

TRABAJOS ORIGINALES

Identificación de genes relacionados a sequía en papas nativas empleando RNA-Seq

Identification of genes related to drought in native potatoes using RNA-Seq

Yerisf Torres*, Roberto Lozano, Carlos Merino y Gisella Orjeda

Unidad de genómica, Laboratorios de Investigación y Desarrollo (LID), Universidad Peruana Cayetano Heredia. Av. Honorio Delgado 430, Urb. Ingeniería, S.M.P. Lima - Perú.

Email Yerisf Torres: yerisf.torres.a@upch.pe;

Email Roberto Lozano: roberto.lozano@upch.pe

Email Carlos Merino: carlos.merino.m@upch.pe

Email Gisella Orjeda: gisella.orjeda@upch.pe

*Autor para Correspondencia

Resumen

El reciente desarrollo del RNA-Seq, un método de secuenciación masivo en paralelo para el análisis de transcriptomas permite conocer el perfil de expresión de las plantas en respuesta a estrés de tipo abiótico y biótico. En este estudio, se secuenció el mRNA proveniente de hojas y raíces de dos variedades de papas nativas expuestas a diferentes niveles de sequía. Lecturas o *reads* de 50 pares de bases provenientes de mRNA se mapearon al genoma de papa: 75 – 82% mapearon a posiciones únicas, 6 – 14% mapearon a múltiples posiciones y 9 – 12% no mapearon a posición alguna del genoma. Comparando los perfiles de expresión, se encontraron entre 887 – 1925 genes inducidos/reprimidos por sequía en la variedad sensible y 998 – 1995 en la tolerante. Este estudio generó información de gran valor que podrá ser utilizada en futuros estudios para comprender mejor los mecanismos moleculares de resistencia a sequía en papa y especies cercanas.

Palabras clave: RNA-Seq; transcriptoma; sequía; papa; mRNA.**Abstract**

The recent advent RNA sequencing technology (RNA-Seq), a massively parallel sequencing method for transcriptome analysis, provides an opportunity to understand the expression profile of plants in response to biotic and abiotic stress. In this study, the mRNA was sequencing from leaves and roots of two native potato varieties at different levels of drought. Fifty-base-pair reads from whole mRNAs were mapped to the potato genomic sequence: 75 – 82% mapped uniquely to the genome, 6 – 14% mapped to several locations in the genome and 9 – 12% had no match in the genome. Comparing expression profiles, 887 to 1925 genes were found to be induced/repressed by drought in the sensible variety and 998 to 1995 in the tolerant. This research provides valuable information for future studies and deeper understanding of the molecular mechanism of drought resistance in potato and related species.

Keywords: RNA-Seq; transcriptome; drought; potato; mRNA.**Citación:**

Torres Y., R. Lozano, C. Merino & G. Orjeda. 2014. Identificación de genes relacionados a sequía en papas nativas empleando RNA-Seq. Rev. peru. biol. 20(3): 211 - 214 (Marzo 2014)

Introducción

La sequía es el estrés medio ambiental más importante en la agricultura, por lo que se vienen realizando muchos esfuerzos para mejorar la productividad de los cultivos bajo condiciones limitantes de agua. La papa, el tercer cultivo alimentario más importante del mundo (FAOSTAT 2008) es muy sensible a la sequía, ya que necesita un riego frecuente. A diferencia de *Solanum tuberosum subs. tuberosum*, las especies nativas de los andes, cultivadas a altitudes de 3500 m, están adaptadas a diversas condiciones climáticas adversas (Vasquez-Robinet et al., 2008). Esto hace a estas variedades de papa los candidatos ideales para estudiar la expresión de genes responsables de la tolerancia a la sequía.

Este trabajo pretende identificar genes relacionados a sequía en papa, empleando la tecnología de secuenciación de RNA (RNA-Seq), una herramienta revolucionaria de la transcriptómica (Mortazavi et al. 2008) que permite secuenciar genes transcritos y cuantificarlos de manera precisa.

Presentado: 05/11/2013
Aceptado: 20/01/2014
Publicado online: 14/03/2014

Materiales y métodos

Material vegetal.- Dos variedades de *S. tuberosum andigena*, Negrita 703671 (tolerante a sequía) y Wila-HuakaLajra 703248 (susceptible a sequía) fueron propagadas in-vitro, enraizadas y transferidas a un sistema aeropónico de cultivo en la Estación Experimental de INIA- Huancayo.

