



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





METAANÁLISIS DE TRANSCRIPTOMAS DE MAÍZ (*ZEA MAYS* L.) EN RESPUESTA A *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*, *F. GRAMINEARUM* Y *USTILAGO MAYDIS*

Peñas Ballesteros A^{1,2}; Baricalla AA^{1,3}; Iglesias, J^{2,3*}

¹ Centro de Investigaciones y Transferencia del Noroeste de la provincia de Buenos Aires CITNOBA (UNNOBA - UNSAdA - CONICET), Monteagudo 2772, Pergamino, Buenos Aires, Argentina

² Instituto Nacional de Tecnología Agropecuaria-Estación Experimental Pergamino (INTA-EEA Pergamino), Av. Frondizi (Ruta 32) Km 4,5, Pergamino, Buenos Aires, Argentina

³ Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires (UNNOBA), Monteagudo 2772, Pergamino, Buenos Aires, Argentina

* iglesias.juliana@inta.gob.ar

META-ANALYSIS OF MAIZE (*ZEA MAYS* L.) TRANSCRIPTOMES IN RESPONSE TO *FUSARIUM VERTICILLIOIDES*, *F. GRAMINEARUM* AND *USTILAGO MAYDIS*

Abstract

Maize (*Zea mays* L.) ears are affected by several pathogens that impact grain yield and quality, such as *Fusarium verticillioides* (necrotroph), *F. graminearum* (hemibiotroph) and *Ustilago maydis* (biotroph). Even though there is a large volume of transcriptomic data available at NCBI regarding maize responses to these pathogens, studies on multiple disease resistance are lacking. In this work, we aimed at identifying key genes and metabolic pathways involved in the multiple disease response of maize against the aforementioned ear rot pathogens. We analyzed RNA-seq data from four transcriptomic studies that evaluated resistant and/vs. susceptible maize genotypes under artificial inoculation at 48 and 72 hours after infection with each pathogen. The results obtained showed that resistant genotypes differentially overexpressed 1539 genes involved in the biosynthesis of phenylpropanoids, monoterpenoids and other secondary metabolites, while the susceptible genotypes differentially overexpressed 1356 genes associated with the photosynthesis pathway. This finding highlights that resistance leads to changes in secondary metabolism (specialized metabolites) based on the induction of defense programs while susceptibility leads to changes in primary metabolism which affect growth and development of the plant. These results will contribute towards our understanding of the mechanisms underlying multiple disease resistance to maize ear rot pathogens with different lifestyles.

Palabras claves

Interacción planta-patógeno, Expresión génica diferencial, Resistencia a múltiples enfermedades, Fenilpropanoides, Fenilalanina amonio liasa (PAL)

Keywords

Plant-pathogen Interaction, Differential gene expression, Multiple Disease Resistance, Phenylpropanoids, Phenylalanine ammonia lyase (PAL)



Introducción

La población mundial está en constante crecimiento, lo cual representa un desafío para el sistema agroproductivo, dado que es necesario satisfacer el inevitable incremento en la demanda de alimentos. El cultivo de maíz (*Zea mays L.*) posee un gran volumen de producción a nivel mundial y nacional, destinado principalmente a la alimentación humana y animal, pero se ve afectado por diversos patógenos que impactan negativamente sobre el rendimiento y la calidad de los granos, limitando la producción del cultivo. Entre los patógenos más importantes que infectan la espiga de maíz, órgano involucrado directamente en el rendimiento, se destacan *Fusarium verticillioides* y *F. graminearum*, causantes de contaminación de los granos con micotoxinas perjudiciales para la salud humana y animal, y *Ustilago maydis* causante de tumores en los tejidos de los granos.

