

■ Análisis del transcriptoma de aguacate Hass (*Persea americana* Mill.) en el sistema de interacción fruto- quitosano-*Colletotrichum*

L. Xoca-Orozco¹, S. González-Morales², R. Velázquez-Estrada¹, P. Gutiérrez-Martínez¹, J. Vega-Arreguín³, A. Chacón-López¹.

¹. Laboratorio Integral de Investigación en Alimentos. Instituto Tecnológico de Tepic, Nayarit, México.

². Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad. CINVESTAV. Irapuato. Guanajuato. México.

³. Laboratorio de Ciencias Genómicas. Escuela Nacional de Estudios Superiores. UNAM. León. Guanajuato. México.

RESUMEN

El quitosano además de presentar un efecto antifúngico, también actúa como elicitador el cual es capaz de estimular el mecanismo de defensa del sistema vegetal induciendo la resistencia del hospedero. A la fecha se cuenta con poca información referente a la expresión de genes relacionados con el sistema de defensa del fruto que son inducidos durante la interacción con quitosano. El objetivo de esta investigación fue realizar el análisis transcriptómico de los genes que se expresan diferencialmente en la interacción Fruto-Fitopatógeno-Quitosano. Las muestras bajo estudio se obtuvieron a partir de frutos 1) tratados con quitosano, 2) inoculados con el hongo, 3) tratados con quitosano e inoculados con el hongo y 4) un control. Las muestras se tomaron de frutos en estado de madurez intermedio (entre madurez fisiológica y de consumo) a diferentes tiempos (0, 1, 6, 9 y 24 h post tratamiento-inoculación). El RNA obtenido de las muestras en cada condición a los tiempos establecidos, fue secuenciado usando la plataforma HISEQ 2000 ILLUMINA. El alineamiento de las secuencias obtenidas se realizó con el programa RSEM utilizando un transcriptoma de referencia obtenido de la var *drymifolia*. Para determinar los genes diferencialmente expresados se utilizó un análisis de máxima verosimilitud $p < 0.05$, utilizando el programa R (EdgeR). La secuenciación arrojó 313 millones de secuencias con longitud de 100 pb (pair-end). En promedio el 73% de las secuencias obtenidas en cada condición alinearon con el transcriptoma de referencia. Los perfiles de expresión mostraron que en el sistema fruto-quitosano existe un mayor número de genes expresados diferencialmente, comparado con el sistema fruto-patógeno. El análisis de la categorización de los genes expresados diferencialmente con respecto al control, muestra que existen diferentes vías metabólicas modificadas por la presencia del quitosano. La regulación de diversos procesos metabólicos inducida por el quitosano desencadena una mayor resistencia en el fruto evitando el desarrollo del fitopatógeno.

Palabras clave: Elicitador, Expresión, Resistencia, Post-cosecha.

INTRODUCCIÓN

El fruto de aguacate (*Persea americana* Mill) Hass es uno de los principales productos hortofrutícolas de gran importancia comercial en el mundo. La elevada producción de aguacate en México se ve afectada ya que los frutos son susceptibles a daños causados principalmente por hongos como *Colletotrichum* sp., este patógeno ocasiona pérdidas importantes en postcosecha, alcanzando hasta un 20% (Rodríguez-López *et al.*, 2009), para controlar este fitopatógeno, por lo general, se utilizan fungicidas químicos los cuales pueden afectar al medio ambiente e inclusive pueden permanecer en el fruto durante su consumo y provocar daños en la salud del consumidor (Brent y Hollomon, 2007). Es por ello que surge la necesidad de buscar alternativas empleando fungicidas de origen biológico, como lo es el quitosano, el cual no tiene características contaminantes, ni afecta a la salud.