Diseño del experimento.- Las plantas recibieron una irrigación normal durante aproximadamente 3 meses, tiempo después del cual comienza la tuberización, en este momento se inició la inducción del estrés por sequía dejando de regar a las plantas.

Se tomaron muestras de hojas y raíces de ambas variedades considerando cuatro tiempos de muestreo. Para determinar los tiempos de muestreo se realizaron mediciones de la tasa fotosintética de la variedad tolerante (703671) en condiciones normales y de sequía, empleando el equipo CI-340 Handheld Photosynthesis System (CID Bio-Science, Inc. USA) que es un analizador infrarrojo de CO₂/H₂O que mide la cantidad de CO₂ asimilada por un área de hoja conocida en un tiempo dado. El Tiempo Cero correspondió al control del experimento, antes del inicio de la sequía. Los tiempos T1, T2 y T3 correspondieron a una disminución de la tasa fotosintética en la planta tolerante de 25%, 50 – 60% y una recuperación hasta del 80% del valor control respectivamente (Vásquez- Robinet et al. 2008). Los tiempos T1, T2 representaron la respuesta temprana y tardía de las plantas frente a la sequía, mientras que el tiempo T3 representó la recuperación de las plantas luego de reiniciado el riego.

Análisis de expresión.- El RNA fue aislado de aproximadamente 1 – 2 g de tejido de hojas y raíces usando el método fenol-cloroformo (Buell Lab - Michigan State University, comunicación personal 2010), y purificado usando el Kit Ambion DNA-free (Cat. No. 1906).

El RNA extraído fue secuenciado empleando un secuenciador Illumina Hi-Seq™ 2000. Brevemente consiste en que la población de RNA extraído fue convertido a una librería de fragmentos de DNA, cada molécula luego fue amplificada, cuantificada y secuenciada, con lecturas de 50 pares de bases (bp).

Tabla 1. Descripción de las 16 librerías secuenciadas. T: tolerante, S: susceptible, L: hojas, R: raíces.

Nivel de sequía	Variedad	Tejido	Librería
Control	703671	Hoja	TLC
		Raíz	TRC
	703248	Hoja	SLC
		Raíz	SRC
Respuesta temprana	703671	Hoja	TL1
		Raíz	TR1
	703248	Hoja	SL1
		Raíz	SR1
Respuesta tardía	703671	Hoja	TL2
		Raíz	TR2
	703248	Hoja	SL2
		Raíz	SR2
Recuperación	703671	Hoja	TL3
		Raíz	TR3
	703248	Hoja	SL3
		Raíz	SR3

Este procedimiento fue realizado en la Universidad de Michigan (Buell Lab, Michigan State University). Se generaron en total 16 librerías correspondientes a mRNA de hojas y raíces de las dos variedades en estudio en los cuatro tiempos de muestreo (Tabla 1).

Para el análisis bioinformático se realizó primero un control de calidad de las lecturas empleando el programa FastQC versión 0.10.0, y dos herramientas de FastX, FASTQ Clipper, que eliminan secuencias de adaptadores o linkers y FASTQ Trimmed, que permite eliminar bases de mala calidad presentes en las lecturas, acortando el tamaño de éstas.

Las lecturas fueron alineadas al genoma de referencia de papa (PGSC. 2011), empleando los programas Bowtie 2.0.0 (Langmead et al. 2009) y TopHat (Trapnell et al. 2009). Posteriormente se ensamblaron y cuantificaron las lecturas empleando el programa Cufflinks 1.3.0 (Trapnell et al., 2010), y se empleó la herramienta Cuffdiff para identificar los genes con cambios más significativos en el nivel de expresión durante el experimento.

Resultados y discusión

Control de calidad.- Con el programa FastQ se determinó el *Phred Score* para los *reads* de las 32 librerías. Los valores *Phred* varían entre 4 y 60, y asignaron un valor de calidad a cada base de una secuencia, siendo más alta la calidad al más alto valor. Se consideró como umbral un valor *Phred* > 28 (considerando que un valor de *Phred* = 30 indica que la probabilidad de tener una base incorrecta es de 1 en 1000). En 5 librerías las 50 bases de los *reads* tienen un valor *Phred* por encima del umbral, 6 librerías presentaron las 3 primeras bases con un valor *Phred* debajo del umbral y 5 librerías presentaron las 4 primeras bases con un valor *Phred* debajo del umbral. En estos dos últimos casos se empleó la herramienta FastX-Trimmer para cortar las primeras 3 ó 4 bases de todos los *reads* de estas librerías y optimizar la calidad de los mismos.

