

## **Cambios transcriptómicos en la raíz del híbrido almendro × melocotonero ‘Garnem’ bajo estrés hídrico revelan genes de respuesta y tolerancia a la sequía**

**B. Bielsa<sup>1</sup>, S. Hewitt<sup>2,3</sup>, S. Reyes-Chin-Wo<sup>4</sup>, A. Dhingra<sup>2,3</sup> y M.J. Rubio-Cabetas<sup>1</sup>**

<sup>1</sup>Unidad de Hortofruticultura. Centro de Investigación y Tecnología Agroalimentaria de Aragón (CITA), Av. Montañana 930, 50059, Zaragoza, España. <sup>2</sup>Molecular Plant Sciences, Washington State University, Pullman, WA, USA. <sup>3</sup>Department of Horticulture, Washington State University, Pullman, WA, USA. <sup>4</sup>Genome Centre, University of California Davis, Davis, California 95616, USA

**Palabras clave:** portainjertos, Prunus, RNAseq, secuenciación Illumina, sequía

### **Resumen**

Se realizó un análisis transcriptómico mediante RNAseq de tejido radicular del portainjerto almendro × melocotonero ‘Garnem’ [*P. amygdalus* × *P. persica*]. Las plantas se sometieron a un tratamiento osmótico en solución PEG6000 en condiciones controladas (0 h – 2 h – 24 h). Tras el análisis en plataforma Illumina de 10 bibliotecas creadas a partir de raíz de plantas control y tratamiento, se anotaron e identificaron 26.700 genes diferencialmente expresados a las 2 h y a las 24 h involucrados en la respuesta a sequía. Este estudio proporciona una valiosa información de los cambios transcriptómicos iniciados durante las primeras horas de la señalización del estrés en raíces de ‘Garnem’ y sus mecanismos de adaptación. Asimismo, los resultados obtenidos serán de gran interés en la selección de nuevos patrones *Prunus* tolerantes a sequía.

### **INTRODUCCIÓN**

Hasta ahora, la información molecular en relación a la respuesta a la sequía en patrones de *Prunus* es limitada. Con el fin de elucidar los distintos mecanismos moleculares clave desencadenados durante las primeras horas de exposición a la sequía, se llevó a cabo el análisis transcriptómico mediante RNAseq de raíz del híbrido ‘Garnem’ [*P. amygdalus* Batsch × *P. persica* (L.) Batsch]. En este trabajo se presentan los datos sobre los genes diferencialmente expresados involucrados en la respuesta a la sequía a las 2 h y las 24 h tras el inicio del déficit hídrico.

### **MATERIALES Y MÉTODOS**

El experimento se llevó a cabo con 20 plantas de ‘Garnem’: 10 del grupo control con condiciones hídricas óptimas, y 10 plantas a las que se sometió a un tratamiento osmótico con PEG6000. Las condiciones de estrés fueron controladas mediante el potencial hídrico foliar (LWP) (Scholander et al., 1964) y la conductancia estomática (gs) medida con porómetro (Decagon Devices Inc.). Se calculó el contenido relativo de agua (RWC) (Barrs and Weatherley, 1962) y la fuga de electrolitos (EL) (Blum and Ebercon, 1981). A partir del ARN extraído de muestras de raíz de las plantas control y estresadas tomadas a las 0, 2 y 24 h, se crearon 10 bibliotecas de ARN que se secuenciaron mediante Illumina HiSeq™ 2000 con configuración 100 PE. Las secuencias obtenidas fueron pre-procesadas realizando un control de calidad, un filtrado y el ensamblaje de novo con el programa bioinformático CLC Bio Genomics Workbench (ver. 6.0.1). Las secuencias contiguas

(contigs) generadas se normalizaron con el método RPKM (Read per kilobase per million reads), calculando su expresión diferencial con un dato de corte 5 veces por encima o por debajo del nivel basal de expresión. Mediante el paquete Blast2GO v. 3.3 se anotaron funcionalmente los genes diferencialmente expresados (DEGs), además de identificar las diferentes rutas metabólicas en los cuales estaban involucrados. La validación final de los resultados se realizó mediante el análisis de expresión de 16 DEGs por qRT-PCR para confirmar la reproducibilidad del análisis.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Los datos fisiológicos confirmaron que las plantas de ‘Garnem’ estuvieron sometidas a estrés hídrico, alcanzando niveles de LWP estadísticamente menores en las plantas tratadas que en las plantas control. Los niveles de gs alcanzaron el valor mínimo a las 24 h, derivado del cierre estomático que reduce las pérdidas de agua (Negin and Moshelion, 2016). El ligero descenso del RWC y la ausencia de variación en la ratio de EL durante el experimento, indicaron que las plantas de ‘Garnem’ presentarían una estrategia de evitación como consecuencia de la acumulación de solutos y el consecuente ajuste osmótico (Verslues et al., 2006).

