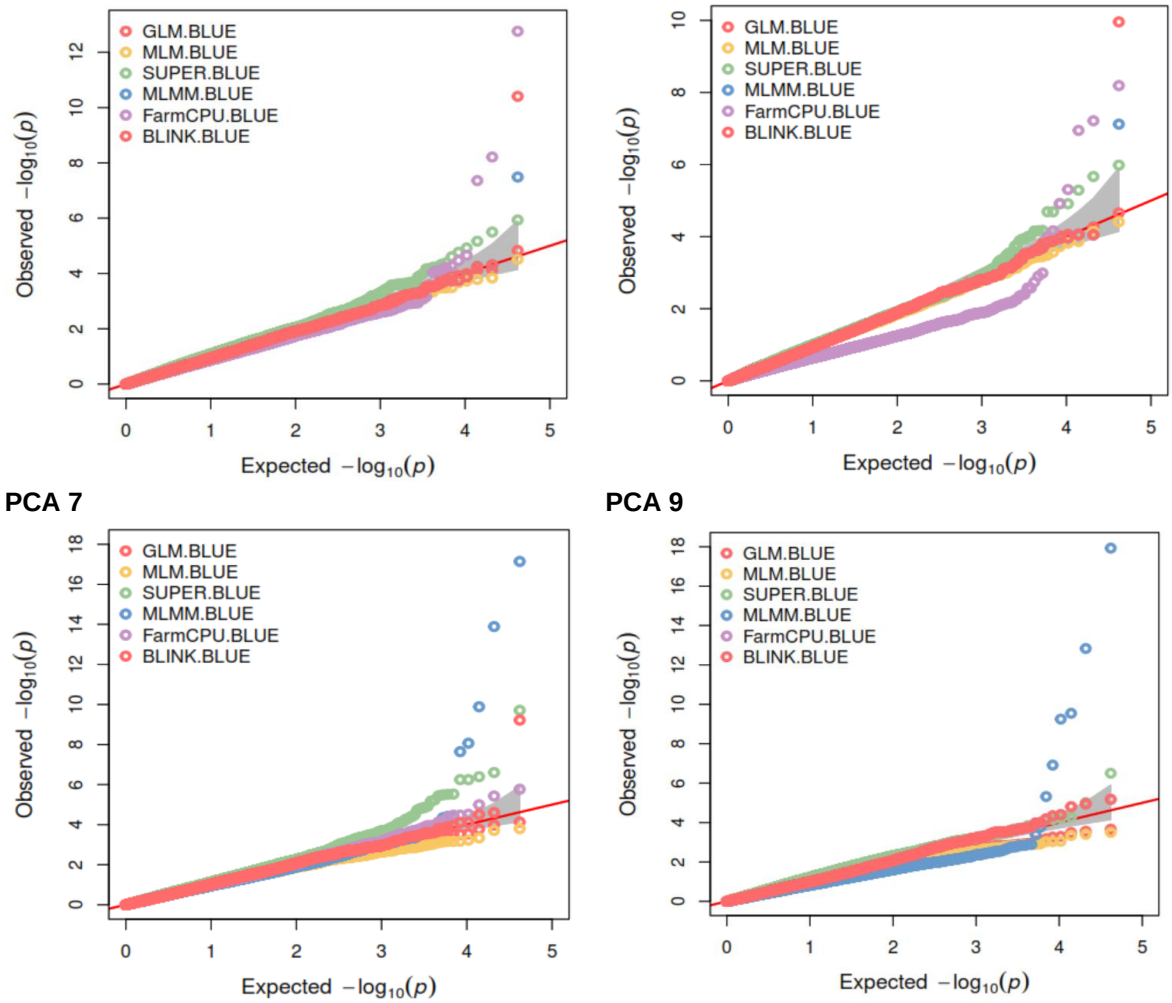


Figura 10. Q-Q *plot* obtenidos con GAPIT partir de los valores BLUE de severidad de síntomas de BLS para las distintas covariables estudiadas (Q2, Q3, Q7, Q9, PCA 2, PCA 3, PCA 7 y PCA 9). Se implementaron seis modelos para el análisis: GLM, MLM, SUPER, MLMM, FarmCPU y BLINK; cada uno representado con un color diferente. El eje de las abscisas muestra el $-\log_{10}$ del valor p esperado (*Expected* $-\log_{10}(p)$) y el eje de las ordenadas muestra el $-\log_{10}$ del valor p observado (*Observed* $-\log_{10}(p)$). La línea roja indica la distribución esperada de los valores p bajo la hipótesis nula, mientras que el umbral gris representa el punto de corte de significancia ajustado

6.6 Desequilibrio de ligamiento

Se estimó el desequilibrio de ligamiento (LD) para los 42236 SNPs utilizados. A partir del modelo ajustado, se observó que el máximo valor de r^2 obtenido fue igual a 0,46. La caída a la mitad del r^2 (r^2=0,23) correspondió a una distancia de 51673 pb (Figura 11a), mientras que para un r^2=0,1, el LD cayó por debajo de 205434 pb (Figura 11b).

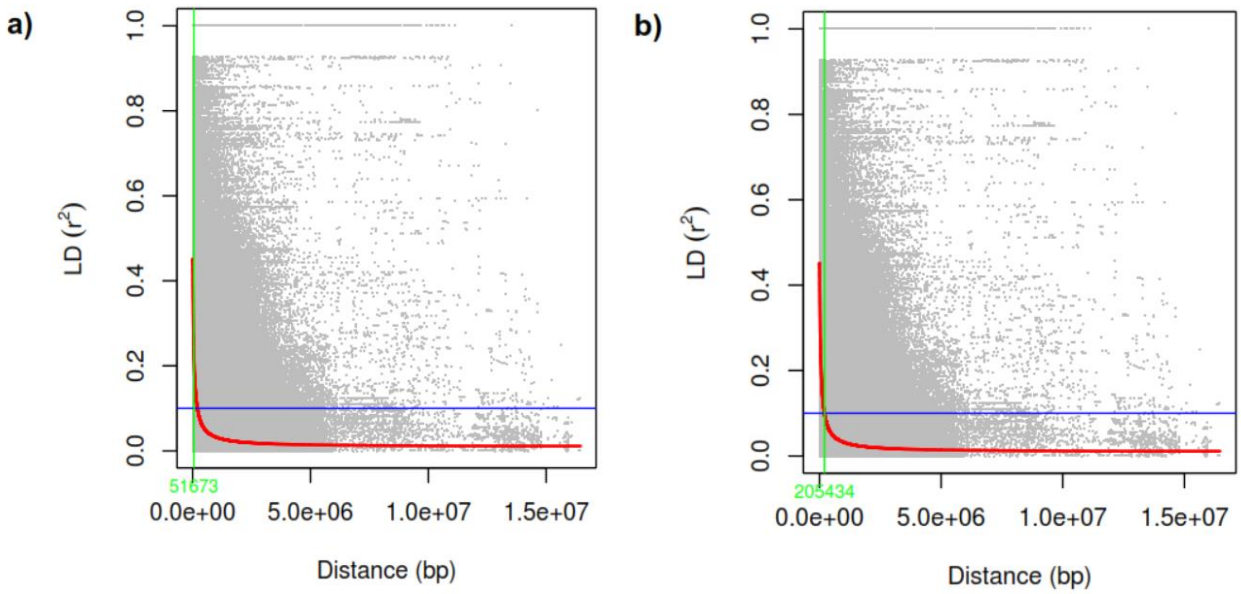


Figura 11. Gráfico de dispersión de los valores r^2 en función de la distancia física expresada en pb (LD) de los 42236 SNPs utilizados. La línea roja representa el modelo de regresión ajustado a los datos, mientras que la línea verde señala la distancia genética donde ocurre el decaimiento del LD. **(a)** Visualización del decaimiento del LD en 51673 pb, para la caída a la mitad del r^2 (r^2=0,23). **(b)** Visualización del decaimiento del LD en 205434 pb para r^2=0,1 (b).

Considerando que el genoma de *Zea mays* cuenta con una longitud de 2400 Mb y que en este estudio se utilizaron 42236 SNPs, se estima una densidad promedio se encontró un marcador cada 56824 pb.

6.7 Marcadores Significativos

El umbral de significancia se calculó mediante la corrección de Bonferroni (Bonferroni,1936), a partir de un valor p de 0,05 (α) y del número final de marcadores considerados (42236 SNPs):

$$\alpha_{\text{Bonferroni}} = \alpha \ / \ \text{n° de marcadores considerados} = 0{,}05 \ / \ 42236 \approx 1{,}18\times10\text{-}6$$

Así, sólo se consideraron significativos aquellos marcadores con valor p menor a $1{,}18\times10^{-6}$.

A continuación, se calculó el valor de corte como:

$$Valor\ de\ corte = -\log10(valor\ p) = -\log10(1{,}18\times10^{-6}) = 5{,}92$$

Así, todos los marcadores significativos se observan por encima de 5,92 en el *Manhattan Plot* (Figura 12).

En lo que respecta a la determinación de los marcadores significativos, se optó por continuar el análisis utilizando los resultados obtenidos con GAPIT-PCA 2 y GAPIT-PCA 3 (Figura 12).

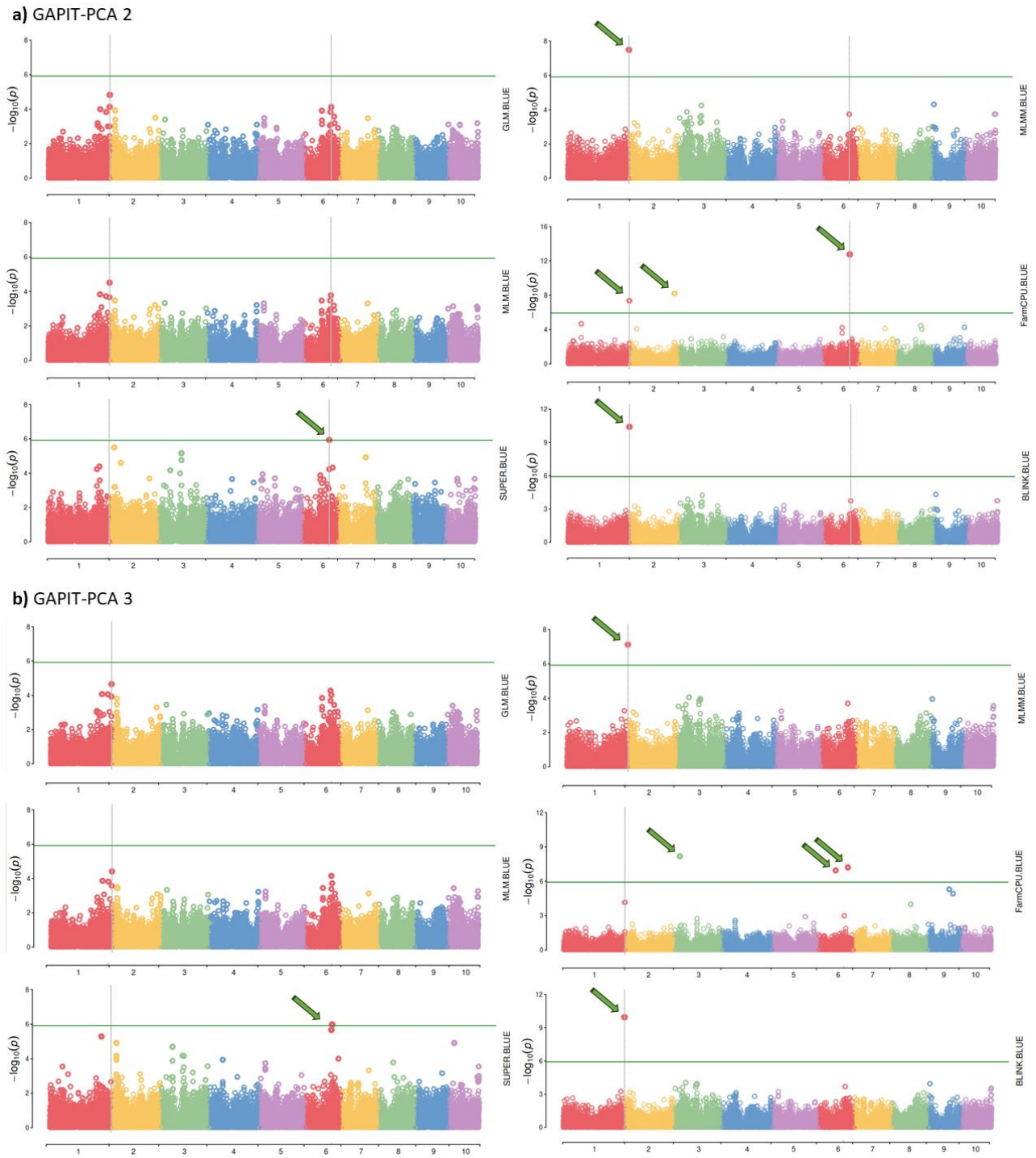


Figura 12. *Manhattan plot* obtenido a partir de GAPIT-PCA 2 **(a)** y GAPIT-PCA 3 **(b)**. En el eje de las ordenadas cada color representa un cromosoma de maíz (1-10). En el eje de las ordenadas, a la izquierda se muestra el valor *p* y a la derecha se menciona el modelo: GLM, MLM, SUPER,

MLMM, FarmCPU y BLINK. Cada punto corresponde a un SNP. La línea verde paralela al eje de las ordenadas representa el valor de corte (5,92). Se señalan con flechas los SNPs significativos.