El poder antifúngico del quitosano se ha probado en diversos hongos de manera *in vitro* y existen reportes indicando que el quitosano es efectivo en la inhibición del desarrollo de *Colletotrichum* sp., (Bautista-Baños *et al.*, 2005) en varios sistemas vegetales, los estudios en quitosano-aguacate son prácticamente nulos, a la fecha, solo existe un reporte por Salvador *et al.*, (1999), donde aplicaron quitosano para combatir a *Colletotrichum* sp (agente causal de la antracnosis) y *Diplodia* sp (agente causal de la pudrición del pedúnculo), aislados de aguacates enfermos. Las pruebas *in vitro* resultaron con 100% de inhibición para ambas cepas, aplicando quitosano en concentraciones desde 1 a 2% p/v. No obstante la efectividad del quitosano en la inhibición del desarrollo de los hongos fitopatógenos, los mecanismos de acción no están del todo claros. Para ir esclareciendo a nivel molecular los posibles mecanismos de acción del quitosano es importante conocer la expresión genética que conlleva la interacción fruto-patógeno-quitosano. Además, se cuenta con poca información referente a la actividad de genes relacionados con el sistema de defensa del fruto durante la interacción con quitosano y el patógeno, por lo que la información, referente a la actividad de genes, es de gran importancia para comprender y definir los procesos que intervienen por un lado en evitar el desarrollo del patógeno, y por otro en la inducción del sistema de defensa del fruto, ambos procesos promovidos por el quitosano

MATERIALES Y MÉTODOS

Preparación de muestras para el análisis de expresión genética

Para determinar el estado de madurez de los frutos y los tiempos post-tratamientos para la toma de muestras empleadas para el análisis transcriptómico, se evaluó el desarrollo de la infección en frutos de aguacate Hass en diferente estado de madurez: fisiológico, de consumo y un estado de madurez intermedio (estado intermedio entre madurez fisiológica y de consumo). Estos frutos fueron inoculados con una suspensión de esporas (1×10^6 mL⁻¹) y se tomaron muestras de tejido a diferentes tiempos post inoculación. Cada muestra fue observada en un estereoscopio para dar seguimiento a la invasión del hongo en el fruto. Una vez determinado el estado de madurez (intermedio) así como también los tiempos post inoculación (0,1, 6-9 y 24 h), se tomaron muestras de frutos: sin inocular y sin quitosano, frutos inoculados con y sin quitosano. A las muestras se les extrajo el

RNA empleando la metodología propuesta por Djami-Tchatchou y Straker (2012). El RNA obtenido fue secuenciado utilizando la plataforma de Secuenciación por Síntesis (SBS) (del Laboratorio Nacional de Genómica para la Biodiversidad: LANGEBIO, CINVESTAV, Irapuato, México), con el sistema HiSeq 2000 de Illumina, la corrida de secuenciación fue 2 x 100 (paired-end).

Análisis bioinformático para la determinación de la expresión genética

Una vez obtenidas las secuencias, se aplicó un análisis bioinformático para procesar los datos. Se llevó a cabo un alineamiento utilizando el programa RSEM (Li & Dewey, 2011) utilizando un transcriptoma de referencia del aguacate (*Persea americana*) var. *drymifolia*, proporcionado por el LANGEBIO. Para poder determinar la expresión diferencial de los genes se realizó una prueba de Máxima Verosimilitud con $p < 0.05$, utilizando el programa estadístico R Project for Statistical Computing versión 2.15.2 (R Core Team, 2013) mediante la librería EdgeR (McCarthy *et al.*, 2012). Para el análisis se tomaron cuatro matrices de comparación; tomando en cuenta todas las muestras que contenían quitosano (Quitosano no Inoculado y Quitosano Inoculado) contra todas las que no contenían quitosano (Control y No Quitosano Inoculado), así como también la comparación entre los tratamientos de quitosano no inoculado (QNI vs C) y quitosano inoculado (QI vs C). Como respuesta estadística se consideró la diferencia de expresión entre el tratamiento y el testigo (fold change) (FC), el cual indica si la expresión es reprimida (FC = -), inducida (FC = +) o sin cambio en la expresión (FC = 0) entre tratamientos, así como también el valor estadístico p (p-value).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

