

Breve introducción

HuangLongBing (HLB) es la enfermedad más devastadora de los cítricos y hasta el momento no cuenta con un tratamiento efectivo. Es causada por bacterias del género *Candidatus Liberibacter* spp. Estas bacterias son parásitos obligados del floema y se transmiten por un insecto vector (*Diaphorina citri*). Los síntomas del HLB incluyen alteraciones sistémicas en la fisiología, en el desarrollo y, en etapas avanzadas, la muerte de la planta.

Objetivo

Identificar mediante análisis de redes de coexpresión vías metabólicas y procesos biológicos asociados a la enfermedad HLB en plantas cítricas infectadas.



Figura 1. Síntomas de *HuangLongBing* causada por *Candidatus Liberibacter* spp. en hojas y frutos de naranja Valencia



Materiales y métodos

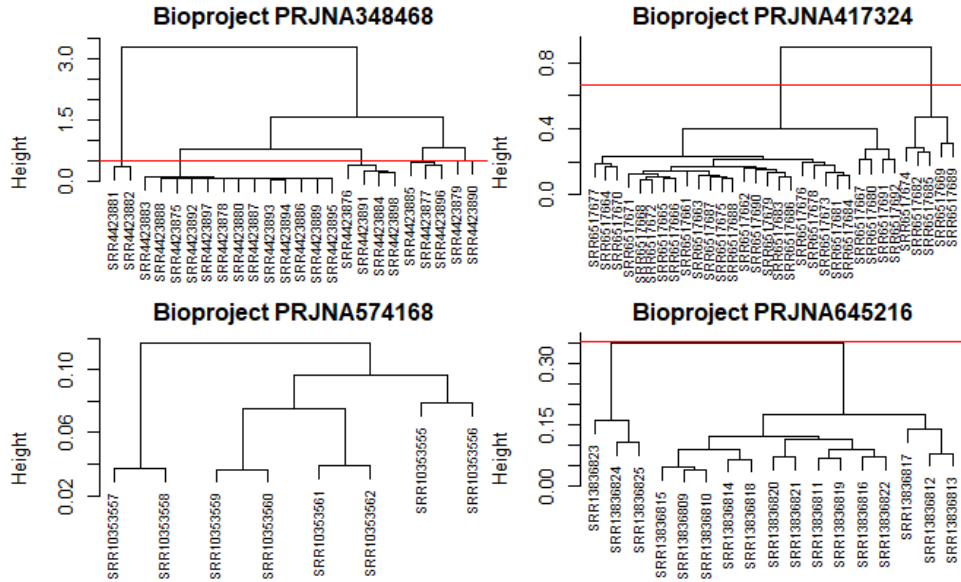


Figura 2. Agrupamiento jerárquico por distancia de Pearson de muestras ajustadas y normalizadas. Se excluyeron las muestras con distancia Pearson > 0,5 (línea roja)

Análisis Ontológicos-Funcionales

Se buscaron módulos de consenso entre las bibliotecas (Figura 3). y con *stringApp v1.7.1* y *ClueGO v.2.5.9*, en Cytoscape, se realizó un análisis de enriquecimiento funcional. Por textmining y homología proteica se anotaron la ontología de los genes ($p\text{-val} < 0.05$).

Procesamiento de datos

Se descargaron del NCBI 4 bibliotecas de secuenciación de ARN basados en interacciones entre planta, patógeno y vector: PRJNA348468, PRJNA417324, PRJNA574168 y PRJNA645216; las mismas comprendían 85 muestras de ARNseqs. Se eliminaron las lecturas de baja calidad usando *Trimmomatic v0.39*, luego se mapearon las lecturas contra el genoma de mandarina con *STAR v2.7.3a* (se obtuvieron alineamientos en promedio >80%) y se contaron las lecturas con *featureCounts v2.0.3* usando un archivo de anotación génica.

Red ponderada de co-expresión génica (WGCNA)

Se normalizaron los conteos de las lecturas a partir de una transformación estabilizadora de las varianzas con el paquete de R *DESeq2 v1.30.1*. Se agruparon jerárquicamente las muestras basándose en la distancia de Pearson y se filtraron valores atípicos (Figura 2). Luego se realizó un análisis de red ponderada de co-expresión a los fines de encontrar grupos de genes correlacionados entre los conjuntos de datos y posibles candidatos reguladores de co-expresión o biomarcadores mediante el paquete de R *WGCNA v.1.7.1* (Figura 3)