Debido al impacto negativo que tienen las enfermedades causadas por dichos patógenos, surge la necesidad de desarrollar y aplicar estrategias que permitan mitigar los efectos nocivos sobre el cultivo. Dado que uno de los principales factores involucrados en la progresión de las enfermedades es el nivel de resistencia y/o susceptibilidad de los genotipos de maíz, resulta indispensable el desarrollo de resistencia genética a través de programas de mejoramiento. Un atributo necesario para incorporar mediante estos programas es la resistencia a múltiples enfermedades (MDR, del inglés: *Multiple Disease Resistance*), ya que implicaría la incorporación de resistencia efectiva a más de un patógeno. Consecuentemente, es importante conocer la naturaleza genética que controla la MDR y los mecanismos asociados para diseñar estrategias apropiadas de mejoramiento.

No obstante, surge un gran inconveniente al momento de identificar dichos mecanismos: los patógenos pueden presentar distintos estilos de patogénesis y, por lo tanto, su interacción con los mecanismos de defensa del hospedante tiende a ser diferente. Particularmente, *Fusarium verticillioides*, *F. graminearum* y *Ustilago maydis* presentan distintos mecanismos para nutrirse, infectar y producir síntomas. Por un lado, *Fusarium verticillioides* es un patógeno necrótrofo, es decir que requiere matar las células del hospedante para poder colonizar tejido muerto y, para lograrlo, produce enzimas líticas y toxinas que permiten la desintegración celular y la colonización del espacio intracelular, sin generar estructuras especializadas que le permitan el ingreso al hospedante. Por otro lado, *Fusarium graminearum* es un patógeno hemibiótrofo, dado que inicia la colonización del hospedante de manera biotrófica e intercelular, colonizando tejido vivo del hospedante. Luego de un periodo de tiempo, este patógeno comienza a comportarse como necrótrofo en una fase que implica mayor virulencia y agresividad, donde comienza a crecer de forma intracelular y genera muerte celular. Finalmente, *Ustilago maydis* es un patógeno biótrofo, es decir que requiere colonizar tejido vivo para su supervivencia. Este patógeno comienza con el crecimiento de hifas de manera intracelular para la obtención de nutrientes, donde combina presión de turgencia y enzimas líticas para romper la pared celular, y una vez que logra establecer una interacción directa con el hospedante, comienza la colonización de manera intercelular. Dadas estas particularidades resulta sumamente desafiante, así como necesaria, la identificación de los mecanismos que confieren resistencia frente a estos patógenos a pesar de que estos presenten diferentes estilos de patogénesis.

Debido a la importancia de las enfermedades causadas por estos tres patógenos que afectan al cultivo de maíz, se han llevado a cabo numerosos estudios donde se evalúa el impacto de los mismos sobre la expresión génica del cultivo, a modo de identificar las posibles vías metabólicas implicadas en la resistencia a dichos patógenos. En consecuencia, en la actualidad, se pueden encontrar un gran



volumen de datos transcriptómicos públicamente disponibles provenientes de estudios donde se evalúa la respuesta del cultivo de maíz a estos patógenos. Sin embargo, en esos estudios, solo se ha evaluado el efecto de un patógeno a la vez, sin evaluarse el impacto de varios patógenos en forma conjunta. Teniendo en cuenta este detalle, el objetivo de este trabajo fue identificar los genes y las vías metabólicas comunes implicados en las respuestas de resistencia o susceptibilidad de líneas de maíz frente a *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum* y *Ustilago maydis* a partir del análisis integral y comparativo de datos transcriptómicos disponibles en bases de datos públicas.