En los frutos inoculados en madurez fisiológica no hubo desarrollo del patógeno, esto posiblemente debido a que la colonización es detenida por algunos compuestos antifúngicos los cuales están en mayor proporción en el fruto durante esa etapa de madurez (Prusky *et al.*, 1991) (Figura 1 A). En los frutos en madurez de consumo la enfermedad se desarrolló rápidamente (Figura 1 C), en los frutos en madurez intermedia (Figura 1 B), aunque fueron susceptibles al patógeno la enfermedad no se desarrolló tan rápidamente, lo cual hace más factible observar cambios en las respuestas del fruto frente al fitopatógeno. Tomando en cuenta los resultados observados, se consideraron cuatro tiempos para tomar muestra del fruto partir de las cuales se obtuvo el RNA para determinar la expresión genética: al tiempo cero (inmediatamente después del tratamiento e inoculación de los frutos), el cual se tomó como control y como respuesta temprana, 1, a los tiempos 6 y 9 h (el RNA de éstos se mezclaron ya que no se observaron grandes diferencias en el desarrollo de la infección en los frutos) y como una respuesta tardía se tomó el tiempo de 24 h. La inoculación se realizó con la cepa de *Colletotrichum* sp aislada de trabajos anteriores y los tratamientos de quitosano fueron con QBPM a 1.5% (p/v).

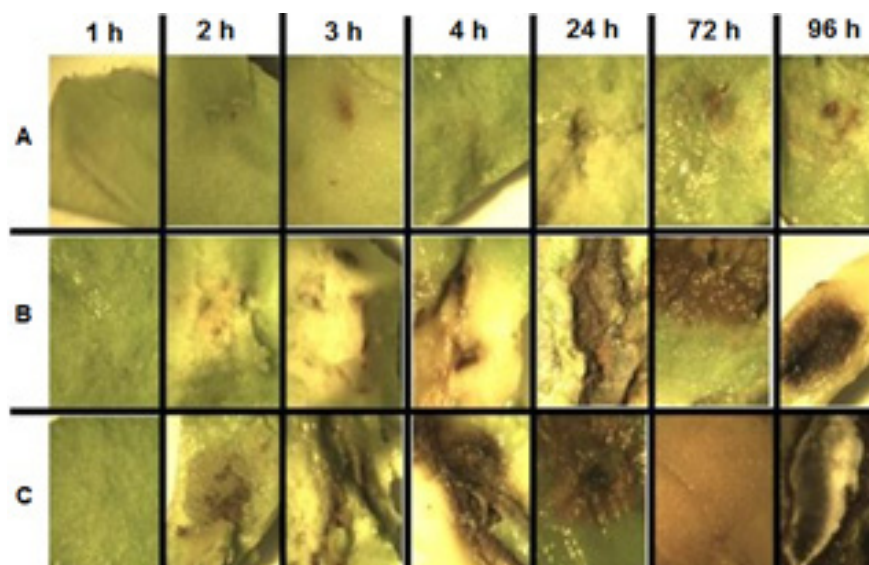


Figura 1. Pulpa (fruto de aguacate) del área circundante a la inoculación en frutos inoculados en diferentes estados de madurez y a diferentes tiempos: A) Madurez fisiológica, B) Madurez intermedia, C) Madurez de consumo.

Una vez obtenidas las secuencias del RNA correspondiente a cada tratamiento, se llevó a cabo un alineamiento de estas secuencias contra la base de datos de referencia utilizando el programa RSEM. Los resultados del alineamiento mostraron un promedio de mapeo del 73%, (secuencias que corresponden con el genoma de referencia).

Análisis expresión diferencial de genes.

Para el análisis de expresión diferencial se construyó una matriz de comparación tomando como referencia los frutos control (C), comparados con los frutos tratados con quitosano (Q), inoculados y tratados con quitosano (QP) e inoculados (P), esta comparación se hizo para cada uno de los tiempos considerados en el experimento. El análisis estadístico mostró que en la matriz de comparación global QvsnQ (Frutos tratados con quitosano en comparación con frutos sin quitosano, Cuadro 4), existe una cantidad de 3442 genes expresados diferencialmente, de los cuales 1602 se encuentran reprimidos y 1840 se encuentran inducidos.

Cuadro 3. Expresión diferencial de algunos de los tratamientos, comparando contra el tratamiento control. P, Q y QP: tratamientos. 0, 1, 6/9 y 24: tiempos de toma de muestra en h

Tratamiento	Genes reprimidos	Genes Inducidos	Expresión Diferencial total
Q_0	383	1340	1723
Q_1	1767	2316	4083
Q_6/9	1408	1914	3322
Q_24	1386	1703	3089
P_0	28	185	213
P_1	513	941	1454
P_6/9	225	551	776
P_24	239	518	757
QP_0	286	802	1088
QP_1	314	880	1194
QP_6/9	144	488	632
QP_24	752	1409	2161

Realizando la comparación entre frutos que no fueron tratados con quitosano y que se inocularon (P) resultaron 3200 genes expresados diferencialmente (para todos los tiempos), mientras que los frutos que fueron tratados con quitosano (Q) resultaron con 5075 genes expresados diferencialmente, lo que muestra que se tiene una mayor expresión diferencial de genes por efecto del quitosano en el fruto.

