

El objetivo más codiciado de todo fitopatólogo, es decir, de toda persona que estudia las enfermedades de plantas, es la búsqueda de los genes que determinan los caracteres más importantes de los patógenos. Estos pueden ser los genes responsables de la patogenicidad, los genes que confieren resistencia a productos químicos como fungicidas o antibióticos, o los genes que determinan la adaptación a condiciones extremas, en particular al cambio climático. Para perseguir ese tan anhelado objetivo, los fitopatólogos hemos aprovechado los avances tecnológicos tanto en el laboratorio como en computación. Hemos secuenciado genomas, transcriptomas (perfil de expresión génica de una célula o tejido en un momento determinado) y hemos analizado metabolomas y proteomas (conjunto de metabolitos y proteínas, respectivamente, producidos por una célula o tejido en un momento determinado) para descubrir los genes, proteínas o metabolitos responsables de una característica dada.



Fotografía: Jcomp



Fotografía: Drazen Zigic

Sin embargo, esto nos ha llevado a establecer listas interminables de genes, proteínas o metabolitos candidatos, guardadas en bases de datos, que esperan a ser estudiadas para que se establezca su funcionalidad. Nuestro más reciente intento por descubrir las bases genéticas de caracteres de interés es la unión de la genotipificación y la fenotipificación con la ayuda de la estadística para establecer asociaciones. Estos análisis reciben el nombre de gwas por sus siglas en inglés (Genome-Wide Association Studies), en español, estudios de asociación de todo el genoma. En este artículo explicaremos el fundamento del proceso, mostraremos algunos ejemplos y hablaremos de aplicaciones para el caso particular de nuestro laboratorio, el estudio del fitopatógeno Phytophthora infestans.

Phytophthora infestans

Phytophthora infestans es un protista que por muchos años fue considerado como un hongo por las similitudes que tiene con estos organismos. Hoy en día sabemos que este organismo pertenece al grupo de los oomicetes, un linaje relacionado con el de las algas pardas y diatomeas [1,2]. Entre los oomicetes, más de cien especies han sido reportadas como patógenos de plantas [3,4] y unas pocas han sido reportadas como patógenos de animales [5]. Este patógeno es hemibiótrofo, es decir, que, durante el ciclo de la enfermedad, el patógeno tiene dos fases; una biótrofa, durante la cual mantiene vivo a su hospedero y, luego de cuarenta y ocho horas de infección, el patógeno mata a su hospedero en la fase llamada necrótrofa [3].

Este patógeno puede reproducirse tanto sexual como asexualmente durante su ciclo de vida. En su fase asexual, *P. infestans* produce unas estructuras conocidas como esporangios que pueden producir propágulos flagelados llamados zoosporas o germinar directamente en una hifa (filamento que forma el cuerpo vegetativo de estos organismos). Estas dos formas de germinación, llamadas indirecta y directa, respectivamente, se dan dependiendo de las condiciones ambientales. Si las temperaturas son superiores a 12 °C, los esporangios germinan de forma directa, pero si las temperaturas son más bajas y la humedad relativa es alta, los esporangios liberan varias zoosporas, que podrían llevar al desarrollo de la enfermedad.

La reproducción sexual ocurre solamente cuando dos cepas diferentes, compatibles genéticamente (conocidas como A1 y A2), se encuentran y forman esporas sexuales conocidas como oosporas. Estas oosporas son el resultado de procesos de recombinación genética que además de generar variabilidad genética, le permiten al patógeno sobrevivir en el suelo por largos periodos de tiempo, incluso en condiciones ambientales adversas. Estas estructuras servirían como inóculo del patógeno en el siguiente ciclo de cultivo, lo que aumenta las posibilidades de que se desarrolle la enfermedad [6].



Phytophthora infestans Fotografía: I. Sáček

En Colombia, a la enfermedad causada por *Phytophthora infestans* la llaman gota o tizón tardío. Esta enfermedad es conocida por los efectos devastadores que ha tenido en varios cultivos y porque contribuyó a la gran hambruna de Irlanda a mediados del siglo XIX. El protista causa la enfermedad en papa, tomate y otros cultivos de la familia botánica Solanaceae.

