



**MAÍZIFICANDO
CONCIENCIA**
XII CONGRESO NACIONAL DE MAÍZ

Eje

Genética y mejoramiento

8, 9 y 10 de Noviembre
Pergamino, BA
UNNOBA



Secretaría de Agricultura,
Ganadería y Pesca
Ministerio de Economía
Argentina

20
22





IDENTIFICACIÓN DE REGIONES GÉNICAS CANDIDATAS PARA RESISTENCIA MÚLTIPLE A ENFERMEDADES DE ESPIGA EN MAÍZ

Montenegro LD¹; Baricalla AA^{1,2}; Perdomo SI¹ e Iglesias J^{1,3*}.

¹ Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA), Monteagudo ²⁷⁷², Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

² Centro de Investigaciones y Transferencia del Noroeste de la provincia de Buenos Aires CITNOBA (UNNOBA - UNSAdA - CONICET), Monteagudo 2772, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

³ Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Estación Experimental Pergamino (INTA-EEA Pergamino), Av. Frondizi (Ruta 32) Km 4,5, Pergamino, Buenos Aires, Argentina.

* iglesias.juliana@inta.gob.ar

IDENTIFICATION OF CANDIDATE GENOME REGIONS TO MULTIPLE DISEASE RESISTANCE TO EAR DISEASES OF MAIZE

Abstract

Maize ears are regularly infected with *Fusarium verticillioides* (FV), *Fusarium graminearum* (FG) and *Ustilago maydis* (UM), which causes reduction of grain yield and quality. However, conventional breeding can be hampered by the complex genetic architecture of disease resistance. In this regard, Genome Wide Association Study (GWAS) based on genotype (SNP)-phenotype association, is effective to identify disease resistance QTLs. The objective of this work was to identify genomic regions associated to multiple disease resistance (MDR) to FV, FG and UM, in a panel of 63 maize inbred lines from the EEA INTA Pergamino Maize Breeding Program, through a GWAS study. Trials for phenotypic evaluation were planted in two environments for FV and FG and in five environments for UM. Genotyping was based on Illumina® MaizeSNP50 BeadChip. Best linear unbiased estimator (BLUE) of the phenotypic data were obtained. Linkage disequilibrium and association analysis were performed by TASSEL. Four candidate bins were obtained for resistance to FV, 10 bins to FG and 7 bins to UM. In particular, bins 2.05 and 2.09 were associated with MDR. The results obtained include genes involved in pathogen recognition and signaling pathways for disease resistance. This work describes for the first time candidates genes associated to MDR in Argentinian germplasm.

Palabras claves

GWAS, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum*, *Ustilago maydis*, desequilibrio por ligamiento

Keywords

GWAS, *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum*, *Ustilago maydis*, candidate gene, linkage disequilibrium



Introducción

El maíz es afectado por diversos patógenos y plagas que disminuyen la productividad y la calidad de los granos. Dentro del complejo fúngico que produce las enfermedades de la espiga, en este trabajo haremos foco en *Fusarium verticillioides* (Saccardo) Nirenberg [(= *F. moniliforme* (Sheldon), teleomorfo *Gibberella moniliformis* (Wineland) (= *G. fujikuroi* (Sawadalto in Ito & Kimura, mating type A)], *Fusarium graminearum* Schwabe (teleomorfo *Gibberella zeae* Schwein) y *Ustilago maydis* (Persoon) Roussel.

Brevemente, *Fusarium verticillioides* (FV) es un hongo necrótrofo que produce enzimas líticas y micotoxinas, como las fumonisinas (FB), que contribuyen al proceso de infección. La FB1 es la micotoxina que causa mayor preocupación en cuanto a inocuidad alimentaria y tiene un rol controvertido como factor de virulencia. *Fusarium graminearum* (FG) es un hemibiótrofo y también produce micotoxinas, especialmente deoxinivalenol (DON) y zearalenona (ZEA). Aunque DON no posee gran toxicidad, es considerada una micotoxina de relevancia económica y es un factor de virulencia clave. Finalmente *Ustilago maydis* (UM) causa lo que se denomina carbón común del maíz. Es un basidiomicete biótrofo (parásito obligado que se nutre de las células vivas del hospedante) que se identifica fácilmente por las agallas con aspecto de tumor que produce. UM afecta severamente los rendimientos en años favorables y aunque no produce micotoxinas, la formación de agallas puede facilitar la infección de otros patógenos que sí las producen, tales como FV y FG.