Mapeo de las lecturas.- Una vez realizado el control de calidad, se empleó el programa TopHat para mapear todas las secuencias obtenidas al genoma de referencia de papa que corresponde a *S. tuberosum Group Phureja* DM1-3 516R44 (PGSC 2011). En base al alineamiento, las secuencias fueron clasificadas en tres clases: *reads* únicos que son aquellos que mapean con una única posición en el genoma, *reads* que mapean con más de una posición en el genoma de referencia y los *reads* que no mapean con región genómica alguna. Empleando el script Perl mapping estadísticas se calculó el número y porcentaje de estos *reads* (Tabla 2).

Del total de *reads* evaluados por cada librería, el 75 – 83% de *reads* fueron únicos, mientras que el 6 – 14% mapearon a múltiples localizaciones en el genoma y 8 – 11% no mapearon con el genoma. Estos valores indican un desempeño/ rendimiento similar de construcción y secuenciamiento entre las librerías. Adicionalmente, como un control de calidad se secuenció una librería construida a partir de hojas del individuo de referencia DM1-3 516R44, encontrándose valores semejantes.

Expresión diferencial de genes.- El siguiente paso en el análisis de RNA-Seq fue la reconstrucción del transcriptoma y su cuantificación. El nivel de expresión de todos los transcriptos que mapearon en el genoma fue cuantificado como fragmentos por kilobase de exón por millón de *reads* (FPKM).

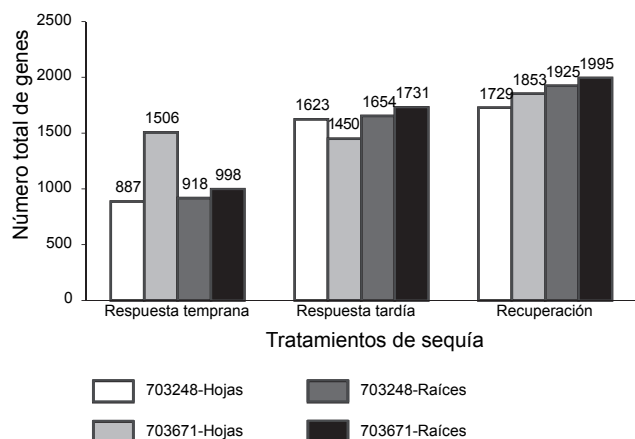
Tabla 2. Resumen estadístico del número de reads secuenciados y mapados con TopHat al genoma de referencia. DM hojas: corresponde a una librería construida a partir del RNA de hojas de DM, a quien corresponde el genoma de referencia.

Librería	Total reads	Único	%	Múltiple	%	Unmapped	%
TLC	26304956	21291611	80,94	2758808	10,49	2254537	8,57
TL1	17079619	14158415	82,9	1535509	8,99	1385695	8,11
TL2	22260826	18156792	81,56	2257435	10,14	1846599	8,3
TL3	25424875	20546901	80,81	2214432	8,71	2663542	10,48
TRC	30840996	25101293	81,39	2153567	6,98	3586136	11,63
TR1	19780525	16431906	83,07	1478617	7,48	1870002	9,45
TR2	23292392	19398147	83,28	1475718	6,34	2418527	10,38
TR3	14717082	12249428	83,23	1047903	7,12	1419751	9,65
SLC	27976839	21798560	77,92	3250580	11,62	2927699	10,46
SL1	28223430	21187144	75,07	4139513	14,67	2896773	10,26
SL2	23408804	18275867	78,07	2455980	10,49	2676957	11,44
SL3	20067948	15983176	79,65	2002679	9,98	2082093	10,38
SRC	27993309	22590737	80,7	2129629	7,61	3272943	11,69
SR1	27415791	22386601	81,66	1945125	7,09	3084065	11,25
SR2	24620110	20164169	81,9	1711811	6,95	2744130	11,15
SR3	16975442	13975326	82,33	1162503	6,85	1837613	10,83
DM Hojas	15983851	12481572	78,09	1513613	9,47	1988666	12,44

La comparación de niveles de expresión entre diferentes muestras es parte clave del secuenciamiento de transcriptoma. Empleando el programa Cuffdiff se compararon los perfiles de expresión de las variedades susceptible (703248) y tolerante (703671) durante la exposición a sequía (respuesta temprana, tardía y recuperación) y además entre ambos individuos.