Se generaron 0,42 billones de lecturas en el análisis de RNAseq, las cuales se procesaron y se ensamblaron en contigs cuyos valores RPKM fueron calculados. Posteriormente, se realizó una comparación dos a dos de los valores de expresión entre las plantas control y las tratadas en los diferentes puntos temporales del experimento. Esta comparación reveló que la mayor actividad transcripcional tenía lugar a las 2 h, con 12.693 DECs (Differentially Expressed Contigs) únicos sobre-regulados, que a las 24 h. Un total de 26.700 DEGs fueron clasificados en función de sus términos ontológicos (GO), destacando “response to stimulus” en la categoría de Proceso Biológico, la cual engloba a “response to stress”; y “catalytic activity” y “binding” en la categoría de Función Molecular, términos GO relacionados con la respuesta transcripcional (Shinozaki and Yamaguchi-Shinozaki, 2007). Se anotaron 655 enzimas participando en un total de 140 rutas metabólicas y destacando entre las seis rutas con mayor número de DEGs involucrados las siguientes: metabolismo de la purina, metabolismo de la tiamina, metabolismo de almidón y sacarosa, y glicolisis. Además de estas, también destacaron otras rutas relacionadas con el metabolismo de los lípidos y los carbohidratos, sugiriendo el importante papel de estos compuestos en el mantenimiento homeostático celular y el ajuste osmótico que permiten la adaptación de ‘Garnem’ bajo condiciones de sequía (Ksouri et al., 2016; Pan et al., 2016).

En función del papel desempeñado en la respuesta a la sequía, los 26.700 DEGs se clasificaron en tres grupos: (i) genes implicados en las cascadas de señalización y control transcripcional; (ii) genes con función osmoprotectora contra los daños por deshidratación; y (iii) genes implicados en el transporte y absorción de agua e iones (Ciarmiello et al., 2011).

Este estudio ha permitido categorizar la respuesta primaria a sequía en ‘Garnem’ con la inducción de genes relacionados con la regulación del cierre estomático, la inducción de genes efectores y la supresión de genes con efecto negativo en las dos primeras horas de exposición a la sequía, mientras que a las 24 h se produce la expresión de genes implicados en el mantenimiento de la homeostasis celular que permite a ‘Garnem’ adaptarse a las nuevas condiciones limitantes. Así mismo, se identificaron DEGs sobre regulados relacionados directamente con la mejora del uso eficiente del agua. Esta valiosa información permitirá generar nuevas estrategias para la selección de patrones tolerantes a la sequía que en el programa de mejora genética del CITA.

**AGRADECIMIENTOS**

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto RTA-INIA 2014-00062 y el Gobierno de Aragón (grupo A12).

**Referencias**

- Barrs, H.D. and Weatherley, P.E. 1962. A re-examination of the relative turgidity technique for estimating water deficits in leaves. *Aust. J. Biol. Sci* 15: 413–428.
- Blum, A. and Ebercon, A. 1981. Cell membrane stability as a measure of drought and heat tolerance in wheat. *Crop Sci.* 21: 43–47.
- Ciarmiello, L., Woodrow, P., Fuggi, A., Pontecorvo, G. and Carillo, P. 2011. Plant genes for abiotic stress, in: Shanker, A. (Ed.), *Abiotic Stress in Plants – Mechanisms and Adaptations*. InTech, pp. 283–308. doi:10.5772/22465
- Ksouri, N., Jiménez, S., Wells, C.E., Contreras-Moreira, B. and Gogorcena, Y. 2016. Transcriptional Responses in Root and Leaf of *Prunus persica* under Drought Stress Using RNA Sequencing. *Front. Plant Sci.* 7: 1–19. doi:10.3389/fpls.2016.01715
- Negin, B. and Moshelion, M. 2016. The evolution of the role of ABA in the regulation of water-use efficiency: From biochemical mechanisms to stomatal conductance. *Plant Sci.* 251: 82–89. doi:10.1016/j.plantsci.2016.05.007
- Pan, L., Zhang, X., Wang, J., Ma, X., Zhou, M., Huang, L., Nie, G., Wang, P., Yang, Z. and Li, J. 2016. Transcriptional Profiles of Drought-Related Genes in Modulating Metabolic Processes and Antioxidant Defenses in *Lolium multiflorum*. *Front. Plant Sci.* 7: 519. doi:10.3389/fpls.2016.00519
- Scholander, P.F., Hammel, H.T., Hemmingsen, E.A. and Bradstreet, E.D. 1964. Hydrostatic Pressure and Osmotic Potential in Leaves of Mangroves and Some Other Plants. *PNAS* 52: 119–25.
- Shinozaki, K. and Yamaguchi-Shinozaki, K. 2007. Gene networks involved in drought stress response and tolerance. *J. Exp. Bot.* 58: 221–227. doi:10.1093/jxb/erl164
- Verslues, P.E., Agarwal, M., Katiyar-Agarwal, S., Zhu, J. and Zhu, J.-K. 2006. Methods and concepts in quantifying resistance to drought, salt and freezing, abiotic stresses that affect plant water status. *Plant J.* 45: 523–39. doi:10.1111/j.1365-313X.2005.02593.x