Dado que el hongo induce en el fruto un estrés biótico, y el fruto responde de alguna manera a este estrés, en este punto nos enfocamos en analizar si el quitosano estaría induciendo genes que participan en el sistema de defensa del fruto más intensamente que como lo hace el patógeno per se. Los genes expresados diferencialmente se ubicaron en la vía del estrés biótico de acuerdo a los mapas que ya se han reportado para plantas modelo como *Arabidopsis thaliana* (Usadel *et al.*, 2009). En la figura 2 se observa que cuando se tiene la interacción del patógeno con el fruto al tiempo de 1 h, la vía de respuesta a estrés biótico se empieza a activar (atendiendo a los genes que se expresan diferencialmente), respondiendo el sistema de defensa del fruto ante el patógeno (Figura 2 a), la mayoría de los genes ubicados aquí, participan en la señalización de hormonas, son factores de transcripción y algunos genes de defensa como los que participan en la síntesis las proteínas PR. Se observa mayor participación de genes con expresión diferencial en esta vía cuando está presente el quitosano (Q, figura 2 b). De acuerdo a los resultados se observa que uno de los mecanismos de acción del quitosano es inducir la ruta metabólica de respuesta a estrés biótico, disparando la resistencia del fruto al patógeno. Cuando se tienen frutos inoculados con el fitopatógeno sin ser tratados con quitosano, la expresión diferencial de esta ruta, a las 24 h empieza a ceder reprimiendo los actores principales que a tiempos tempranos se encontraban inducidos (Figura no mostrada), esto posiblemente debido a que a medida que el fruto madura prácticamente es nula la presencia de sustancias antifúngicas (Rodríguez-López, 2009), sin embargo, en los frutos tratados con quitosano la expresión de los correspondientes genes se mantiene, con lo que se corrobora que el quitosano induce y conserva activo el sistema de defensa del fruto previniendo la acción del patógeno.

