



Sociedad
Española
de **Ciencias**
Hortícolas

90

Septiembre 2022

ACTA DE HORTICULTURA

**Comunicaciones Técnicas
Sociedad Española de
Ciencias Hortícolas**

**X Congreso Nacional de
Mejora Genética de Plantas**

**Editores:
Rosa Ana Malvar
Pedro Fiz Rocha**

Pontevedra, 19-22 de septiembre 2022

32. Identificación de zonas del genoma relacionadas con la susceptibilidad a la infección por *Monilinia fructicola* en una colección de variedades locales de melocotón mediante análisis de asociación (GWAS)

Celia M. Cantin^{1,2*}, Jorge Más-Gómez³, Juan Barriuso⁴, Pedro J. Martínez-García³

¹Estación Experimental de Aula Dei-CSIC, Avda. Montañana 1005, 50059, Zaragoza

²Unidad de Hortofruticultura, CITA, Avda. Montañana 930, 50059, Zaragoza

³Centro de Edafología y Biología Aplicada del Segura (CEBAS), CSIC. Murcia.

⁴Departamento de Ciencias Agrarias y del Medio Natural, Universidad de Zaragoza

*Autor para correspondencia: cmcantin@eead.csic.es

Palabras clave: Monilia, germoplasma, calidad de fruto, patología postcosecha.

RESUMEN

En este trabajo, enmarcado dentro de los proyectos nacional RTI2018-094176-R-C31 y C32, se ha llevado a cabo una evaluación de la susceptibilidad a *Monilinia fructicola* (G. Winter) Honey, en 85 cultivares españoles de melocotón (*Prunus persica* L., Batsch) de la Colección Nacional de Referencia del CITA de Aragón (Zaragoza). Los principales objetivos de este trabajo son la caracterización del material local existente en esta colección, la identificación de fuentes de tolerancia y atributos de calidad del fruto de interés, así como avanzar en la comprensión de los factores implicados en la susceptibilidad a esta patología postcosecha. Los resultados obtenidos en este trabajo muestran una gran variabilidad en la susceptibilidad a la infección por *M. fructicola* en el germoplasma local estudiado. Paralelamente, se ha llevado a cabo el genotipado masivo de todas las variedades estudiadas mediante la versión 2 del chip de SNPs de melocotonero de Illumina ‘peach SNP chip (9+9K)’. Una vez obtenidos los datos genotípicos y fenotípicos, el análisis de asociación del genoma completo (GWAS) nos ha permitido identificar varias zonas del genoma asociadas con el control de la susceptibilidad a la podredumbre parda por *M. fructicola*.

INTRODUCCIÓN

La podredumbre parda, causada por *Monilinia* spp. es una de las enfermedades económicamente más importantes en frutas de hueso. En España, *M. laxa* y *M. fructicola* han sido los patógenos más recurrentes desde la desaparición de *M. fructigena* de España en 2010. *M. fructicola* es actualmente la especie predominante en el Valle del Ebro. Se estima que la infección por podredumbre parda puede causar la pérdida de más del 60% de la cosecha (Villarino et al., 2016), lo que representa enormes pérdidas económicas para los productores.

A pesar de que la utilización de fungicidas es actualmente la estrategia de control más utilizada, la tolerancia o la susceptibilidad reducida es la estrategia más segura y sostenible para el medio ambiente para reducir la incidencia de esta y otras fisiopatías fúngicas en frutales. En el caso de podredumbre parda, se ha observado cierto grado de tolerancia frente a *Monilinia* spp. en la variedad local brasileña ‘Bolinha’, así como en algunas selecciones avanzadas (Martínez-García et al., 2013).

Sin embargo, ni los mecanismos de tolerancia a la podredumbre parda ni su control genético están dilucidados. Estudios previos han relacionado los altos niveles de fenoles y la actividad de la enzima polifenol oxidasa, así como cutículas más gruesas con una menor

susceptibilidad a *Monilinia* spp. (Gradziel et al., 2003; Villarino et al., 2013). Así mismo, estudios previos han descrito la resistencia/susceptibilidad a podredumbre parda como un carácter poligénico de naturaleza cuantitativa (Martínez-García et al., 2013; Baró-Montel et al., 2019), y se han identificado QTLs y genes candidatos en distintas zonas del genoma asociados con este carácter (Fu et al., 2021).

En este trabajo, hemos utilizado la colección de variedades de melocotonero de origen español del Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA) con el fin de analizar la tolerancia/susceptibilidad a podredumbre parda de este material, así como un análisis de asociación del genoma completo (GWAS), con el fin de identificar las zonas del genoma asociadas con este carácter.

MATERIAL Y MÉTODOS

Las evaluaciones se llevaron a cabo durante dos campañas (2019-2020) utilizando 85 cultivares (82 españoles + 3 extranjeros; 2 árboles por cultivar) de la colección nacional de melocotonero del CITA (Zaragoza). La colección consta de 12 cultivares ‘non-melting’ y 73 ‘non-melting, de los cuales 7 son paraguayos, 2 nectarinas y 76 melocotones, 26 de carne blanca y 59 de carne amarilla. Los árboles se plantaron en 2010, injertados sobre el híbrido melocotón x almendro 'Garnem'.