En los resultados obtenidos tanto con la covariable PCA 2 como con PCA 3, los modelos que permitieron detectar marcadores significativos fueron FarmCPU, SUPER, MLMM y BLINK (Tabla 8).

Tabla 6. Listado de SNPs significativos detectados por el análisis de GAPIT en base a PCA de 2 y 3 componentes principales (CP) para un valor p=1,18×10^{-6}. Adicionalmente se detalla el cromosoma (Cr), la posición, covariable, modelo implementado en GAPIT, valor de significancia (valor p), de cada SNP. Por último, en la pestaña Gen se enuncia el nombre de acceso en MaizeGDB y el modelo génico al que se asocia cada SNP.

SNP	Cr	Bin*	Posición	CP	Modelo	Valor p	Gen	
							Acceso MaizeGDB	Modelo Génico
PZE-101253379	1	1.11	304562635	2 3	FarmCPU	4,38E-08	rs131922130	GRMZM2G056393 (pco134899)
					MLMM	7,58E-08		
					BLINK	1,10E-10		
SYN32414	2	2.08	22134461	2	FarmCPU	6,13E-09	N/A	N/A
PZE-103033843	3	3.04	26404797	2 3	FarmCPU	6,46E-09	rs131394100	GRMZM2G410916 (bnlg1452)
PZE-106034115	6	N/A	89523939	3	FarmCPU	1,13E-07	rs130323264	N/A
SYN26946	6	6.05	134125563	2 3	SUPER	1,04E-06	rs130389485	GRMZM2G021846 (cl46_1)
PZE-106081909	6	N/A	150036992	3	FarmCPU	6,11E-08	rs130406935	N/A

N/A: sin datos

**Bin: en maíz hace referencia a regiones cromosómicas predefinidas utilizadas para el mapeo. Estos segmentos ayudan a agrupar marcadores genéticos y a facilitar el análisis de asociaciones.*

En el bin 1.11, se encuentra el marcador PZE-101253379, asociado al gen *Zm00001eb064310* (*pco134899*) (*GRMZM2G056393* (MaizeGDB)/*LOC100381906* (NCBI)), el cual codifica para un factor de elongación denominado *Factor de elongación G-1*. Este gen representa un factor primordial en la biogénesis de la mitocondria, en particular en la regulación de la transcripción y traducción del ADN mitocondrial (*Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes* [KEGG], 2024). Las mitocondrias cumplen roles fundamentales en

los procesos de interacción de plantas y patógenos, siendo usualmente blancos precisos para la supresión de las defensas.

Por su parte, en el bin 3.04, PZE-103033843 se encuentra asociado a *Zm00001eb.1* (*bnlg1452*) (*GRMZM2G410916* (MaizeGDB) / *LOC103649874* (NCBI)), que codifica para la proteína alfa-1,3-arabinosiltransferasa (XAT3). Esta misma se encuentra relacionada a la actividad glucosiltransferasa (NCIB, 2024). Este bin ya ha sido descripto en numerosas publicaciones internacionales y en trabajos del grupo de acogida de esta tesis como *hotspot* de genes de resistencia (Kolkman *et al.*, 2023; Kistner *et al.*, 2022; Qiu *et al., 2020)*.

Por último, en el bin 6.05, se encuentra el marcador SYN26946 que se asocia al gen *Zm00001eb.1* (*cl46_1*) (*GRMZM2G021846* (MaizeGDB) / *LOC541911* (NCBI)), el cual codifica para la proteína fructosa-6-fosfato-2-quinasa / fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2 / FBPasa-2). Se trata de una enzima involucrada en la glucólisis y la gluconeogénesis, actuando como regulador esencial de ambas vías (Rider *et al.*, 2004).

7 DISCUSIÓN

La producción del cultivo de maíz depende de múltiples factores como las condiciones ambientales, la genética y el manejo agronómico, entre otros. En ciertas ocasiones, estos factores interactúan de forma tal que propician el desarrollo de enfermedades; una de ellas es la bacteriosis foliar causada por *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*. Esta enfermedad genera lesiones cloróticas y necróticas en las hojas, que causan disminución de la capacidad fotosintética de la planta e impactan en el rendimiento de granos a futuro. Adicionalmente se ha reportado que *Xanthomonas* spp. tiene la capacidad de colonizar la semilla, manteniéndose viable hasta 18 meses (Dey & Raghuwanshi, 2024), lo que la convierte en una plaga cuarentenaria de cuidado. Esto genera la necesidad de implementar medidas preventivas.

Actualmente, no existen medidas de control adecuadas contra esta clase de patógenos. Se plantea entonces la necesidad de desarrollar nuevos genotipos de maíz resistentes a BLS. En este sentido, el grupo de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino evaluó previamente a campo un panel de líneas endocriadas en busca de fuentes de resistencia frente a la infección con Xvv. En el presente trabajo de tesis, se continuó con dicha línea de investigación caracterizando fenotípicamente el mismo *set* de líneas en invernáculo, investigando también regiones génicas asociadas a la resistencia frente a Xvv.

En primer lugar, se procedió con el fenotipado de plántulas en invernáculo y, posteriormente, al ajuste de un modelo estadístico. Así, se caracterizó con éxito la respuesta de 71 genotipos frente a BLS; determinando su comportamiento (“Susceptibles”, “Moderadamente Susceptibles”, “Moderadamente Resistentes” y “Resistentes”).

A lo largo de su maduración, las plantas van desarrollando diferentes tipos de resistencias. En sus primeros estadíos, presentan una resistencia cualitativa. Esta se trata de una resistencia de fenotipo completo (resistente o susceptible). En términos genéticos, se encuentra controlada por unos pocos genes de efecto mayor (genes *R*). En estos casos, la interacción planta-patógeno resulta de la interacción gen a gen, donde para un gen de patogenicidad (*avr*) existe un gen de resistencia en el huésped (*R*). En consecuencia, este tipo de resistencia es raza-específica y puede ser evaluada en estadío de plántula, pues estos genes están activos durante todo el ciclo vegetativo. Esta resistencia es muy

frecuente en la interacción de plantas con patógenos biótrofos y circunstancialmente también en hemibiótrofos. A medida que avanza el ciclo de crecimiento, la planta comienza a desarrollar una resistencia de tipo cuantitativa. Tal como su nombre lo indica, en este caso se ven involucrados numerosos genes de efecto menor, influenciados por epistasis y la interacción con el ambiente. Por consiguiente, podemos observar una gradualidad en el fenotipo, con pequeñas variaciones dentro de un mismo síntoma. Es por ello que se suele realizar su estudio a campo, en diferentes años y localidades; sobre todo en patógenos hemibiótrofos y necrótrofos. Es importante recalcar que no todos los genes involucrados se expresan durante todo el ciclo de vida de la planta, por lo que la evaluación se lleva a cabo en estadíos más avanzados (Kistner, 2021).

En nuestro caso, Xvv representa un caso particular. En general, *Xanthomonas* spp. presenta un ciclo de vida dividido en dos etapas. La primera de ellas se desarrolla en tejido vivo, actuando como patógeno biótrofo. En esta etapa, coloniza la superficie foliar, infecta a su huésped y se establece en el xilema o en el mesófilo (Dey & Raghuwanshi, 2024). Por último, algunas especies de este género migran y se establecen en las semillas de las plantas. La segunda etapa de vida se da una a medida que ocurre la muerte de la planta, convirtiéndose en necrotrófico. Las bacterias pasan a un estado de latencia, sobreviviendo sobre el rastrojo, suelo y la rizosfera (An *et al.*, 2020). En consecuencia, Xvv induce una combinación de ambos mecanismos de resistencia en el maíz. Así, para esta tesis, se decidió estudiar la enfermedad en estadio de plántula e indagar en los aspectos genéticos relacionados a la resistencia a BLS.

Frente a este escenario, se observó que el panel evaluado generaba un umbral de severidad, siendo los genotipos L5665, LP116, LP1411, LP1512, LP1513, LP199, LP223, LP29, LP521, LP612, LP869, P465 los más resistentes. Por otro lado, se identificaron seis SNPs significativos en los cromosomas 1, 2, 3 y 6. Asimismo, tres de estos SNPs son informativos, pues colocalizan con los modelos génicos asociados. Cabe destacar que los estudios que reportan genes de resistencia en maíz frente a la infección de *Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum*, son notablemente limitados.

En el bin 1.11, encontramos a *Zm00001eb064310 (pco134899),* un factor de elongación relacionado a la biogénesis mitocondrial. Es importante destacar que este factor cuenta con un dominio de unión de tipo "*Avirulence AvrPtoB*". Usualmente este dominio

suele estar asociado al efector AvrPtoB de *Pseudomonas syringae* que interactúa con la quinasa de membrana BAK1 desencadenando respuestas inmunes en *Arabidopsis thaliana* y *Solanum lycopersicum* (Liu *et al.,* 2016; Cheng *et al.,* 2011). Hasta la fecha de publicación de esta tesis, aún no se ha relacionado con la resistencia frente a Xvv. No obstante, es a destacar que no deja de ser un hallazgo relevante, dado el nivel de importancia que tiene la mitocondria en respuestas de defensa en plantas (Wang *et al.*, 2022).

En el bin 3.04, se detectó al gen *Zm00001eb.1* el cual codifica la proteína alfa-1,3-arabinosiltransferasa (XAT3*).* Esta se trata de una glicosiltransferasa de la familia 61 (GT61) encargada de la formación de xilano de la pared vegetal (Zhang *et al.*, 2021*)*. XAT3 fue específicamente mencionado, sin mayor detalle, en el trabajo de búsqueda de genes de resistencia a tizón del norte (*Helminthosporium turcicum*) en maíz realizado por Kolkman *et al.* (2023). Otros autores también mencionan a genes responsables de la síntesis de xilanos de membrana en interacciones de maíz con *Cercospora* spp y *Bipolaris maydis* (Pan *et al.*, 2024; Chen *et al.*, 2023). Los xilanos son componentes importantes de pared celular (primaria y secundaria), que constituyen hasta un 30% en la composición de su estructura. Su contenido y grado de acetilación son importantes ya que modelan la manera en la que las plantas interactúan con sus patógenos y en el tipo de respuesta (Li *et al.*, 2019).