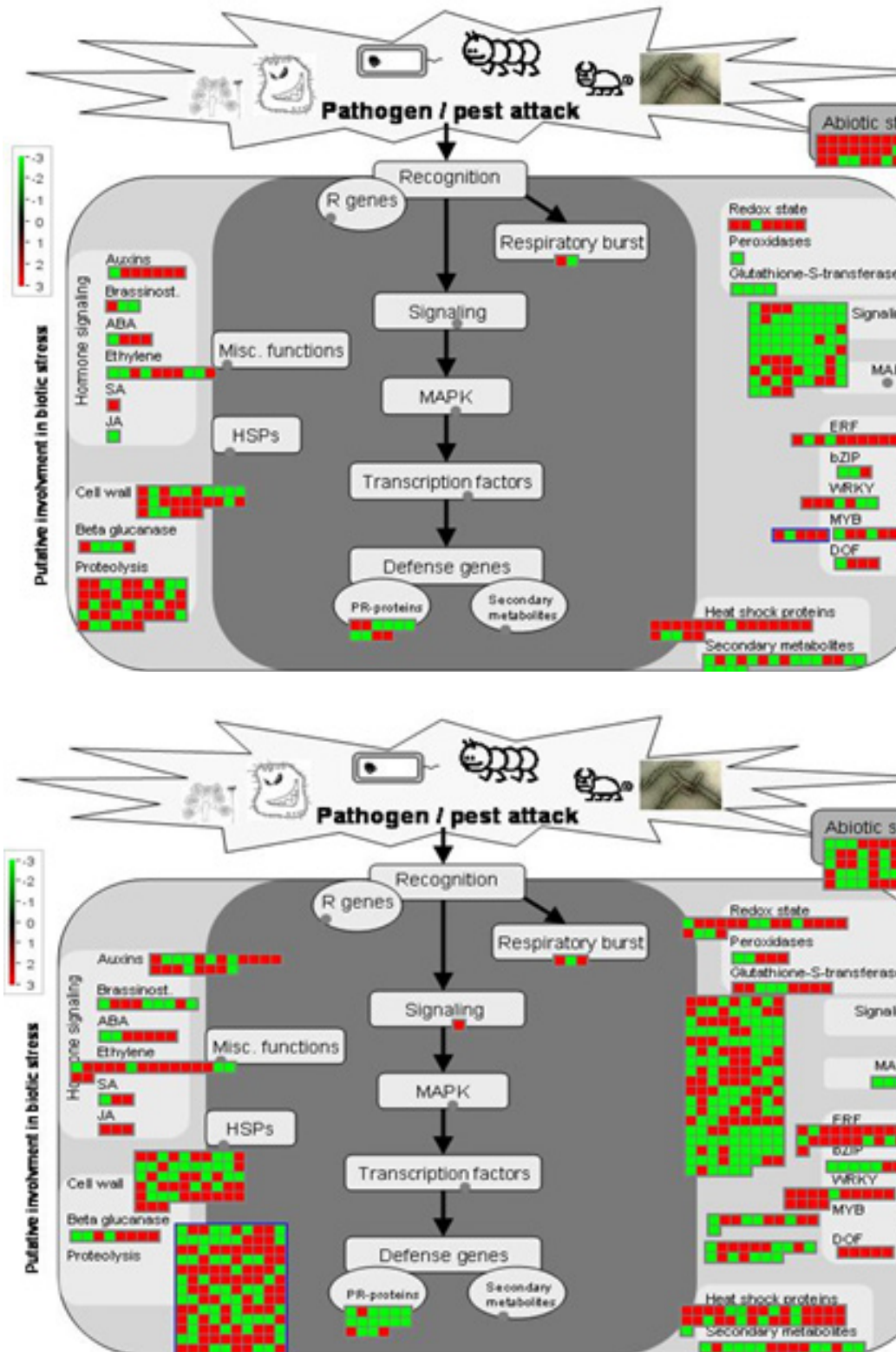


Figura 2. Clasificación MapMan de genes que participan en la ruta del estrés biótico, para el tiempo 1. (a): P_1 y (b): Q_1. Color verde: genes reprimidos. Color rojo: genes inducidos.

CONCLUSIONES

De acuerdo con los perfiles de expresión y la anotación funcional el quitosano está incidiendo sobre rutas metabólicas relacionadas con el sistema de defensa de la planta, así como también tiene efecto en otras rutas de importancia en el desarrollo del fruto. Se observa que el quitosano funciona como un elicitor (inductor) del sistema de defensa del fruto, logrando inducir genes asociados a la síntesis de compuestos involucrados en este proceso.