Materiales y métodos

Se seleccionaron estudios transcriptómicos públicamente disponibles donde se habían evaluado genotipos resistentes y susceptibles inoculados con *Fusarium verticillioides*, *Fusarium graminearum* y *Ustilago maydis* entre 48 y 72 horas después de la infección. Para la selección de los proyectos, se tuvo en cuenta que los genotipos hubieran sido cultivados, inoculados, muestreados y evaluados en condiciones similares. Se utilizaron datos extraídos de una totalidad de 4 proyectos provenientes de NCBI y se seleccionaron 3 genotipos: B73 (susceptible para *Fusarium verticillioides* y *F. graminearum* y resistente para *Ustilago maydis*), CO441 (resistente para *Fusarium verticillioides* y *F. graminearum*) y Oh43 (susceptible para *Ustilago maydis*). Se obtuvieron los datos de RNA-seq asociados a esos estudios y se evaluó la calidad de la secuenciación para asegurar que se cumplieran los estándares de calidad. Los datos que no cumplieron con los estándares de calidad fueron procesados con Trim galore. Luego, se procedió con el mapeo de los transcritos al genoma de maíz en su última versión disponible (v5, Hufford et al., 2021) mediante HISAT2 y los transcritos mapeados en regiones exónicas codificantes se cuantificaron mediante *featureCounts*. Los conteos de genes resultantes se utilizaron para la determinación de expresión génica diferencial mediante edgeR. Los datos se ajustaron mediante un modelo logarítmico lineal generalizado binomial negativo de casi verosimilitud y se planteó un diseño donde el primer factor clasificaba a las muestras según si provenían de genotipos resistentes o susceptibles y el segundo factor estaba asociado al proyecto de NCBI de donde procedían los datos transcriptómicos. Finalmente, mediante el contraste de genotipos resistentes y susceptibles, se obtuvo una lista de genes que modificaron su expresión significativamente entre ambas clases de genotipos. Este listado fue vinculado a términos ontológicos mediante la suite g:profiler para la identificación de vías metabólicas asociadas. Por último, las vías metabólicas que estaban significativamente representadas se graficaron en *PathView*.

Resultados

A partir del contraste de genotipos resistentes contra susceptibles, se encontró expresión diferencial de un total de 2895 genes para los genotipos evaluados. Los genotipos resistentes mostraron una sobreexpresión de 1539 genes en común en respuesta a los tres patógenos, mientras que, para el caso de los genotipos susceptibles, se detectó sobreexpresión de 1356 genes compartidos ($p.value < 0.001$; $FDR < 0,001$) (Figura 1).