Por último, en el bin 6.05 encontramos a *Zm00001eb.1 (cl46_1).* Este codifica para una enzima bifuncional: fructosa-6-fosfato-2-quinasa/fructosa-2,6-bisfosfatasa (PFK-2/ FBPasa-2). En el extremo N-terminal contamos con el dominio PFK-2, una kinasa que cataliza la fosforilación de la fructosa-6-fosfato, al transferir un grupo fosfato desde un ATP al carbono 2. De esta forma, obtenemos fructosa-2,6-bisfosfato (F-2,6-P_2). A su vez, en el extremo C-terminal se halla el dominio FBPasa-2, una fosfatasa que cataliza la hidrólisis de este grupo fosfato en pirofosfato (Ppi), regenerando fructosa-6-fosfato. Esta actividad bifuncional constituye a uno de los puntos de regulación clave en la glucólisis y la gluconeogénesis (Rider *et al.*, 2004).

En estudios previos, Mutuku & Nose (2010) demostraron la activación de las vías glucolíticas en arroz (*Oryza sativa L.*), para la síntesis de metabolitos secundarios relacionados a la resistencia frente al hongo *Rhizoctonia solani* (*R. solani*). Posteriormente, estos autores lograron confirmar el aumento en la actividad de las enzimas PFP/PFK en líneas resistentes de arroz frente al patógeno mencionado. Además, detectaron un aumento

en la concentración de F-2,6-P_2 y una disminución de PPi. En cuanto a los resultados genómicos, detectaron un aumento en la expresión del ARNm de las isoformas citosólicas de PFP/PFK, dentro de la cual se encuentra PFK-2. Por último, los investigadores reportan una expresión elevada de PFK-2 en el coleóptilo y de PFP-4 en la hoja bandera, frente a la infección de *Xanthomonas oryzae* pv*. oryzae* (Mutuku & Nose, 2012).

Finalmente, el análisis del LD confirmó la elevada precisión en la identificación de los genes. Se observó una rápida caída del desequilibrio a los 205434pb (r^2=0,1), valor que indica una alta resolución en la detección de regiones genómicas de interés. Estos resultados son similares a los calculados por Montenegro (2022) para el mismo *set* de líneas, en un contexto de enfermedades de espiga. Previamente, Flint-Garcia *et al*. (2003) señaló que factores como la estructuración poblacional y la mezcla (*admixture*) influyen en el LD. En este análisis se confirma tal postulado, pues se obtuvo un valor de desequilibrio relativamente bajo para una población de líneas endocriadas (líneas estabilizadas) con una estructuración definida de 2 subpoblaciones.

Los genes candidatos identificados en esta tesis proporcionan información valiosa sobre las regiones asociadas con la resistencia a Xvv. A partir de estos hallazgos, se pueden explorar estudios funcionales de silenciamiento y sobreexpresión mediante edición génica, utilizando herramientas como CRISPR-Cas9 o ARN de interferencia (RNAi). Además, sería posible realizar un mapeo fino de mayor resolución, aumentando la densidad de SNPs en las regiones flanqueantes a los loci estudiados. Finalmente, estudios transcriptómicos permitirían analizar los niveles de expresión en distintas condiciones ambientales y aportar información sobre sus posibles mecanismos regulatorios.

La identificación de genes R mejora el entendimiento de los procesos moleculares involucrados en la interacción planta-patógeno. Este estudio sienta las bases para futuras investigaciones dirigidas al desarrollo de resistencia a Xvv. Los resultados obtenidos sirven como referencia para los primeros pasos en un programa de mejoramiento de maíz enfocado en la resistencia a BLS, mediante estrategias moleculares como la Selección Asistida por Marcadores (MAS, del inglés *Marker-Assisted Selection*).

8 REFERENCIAS

Ali, F., & 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. https://doi.org/10.1111/j.1744-7909.2012.01114.x

An, S.-Q., Potnis, N., Dow, M., Vorhölter, F.-J., He, Y.-Q., Becker, A., Teper, D., Li, Y., Wang, N., Bleris, L., & Tang, J.-L. (2020). *Mechanistic insights into host adaptation, virulence, and epidemiology of the phytopathogen Xanthomonas. FEMS Microbiology Reviews,* 44(1), 1–32. https://doi.org/10.1093/femsre/fuz024

BioRender.com. (2024). Diagrama ilustrativo de distribución de macetas por tanda para dos genotipos [Ilustración]. Recuperado de https://biorender.com

Bolsa de Comercio de Rosario. (2024). Balance regional de maíz 2023/24 en Argentina. AÑO XLI, Edición N°2136 - Especial Campaña Maíz 2023/24. https://www.bcr.com.ar/es/print/pdf/node/103476

Bonferroni, C. E. (1936*). Teoria statistica delle classi e calcolo delle probabilità. Pubblicazioni del R Istituto Superiore di Scienze Economiche e Commerciali di Firenze,* 8, 3-62.

Bradbury, P. J., Zhang, Z., Kroon, D. E., Casstevens, T. M., Ramdoss, Y., & Buckler, E. S. (2007). TASSEL: *Software for association mapping of complex traits in diverse samples. Bioinformatics* 23:2633-2635.

Braga, K., Fantin, L. H., Roy, J. M. T., Canteri, M. G., & de Paiva Custódio, A. A. (2020). *Development and validation of a diagrammatic scale for the assessment of the severity of bacterial leaf streak of corn. European Journal of Plant Pathology,* 157(2), 367–375. https://doi.org/10.1007/s10658-020-02008-7

Broders, K. (2017). *Status of bacterial leaf streak of corn in the United States. In: Proceedings of the Integrated Crop Management Conference*. https://doi.org/10.31274/icm-180809-247

Chen, G., Xiao, Y., Dai, S., Dai, Z., Wang, X., Li, B., Jaqueth, J. S., Li, W., Lai, Z., Ding, J., & Yan, J. (2023). *Genetic basis of resistance to southern corn leaf blight in the maize multi-parent population and diversity panel. Plant Biotechnology Journal, 21*(3), 506-520. https://doi.org/10.1111/pbi.13967

Cheng, W., Munkvold, K. R., Gao, H., Mathieu, J., Schwizer, S., Wang, S., Yan, Y.-b., Wang, J., Martin, G. B., & Chai, J. (2011). *Structural Analysis of Pseudomonas syringae AvrPtoB Bound to Host BAK1 Reveals Two Similar Kinase-Interacting Domains in a Type III Effector. Cell Host & Microbe*, 10(6), 616–626. https://doi.org/10.1016/j.chom.2011.10.013

Coutingo, T.A. & Wallis, F.M. (1991). *Bacterial Streak Disease of Maize (Zea mays L.) in South Africa. Journal of Phytopathology*, 133: 112-112. https://doi.org/10.1111/j.1439-0434.1991.tb00144.x

Del Dago, D. A. A., & Iglesias, J. (2022, septiembre). *Eficiencia del método de evaluación de la bacteriosis causada por Xanthomonas vasicola pv. vasculorum en líneas endocriadas de maíz* [Póster y resumen]. II Congreso Multidisciplinario: Ciencia y tecnología para el desarrollo sostenible, Pergamino, Buenos Aires, Argentina. Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria (INTA). http://hdl.handle.net/20.500.12123/16738

Dey, R., & Raghuwanshi, R. (2024). *An insight into pathogenicity and virulence gene content of Xanthomonas* spp. *and its biocontrol strategies. Heliyon*, 10(14), e34275. https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2024.e34275

Di Rienzo, J. A., Casanoves, F., Balzarini, M. G., González, L., Tablada, M., Robledo, C. W. (2020). "InfoStat: *Software* Estadístico" versión 2020. Centro de Transferencia InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba. Accedido el 31/01/2022 desde http://www.infostat.com.ar .

Earl, D. A., & von Holdt, B. M. (2012). *STRUCTURE HARVESTER: A website and program for visualizing STRUCTURE output and implementing the Evanno method. Conservation Genetics* Resources, 4(2), 359-361. https://doi.org/10.1007/s12686-011-9548-7

Esker, P. (2008). *Estimating common rust on corn. Wisconsin Crop Manager, 15*(23), 1–2.

Español L., Rodríguez A., Kistner M.B., Iglesias J. (2019). Búsqueda de fuentes de resistencia frente a bacteriosis en maíz. VI Jornadas de Jóvenes Investigadores UNNOBA. Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

Evanno, G., Regnaut, S., & Goudet, J. (2005). *Detecting the number of clusters of individuals using the software STRUCTURE: A simulation study. Molecular Ecology, 14*(8), 2611–2620. https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02553.x

Eyhérabide, G. H. (2012). Mejoramiento genético en maíz. En *Bases para el manejo del cultivo de maíz* (p. 127). Ediciones INTA. ISBN 978-987-679-141-0

Flint-Garcia, S. A., Thornsberry, J. M., & Buckler, E. S. (2003). *Structure of linkage disequilibrium in plants. Annual Review of Plant Biology*, 54, 357-374. https://doi.org/10.1146/annurev.arplant.54.031902.134907

Ganal, M. W., Durstewitz, G., Polley, A., Bérard, A., Buckler, E. S., Charcosset, A., Clarke, J. D., Graner, E. M., Hansen, M., Joets, J., Le Paslier, M. C., McMullen, M. D., Montalent, P., … Falque, M. (2011). *A large maize (Zea mays L.) SNP genotyping array: Development and germplasm genotyping, and genetic mapping to compare with the B73 reference genome. PLOS ONE*, 6(12), e28334. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0028334

Giménez Pecci, M., Maurino, M., Druetta, M., Torrico, A., Oleszczuc, D., Guerra, F., Laguna, I. G. (2018). Enfermedades Del Maíz De Siembra Tardía Causadas Por Virus, Mollicutes Y Bacterias. In L. Borras ; S. Uhart (Eds.), El Mismo Maíz, Un Nuevo Desafío: Compendio Primer Congreso De Maíz Tardío. San Isidro - Argentina: *Dow Agrosciences* Argentina

Huang, M., Liu, X., Zhou, Y., Summers, R. M., & Zhang, Z. (2019). *BLINK: A package for the next level of genome-wide association studies with both individuals and markers in the millions. GigaScience, 8*(2), giy154. https://doi.org/10.1093/gigascience/giy154

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.

Illumina, Inc. (2016). *Infinium iSelect Custom Genotyping Assays* [Nota técnica]. Recuperado de https://www.illumina.com/content/dam/illumina-marketing/documents/products/technotes/technote_iselect_design.pdf

IPAD (International Production Assessment Division, USDA Foreign Agricultural Service). (2024). Argentina Production. USDA. Recuperado el 1 de Junio de 2024, de https://ipad.fas.usda.gov/countrysummary/default.aspx?id=AR

Kassambara, A., & Mundt, F. (2020). *factoextra: Extract and visualize the results of multivariate data analyses* (R package version 1.0.7) [Computer software]. CRAN. https://CRAN.R-project.org/package=factoextra

Kistner, M. B. (2021). Explorando la complejidad de la resistencia genética a enfermedades en maíz. Trabajo Final para obtener el grado de Especialista de la Universidad de Buenos Aires en Mejoramiento Genético Vegetal otorgado por la Universidad de Buenos Aires. Facultad de Agronomía. Escuela para Graduados. Fauba Digital http://ri.agro.uba.ar/greenstone3/library/collection/tesis/document/2021kistnermariabelen

Kistner, M. B., Nazar, L., Montenegro, L. D., Cervigni, G. D., Galdeano, E., Iglesias, J. (2022). *Detecting sources of resistance to multiple diseases in Argentine maize (Zea mays L.) germplasm. Euphytica,* 218(5). https://doi.org/10.1007/s10681-022-03000-4

Kolkman, J. M., Moreta, D. E., Repka, A., Bradbury, P., & Nelson, R. J. (2023). *Brown midrib mutant and genome-wide association analysis uncover lignin genes for disease resistance in maize. The Plant Genome, 16*(1), e20278. https://doi.org/10.1002/tpg2.20278

Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. (s.f.). Zea mays 100381906 (zma:100381906). Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes. https://www.kegg.jp/entry/zma:100381906. Consultado el 10 de diciembre del 2024.