A la fecha actual no existen métodos de control químico que sean efectivos para estas enfermedades; trabajos recientes incluso confirman que FV y FG no responden favorablemente ante la utilización de fungicidas (Masiello *et al.*, 2019). Por lo tanto, el desarrollo de resistencia genética se presenta como una alternativa eficaz, sustentable y durable en el control de estas enfermedades.

La resistencia a enfermedades de la espiga del maíz suele ser más bien del tipo cuantitativo (herencia poligénica vs herencia cualitativa o monogénica). Si a esto sumamos la resistencia efectiva contra más de un patógeno (>2), tenemos la resistencia a múltiples enfermedades, que de aquí en más llamaremos MDR por sus siglas en inglés *Multiple Disease Resistance*. La resistencia MDR estaría condicionada por diversos mecanismos a nivel de locus y genes, pudiendo estar controlada por grupos de genes de resistencia (genes R), por genes patógeno-específico y/o por genes de efecto pleiotrópico (Wiesner-Hanks y Nelson, 2016).

El maíz tiene una larga historia en el desarrollo de herramientas genéticas y genómicas, y se considera uno de los sistemas de plantas superiores más accesibles, ya que posee un genoma completamente secuenciado y marcadores moleculares caracterizados. No obstante, mapear caracteres cuantitativos es complejo, ya que el fenotipo está dado por la sumatoria de efectos génicos producto de la acción conjunta de dos o más genes, su interacción y la interacción con el ambiente.

En años recientes se comenzaron a utilizar nuevos métodos como el mapeo de asociación de genoma completo (GWAS del inglés *Genome wide association mapping*). GWAS es una herramienta eficaz y potente para identificar QTLs y/o regiones candidatas para resistencia a enfermedades, incluidas regiones MDR. Este análisis se basa en la asociación entre la variación fenotípica y polimorfismos genéticos de una población dada. Una de las ventajas del GWAS es que utiliza poblaciones con muchas generaciones sometidas a eventos de recombinación. Esto le permite basarse en el principio



de desequilibrio por ligamiento (DL), el cual plantea que solo permanecerán aquellas asociaciones entre los marcadores moleculares y genes que estén altamente ligados al carácter de interés. Es decir la asociación no al azar de alelos en diferentes loci.

En este contexto fue que planteamos el uso de GWAS para identificar regiones candidatas para MDR a FV, FG y UM en un panel de germoplasma Argentino. Los resultados obtenidos a partir de este trabajo de investigación nos permitirán ahondar en el conocimiento de estos patosistemas y contar con más herramientas para contribuir a reducir pérdidas económicas y a desarrollar variedades de maíz genéticamente resistentes.

Materiales y métodos

Material genético:

Se evaluó un set diverso de 63 líneas endocriadas de maíz pertenecientes al Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino. Este panel cuenta con datos de pedigrí (Kistner *et al.*, 2022; Olmos *et al.*, 2014) e información sobre la estructuración genética de las líneas (Q=3)

Fenotipado para enfermedades:

Los datos de la evaluación de las podredumbres de espiga causadas por *Fusarium* spp. fueron obtenidos durante las campañas 2002/2003 y 2016/17 bajo un diseño de parcelas divididas con dos repeticiones. La evaluación de síntomas se llevó a cabo bajo infección artificial. El inóculo de FV fue desarrollado en base al aislamiento monospórico P364 y el inóculo de FG a partir del monospórico IVI13, ambos de capacidad toxicogénica y agresividad conocida. La evaluación de la severidad de síntomas se estimó en base a un ranking del porcentaje del área de la espiga afectada donde: 1 = sin síntomas; 2 = 1- 3%; 3 = 4-10%; 4 = 11-25%; 5 = 26-50%; 6 = 51-75% y 7 = 76-100%.

Los datos de UM fueron obtenidos bajo infección natural durante las campañas agrícolas 2016/17, 2017/18 y 2018/2019 contabilizando un total de cinco ambientes. Los ensayos fueron sembrados en un diseño de bloques completos aleatorizados, con dos repeticiones. Los datos de incidencia de UM se obtuvieron contabilizando la cantidad de plantas con síntomas en espiga sobre el número total de plantas de la parcela.