Los impactos económicos de este patógeno son importantes, pues generan graves problemas socioeconómicos y considerables pérdidas en la producción de los cultivos en diferentes regiones del mundo [7]. Se estima que cerca del 80% de la producción puede malograrse en cada ciclo de cosecha y alrededor de 5000 millones de dólares se pierden anualmente en estos cultivos debido a la presencia del patógeno [4]. En Colombia se estima que un productor debe destinar en promedio cerca del 5% de los gastos totales de producción al control químico de la gota de la papa [8]. Dada la importancia del cultivo de papa a escala mundial, el patógeno se ha considerado uno de los principales causantes de pobreza en las regiones productoras, pues incrementa los problemas de seguridad alimentaria en todo el mundo [9].



Fuente: Rawpixel



Cultivo de papa Fotografía: Awaais

Por todo lo anterior, muchos investigadores alrededor del mundo investigan varios aspectos de este patosistema, patógeno-hospedero.

Algunos se enfocan en la búsqueda de resistencia en las plantas hospederas, otros buscan estudiar la diversidad genética del patógeno y algunos queremos entender los genes o grupos de ellos que controlan aspectos importantes del patógeno, todo esto con el fin de diseñar estrategias de manejo eficiente de las enfermedades. En el laboratorio de Micología y Fitopatología Uniandes (LAMFU) queremos entender los determinantes genéticos que controlan la resistencia o susceptibilidad del patógeno a los fungicidas, y que controlan la adaptación a temperaturas de crecimiento mayores a la temperatura óptima de crecimiento (20°C). La identificación de estos genes es determinante para poder diseñar mecanismos que contrarresten su actividad especialmente en escenarios de incremento de la resistencia a fungicidas y de cambio climático, como los que estamos enfrentando en la actualidad.

GWAS en pocas palabras

Una de las estrategias más comunes en la actualidad para la identificación de genes asociados con caracteres fenotípicos es el análisis GWAS. Como dijimos en la introducción, el GWAS tiene por objetivo buscar las asociaciones estadísticamente significativas entre regiones genómicas y fenotipos. En pocas palabras, necesitamos, por un lado, determinar el fenotipo de un grupo de cepas del patógeno y, por otro lado, determinar los genotipos de cada una de ellas.

Hablemos de fenotipificación, tal vez el concepto más fácil de entender, pero también el proceso más costoso y laborioso de hacer en el laboratorio. El fenotipo es la manifestación visible de un grupo de genes en un ambiente dado, por ejemplo, el color de una flor. En el caso particular de la resistencia y susceptibilidad a fungicidas, debemos, para cada cepa, establecer cómo es su respuesta a diferentes concentraciones del producto químico. La manera más común de determinar el fenotipo de respuesta a un fungicida es determinar el crecimiento relativo de una cepa expuesta a una concentración dada con respecto al crecimiento de la misma cepa que crece en el mismo medio, pero sin fungicida. Al final, tendremos una gran base de datos con el porcentaje de crecimiento relativo al control (medio sin fungicida) de cada cepa en cada concentración del producto, con lo que se logra así la fenotipificación.

De manera complementaria debemos determinar el genotipo de cada cepa, en un proceso que se llama genotipificación. Los genotipos son el conjunto de genes de un individuo. Idealmente, y de acuerdo con esta definición, el genotipo se determina al secuenciar completamente el genoma de cada microorganismo. El problema es que, para un estudio de GWAS, se requiere de cientos a miles de individuos para que los análisis sean lo suficientemente robustos para establecer asociaciones significativas. Secuenciar el genoma completo de cientos de organismos resultaría muy costoso y el proyecto sería inalcanzable para la mayoría de los laboratorios. Como alternativa a determinar el genoma completo en cientos de organismos, lo que se hace es utilizar marcadores genéticos que den una información amplia y aproximada del genotipo.



Síntoma en hoja de papa Phytophthora infestans Fuente: Wikipedia

Un marcador genético es una secuencia variable de ADN con una ubicación conocida o de fácil reconocimiento en el genoma. Existen varios tipos de marcadores genéticos, entre los más usados están los polimorfismos del tamaño de fragmentos de restricción (RFLPs, por sus siglas en inglés), y los polimorfismos del tamaño de fragmentos amplificados (AFLPs) [10]. La importancia de los marcadores se basa en esas pequeñas diferencias que existen en la secuencia de ADN de los organismos de una misma especie. Por tal razón, buscamos marcadores que cubran un gran porcentaje del genoma, para que aumenten las posibilidades de encontrar regiones variables entre organismos de la misma especie que, luego, podamos asociar con las diferencias en fenotipo que muestren esos mismos organismos.