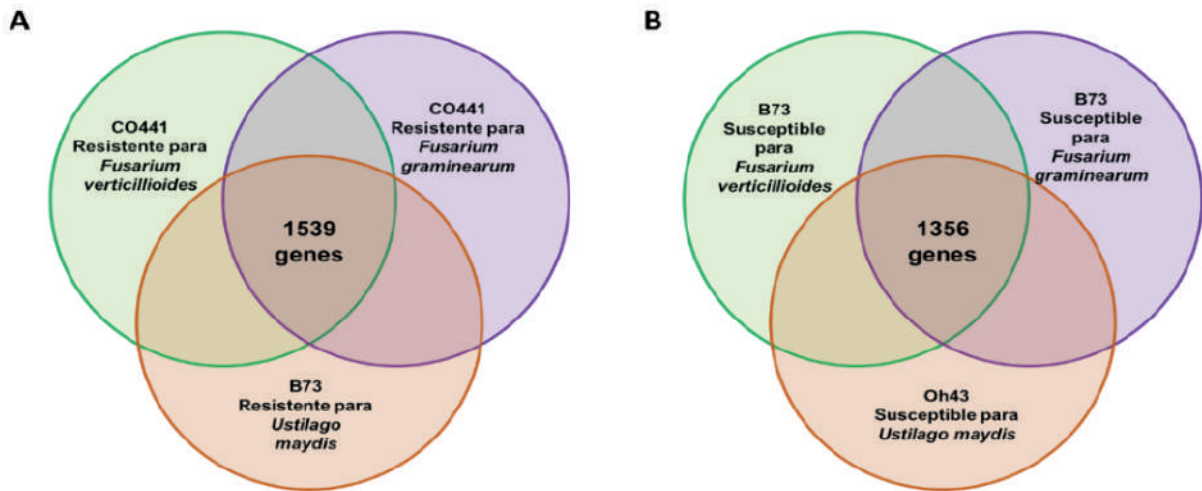
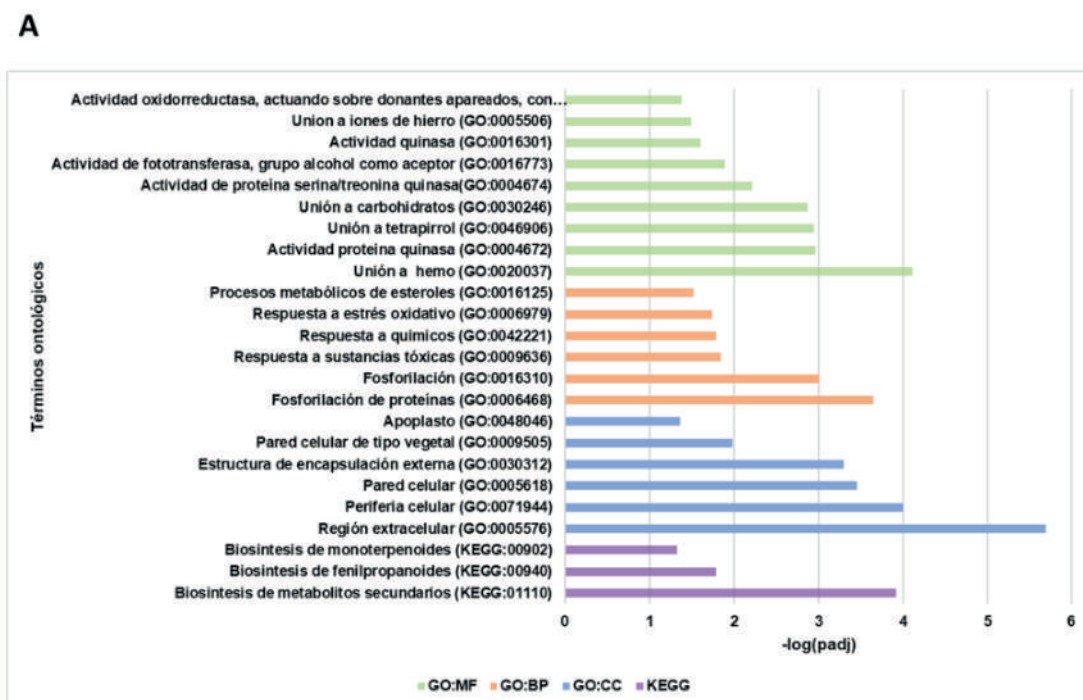


Figura 1. Representación gráfica mediante un diagrama de Venn de los genes diferencialmente sobreexpresados en común para los genotipos resistentes (A) y genotipos susceptibles (B) en respuesta a *Fusarium verticillioides*, *F. graminearum* y *Ustilago maydis*.

Por un lado, los genes sobreexpresados en los genotipos resistentes estuvieron asociados a las vías de biosíntesis de fenilpropanoides y monoterpénoides. Además, el enriquecimiento de términos ontológicos mostró la asociación de estos genes con las respuestas a estrés oxidativo y sustancias tóxicas, fosforilación de proteínas, modificaciones en la pared celular y procesos metabólicos de esteroides (Figura 2A)

Por otro lado, los genes sobreexpresados en genotipos susceptibles se vincularon con la vía metabólica de la fotosíntesis. Asimismo, el enriquecimiento de términos ontológicos asoció estos genes con actividades de óxido-reducción e isomerasa, metabolismo de ácidos orgánicos y la generación de metabolitos y energía (Figura 2B).