Los frutos fueron cosechados en madurez comercial. La susceptibilidad del fruto a la infección por *Monilinia fructicola* (Winter) Honey se evaluó mediante inoculación controlada. La cepa utilizada en este estudio (CPMC3) fue proporcionada por el grupo de Patología Postcollita del IRTA (Lleida, Cataluña, España). Para las inoculaciones se usaron veinte frutos sin defectos de cada árbol y madurez similar. La inoculación sin herida se realizó siguiendo el protocolo de Martínez-García et al. (2013). Los diámetros de las lesiones (mm) se registraron 5 días después de la inoculación y tras incubación a 20 °C en oscuridad y alta humedad (100%). Para cada variedad se calculó el índice de severidad de la enfermedad (DSI) siguiendo el protocolo de Fu et al., (2021) con modificaciones, y se promedió para los dos árboles por variedad.

Se genotiparon 85 accesiones de melocotonero de la colección nacional con el nuevo chip de SNPs de alta densidad (9+9K). Las lecturas del chip fueron procesadas en GenomeStudio v.2.0.5. (Illumina Inc., San Diego, CA, EEUU) y se filtraron los SNPs en ASSiST v1.02 y se eliminaron aquellos SNPs con una frecuencia del alelo menos común (MAF) inferior al 5%. Para el estudio de asociación de genoma completo (GWAS) se utilizaron 3 datasets (2019, 2020 y la media de ambos años). Para los análisis se utilizaron los paquetes de R “GAPIT” v.3.1. (Lipka et al., 2012) y “mrMLM” v.4.0 (Zhang et al., 2020). Se emplearon los modelos “single-locus” GLM y MLM, los modelos “multi-locus” MLMM, BLINK y FarmCPU del paquete GAPIT, y mrMLM, FASTmrMLM, FASTmrEMMA, pLARM EBB, pKWmEB, ISIS y EM-BLASSO del paquete mrMLM. En todos los modelos se utilizó una PCA de la estructura de población calculada en GAPIT/mrMLM como covariable. Las asociaciones significativas marcador-carácter se determinaron utilizando la corrección de Bonferroni con $\alpha = 0.05$ en el caso de los análisis realizados en GAPIT y con un LOD score ≥ 3 en los análisis realizados en mrMLM. Se consideraron como asociaciones fiables aquellas detectadas por al menos dos modelos y/o dos datasets. Finalmente, se realizó una búsqueda de genes candidatos alrededor de las asociaciones fiables (+50 Kb) y de su enriquecimiento funcional a través de un script de creación propia utilizando el genoma de referencia *Prunus persica* v2.1 (https://www.rosaceae.org/species/prunus_persica/genome_v2.0.a1) y sus anotaciones funcionales con InterProScan, “Gene Ontology” y “KEGG Pathways and Orthologs”.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los resultados mostraron una variabilidad significativa en la susceptibilidad a la infección por *M. fructicola* entre las variedades de melocotonero españolas estudiadas, mientras que no se observaron diferencias significativas entre distintas campañas. 'Rojo de Tudela' fue la variedad menos susceptible, junto con 'La Escola' y 'Gallur', mientras que 'Borracho de Jarque' mostró la mayor susceptibilidad, seguido de dos tipos de paraguayos. Cabe destacar que cuatro accesiones diferentes de 'Calabacero' se encontraron entre los diez cultivares más susceptibles de la colección. Los DSI obtenidos en este trabajo están en el rango de otros trabajos que trabajan con inoculación sin herida y protocolos similares (Baró-Montel et al., 2019; Martínez-García et al., 2013).

Se procesaron un total de 16,038 SNPs, de los cuales 11,119 (69.33%) se determinaron de alta calidad para su uso en el GWAS. Se utilizaron datos de DSI de 52 individuos en el set de 2019, 62 individuos en el set de 2020 y 49 en el set de la media de ambos años. Se realizó el estudio de asociación de genoma completo utilizando como corrección de Bonferroni un $p\text{-value} = 4.5 \times 10^{-6}$ para los modelos utilizados en GAPIT. A través de los distintos modelos se identificaron 9 SNPs con asociaciones significativas, distribuidos en los cromosomas 1, 3, 5 y 6 (Tabla 1). Tres de ellos se detectaron a través de 2 o más modelos y/o métodos. El SNP "Peach_AO_0100138" del cromosoma 1 fue el detectado por más métodos y datasets como significativo, estando situado en la posición 33,041,231 pb. Los autores Martínez-García et al. (2013) también detectaron dos importantes QTLs asociadas a la resistencia a *M. fructicola* en el cromosoma 1, situándose una de ellas alrededor de los 30 Mb.

La búsqueda de genes en las regiones de estos 3 SNPs identificó un total de 40 genes. El enriquecimiento funcional de estos detectó 705 anotaciones en las bases de datos identificando familias de genes relacionadas con la resistencia a enfermedades (Martínez-García et al., 2013; Fu et al., 2021). Las anotaciones funcionales revelan genes relacionados con interacciones planta-patógeno, repeticiones ricas en leucina (LRR), respuesta a estrés y modificación de la pared celular (pectinesterasas).