Papa infectada con Phytophthora infestans Fuente: Wikipedia



Phytophthora infestans Fotografía: Wikipedia

Hoy en día, los marcadores más usados para estudios de GWAS son los polimorfismos de un solo nucleótido Vo SNPs (del inglés, Single Nucleotide Polymorphism) [10]. Gracias a los adelantos tecnológicos en secuenciación de ácidos nucleicos, hoy en día es menos costoso y muy rápido obtener pequeñas secuencias esparcidas en todo el genoma, y en las cuales podemos tratar de buscar esos polimorfismos (variaciones en el genoma entre individuos), lo que se conoce como genotipificación por secuenciación (GBS, por su sigla en inglés). Al final del proceso, tendremos una gran base de datos de pequeñas secuencias a lo largo del genoma que llamaremos el genotipo de cada individuo. Es importante en esta fase el trabajo del bioinformático, quien tiene que procesar cientos de miles de secuencias cortas por organismo y las tiene que ordenar y ubicar en el genoma de referencia para que sean comparables entre individuos.

Entonces, para este momento, el investigador tiene dos bases de datos: una para el fenotipo de cada individuo y una para el genotipo. Es ahí cuando recurrimos a la estadística para determinar qué variaciones en el genoma se asocian de manera estadísticamente significativa con las variaciones en el fenotipo. Una vez identificadas, el bioinformático se devuelve a la ubicación de las variaciones en el genoma con el fin de encontrar los genes que están cerca de esos marcadores polimórficos asociados. De esta manera, terminamos nuestro análisis con una serie de genes o de regiones en el genoma con alta probabilidad de ser los determinantes de esos caracteres que tratamos de controlar como fitopatólogos.

Aplicaciones de GWAS a la fitopatología

Los estudios de asociación han arrojado resultados muy interesantes y prometedores en el área de las enfermedades humanas, lo que permite encontrar genes previamente desconocidos, pero que son responsables de los fenotipos (caracteres de interés) [11]. En el caso de plantas, los análisis de GWAS o estudios de mapeo por asociación —como también se pueden llamar este tipo de estudios— han permitido hacer avances significativos en el mejoramiento genético, por ejemplo, la producción de plantas de maíz con niveles más elevados de betacarotenos [12]. En otro estudio, se usaron 413 genotipos de arroz de 82 países y 44100 variantes de tipo SNP para encontrar asociaciones con 34 rasgos fenotípicos involucrados en la morfología y el desarrollo de la planta y la calidad del grano entre otros [13]. En un estudio reciente, se analizaron 184 genotipos de trigo con 9503 marcadores SNP que fueron seleccionados de un total de 35153 para encontrar regiones del genoma del trigo relacionadas con la concentración de zinc y hierro y el contenido de proteína en los granos. El fin es mejorar la biofortificación del trigo y contribuir así a aumentar los aportes nutricionales de este cereal a la dieta humana [14].

En el estudio de la relación patógeno-hospedero son pocos los ejemplos que encontramos. Entre ellos, es más común encontrar estudios sobre características de la planta hospedera que sobre características del patógeno. En los últimos años, varios estudios en arroz [15], soya [16], caña [17], entre otros, se han publicado con el objetivo de encontrar genes de resistencia a diferentes patógenos. Sin embargo, algunos estudios se han publicado para el patógeno, y en ellos se busca determinar varios genes responsables de los daños que causan los patógenos a los cultivos. Al hacer una búsqueda en la página de las publicaciones periódicas de la American Phytopathological Society (APS), con la palabra clave GWAS, encontramos algunos ejemplos de estudios de asociación en patógenos de plantas. Si bien no haremos un listado detallado de cada referencia, sí es pertinente mencionar los genes que los investigadores buscan determinar: factores de virulencia y de patogenicidad; genes de agresividad; de sensibilidad a azoles (un grupo químico de fungicidas); y de producción de deoxinivalenoles.