Munkvold, G. P., & White, D. G. (2018). *Part I: Infectious diseases*. En *Compendium of corn diseases* (4ª ed., pp. 7-130). APS Press. https://doi.org/10.1094/9780890544945.002

Lang, J. M., Du Charme, E., Ibarra Caballero, J., Luna, E., Hartman, T., Ortiz-Castro, M., Korus, K., Rascoe, J., Jackson-Ziems, T. A., Broders, K., & Leach, J. E. (2017). *Detection and characterization of Xanthomonas vasicola* pv. *vasculorum, the causal agent of bacterial*

leaf streak of maize. Plant Disease, 101(4), 661-668. https://doi.org/10.1094/PDIS-10-16-1449-RE

Li, N., Lin, B., Wang, H., Li, X., Yang, F., Ding, X., Yan, J., & Chu, Z. (2019). *Natural variation in ZmFBL41 confers banded leaf and sheath blight resistance in maize. Nature Genetics,* 51(10), 1540–1548. https://doi.org/10.1038/s41588-019-0503-y

Lischer, H. E. L., & Excoffier, L. (2012). *PGDSpider: An automated data conversion tool for connecting population genetics and genomics programs. Bioinformatics, 28*(2), 298–299. https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btr642

Liu, X., Huang, M., Fan, B., Buckler, E. S., & Zhang, Z. (2016*). Iterative usage of fixed and random effect models for powerful and efficient genome-wide association studies. PLOS Genetics, 12*(2), e1005767. https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1005767

Mesterházy, Á., Lemmens, M., & Reid, L. M. (2012). *Breeding for resistance to ear rots caused by Fusarium spp. in maize – A review. Plant Breeding, 131*(1), 1–19. https://doi.org/10.1111/j.1439-0523.2011.01936.x

Montenegro, L. D. (2022). Estudio de asociación de genoma completo para detectar resistencia a podredumbres de espiga en líneas endocriadas de maíz (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. http://repositorio.unnoba.edu.ar/xmlui/handle/23601/564

Munkvold, G. P., & White, D. G. (2016). *Compendium of Corn Diseases* (4ª ed.). The American Phytopathological Society. https://doi.org/10.1094/9780890544945

Mutuku, M., & Nose, A. (2010). *Rhizoctonia solani infection in two rice lines increases mRNA expression of metabolic enzymes genes in glycolytic, oxidative pentose phosphate pathways and secondary metabolism. Tropical Agriculture and Development, 54*, 119–131.

Mutuku, J. M. & Nose, A. (2012). *High activities and mRNA expression of pyrophosphate-fructose-6-phosphate-phosphotransferase and 6-phosphofructokinase are induced as a response to Rhizoctonia solani infection in rice leaf sheaths. Physiological and Molecular Plant Pathology,* 77(1), 41–51. https://doi.org/10.1016/j.pmpp.2011.11.003

National Center for Biotechnology Information (NCBI). (s.f.). Gene ID: 103649874. Recuperado el 20 de febrero de 2025 de https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/103649874

Nazar, L. (2020). Heredabilidad para la resistencia a múltiples enfermedades en líneas de maíz *(Zea mays)* (Tesis de licenciatura). Escuela de Ciencias Agrarias, Naturales y Ambientales, Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. https://repositorio.unnoba.edu.ar/xmlui/handle/23601/420

Organización de las Naciones Unidas para la Agricultura y la Alimentación. (2024). *Supply situation comfortable as 2023/24 marketing season draws to close; 2024 wheat outlook remains favourable, but adverse weather dents maize yields prospects in southern hemisphere*. En *FAO Cereal Supply and Demand Brief*. Recuperado el 1 de junio de 2024, de https://www.fao.org/worldfoodsituation/csdb/en

Ortiz-Castro, M., Hartman, T., Coutinho, T., Lang, J. M., Korus, K., Leach, J. E., Jackson-Ziems, T., & Broders, K. (2020). *Current understanding of the history, global spread, ecology, evolution, and management of the corn bacterial leaf streak pathogen, Xanthomonas vasicola pv. vasculorum. Phytopathology, 110*(6), 1124–1131. https://doi.org/10.1094/PHYTO-01-20-0018-PER

Pan, Y., Jiang, F., Shaw, R. K., Sun, J., Li, L., Yin, X., Bi, Y., Kong, J., Zong, H., Gong, X., Ijaz, B., & Fan, X. (2024). *QTL mapping and genome-wide association analysis reveal genetic loci and candidate gene for resistance to gray leaf spot in tropical and subtropical maize germplasm. Theoretical and Applied Genetics, 137*(12), 266. https://doi.org/10.1007/s00122-024-04764-0

Peñas Ballesteros, A. (2018). Asociación entre el rendimiento de bioetanol de híbridos de maíz y sus líneas parentales (Tesis de licenciatura). Universidad Nacional del Noroeste de la Provincia de Buenos Aires. https://repositorio.unnoba.edu.ar/xmlui/handle/23601/348

Plazas, M. C., Rossi, R. L. de, Brücher, E., Guerra, F. A., Vilaró, M., Guerra, G. D., Wu, G., Ortiz-Castro, M. C., & Broders, K. (2018). *First report of Xanthomonas vasicola pv. vasculorum causing bacterial leaf streak of maize (Zea mays) in Argentina. Plant Disease, 102*(5), 1026. https://doi.org/10.1094/PDIS-09-17-1449-PDN

Pritchard, J. K., Stephens, M., & Donnelly, P. (2000). *Inference of population structure using multilocus genotype data. Genetics, 155*(2), 945–959.

Qiu, Y., Kaiser, C., Schmidt, C., Broders, K., Robertson, A. E., & Jamann, T. M. (2020). *Identification of quantitative trait loci associated with maize resistance to bacterial leaf streak. Crop Science, 60*(1), 226–237. https://doi.org/10.1002/csc2.20099

R Core Team. (2024). *R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing*. https://www.R-project.org

Rasband, W., & *National Institute of Health, USA. (2024). ImageJ (Version 1.53t). National Institutes of Health.* https://imagej.net/

Remington, D. L., Thornsberry, J. M., Matsuoka, Y., Wilson, L. M., Whitt, S. R., Doebley, J., Kresovich, S., Goodman, M. M., & Buckler, E. S. IV. (2001). *Structure of linkage disequilibrium and phenotypic associations in the maize genome. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America,* 98(20), 11479–11484. https://doi.org/10.1073/pnas.201394398

Rider, M. H., Bertrand, L., Vertommen, D., Michels, P. A., Rousseau, G. G., & Hue, L. (2004). *6-phosphofructo-2-kinase/fructose-2,6-bisphosphatase: head-to-head with a bifunctional enzyme that controls glycolysis. The Biochemical journal,* 381(Pt 3), 561–579. https://doi.org/10.1042/BJ20040752

Rossi, E. A., Ruiz, M., Ratto, M., Visentin, D., Di Renzo, M., y Bonamico, N. 2018. Variabilidad fenotípica y genotípica en líneas de maíz. In XI Congreso Nacional de Maíz. 21-24 de agosto, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

RStudio Team. (2024). *RStudio: Integrated development environment for R* (Version 2024.04.2+764 "Chocolate Cosmos") [Software]. Posit Software, PBC. https://posit.co/products/open-source/rstudio/

Segura, V., *et al.* (2012). *An efficient multi-locus mixed-model approach for genome-wide association studies in structured populations. Nature Genetics, 44*(8), 825–830. https://doi.org/10.1038/ng.2354

Slowikowski, K. (2023). *ggrepel: Automatically position non-overlapping text labels with 'ggplot2'* (R package version X.X.X) [Computer software]. CRAN. https://cran.r-project.org/package=ggrepel

Stich, B., Utz, H. F., Piepho, H. P., Maurer, H. P., & Melchinger, A. E. (2010). *Optimum allocation of resources for QTL detection using a nested association mapping strategy in maize. TAG. Theoretical and applied genetics. Theoretische und angewandte Genetik, 120*(3), 553–561. https://doi.org/10.1007/s00122-009-1175-2

Vilaró, M. L. (2014). *Sobre microbios y humanos*. Editorial Brujas. ISBN 978-987-591508-4.

Wang, J., & Zhang, Z. (2021). *GAPIT Version 3: Boosting power and accuracy for genomic association and prediction. Genomics, Proteomics & Bioinformatics, 19*, 1–12. https://doi.org/10.1016/j.gpb.2020.06.005

Wang, J., Xu, G., Ning, Y., Wang, X., & Wang, G.-L. (2022). *Mitochondrial functions in plant immunity. Trends in Plant Science, 27*(10), 1063-1076. https://doi.org/10.1016/j.tplants.2022.04.007

Wang, Q., Tian, F., Pan, Y., Buckler, E. S., & Zhang, Z. (2014). *A SUPER powerful method for genome-wide association study. PLOS ONE, 9*(9), e107684. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0107684

Wickham, H. (2016). *ggplot2: Elegant graphics for data analysis.* Springer-Verlag New York. https://ggplot2.tidyverse.org

Yang, X., Yan, J., Shah, T., Warburton, M. L., Li, Q., Li, L., Gao, Y., Chai, Y., Fu, Z., Zhou, Y., Xu, S., Bai, G., Meng, Y., Zheng, Y., & Li, J. (2010). *Genetic analysis and characterization of a new maize association mapping panel for quantitative trait loci dissection. Theoretical and Applied Genetics, 121*(3), 417–431. https://doi.org/10.1007/s00122-010-1374-7

Zhang, Y., Li, B., Xu, Y., Li, H., & Wang, Y. (2021). *Identification of a novel gene in Arabidopsis thaliana. Planta,* 254(3), 45. https://doi.org/10.1007/s00425-021-03794-y

Zhang, Y., Lubberstedt, T., & Xu, M. (2013). *The genetic and molecular basis of plant resistance to pathogens. Journal of Genetics and Genomics, 40*(1), 23–35. https://doi.org/10.1016/j.jgg.2012.11.003

9 ANEXO

9.1 Material vegetal

9.1.1 Lista de las 71 líneas endocriadas pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del EEA INTA Pergamino utilizadas en este ensayo (con "X" se destacan cuales genotipos fueron utilizados en cada etapa). Se incluye pedigrí, origen y características relevantes de cada genotipo.