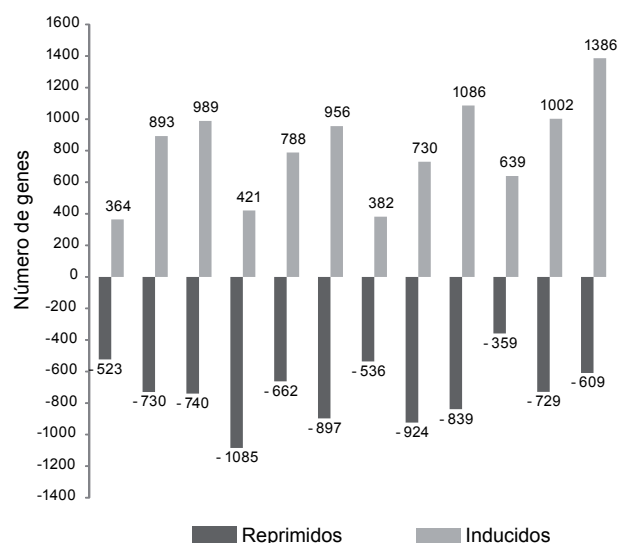
En la Figura 1 se muestra la comparación del número total de transcritos diferencialmente expresados en hojas y raíces de 703248 y 703671 bajo los tratamientos de sequía; el número de genes diferencialmente expresados entre los tratamientos varía entre 887 – 1995 y se encontró un aumento de este número conforme avanza el experimento.

Respecto a la inducción y represión génica, en hojas de 703248 durante la respuesta temprana se encontró que 364 genes

**Figura 1.** Número total de genes diferencialmente expresados en hojas y raíces de *S. tuberosum andigena*, variedad Negrita 703671 (tolerante a sequía) y Wila-HuakaLajra 703248 (susceptible a sequía) durante el estrés por sequía.

fueron inducidos significativamente, mientras que en la sequía tardía y en la recuperación 893 y 989 genes respectivamente; esta tendencia creciente en la inducción de genes se mantiene en hojas y raíces de ambas variedades conforme la sequía avanza. Por otra parte, el número de genes reprimidos varió entre 359 en raíces de 703671 durante la respuesta temprana y 1085 en hojas de 703671 también en la respuesta temprana (Fig. 2).

Comparando el perfil de expresión de ambas variedades, se encontró que en la variedad 703671 un mayor número de genes mostraron cambios significativos en respuesta a la sequía. En la respuesta temprana, 149 genes inducidos y 276 reprimidos fueron comunes a hojas de las dos variedades bajo estudio. Se

**Figura 2.** Distribución del número de genes inducidos y reprimidos en *S. tuberosum andigena*, variedad Negrita 703671 (tolerante a sequía) y Wila-HuakaLajra 703248 (susceptible a sequía) durante el estrés por sequía.

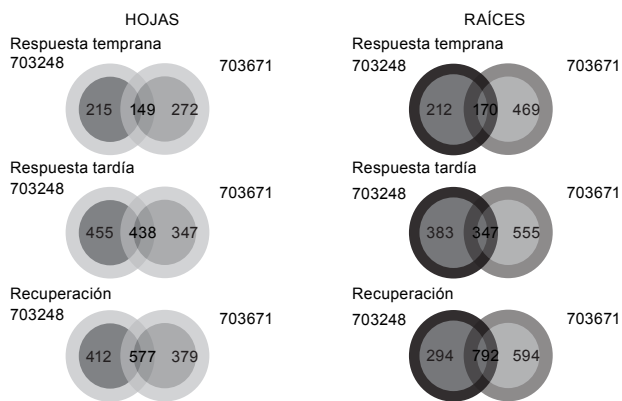


Figura 3. Número de genes inducidos por sequía (respuesta temprana y tardía) y en la recuperación. Se muestra el número de genes compartidos por *S. tuberosum andigena*, variedad Negrita 703671 (tolerante a sequía) y Wila-HuakaLajra 703248 (susceptible a sequía) y aquellos de expresión única.

encontró un mayor número de genes específicos y diferencialmente expresados en hojas de la variedad 703671 (272 inducidos y 809 reprimidos), mientras que se encontraron solo 562 genes (215 inducidos y 247 reprimidos) específicos de hojas de la variedad 703248 (Figs. 3 y 4). Un patrón similar se encontró en raíces, 170 genes inducidos y 101 reprimidos fueron comunes en las dos variedades, encontrándose un mayor número de genes específicos y diferencialmente expresados en la variedad 703671 (469 inducidos y 983 reprimidos), mientras que se encontraron solo 646 genes (211 inducidos y 435 reprimidos) específicos de la variedad 703248 (Figs. 3 y 4). Estos genes específicos de la variedad tolerante representan candidatos que deberán ser estudiados a mayor profundidad para conocer el rol que estos cumplen en la resistencia a sequía.