GWAS y Phytophthora infestans

En el año 2020, publicamos el primer estudio —hasta la fecha— que intenta encontrar asociaciones significativas a escala genómica en un panel de 58 aislamientos de P. infestans de los Estados Unidos y México para tres fenotipos de relevancia para el manejo y la predicción de la enfermedad: crecimiento del micelio a temperaturas cada vez más cálidas; sensibilidad al fungicida mefenoxam; y tipo de apareamiento [18]. Se realizaron pruebas de asociación de todo el genoma para cada uno de los fenotipos, al utilizar variantes genómicas recuperadas por el método de genotipificación por secuenciación para obtener información sobre la base genómica de estos fenotipos. Como se mencionó, el tamaño de la muestra es de suma importancia para aumentar la tasa de descubrimiento de asociaciones. Sin embargo, la caracterización fenotípica con alta exactitud y precisión es costosa y requiere mucho tiempo, lo que limita el número de aislamientos que se pueden incluir en este tipo de estudios. La reproducción asexual de P. infestans permite mantener varias replicas (clones) de un genotipo en un mismo ambiente o en ambientes diferentes. Esto permitió una fenotipificación mucho más precisa ya que la cantidad de variación inducida por el medio ambiente se puede estimar y tener en cuenta en el análisis de asociación [19].

En general, estos aislamientos tuvieron tasas de crecimiento micelial óptimas a 15 °C o 20 °C. Sin embargo, dos individuos del centro de México crecieron mejor a temperaturas más altas que la mayoría de los demás y dos individuos crecieron relativamente menos a temperaturas más altas que la mayoría de los demás. Se encontró un polimorfismo de un solo nucleótido (SNP, por sus siglas en inglés) asociado con la variabilidad en el crecimiento del micelio a 20 °C; dos asociados con la variación del crecimiento del micelio a 25 °C; dos asociados con la sensibilidad al mefenoxam: y uno asociado con el tipo de apareamiento. Es curioso que los SNP asociados con la sensibilidad al mefenoxam se encontraron en una región con pocos genes, es decir, que posiblemente la variación observada para este fenotipo se deba a modificaciones de la regulación de la expresión génica, mientras que los SNP asociados con el crecimiento a las dos temperaturas y el tipo de apareamiento se encontraron en regiones más densas en genes. Lo anterior sugeriría que las variaciones observadas en estas características podrían estar directamente relacionadas con cambios en los productos de estos genes.



Phytophthora infestans Fotografía: Scot Nelson

Conclusión

El estudio de enfermedades de gran importancia, como el tizón tardío de la papa, debe abordarse teniendo en cuenta todos los actores involucrados: ambiente, planta y patógeno. En este último caso, el control de patógenos que están adaptados a varios hospederos y que tienen una gran capacidad de cambio por la posibilidad que tienen de generar muchos individuos por cada ciclo de la enfermedad es una tarea difícil, pero al entender mejor la biología del patógeno, su genética y su comportamiento, daremos saltos importantes hacia el desarrollo de nuevas estrategias de control o, por lo menos, de mitigación de daños causados por estos organismos.

Comparte este artículo



Referencias

- [1] Baldauf SL. An Overview of the Phylogeny and Diversity of Eukaryotes. J Syst Evol. 2008; 46(3): 263-273.
- [2] Kamoun S. Molecular Genetics of Pathogenic Oomycetes. Eukaryotic Cell. 2003; 2(2):191-199.
- [3] Fry W. *Phytophthora infestans*: the Plant (and R Gene) Destroyer. Mol Plant Pathol. 2008; 9(3):385-402.
- [4] Haas BJ, Kamoun S, Zody MC, Jiang RHY, Handsaker RE, Cano LM *et al.* Genome Sequence and Analysis of the Irish Potato Famine Pathogen *Phytophthora infestans*. Nature. 2009; 461(7262):393-398.
- [5] Phillips AJ, Anderson VL, Robertson EJ, Secombes CJ, Van West P. New Insights into Animal Pathogenic Oomycetes. Trends Microbiol. 2008; 16(1):13-19.
- [6] Judelson HS, Blanco FA. The Spores of *Phytophthora*: Weapons of the Plant Destroyer. Nat Rev Microbiol. 2005; 3(1):47-58.