#	Genotipo	Denominación	Origen [1]	Otras características	Fenotipado	Genotipado
1	(R4930x3125-2)-1-9	9	(DK752xB73) F2	-	X	
2	(LP562x3584)-1-39	39	(M370xFA) x FA	-	X	
3	(LP562x3584)-1-53	53	(M370xFA) x FA	-	X	
4	(LP915x3125-2)-1-67	67	(DK752xB73) F2	-	X	
5	(7310x7266)-1-91	91	(Hybrid Cargill 280) F2	-	X	
6	(7310x7266)-1-133	133	(Hybrid Cargill 280) F2	-	X	
7	83525	83525	[(LP1512xLP199)(LP453xLP58)] F2	High Oleic Acid Population	X	
8	83538	83538	[(LP1512xLP199)(LP453xLP58)] F2	Susceptible to CR	X	
9	83556	83556	[(LP1512xLP199)(LP453xLP58)] F2	Low Saturated Fatty Acid Population	X	
10	AX888IT-B	AX888IT-B	(Hybrid AX888IT) F2	-	X	
11	B73	B73	US dent inbred line	Genome sequenced	X	
12	L5605	L5605	(P578 x LP116) F2	-	X	
13	L5632	L5632	(P578 x LP116) F2	-	X	
14	L5665	L5665	(P578 x LP116) F2	-	X	

15	LP1032	LP1032	Composite I	-	X	X
16	LP1044	LP1044	Composite I	-	X	X
17	LP116	LP116	Composite “Argentino-Caribe”	Susceptible to CR	X	X
18	LP122-2	LP122-2	(L3178xL196) F2	-	X	X
19	LP124	LP124	Composite “Colorado precoz”	-	X	X
20	LP125R	LP125R	Synthetic “Colorada dura”	Resistant to CR	X	X
21	LP126	LP126	(LP125R x L196) F2	Susceptible to SCLB	X	X
22	LP128	LP128	(L28 x LP521) F2	-	X	X
23	LP1411	LP1411	(LP199x L3178) F2	-	X	X
24	LP1512	LP1512	Composite II	-	X	X
25	LP1513	LP1513	Composite II	-	X	
26	LP153	LP153	(A1 x L1571) F2	-	X	X
27	LP168	LP168	RS (P465 x D) F2	-	X	X
28	LP178	LP178	Suwan	**Resistant to NCLB**	X	X
29	LP179	LP179	Suwan	-	X	X
30	LP197	LP197	Synthetic “Hybrid Pioneer”	-	X	X
31	LP199	LP199	Composite II	-	X	X
32	LP1996	LP1996	Composite II	-	X	X
33	LP212	LP212	Argentinean flint x Canadian dent	-	X	X
34	LP214	LP214	Argentinean flint x Canadian dent	-	X	X
35	LP223	LP223	Synthetic “Hybrid Pioneer”	-	X	X
36	LP236	LP236	Argentinean flint x Canadian dent	-	X	X
37	LP2542	LP2542	Composite “BS13”	-	X	X
38	LP256-R	LP256-R	RS (L256 x D) F2	Resistant to CR	X	X
39	LP29	LP29	Composite “Colorado precoz”	-	X	X

40	LP311	LP311	Synthetic “Hybrid L100”	Susceptible to NCLB	X	X
41	LP317	LP317	Synthetic “Hybrid L100”	-	X	X
42	LP3830	LP3830	(B23xB87) F2	-	X	X
43	LP438	LP438	Composite “Semidentado Precoz”	-	X	X
44	LP453	LP453	Composite “Argentino-Caribe”	-	X	
45	LP4703	LP4703	Compuesto Prolifico	-	X	X
46	**LP509**	**LP509**	**BSSSxCuarentín**	**Susceptible to BLS**	**X**	
47	LP521	LP521	Synthetic “Colorada dura”	-	X	X
48	LP562	LP562	R49022 x M370	-	X	X
49	LP579	LP579	[(5842xLP125)x(28xP1338)]F2	-	X	X
50	LP580	LP580	(Hybrid Cargill 280) F2	-	X	X
51	LP581	LP581	(Hybrid Titanium) F4	-	X	
52	LP59	LP59	(L10612xB14) F2	-	X	X
53	LP598	LP598	(Hybrid ACA 2000) F2	-	X	X
54	LP605	LP605	[(P465 x D)Fn*x ZN6]F2	-	X	X
55	LP611	LP611	RS (P465 x D)	-	X	X
56	LP612	LP612	RS (P465 x D)	-	X	X
57	LP613	LP613	RS (P465 x D)	-	X	X
58	LP661	LP661	(LP662 x LP611) F2	-	X	X
59	LP662	LP662	(P465 x D) F2	-	X	X
60	LP818	LP818	Synthetic “Hybrid Pioneer”	-	X	X
61	LP869	LP869	Synthetic	-	X	X
62	LP915	LP915	[(N28xB73)x(N28x199)]F2	-	X	X
63	LP916	LP916	DK752xB73	-	X	X
64	LP917	LP917	DK752xB73	-	X	X
65	LP918	LP918	(Hybrid AX888) F2	Resistant to SCLB	X	X

66	LP923	LP923	(Commercial Hybrid) F2	-	X	X
67	LPB2	LPB2	White maize population	-	X	X
68	P1338	P1338	Argentinean x exotic germplasm	-	X	X
69	P465	P465	Argentinean landrace	-	X	X
70	Z9801-A	Z9801-A	(Hybrid AX888IT) F2	-	X	
71	ZN6	ZN6	Red flint population	-	X	X

[1] Extraído de Kistner *et al.* (2022).

9.2 Condiciones de cría y diseño experimental

9.2.1 Detalles de las tandas desarrolladas en este ensayo. Se especifican los genotipos estudiados en cada tanda, fechas de siembras, de inoculación y de evaluación de los 12 días post-infección.

Tanda	Fecha de siembra	Fecha de inoculación	Fecha de evaluación	Genotipos
Tanda 1	03/10/22	25/10/22	7/11/2022	LP1032 B73 L5605 L5632 LP199 L5665 LP3830 LP116 LP141 **LP509**

Tanda 2	13/10/22	1/11/2022	14/11/22	LP521 LP223 LP122-2 LP605 P465 LP662 LP29 LP214 LP199 **LP509**
Tanda 3	20/10/22	8/11/2022	21/11/22	LP126 LP124 LP125 LP153 LP178 256-R LP918 LP168 LP1512 LP1044 LP128 LP1513 **LP509**
Tanda 4	27/10/22	16/11/22	28/11/22	(LP915x3125-2)-1-67 8.3525 AX888IT-B 8.3538 8.3556 (R4930x3125-2)-1-9 (7310x7266)-1-91 (LP562x3584)-1-39 (LP562x3584)-1-53 (7310x7266)-1-133 **LP509**
Tanda 5	03/11/22	22/11/22	5/12/2022	LP197 LP317 LP187 LP562 LP1996 LP311 LP212 LP2542 **LP509**
Tanda 6	10/11/22	29/11/22	12/12/2022	LP579 LP236 LP453 LP581 LP4703 LP438 LP59 LP598=A485 LP580 LP598 **LP509**

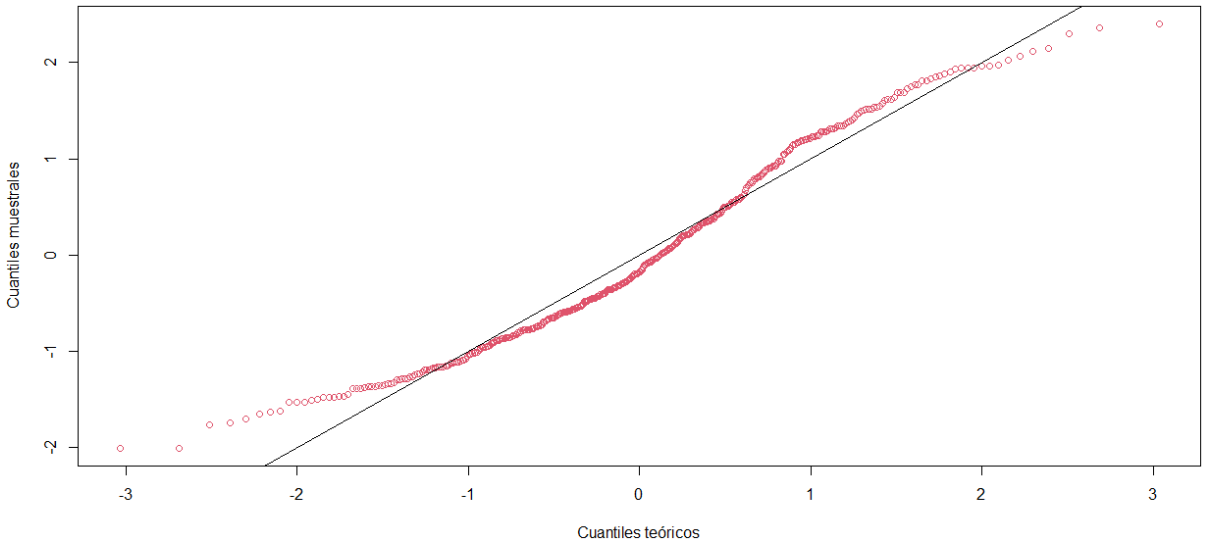
Tanda 7	17/11/22	6/12/2022	19/12/22	LP818 LP915 LP869 LP612 LP611 LP613 LP661 L5632 LP1338 **LP509**
Tanda 8	24/11/22	13/12/22	26/12/22	LP923 LP916 LP917 ZN6 LPB2 Z9801A **LP509**
Tanda 9	29/09/23	24/10/23	6/11/2023	LP126 LP124 LP125 LP153 LP178 256-R LP918 LP168 LP1512 LP1044 LP128 LP1513 LP236 **LP509**

**Nota: se destaca el genotipo LP509 en rojo por tratarse del testigo susceptible incluido en cada tanda.*

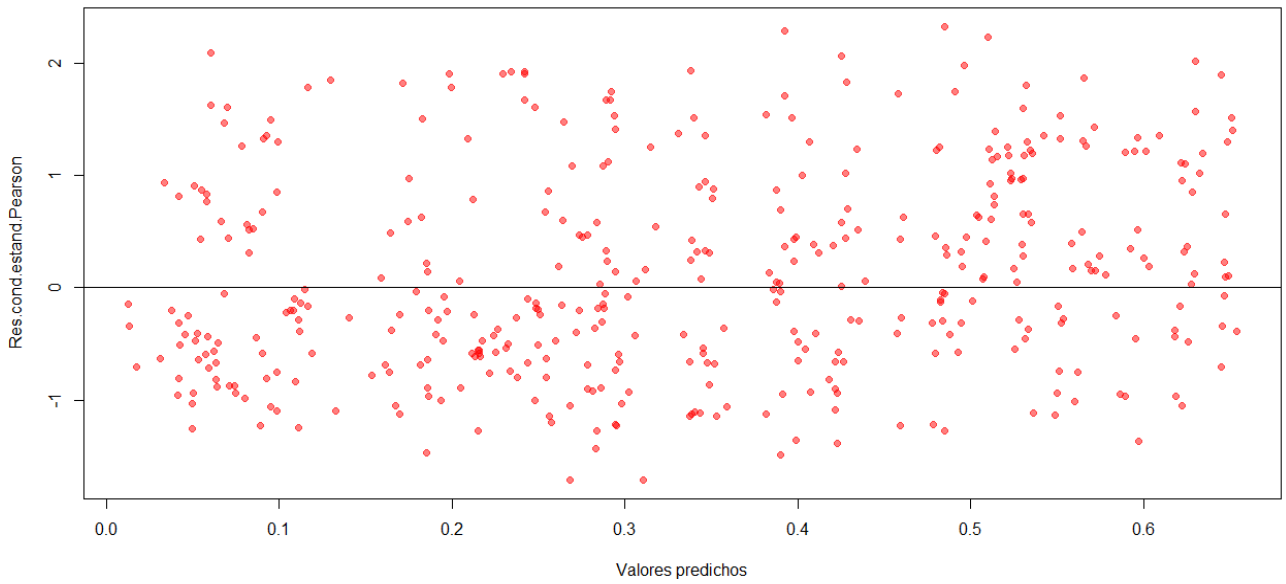
9.3 Fenotipado

9.3.1 Análisis estadístico

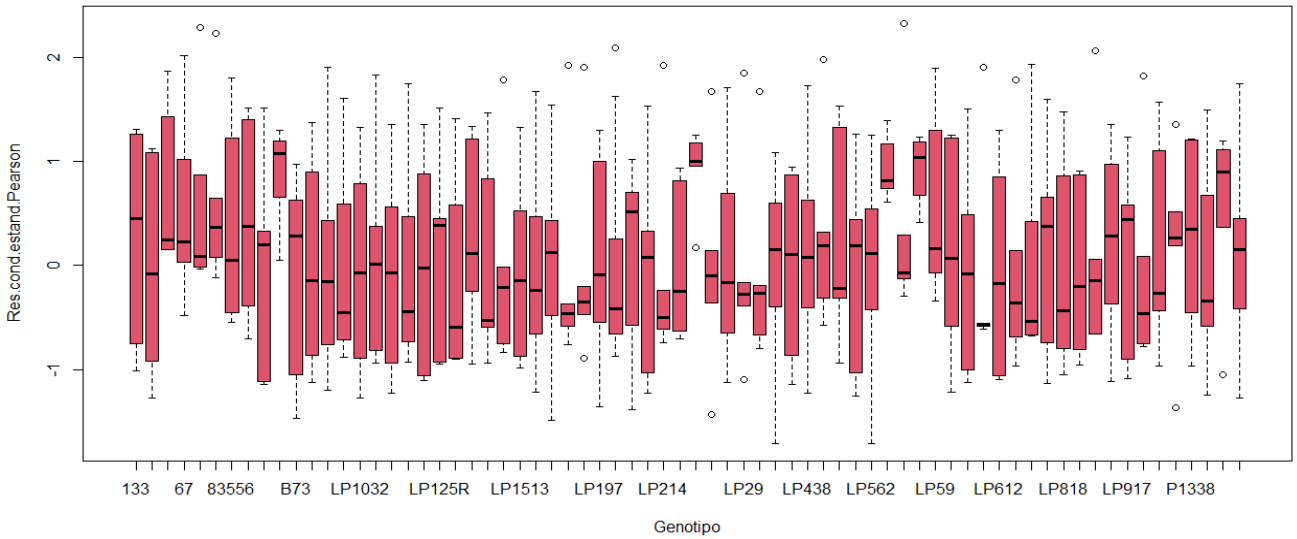
9.3.1.1 Modelo lineal general mixto con Genotipo y Bloque como efecto aleatorio



9.3.1.1.1 Q-Q *Plot* de los residuos de la variable severidad de síntoma pertenecientes a Xvv. Datos registrados en la evaluación de infección artificial en condiciones de invernáculo de un panel de líneas endocriadas de maíz en la EEA INTA Pergamino.