B

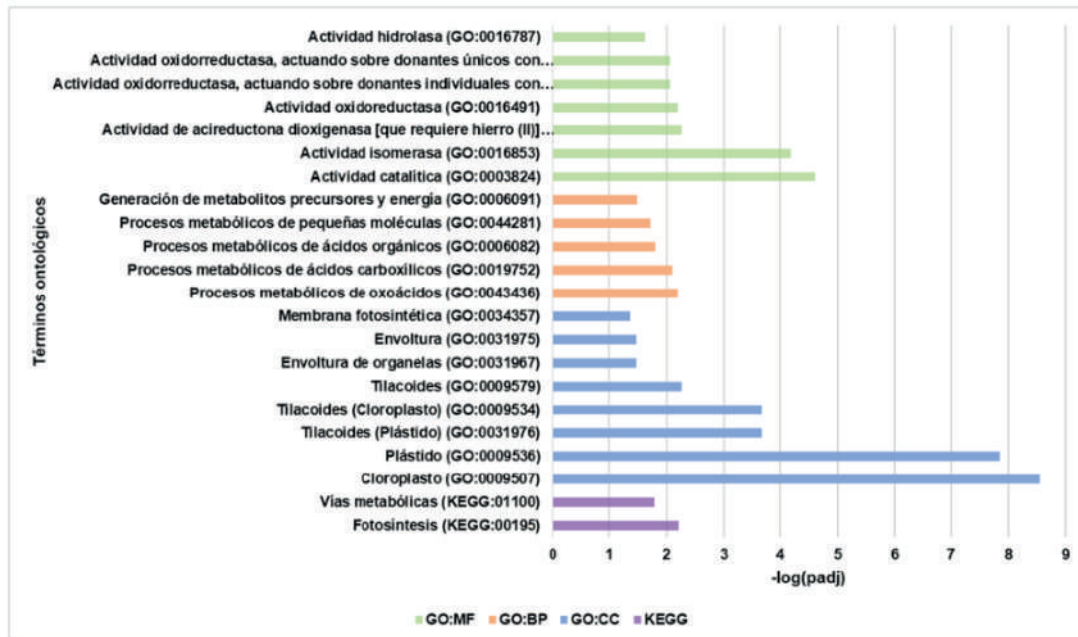


Figura 2. Enriquecimiento de términos ontológicos. En el eje y, se pueden observar los términos ontológicos enriquecidos y en el eje x el logaritmo negativo en base 10 de los valores P de enriquecimiento ajustados ($-\log(\text{padj})$) de esos términos para los genotipos resistentes (A) y para los susceptibles (B). Se pueden observar los términos ontológicos asociados a Funciones moleculares (GO:MF) en verde, Procesos Biológicos (GO:BP) en naranja, Componentes celulares (GO:CC) en azul y Vías de señalización biológicas (KEGG) en violeta.

La vía de fenilpropanoides (Figura 3) se encontró fuertemente asociada a los genes sobreexpresados en los genotipos resistentes, mostrando sobreexpresión de una mayor cantidad de genes involucrados en la vía, incluida la enzima fenilalanina amonio liasa (PAL, EC 4.3.1.24), enzima clave que da inicio a la síntesis de fenilpropanoides y que tiene una participación activa en los procesos que suceden en la pared celular (Bonawitz & Chapple, 2010). En tanto que, los genotipos susceptibles sobreexpresaron algunos genes de esta vía, pero no se encontró sobreexpresión de PAL.

La vía de fotosíntesis (Figura 4) se encontró fuertemente asociada a los genes sobreexpresados en los genotipos susceptibles, sin encontrarse sobreexpresión de estos genes en genotipos resistentes.