Este estudio ha demostrado que existe una variabilidad natural significativa en la susceptibilidad a la podredumbre parda causada por *M. fructicola*, y avanza en la comprensión de su control genético, lo que facilitará el desarrollo de herramientas valiosas para su aplicación en la selección de nuevas variedades con menor susceptibilidad a esta patología postcosecha.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo se enmarca en el proyecto RTI-2018-094176-R-C31/C32/C33, financiado por MCIN/AEI/10.13039/501100011033 y por "ERDF A way of making EUROPE". Los autores agradecen al Dr. J. M. Alonso, responsable del banco de germoplasma de melocotón del CITA, y al grupo de Patología Postcosecha del IRTA por proporcionar la cepa de *M. fructicola*.

REFERENCIAS

- Baró-Montel, N., Eduardo, I., Usall, J., Casals, C., Arús, P., Teixidó, N. and Torres, R. 2019. Exploring sources of resistance to brown rot in an interspecific almond \times peach population. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, 99(8). <https://doi.org/10.1002/jsfa.9640>
- Fu, W., da Silva Linge, C. and Gasic, K. 2021. Genome-wide association study of brown rot (*Monilinia* spp.) tolerance in peach. *Frontiers in Plant Science*, 12. <https://doi.org/10.3389/fpls.2021.635914>

Gradziel, T. M., Bostock, R. M. and Adaskaveg, J. E. 2003. Resistance to brown rot disease in peach is determined by multiple structural and biochemical components. *Acta Horticulturae*, 622. <https://doi.org/10.17660/ActaHortic.2003.622.34>

Lipka, A. E., Tian, F., Wang, Q., Peiffer, J., Li, M., Bradbury, P. J., ... and Zhang, Z., 2012. GAPIT: genome association and prediction integrated tool. *Bioinformatics*, 28(18):2397-2399.

Martínez-García, P. J., Parfitt, D. E., Bostock, R. M., Fresnedo-Ramírez, J., Vazquez-Lobo, A., Ogundiwin, E. A., Gradziel, T. M. and Crisosto, C. H. 2013. Application of genomic and quantitative genetic tools to identify candidate resistance genes for brown rot resistance in peach. *PLoS ONE*, 8(11). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0078634>.

Villarino, M., Melgarejo, P. and de Cal, A. 2016. Growth and aggressiveness factors affecting *Monilinia* spp. survival peaches. *International Journal of Food Microbiology*, 227:6–12. <https://doi.org/10.1016/j.ijfoodmicro.2016.01.023>.

Zhang, Y. W., Tamba, C. L., Wen, Y. J., Li, P., Ren, W. L., Ni, Y. L., ... and Zhang, Y. M., 2020. mrMLM v4. 0.2: an R platform for multi-locus genome-wide association studies. *Genomics, proteomics & bioinformatics*, 18(4):481-487.

TABLAS

Tabla 1. SNPs detectados como significativos en el análisis GWAS. Aquellos SNPs marcados en negrita han sido identificados por 2 o más métodos y/o 2 o más datasets.

Método	Dataset	SNP	Ch.	Posición (pb)	P.value/LOMAF	r2(%)	
FarmCPU	2019	Peach AO 0100138	1	33041231	3.13E-06	0.346153846	
MLMM	2019	Peach AO 0100138	1	33041231	1.95E-06	0.346153846	
MLMM	Media	Peach AO 0100138	1	33041231	1.36E-08	0.336734694	
FASTmrMLM	2019	Peach AO 0100138	1	33041231	5.96	0.3462	68.1545
FASTmrEMM	2019	Peach AO 0100138	1	33041231	5.4274	0.3462	50.6814
FASTmrMLM	Media	Peach AO 0100138	1	33041231	4.3778	0.3367	21.9419
FASTmrEMM	Media	Peach AO 0100138	1	33041231	7.81	0.3367	69.0521
FASTmrMLM	2020	Peach AO 0101180	1	33552391	3.6828	0.2419	2.93E-11
oLARmEB	Media	Peach AO 0123004	1	42867441	3.2745	0.3061	27.773
oLARmEB	2020	Peach AO 0123759	1	43165918	3.3074	0.2581	22.4035
Blink	2020	Peach AO 0309124	3	240372	5.62E-11	0.258064516	
MLMM	2020	Peach AO 0309124	3	240372	1.61E-08	0.258064516	
FASTmrMLM	Media	Peach AO 0309124	3	240372	4.3842	0.2449	66.1353
Blink	2020	Peach AO 0372211	3	17054689	2.17E-07	0.39516129	
SIS BLASSO	^{EN} 2020	Peach_AO_0575235	5	10891139	3.5684	0.2016	48.0644
oLARmEB	2019	Peach AO 0648336	5	15702977	3.039	0.3269	37.9605
Blink	2019	Peach AO 0648505	5	15798855	1.60E-08	0.25	
SIS BLASSO	^{EN} 2019	Peach_AO_0648505	5	15798855	6.6011	0.25	34.6598