- [7] Haverkort AJ, Boonekamp PM, Hutten R, Jacobsen E, Lotz LAP, Kessel GJT *et al.* Societal Costs of Late Blight in Potato and Prospects of Durable Resistance through Cisgenic Modification. Potato Res. 2008; 51(1):47-57.
- [8] Federación Colombiana de Productores de Papa (Fedepapa), Fondo Nacional para el Fomento de la Papa (FAFP). Boletín Regional Nacional. 2022 nov.;
 6. Disponible en: https://fedepapa.com/wp-content/uploads/2023/01/Boleti%CC%81n-Nacional.pdf
- [9] Fisher MC, Henk DA, Briggs CJ, Brownstein JS, Madoff LC, McCraw SL, *et. al.* Emerging Fungal Threats to Animal, Plant and Ecosystem Health. Nature. 2012; 484(7393):186-194.
- [10] Davey JW, Hohenlohe PA, Etter, PD, Boone JQ, Catchen JM, Blaxter ML. Genome-Wide Genetic Marker Discovery and Genotyping Using Next-Generation Sequencing. Nat Rev Genet, 2011;12: 499-510.
- [11] The Wellcome Trust Case Control Consortium. 2007. Genome-wide Association Study of 14,000 Cases of Seven Common Diseases and 3000 Shared Controls. Nature, 447:661-678.

[12] Harjes CE, Rocheford TR, Bai L, Brutnell TP, Kandianis CB, Sowinski SG, Stapleton AE, Vallabhaneni R, Williams M, *et al.* 2008. Natural Genetic Variation in Lycopene Epsilon Cyclase Tapped for Maize Biofortification. Science. 2018; 319(5861):330-333.

[13] Zhao K, Tung C-W, Elzenga GC, Wright MH, Price AH, Norton GJ, *et al.* Genome-wide Association Mapping Reveals a Rich Genetic Architecture of Complex Traits in Oryza sativa. Nat Commun. 2011; 2:467.

[14] Rathan ND, Krishna H, Ellur RK, Sehgal D, Govindan V, Ahlawat AK, Krishnappa G, Jaiswal JP, Singh JB, Sv S, Ambati D, *et. al.* Genome-wide Association Study Identifies Loci and Candidate Genes for Grain Micronutrients and Quality Traits in Wheat (Triticum aestivum L.). Sci Rep. 2022;12(1):7037.

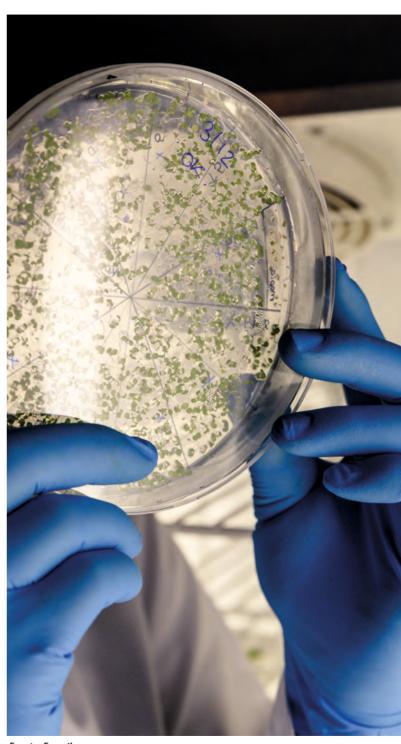
[15] Mgonja EM, Balimponya EG, Kang H, Bellizzi M, Park CH, Li Y, *et. al.* Genome-Wide Association Mapping of Rice Resistance Genes Against *Magnaporthe oryzae* Isolates from Four African Countries. Phytopathology. 2016; 106(11):1359-1365.

[16] Chang HX, Lipka AE, Domier LL, Hartman GL. Characterization of Disease Resistance Loci in the USDA Soybean Germplasm Collection Using Genome-Wide Association Studies. Phytopathology. 2016;106(10):1139-1151.

[17] Yang X, Sood S, Luo Z, Todd J, Wang J. 2018. Genome-Wide Association Studies Identified Resistance Loci to Orange Rust and Yellow Leaf Virus Diseases in Sugarcane (*Saccharum* Spp.). Phytopathology. 2019; 109(4):623-631.

[18] Ayala-Usma DA, Danies G, Myers K, Bond MO, Romero-Navarro JA, Judelson HS, *et. al.* Genome-Wide Association Study Identifies Single Nucleotide Polymorphism Markers Associated with Mycelial Growth (at 15, 20, and 25°C), Mefenoxam Resistance, and Mating Type in Phytophthora infestans. Phytopathology. 2020; 110(4): 822-833.

[19] Ingvarsson PK, Street NR. Association Genetics of Complex Traits in Plants. New Phytologist. 2011;189:909-922.



Fuente: Freepik