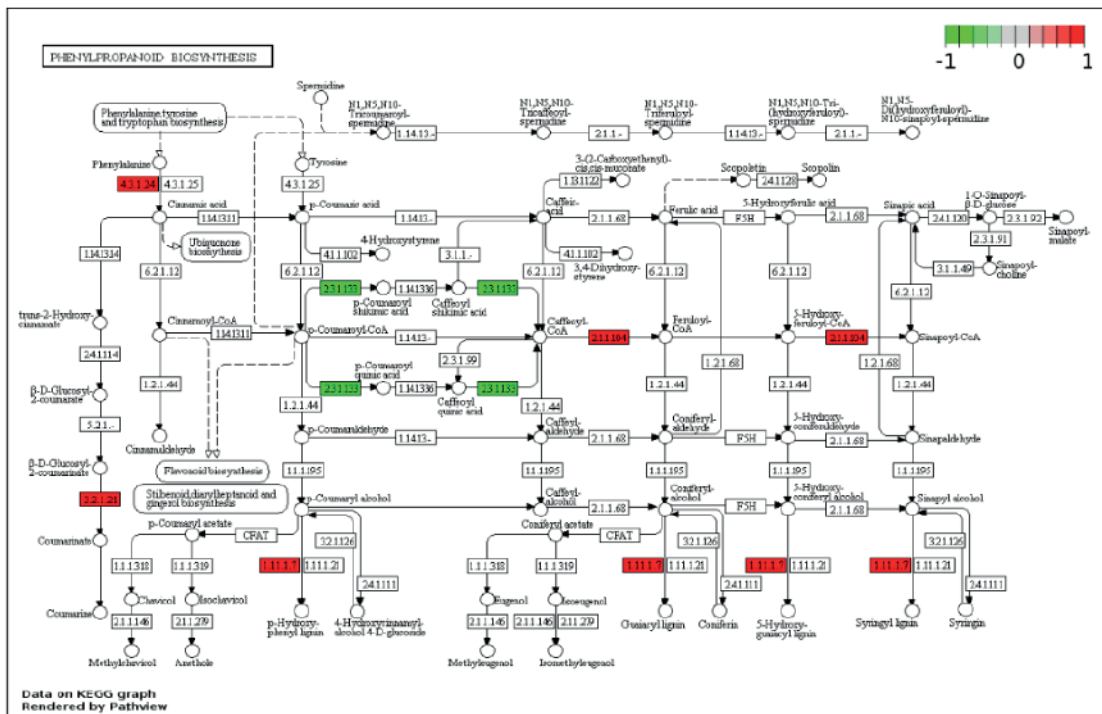


Figura 3. Vía de biosíntesis de fenilpropanoides. En rojo, se observan los genes sobreexpresados en genotipos resistentes, mientras que los genes sobreexpresados en genotipos susceptibles se observan en verde.