LITERATURA CITADA

- Barnet H, y Hunter B. 1998. Illustrated genera of imperfect fungi. Mac Millan Publishing Co., New York: 200-201
- Bautista-Baños S, Hernández-Lauzardo A, Velázquez-del Valle M, Hernández-López M, Ait-Barka E, Bosquez-Molina E. 2006. Chitosan as a potential natural compound to control pre and postharvest diseases of horticultural *commodities*. *Crop Protection Review*, 25: 108–118.
- Bautista-Baños S, Hernández-López M, Hernández-Lauzardo A, Trejo-Espino J, Bautista-Cerón M y Melo-Giorgana G. 2005. Effect of Chitosan on *in vitro* Development and Morphology of Two Isolates of *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. *And Sacc. Revista Mexicana De Fitopatología*, 23(1): 62-67.
- Brent K., and Hollomon D. 2007. Fungicide resistance in crop pathogens: How can it be managed? Global Crop Protection Federation and Fungicides Resistance Action Committee. 2a edition. United Kingdom: 25.
- Córdova-Albores L, Ríos M, Barrera-Necha L, Bautista-Baños S. 2014. Chemical compounds of a native *Jatropha curcas* seed oil from Mexico and their antifungal effect on *Fusarium oxysporum* F.sp. *gladioli*. *Industrial Crops and Products*. 62:166–172.
- Djami-Tchatchou A., and Straker J. 2012. The isolation of high quality RNA from the fruit of avocado (*Persea americana* Mill). *South African Journal of Botany*. 78: 44–46.
- El-Ghaouth A, Arul J, Ponnampalam R, and Boulet M. 1991. Chitosan coating effect on storability and quality of fresh strawberries. *Journal of Food Science*, 56: 1618–31.
- Hanlin T. 1998. Illustrated genera of Ascomycetes. Vol. I. *Am. Phytopathol. Soc.* 118-119.
- Langmead B., and Salzberg S. 2012. Fast gapped-read alignment with Bowtie 2. *Nature Methods*. 9: 357-359.
- Li B., and Dewey C. 2011. RSEM: accurate transcript quantification from RNA-Seq data with or without a reference genome. *BMC Bioinformatics*. 12:323.
- Lorenzo O, y Solano R. 2005. Señalización de Ácido Jasmónico e interacciones con otras hormonas. *biojournal.net*. 1: 1-16.
- McCarthy D, Chen Y., and Smyth, G. 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Research*. 40: 4288-4297.
- Méndez-Bravo A, Calderón-Vázquez C, Ibarra-Laclette E, Raya-González J, Ramírez-Chávez E. 2011. Alkamides Activate Jasmonic Acid Biosynthesis and Signaling Pathways and Confer Resistance to Botrytis cinerea in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS ONE*. 6(11): e27251.
- Montero-Tavera V, Morales L, González M, Anaya J, Corona T., y Gálvez A. 2010. Diversidad genética, patogénica y morfológica del hongo *Colletotrichum gloeosporioides* (penz.) de Michoacán, México. *Revista Mexicana de Ciencias Agrícolas*. 1(2): 157-172.
- Morales-García J, Azpíroz-Rivero H., y Pedraza-Santos M. 2009. Caracterización cultural, morfológica, patogénica e isoenzimática de aislamientos de *Colletotrichum gloeosporioides* Penz., causante de la antracnosis del aguacate (*Persea americana* Mill.) En Michoacán, México. *Revista UDO Agrícola*. 9(4): 848-856.
- Palma-Guerrero J, López-Jiménez J, Pérez-Berná A, Huang I, Jansson H, Salinas J, Villalain J, Read N, López-Llorca L. 2010. Membrane fluidity determines sensitivity of filamentous fungi to chitosan. *Molecular Microbiology* 75(4): 1021–1032.
- Povero G, Loreti E, Pucciariello C, Santaniello A, Di-Tommaso D, Di-Tommaso G, Kapetis D, Zolezzi F, Piaggese A, Perata P. 2011. Transcript profiling of chitosan-treated *Arabidopsis* seedlings. *J Plant Res*. 124: 619-629.
- Prusky D, Plumbley A, Kobilier I. 1991. The relationship between antifungal diene levels and fungal inhibition during quiescent infection of unripe avocado fruits by *Colletotrichum gloeosporioides*. *Plant Pathology* 40: 45-52.
- R Core Team. 2013. R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. <http://www.R-project.org/>

- Rangel G, Castro E, Beltran, E. Reyes, H. García, E. 2010. El ácido salicílico y su participación en la resistencia a patógenos en plantas. *Biológicas*. 12(2): 90 – 95
- Rodríguez-López E, González-Prieto J, Mayek-Pérez N. 2009. La Infección de *Colletotrichum gloeosporioides* (Penz.) Penz. Y Sacc. En Aguacatero (*Persea americana* Mill.): Aspectos Bioquímicos y Genéticos. *Revista Mexicana de Fitopatología*. 27(1): 53-63.
- Salvador L, Miranda P, Aragón N, Lara V. 1999. Recubrimiento de quitosán en aguacate. *Sociedad Química de México*. 43(1): 18-23
- Tamayo, P. 2007. Enfermedades del aguacate. Encuentro Nacional de la Cadena Productiva del Aguacate. *Politécnica* 4: 51-70.
- Usadel B, Poree F, Nagel A, Lohse M, Czedik-Eysenberg A, Stitt M. 2009. A guide to using MapMan to visualize and compare Omics data in plants: a case study in the crop species, Maize. *Plant Cell Environment*, 32: 1211-1229



ACTAS • PROCEEDINGS

VIII CONGRESO MUNDIAL DE LA PALTA 2015

del 13 al 18 de Septiembre. Lima, Perú 2015

www.wacperu2015.com