Análisis estadístico:

El análisis de los datos para las podredumbres de espiga causadas por FV y FG se llevó a cabo utilizando un Modelo Lineal General Mixto en InfoStat (Di Rienzo *et al.*, 2015) obteniendo los valores BLUE (del inglés Best linear unbiased estimator) de cada genotipo para el posterior estudio de asociación fenotipo-genotipo. Se seleccionaron los efectos de ambiente y de repetición dentro de ambiente como aleatorios y el efecto de genotipo como fijo. Los dos ambientes se analizaron de forma conjunta.

Para el análisis de los datos de UM, se ajustó un Modelo Lineal Generalizado Mixto (MLGM) y se ajustó una distribución binomial usando el software estadístico RStudio (R Team, 2021), analizando los cinco ambientes en forma conjunta. Para la obtención de los valores BLUE, se contemplaron los efectos de ambiente y de repetición dentro de ambiente como aleatorios y el efecto de genotipo como fijo.



Análisis genotípico:

El análisis genotípico se llevó a cabo a partir del chip MaizeSNP50 de Illumina, que consta de 54473 loci de SNPs utilizando B73v5 como línea de referencia (Zm-B73-REFERENCE-NAM-5.0). Se eliminaron los marcadores y las líneas con más del 20% de datos faltantes y de heterocigosidad. Se determinaron marcadores monomórficos y polimórficos, y luego se eliminaron los marcadores con frecuencia alélica <5%. De esta forma, 43576 SNPs pasaron los filtros descriptos. El chip posee SNPs altamente polimórficos y presenta en promedio más de 25 marcadores por megabase (Mb), proporcionando una amplia densidad de SNPs para estudios de GWAS. Los datos del chip se complementaron con información de la estructura genética y relaciones de parentesco genético de las 63 líneas endocriadas consideradas en este trabajo. Todas las bases de ADN fueron modificadas al código de dos dígitos tal como lo requiere TASSEL (Bradbury *et al.*, 2007) programa utilizado posteriormente para realizar el GWAS. Finalmente, para estimar la proporción de variabilidad genética alcanzada por el conjunto de marcadores, se midió el desequilibrio por ligamiento (DL) entre todos los pares de SNPs para todo el genoma a través del coeficiente de determinación (r^2) con el software TASSEL.

Resultados y discusión

El GWAS permitió identificar 49 SNPs significativos ubicados en 21 segmentos cromosómicos (bins), con regiones génicas que codifican moléculas implicadas en vías de reconocimiento de patógenos y defensa. En este trabajo, el decaimiento del DL fue rápido con un $r^2=0,1$ de 262Kb por lo que se logró una alta resolución en las asociaciones identificadas. Debido a que la cobertura del genoma fue buena y a que hubo un decaimiento rápido del DL, fue posible identificar regiones candidatas para MDR en este panel de líneas endocriadas.

Para FV se encontraron cuatro regiones génicas, ubicadas en los bins 2.05, 2.06, 2.09 y 2.10. Si bien existe información previamente publicada para los bins 2.05 y 2.09, los bins 2.06 y 2.10 no han sido reportados en la bibliografía hasta el momento y este trabajo es la primera mención para maíz y patógenos.

Para FG se hallaron 10 bins significativos (2.02, 2.05, 2.06, 2.09, 2.10, 3.04, 5.03, 6.07, 7.04 y 8.08). Mientras que si existen reportes para los bins 2.06, 2.09, 3.04, 6.07, 7.04; los bins 2.02, 2.05, 2.10, 5.03 y 8.08 no han sido reportados aún como regiones de resistencia.

Con respecto a UM, se hallaron 7 bins candidatos (1.07, 2.05, 2.08, 2.09, 3.01, 5.03 y 5.05). Los bins 1.07 y 5.03 fueron reportados previamente como regiones asociadas a resistencia genética a este patógeno. Mientras que, los bins 2.05, 2.08, 2.09, 3.01 y 5.05 no se habían reportado hasta ahora y este trabajo constituye su primera mención.