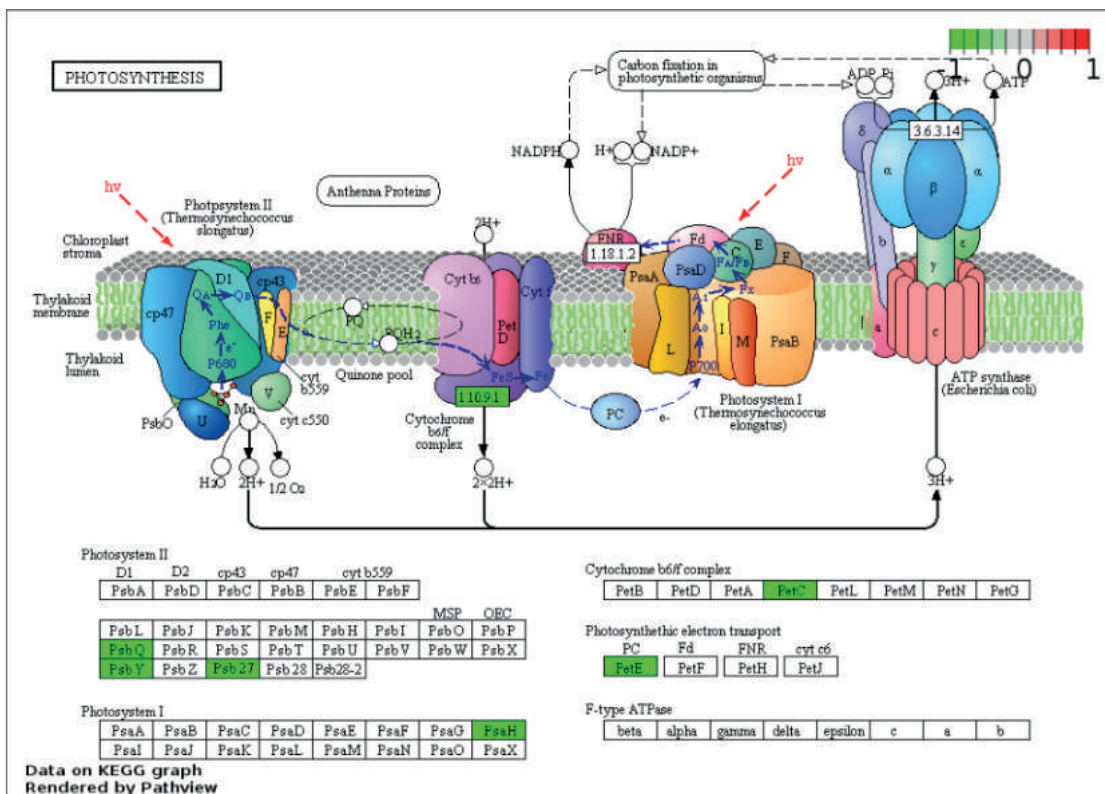


Figura 4. Vía metabólica de la fotosíntesis. En verde, se observan los genes sobreexpresados en plantas susceptibles.



Discusiones

En primer lugar, la cantidad de genes que se expresaron diferencialmente en ambas condiciones se encuentra en un rango similar de genes diferencialmente expresados a los reportados en los estudios previos de donde se extrajeron los datos transcriptómicos. Asimismo, la cantidad de genes encontrados resulta óptima para los estudios de enriquecimiento por términos ontológicos.

En este trabajo, se observó que los genotipos resistentes presentaron sobreexpresión diferencial de genes en común en respuesta a los tres patógenos en estudio. Particularmente, se encontró una fuerte representación de los genes involucrados en la vía de fenilpropanoides. A partir de esta vía, se obtienen fenilpropanoides, compuestos con una potente actividad antifúngica y un rol activo en las respuestas de defensa, y derivados complejos que fortalecen las estructuras de la pared celular. Los resultados obtenidos nos indican que los genotipos resistentes tendrían una expresión más activa de las enzimas que intervienen en la síntesis de compuestos involucrados en el fortalecimiento de la pared celular, dificultando el acceso de patógenos, y en la síntesis de fenilpropanoides que imposibilitarían el crecimiento de los mismos, contribuyendo a la resistencia de estos genotipos a múltiples patógenos. Estos resultados concuerdan con estudios previos, realizados en germoplasma de maíz argentino, donde se demostró que mayores niveles de expresión de la fenilalanina amonio liasa (PAL), un mayor contenido de fenilpropanoides y un mayor espesor del pericarpio estarían involucrados en la resistencia a *Fusarium verticillioides* y *F. graminearum* (Avalos Salemme, 2021; Giomi et al., 2016; Giomi, 2015; Campos-Bermudez et al., 2013), indicando la importancia de esta vía en los mecanismos de defensa que confieren resistencia a diversos patógenos en germoplasma argentino y de otras procedencias. Estos resultados son sumamente importantes debido a que los patógenos evaluados presentan distintos estilos de patogénesis, por lo que esta vía podría estar involucrada en los mecanismos asociados a la resistencia a múltiples enfermedades.