Es importante resaltar que, durante la respuesta temprana de ambas variedades se encontró un mayor número de genes únicos y específicos con expresión diferencial en comparación al de los genes comunes, mientras que en la etapa de recuperación es mayor el número de genes comunes con expresión diferencial. Lo cual podría indicar que los mecanismos de respuesta temprana a sequía son específicos de cada variedad, pudiendo ser esta la etapa clave para encontrar genes responsables de la resistencia a sequía.

En este trabajo, el empleo del RNA-Seq permitió generar 400 millones de *reads*, que analizados y procesados con herramientas bioinformáticas permitieron identificar y cuantificar un gran número de genes de papa relacionados a sequía y que podrían permitir comprender mejor los mecanismos de resistencia en papa y otras especies relacionadas.

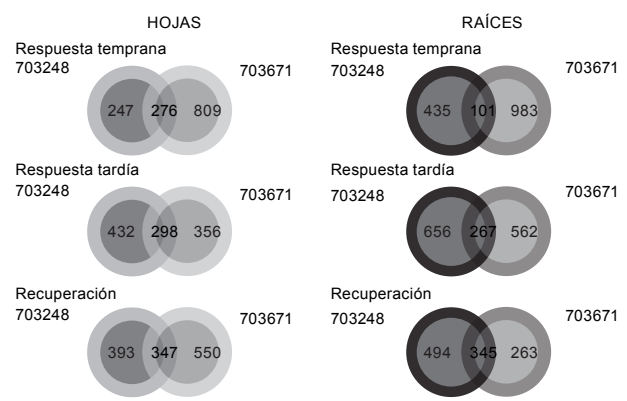


Figura 4. Número de genes reprimidos por sequía (respuesta temprana y tardía) y en la recuperación. Se muestra el número de genes compartidos por *S. tuberosum andigena*, variedad Negrita 703671 (tolerante a sequía) y Wila-HuakaLajra 703248 (susceptible a sequía) y aquellos de expresión única.

Información adicional

Contribución de autores.- Gisella Orjeda y Yerisf Torres: concepción y diseño de experimento. Yerisf Torres, Roberto Lozano: realización del experimento. Yerisf Torres, Roberto Lozano y Carlos Merino: análisis de datos. Yerisf Torres, Roberto Lozano y Carlos Merino: redacción del artículo.

Conflicto de interés.- Los autores han declarado no incurrir en conflicto de intereses.

Financiamiento.- Los autores agradecen el financiamiento FINCyT (099-FINCyT-EQUIP-2009)/(076-FINCyT-PIN-2008).

Literatura citada

- FAOSTAT 2008. Potato world: Production and consumption. International Year of the Potato. <<http://www.potato2008.org/en/world/>>. Acceso: 08/10/2008.
- Langmead B., C. Trapnell, M. Pop & S. Salzberg. 2009. Ultrafast and memory-efficient alignment of short DNA sequences to the human genome. *Genome Biol.*10:R25.
- Mortazavi A., B. Williams, K. McCue, L. Schaeffer & B. Wold 2008. Mapping and quantifying mammalian transcriptomes by RNA-Seq. *Nature Methods*, Vol. 5, Issue7, pp. 621-628.
- PGSC (The Potato Genome Sequencing Consortium). 2011. Genome sequence and analysis of the tuber crop potato. *Nature* 475, 189–195.
- Trapnell C., L. Pachter & SL. Salzberg. 2009. TopHat: discovering splice junctions with RNA-seq. *Bioinformatics.*;25:1105–1111.
- Trapnell C., A. Roberts, L. Goff, et al. 2012. Differential gene and transcript expression analysis of RNA-seq experiments with TopHat and Cufflinks. *Nature Protocols*, Vol. 7, Issue 3, pag 562–578
- Vasquez-Robinet C., Sh. Mane, A. Ulanov, et al. 2008. Physiological and molecular adaptations to drought in Andean potato genotypes. *Journal of Experimental Botany*, Vol. 59, No. 8, pp. 2109–2123.