Este trabajo destaca dos regiones génicas de resistencia múltiple a FV, FG y UM (bins 2.05 y 2.09) en líneas endocriadas del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino. Ningún estudio previo encontró regiones comunes para estas enfermedades y es la primera vez que se explora la resistencia múltiple a enfermedades de espiga en germoplasma argentino y en el mundo.

La mayoría de las regiones génicas encontradas se ubican en el cromosoma 2. Notablemente este cromosoma aloja diversos genes de resistencia. Wisser *et al.* (2006) realizaron un metaanálisis de la

arquitectura genética de la resistencia a enfermedades en maíz, donde observaron que el cromosoma 2 se encuentra dentro de los cromosomas que tienen más regiones de resistencia. Se observó una región (≈ 315 a 375 cM) que resultó asociada a genes de resistencia para 9 de las 11 enfermedades estudiadas en su trabajo. Ali et al. (2013) encontraron regiones de resistencia para *Exserohilum turcicum*, *Bipolaris maydis*, y *Cercospora zea-maydis* también en este cromosoma.

En relación a los bins de MDR identificados en este trabajo, Maschietto et al. (2017) encontraron para FV una región en el bin 2.05 que contiene 3 genes (*YPTM1*, *LOX8* y *22 kDa HSP*), que están completamente relacionados con la respuesta frente a estrés. *LOX8* por ejemplo, es un gen que codifica para la producción de oxilipinas, principalmente jasmonato. En este trabajo se observó que el marcador PZE102098315 asociado al bin 2.05 que se encontró para UM, se encuentra en la región génica que codifica para la proteína inducida por jasmonato, es decir que es probable que este bin aloje una región génica de MDR que podría destacarse por formar parte de la vía del jasmonato (la planta sintetiza esta hormona para responder a los necrótrofos como FV por ej). Por otra parte, en el bin 2.09 se alojan regiones de síntesis para diversas proteínas, que se destacan por su relevancia en interacción maíz-patógenos: la proteína RPS2 y una enzima glucano endo-1,3-beta-glucosidasa.

RPS2 corresponde a un gen de resistencia (genes R) de la familia NLR (del inglés: *nucleotide-binding domain leucine-rich repeat*, dominios de unión a nucleótidos ricos en repeticiones de leucina), receptores proteicos típicos de respuestas inmunes de tipo ETI (del inglés: Effector triggered immunity, inmunidad activada por efectores de patógenos). Se ha publicado que RPS2 cumple importantes roles en respuesta de defensa frente a *Pseudomonas spp.* en *Arabidopsis thaliana* y resistencia amplia a patógenos en arroz. Por otra parte, las enzimas de tipo beta-glucosidasa, como la que aquí se menciona, son de gran relevancia en la síntesis de fitoanticipinas, compuestos de defensa preformados que pueden almacenarse glucosilados, y que son bioactivados por estas enzimas ante la presencia de un patógeno.

Por último, con respecto a interacciones entre pares de patógenos, se hallaron 4 regiones (bins 2.05, 2.06, 2.09 y 2.10) de resistencia múltiple a ambas especies de *Fusarium*, 2 regiones (bins 2.05 y 2.09) de resistencia común entre FV y UM y 3 regiones (bins 2.05, 2.09 y 5.03) de resistencia común para FG y UM. Es a destacar el bin 2.10, donde se ubica la región génica que codifica para la proteína pangloss2 (PAN2) (Sutimantanapi et al., 2014). PAN2 es un receptor tipo RLK (receptor *like kinase*) con repeticiones ricas en leucina (LRR *Leucine-rich repeat receptor*), una de las familias de receptores más abundantes y mejor caracterizadas en plantas. PAN2 posee un dominio extracelular que percibe directamente las señales extracelulares (PAMPs, respuestas inmunes PTI del inglés *pathogen triggered immunity*), un dominio transmembrana, y un dominio quinasa citoplasmático que transduce estas señales dentro de la célula. Sutimantanapi et al. (2014) postulan que PAN2 podría estar implicado en el desarrollo estomático y por ende relacionado a mecanismos de defensa mediado por la regulación de la apertura estomática. Es decir que, en un sentido más amplio, este gen candidato también abre la posibilidad de pensar en una resistencia que incluya respuesta a estreses abióticos (*i.e* sequía) través de la regulación de la apertura estomática.