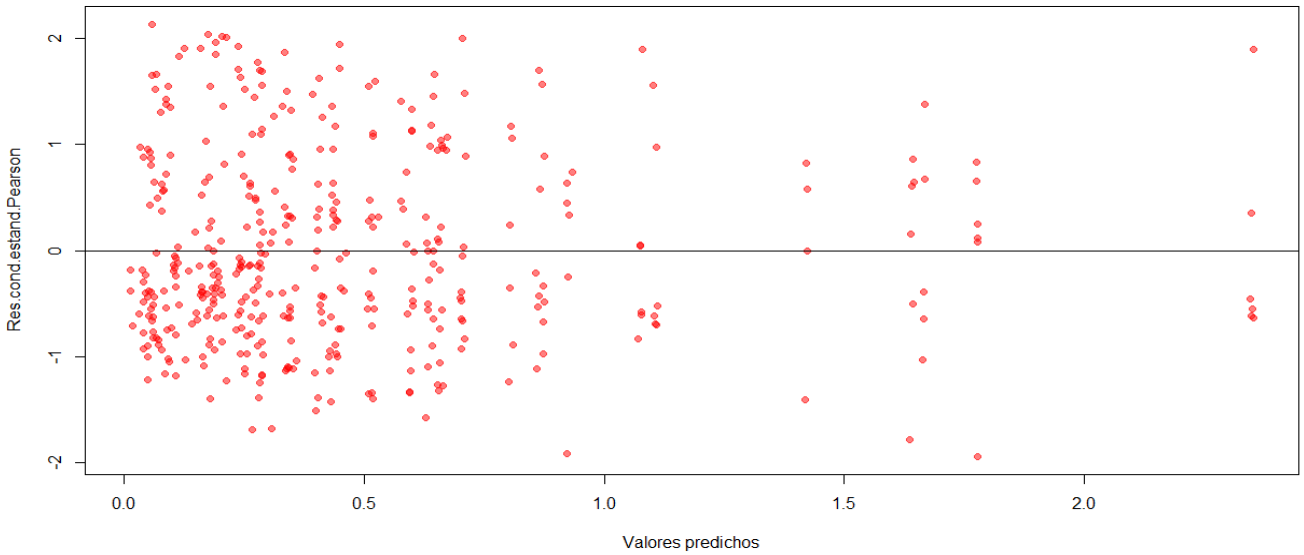


9.3.1.1.2 Gráfico de dispersión de los valores Residuos vs. Predichos de variable severidad de síntoma pertenecientes a Xvv. Datos registrados en la evaluación de infección artificial en condiciones de invernáculo de un panel de líneas endocriadas de maíz en la EEA INTA Pergamino.



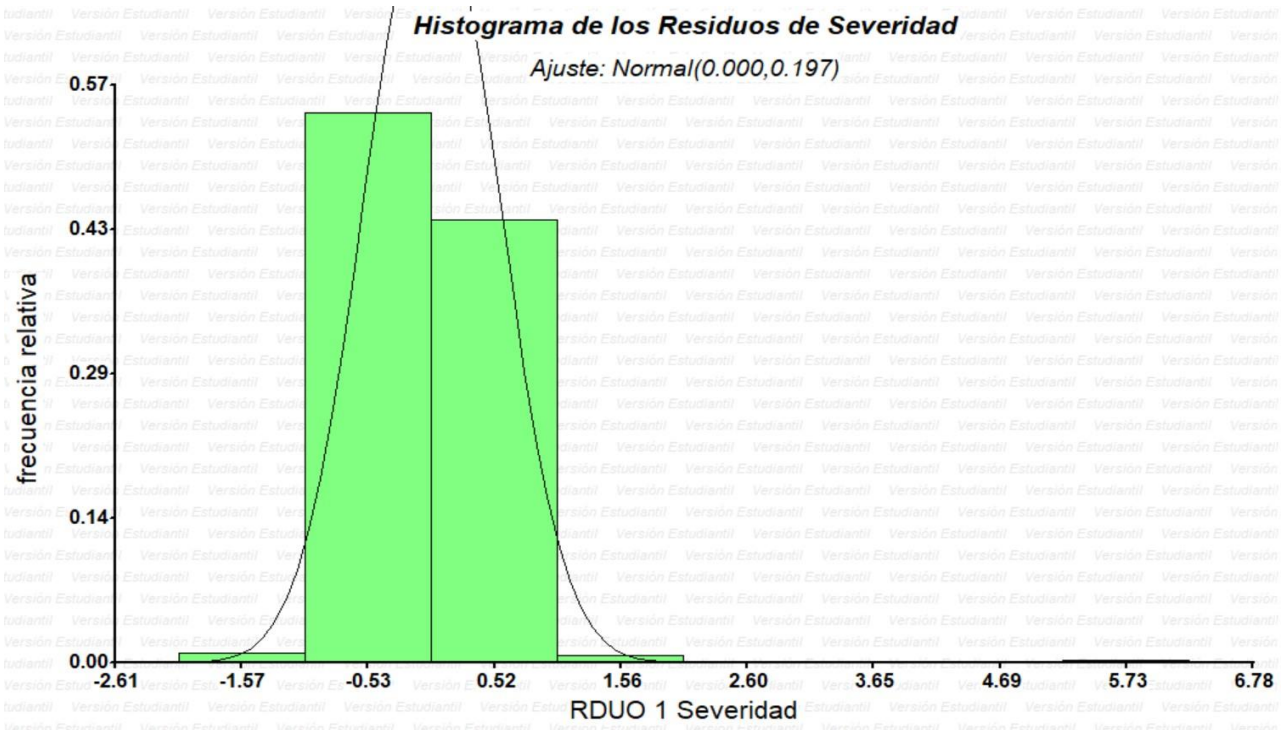
9.3.1.1.3 Homogeneidad de varianzas de los residuos de las 71 líneas endocriadas de maíz pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del EEA INTA Pergamino evaluadas para la resistencia de Xvv, en condiciones de invernáculo.

9.3.1.2 Modelo lineal general mixto con Genotipo como efecto fijo y Bloque como efecto aleatorio

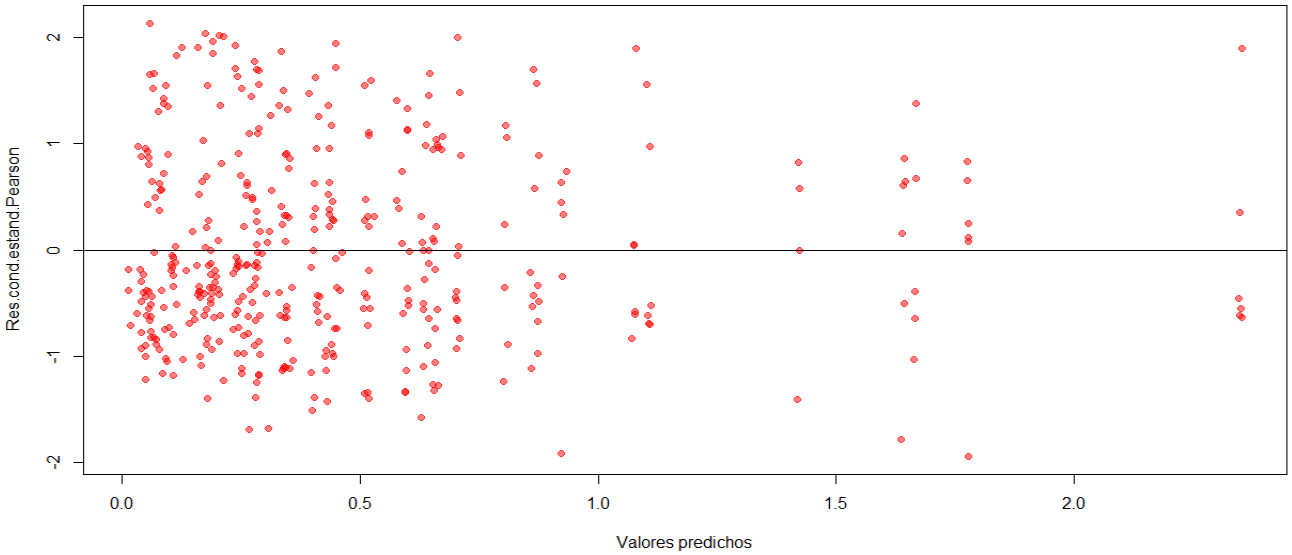


9.3.1.2.1 Q-Q *Plot* de los residuos de la variable severidad de síntoma pertenecientes a Xvv. Datos registrados en la evaluación de infección artificial en condiciones de

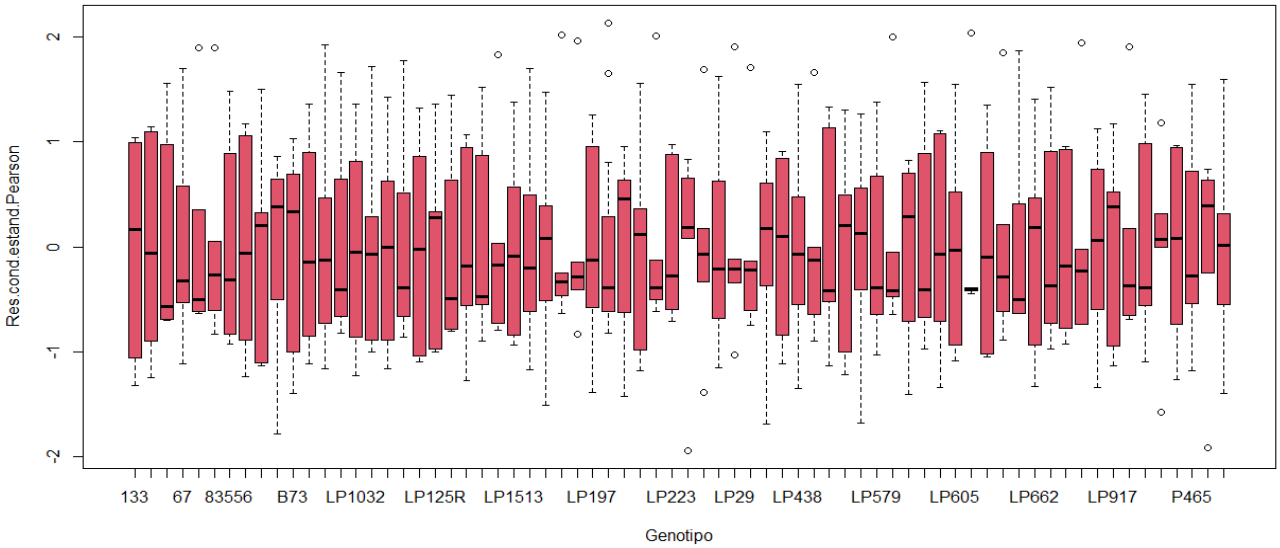
invernáculo de un panel de líneas endocriadas de maíz en la EEA INTA Pergamino.