Del mismo modo, los genotipos susceptibles presentaron sobreexpresión diferencial de genes en común en respuesta a los tres patógenos. Fundamentalmente, dichos genes estuvieron involucrados en la vía de la fotosíntesis. Por un lado, esto podría deberse a que los mecanismos de defensa exitosos se basan en el reconocimiento temprano de los patógenos y la rápida activación de las vías necesarias para las respuestas de defensa. Una vez que las plantas detectan la invasión del patógeno, pueden inhibir la fotosíntesis para asignar más energía a la respuesta inmune. Se podría pensar que los genotipos resistentes requieren grandes cantidades de energía debido a la rápida activación de la respuesta de defensa, impactando negativamente en la fotosíntesis, mecanismo que no sucedería en etapas tempranas de la infección en los genotipos susceptibles. Por otro lado, los patógenos pueden manipular a las plantas hospedantes para la obtención de nutrientes (azúcares, ácidos orgánicos, entre otros) para apoyar su proliferación activa, llevando a la progresión de la enfermedad. El estudio de los mecanismos asociados a la susceptibilidad es de gran importancia, debido a que la determinación de la susceptibilidad de una planta no es un proceso pasivo, ya que, muchas veces, se requiere de la cooperación del hospedante para llevar a cabo la enfermedad, teniendo un impacto fundamental en la interacción planta-patógeno y el desarrollo de la enfermedad. Dado que los genes que participan en los mecanismos que confieren susceptibilidad son principalmente indispensables para el desarrollo normal de las plantas, el estudio de los mecanismos involucrados representa un gran desafío.



Conclusión

Los resultados obtenidos remarcan la importancia de la vía de biosíntesis de fenilpropanoides y la vía metabólica de la fotosíntesis en los mecanismos que definen las respuestas de resistencia y/o susceptibilidad del cultivo de maíz y que, en definitiva, determinarán el transcurso de la enfermedad. Estos resultados contribuyen a una mayor comprensión de la arquitectura genética que controla la resistencia a múltiples enfermedades, siendo sumamente importantes para el desarrollo de germoplasma resistente y establecen las bases para futuras investigaciones que permitan abordar el estudio de los mecanismos involucrados en la resistencia a múltiples enfermedades del cultivo de maíz mediante el análisis integral y comparativo de datos transcriptómicos disponibles.

Apoyo financiero

El presente análisis forma parte de la tesis de Maestría en Bioinformática y Biología de Sistemas de Andrea Peñas Ballesteros

Proyectos INTA: INTA 2019-PE-E6-I114-001
INTA 2019-PE-E6-I128-001



Referencias bibliográficas

Avalos Salemme, G. A. (2021). Fenotipado de líneas de maíz por caracteres asociados a la resistencia a las podredumbres de espigas causadas por *Fusarium* y *Gibberella*. Tesis de grado para optar por el título de Ingeniero Agrónomo, Universidad Nacional del Noroeste de la provincia de Buenos Aires. 42 pp.

Bonawitz, N. D.; & Chapple, C. (2010). The genetics of lignin biosynthesis: connecting genotype to phenotype. *Annual review of genetics*, 44, 337-363.

Campos-Bermudez, V. A.; Fauguel, C. M.; Tronconi, M. A.; Casati, P.; Presello, D. A.; & Andreo, C. S. (2013). Transcriptional and metabolic changes associated to the infection by *Fusarium verticillioides* in maize inbreds with contrasting ear rot resistance. *PLoS One*, 8(4), e61580.

Giomi, GM. (2015). Mapeo de QTLs asociados a componentes de resistencia a *Fusarium* spp. en grano de maíz. Tesis Doctoral, Universidad Nacional de Rosario, Facultad de Ciencias Agrarias. 84 pp.

Giomi, G. M.; Kreff, E. D.; Iglesias, J.; Fauguel, C. M.; Fernandez, M.; Oviedo, M. S.; & Presello, D. A. (2016). Quantitative trait loci for *Fusarium* and *Gibberella* ear rot resistance in Argentinian maize germplasm. *Euphytica*, 211(3), 287-294.

Hufford M. B.; Seetharam A. S.; Woodhouse M. R.; Chougule K. M.; Ou S.; Liu J.; ... & Dawe R. K. (2021). De novo assembly, annotation, and comparative analysis of 26 diverse maize genomes. *Science*, 373, 655–662.