Finalmente, sería de gran importancia seguir estudiando con mayor detalle la función de los genes que se encuentran dentro de estas regiones de resistencia múltiple, para un mejor entendimiento de los mecanismos de defensa y para aportar a la búsqueda y desarrollo de genotipos de maíz con resistencia a múltiples enfermedades.

Conclusiones

Dentro del germoplasma estudiado, hallamos una amplia variabilidad fenotípica y genotípica para resistencia a FV, FG y UM, que nos permitió llevar a cabo un estudio GWAS. En este análisis, se identificaron 21 segmentos cromosómicos asociados a las distintas enfermedades evaluadas, a través de 49 SNPs significativos. Dos de estos segmentos cromosómicos son comunes a las tres enfermedades consideradas, es decir son regiones MDR (bins 2.05 y 2.09). Los resultados presentados proporcionan información sumamente valiosa para llevar adelante un mapeo más fino de genes y regiones candidatas, con miras a profundizar el entendimiento de los mecanismos moleculares asociados a la MDR de enfermedades de espiga en este y otros paneles de germoplasma de maíz. Este trabajo explora modelos y rutinas de análisis por primera vez para estas variables y para este set de datos proveniente de germoplasma argentino del Programa de Mejoramiento Genético de Maíz de la EEA INTA Pergamino. El mismo aporta datos inéditos y desconocidos hasta ahora no solo en cuanto a regiones candidatas sino también arroja luz sobre la estructuración de este panel de genotipos y sus valores de DL.

Apoyo financiero

Programa de Promoción de la Investigación Científica de la UNNOBA- EXP 2691/2019 Resol. N° 1002/2019; Proyecto INTA 2019-PE-E6-I114-072.

Agradecimientos

Los autores agradecen al grupo de Mejoramiento de Maíz de la EEA INTA Pergamino por su participación en las actividades de campo, por la información provista y por su colaboración en la realización del presente trabajo.

Este trabajo formó parte de la tesina de grado de LDM.

Referencias bibliográficas

Bradbury PJ, Zhang Z, Koon DE, Casstevens TM, Ramdoss Y, Buckler ES. 2007. TASSEL: Software for association mapping of complex traits in diverse samples *Bioinformatics* 23(19):2633–5.

Di Rienzo JA, Casanoves F, Balzarini MG, Gonzalez L, Tablada M, Robledo C.W. InfoStat versión 2015. Grupo InfoStat, FCA, Universidad Nacional de Córdoba, Argentina. URL <http://www.infostat.com.ar>.

Kistner MB, Nazar L, Montenegro .D, Cervigni GDL, Galdeano E, Iglesias J. 2022. Detecting sources of resistance to multiple diseases in Argentine maize (*Zea mays* L.) germplasm. *Euphytica* 218:48.

Maschietto V, Colombi C, Pirona R, Pea G, Strozzi F, Marocco A, Rossini L, Lanubile A. 2017. QTL mapping and candidate genes for resistance to *Fusarium* ear rot and fumonisin contamination in maize. *BMC Plant Biology* 17.

Masiello M, Somma S, Ghionna V, Logrieco A.F. 2019. In vitro and in field response of different fungicides against *Aspergillus flavus* and *Fusarium* species causing ear rot disease of maize. *Toxins* 11(11).

Olmos SE, Delucchi C, Ravera M, Negri ME, Mandolino C, Eyhéabide GH. 2014. Genetic relatedness and population structure within the public Argentinean collection of maize inbred lines. *Maydica* 59(1): 16–31.

R Core Team. 2021. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>

Sutimantanapi D, Pater D, Smith LG. 2014. Divergent roles for maize pan1 and pan2 receptor-like proteins in cytokinesis and cell morphogenesis. *Plant Physiology* 164: 1905–191.

Wiesner-Hanks T, Nelson R. 2016. Multiple disease resistance in plants. *Annual Review of Phytopathology* 54: 229–52.

Wisser RJ, Balint-Kurti PJ, Nelson RJ. 2006. The genetic architecture of disease resistance in maize: A synthesis of published studies. *Phytopathology* 96:120-129.