9.3.1.2.2 Histograma de los residuos de la variable severidad de síntoma pertenecientes a Xvv. Datos registrados en la evaluación de infección artificial en condiciones de invernáculo de un panel de líneas endocriadas de maíz en la EEA INTA Pergamino.



9.3.1.2.3 Gráfico de dispersión de los valores Residuos vs. Predichos de variable severidad de síntoma pertenecientes a Xvv. Datos registrados en la evaluación de infección artificial en condiciones de invernáculo de un panel de líneas endocriadas de maíz en la EEA INTA Pergamino.



9.3.1.2.4 Homogeneidad de varianzas de los residuos de las 71 líneas endocriadas de maíz pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del EEA INTA Pergamino evaluadas para la resistencia de Xvv, en condiciones de invernáculo.

9.3.2 Tabla de valores AIC y BIC para cada modelo estadístico estudiado en un ensayo de evaluación de un panel de 71 líneas endocriadas de maíz pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del EEA INTA Pergamino, para la resistencia frente a BLS.

Modelo	Factor aleatorio: Genotipo y Bloque	Factor aleatorio: Bloque
	Factor fijo: -	Factor fijo: Genotipo
AIC	100,26	187,58
BIC	394,33	729,93

9.4 Comparación Campo - Invernáculo

9.4.1 Lista de genotipos evaluados que mantuvieron su comportamiento, en ambos ambientes (campo e invernáculo), frente a la infección de Xvv.

Genotipos	Comportamiento	Genotipos	Comportamiento
83556	Resistentes	P465	Resistentes
LP223	Resistentes	LP125R	Resistentes
133	Resistentes	LP128	Resistentes
LP521	Resistentes	LP661	Resistentes
LP869	Resistentes	LP818	Resistentes
LP153	Resistentes	LP179	Resistentes
LP1411	Resistentes	LP605	Resistentes
LP178	Resistentes	LP311	Resistentes
83538	Resistentes	LP317	Resistentes
LP168	Resistentes	LP1222	Resistentes
LP126	Resistentes	LP915	Resistentes
L5665	Resistentes	LP917	Moderadamente Resistentes
LP199	Resistentes	LP59	Moderadamente Susceptibles
LP116	Resistentes	LP581	Susceptibles

9.4.2 Resumen del comportamiento, a campo y en invernáculo, de los genotipos pertenecientes Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del EEA INTA Pergamino, en base a su fenotipo frente a Xvv.

		CAMPO			
		Resistente	Moderadamente Resistente	Moderadamente Susceptible	Susceptible
INVERNÁCULO	Resistente	**25**	13	1	5
	Moderadamente Resistente	9	**1**	5	3
	Moderadamente Susceptible	3	1	**1**	0
	Susceptible	0	1	1	**1**

		CAMPO			
		Resistente	Moderadamente Resistente	Moderadamente Susceptible	Susceptible
INVERNÁCULO	Resistente	35,7%	18,6%	1,4%	7,1%
	Moderadamente Resistente	12,9%	1,4%	7,1%	4,3%
	Moderadamente Susceptible	4,3%	1,4%	1,4%	0,0%
	Susceptible	0,0%	1,4%	1,4%	1,4%

9.5 Genotipado

9.5.1 Listado de los 52 genotipos seleccionados, en el marco del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino, para realizar el mapeo de asociación en busca de genes candidatos frente a la infección artificial de Xvv en condiciones de invernáculo.

LP1032	LP179	LP3830	LP661
LP1044	LP197	LP438	LP662
LP116	LP199	LP4703	LP818
LP1222	LP1996	LP521	LP869
LP124	LP212	LP562	LP915
LP125R	LP214	LP579	LP916
LP126	LP223	LP580	LP917
LP128	LP236	LP59	LP918
LP1411	LP25421	LP598	LP923
LP1512	LP256R	LP605	LPB2
LP153	LP29	LP611	P1338
LP168	LP311	LP612	P465
LP178	LP317	LP613	ZN6

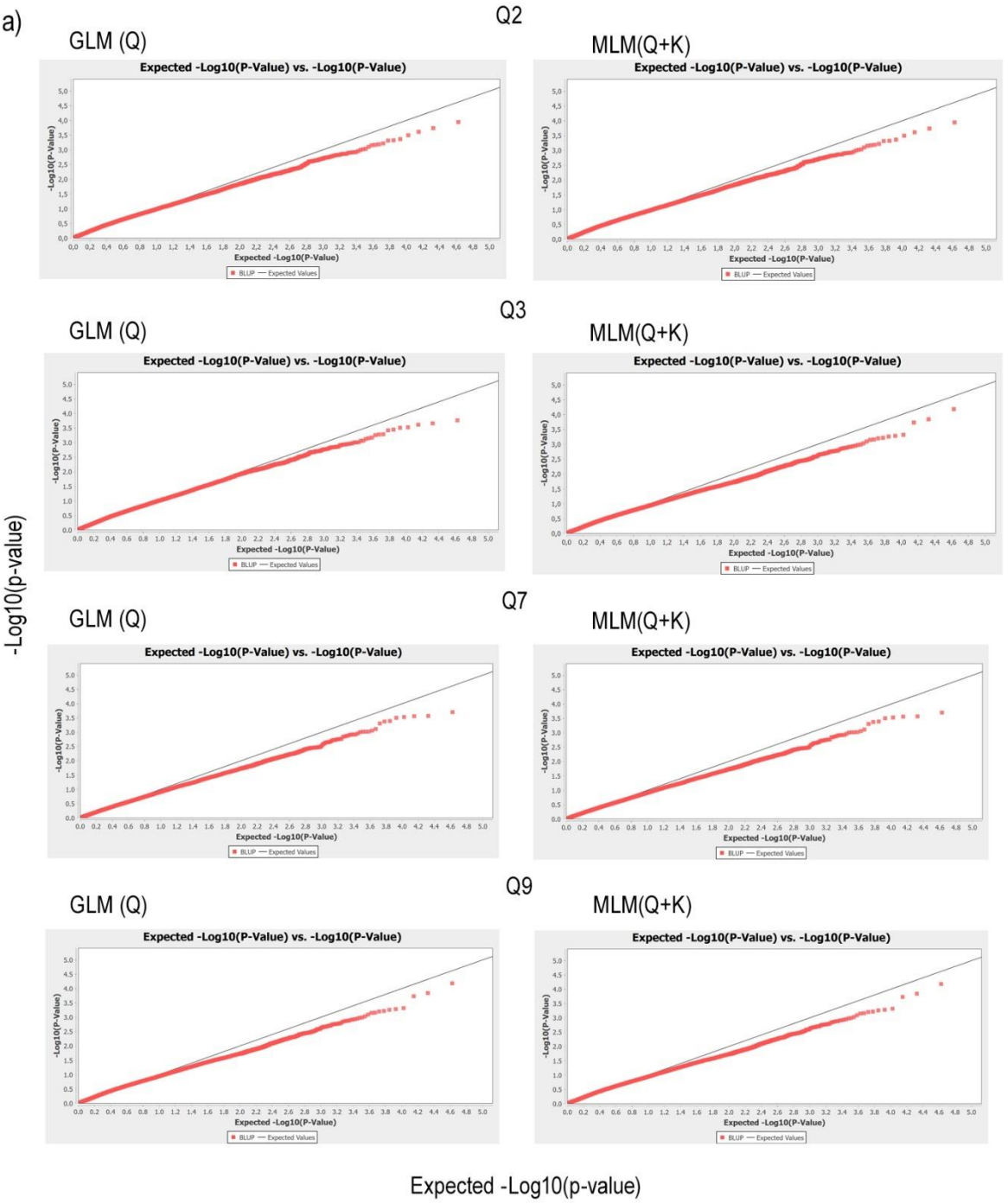
9.5.2 Parámetros establecidos para el análisis de estructuración poblacional de un *set* de 52 líneas endocriadas de maíz pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Maíz del EEA INTA Pergamino. El análisis se desarrolló empleando el programa STRUCTURE v2.3.4.

- Missing values: -9
- Running Length
    - Length of Burnin Period: 5000
    - Number of MCMC Reps after Burnin: 10000
- Ancestry Model Info
    - Use Admixture Model
        - Infer Alpha
        - Initial Value of ALPHA (Dirichlet Parameter for Degree of Admixture): 1.0
        - Use Same Alpha for all Populations
        - Use a Uniform Prior for Alpha
        - Maximum Value for Alpha: 10.0
        - SD of Proposal for Updating Alpha: 0.025
- Frequency Model Info
    - Allele Frequencies are Correlated among Pops

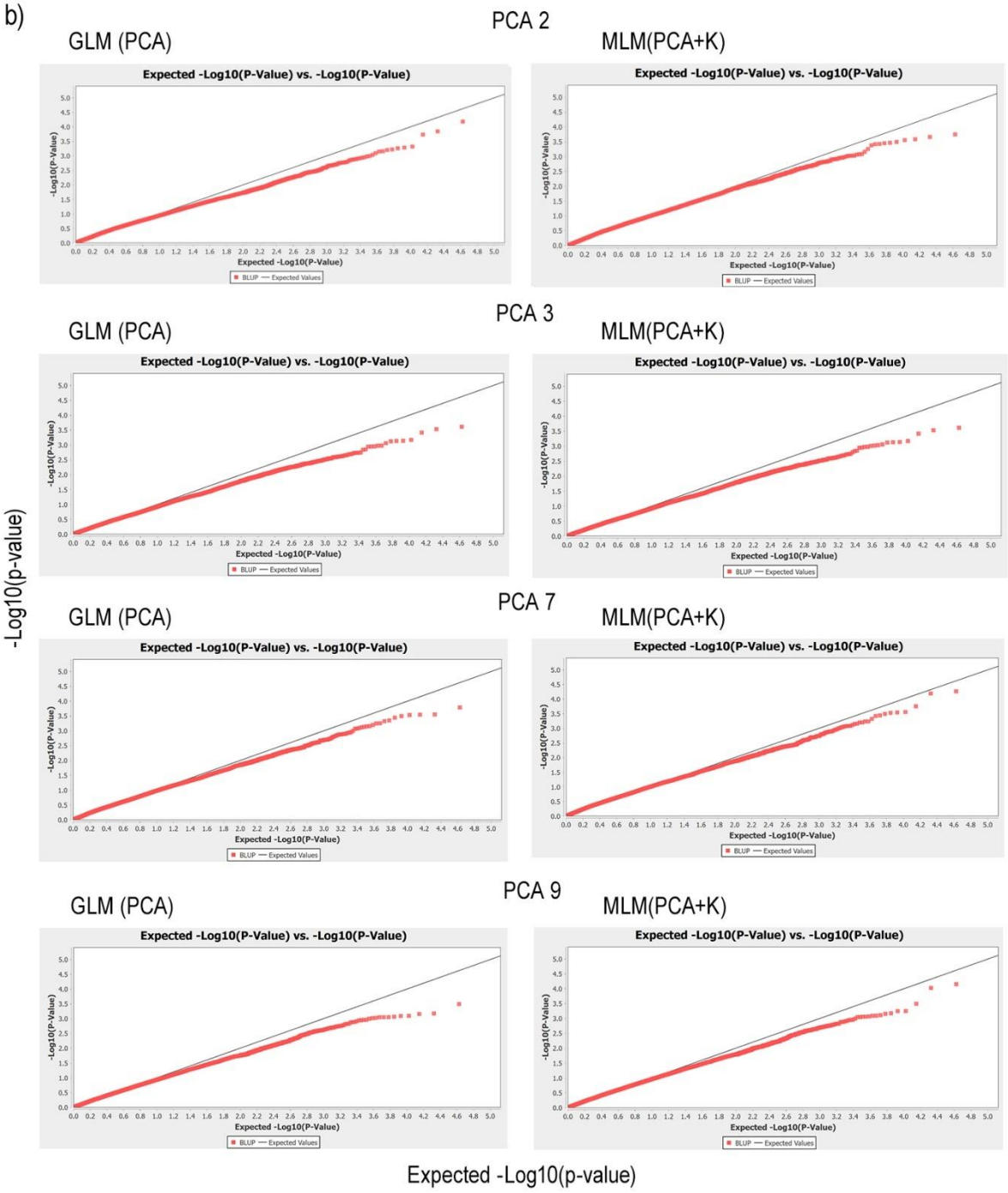
        - Assume Different Values of Fst for Different Subpopulations
        - Prior Mean of Fst for Pops: 0.01
        - Prior SD of Fst for Pops: 0.05
        - Use Constant Lambda (Allele Frequencies Parameter)
        - Value of Lambda: 1.0
- Advanced Options
    - Estimate the Probability of the Data Under the Model
    - Frequency of Metropolis update for Q: 10

9.5.3 Q-Q *plot* de los valores p (p-*values*) obtenidos con Tassel utilizando los valores BLUP de severidad de síntomas de BLS y considerando las covariables (a) Q2, Q3, Q7, Q9 y (b) PCA 2, PCA 3, PCA 7 y PCA 9. Se implementaron cuatro modelos para el análisis: GLM (PCA), GLM (Q), MLM(Q+K), MLM(PCA+K). El eje de las ordenadas muestra el -$\log_{10}$ del valor p observado (-Log_{10}(*p-value*)) y el eje de las abscisas muestra el -$\log_{10}$ del valor p esperado (E*xpected* -Log_{10}(*p-value*)). La línea roja indica la distribución observada de los valores p mientras que la línea gris representa la distribución según los valores p esperados.

a)

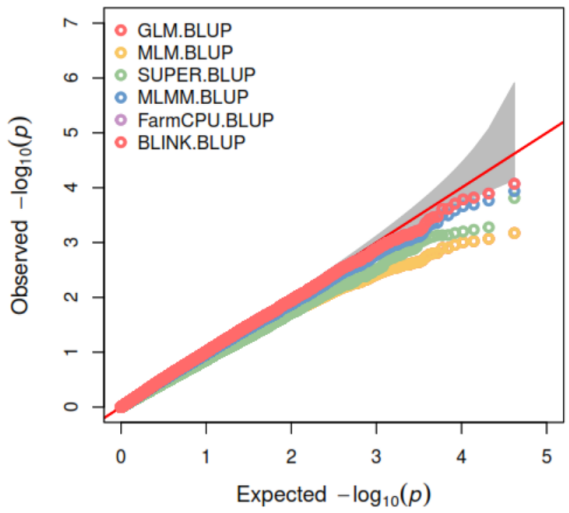

Q2
GLM (Q)
MLM(Q+K)
Q3
GLM (Q)
MLM(Q+K)
Q7
GLM (Q)
MLM(Q+K)
Q9
GLM (Q)
MLM(Q+K)
Expected -Log10(P-Value) vs. -Log10(P-Value)
-Log10(P-Value)
Expected -Log10(P-Value)
BLUP
Expected Values
-Log10(p-value)
Expected -Log10(p-value)

b)

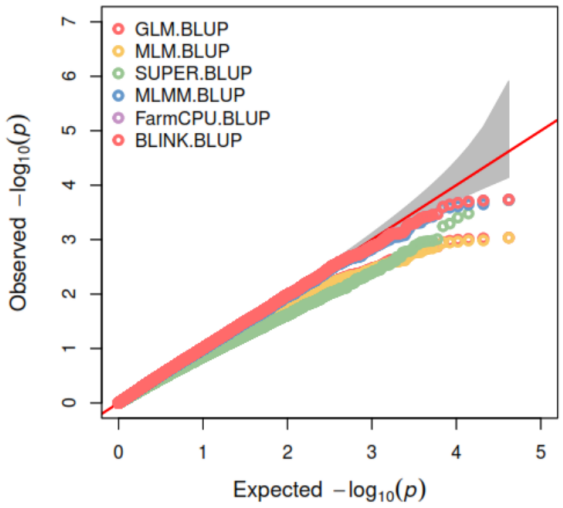

PCA 2
GLM (PCA)
MLM(PCA+K)
PCA 3
GLM (PCA)
MLM(PCA+K)
PCA 7
GLM (PCA)
MLM(PCA+K)
PCA 9
GLM (PCA)
MLM(PCA+K)
Expected -Log10(P-Value) vs. -Log10(P-Value)
-Log10(P-Value)
Expected -Log10(P-Value)
BLUP
Expected Values
-Log10(p-value)
Expected -Log10(p-value)

9.5.4 Gráficos Q-Q obtenidos con GAPIT a partir de los resultados del GWAS realizados utilizando los valores BLUP de severidad y distintas covariables estudiadas (Q2, Q3, Q7, Q9, PCA 2, PCA 3, PCA 7 y PCA 9). Se implementaron seis modelos para el análisis (GLM, MLM, SUPER, MLMM, FarmCPU y BLINK), cada uno representado con un color diferente. El eje de las abscisas muestra el -$\log_{10}$ del valor p esperado (*Expected* -$\log_{10}$(p)) y el eje de las ordenadas muestra el -$\log_{10}$ del valor p observado (*Observed* -$\log_{10}$(p)). La línea roja indica la distribución esperada de los valores p bajo la hipótesis nula, mientras que el umbral gris representa el punto de corte de significancia ajustado.

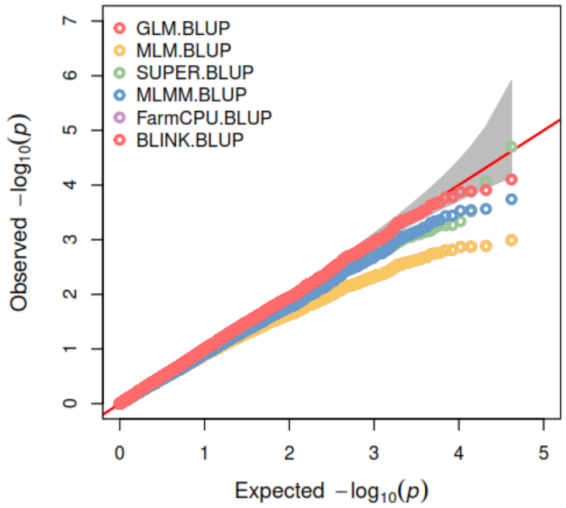
Q2



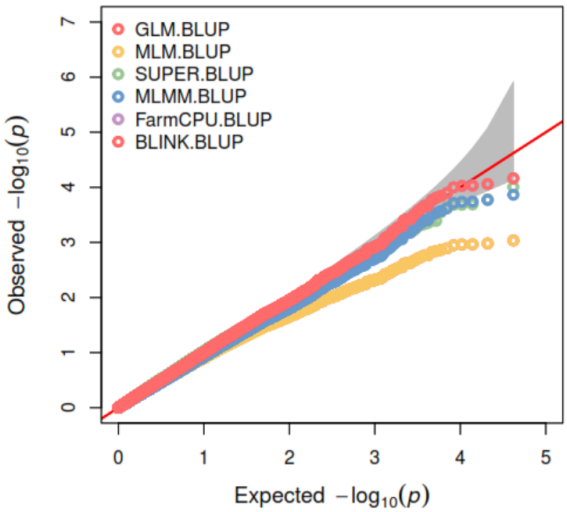
Q3



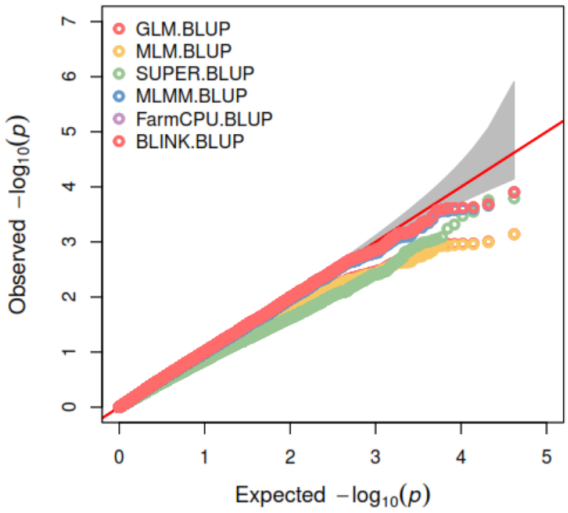
Q7



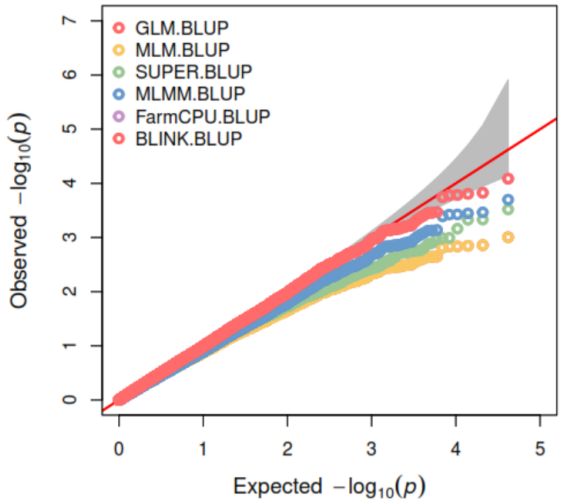
Q9



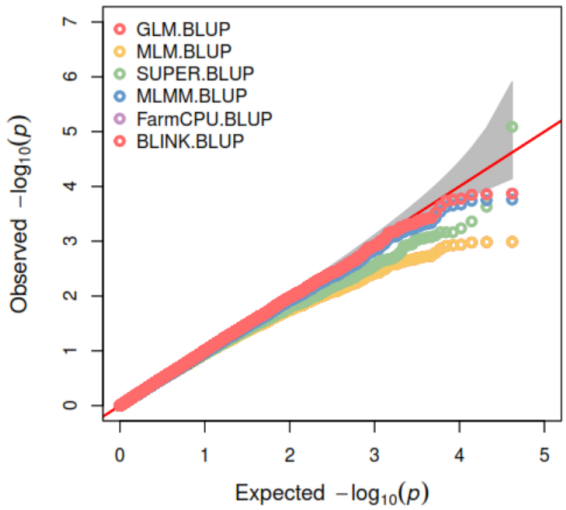
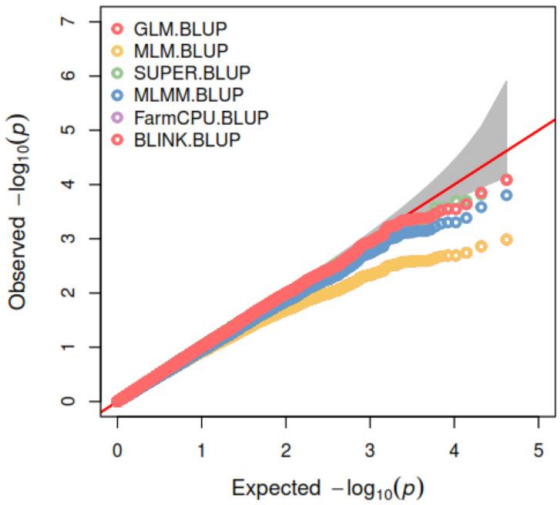
PCA 2



PCA 3



PCA 7



PCA 9