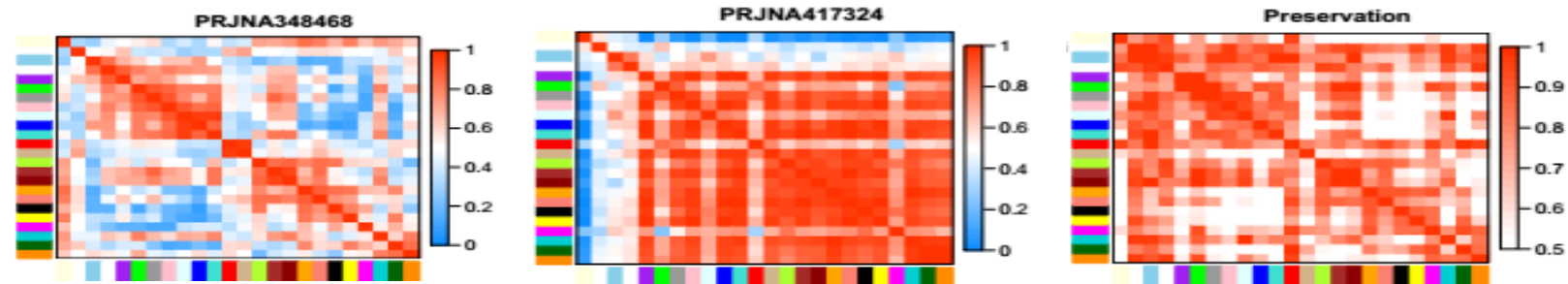


Figura 3. Ejemplo de análisis de consenso entre base de datos PRJNA348468 y PRJNA417324. En los mapas de calor, el rojo indica alta adyacencia (correlación positiva) y el azul indica baja adyacencia (correlación negativa). El mapa de calor de preservación muestra los genes modulares “*eigengene*” preservados donde se ve la conservación media de la adyacencia de cada *eigengene* versus los otros *eigengene*.

Resultados y conclusión

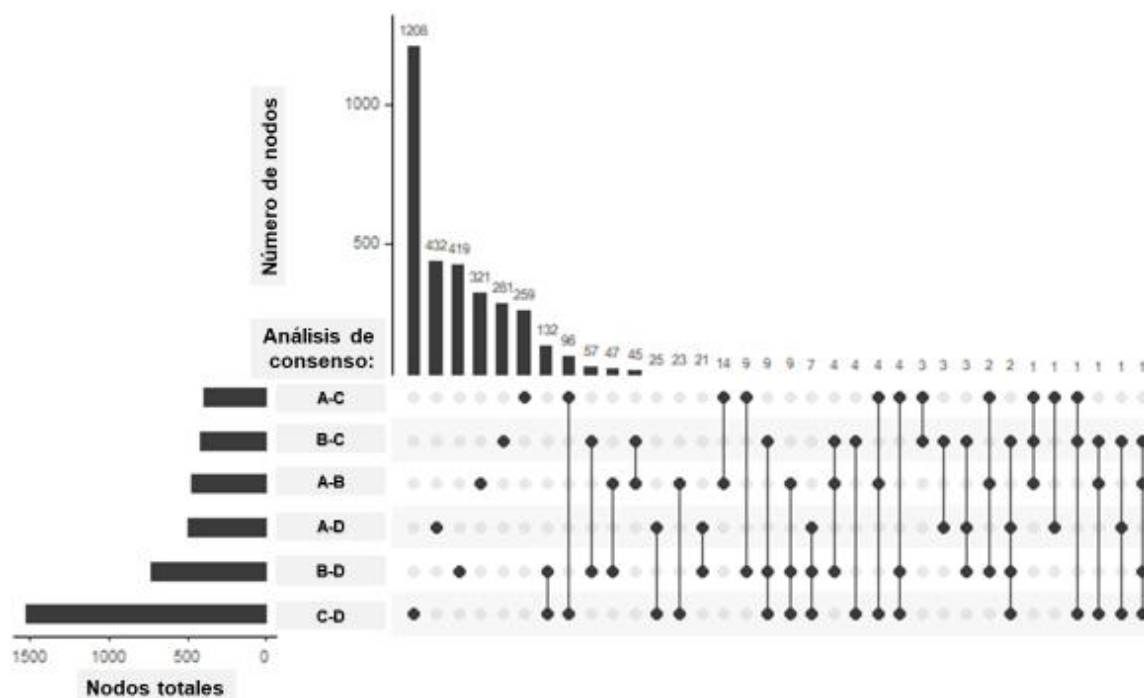


Figura 4. Diagrama Upset para resumir número de genes compartidos, representados en nodos, entre los diversos análisis de consenso realizados. A-PRJNA348468, B-PRJNA417324, C-PRJNA574168 y D-PRJNA645216.

La anotación funcional de los módulos es clave para generar nuevas hipótesis de cómo es la sintomatología del HLB en los primeros estadios y así poder predecir la función de aquellos genes aún no anotados que podrían estar vinculados a la misma.

- Al agrupar jerárquicamente los conteos de las muestras basándose en la distancia de Pearson y filtrar los valores atípicos se redujo de 85 a 65 las lecturas finales y el conteo de genes de 24533 a 19908.

- A partir del análisis de los módulos de consenso de redes de coexpresión de genes (RCG) se pudo observar que había genes modulares repetidos entre los distintos ensayos (Figura 4)

- La anotación ontológica de los genes presentó un enriquecimiento funcional de procesos biológicos como: respuesta a quitina, respuesta a estímulos biológicos, fosforilaciones y ácido salicílico; de componentes celulares como: plástidos, citoesqueleto, citoplasma; y de componentes moleculares como: actividad ATP-asa, actividad helicasa, factores de transcripción, entre otros (Figura 5).

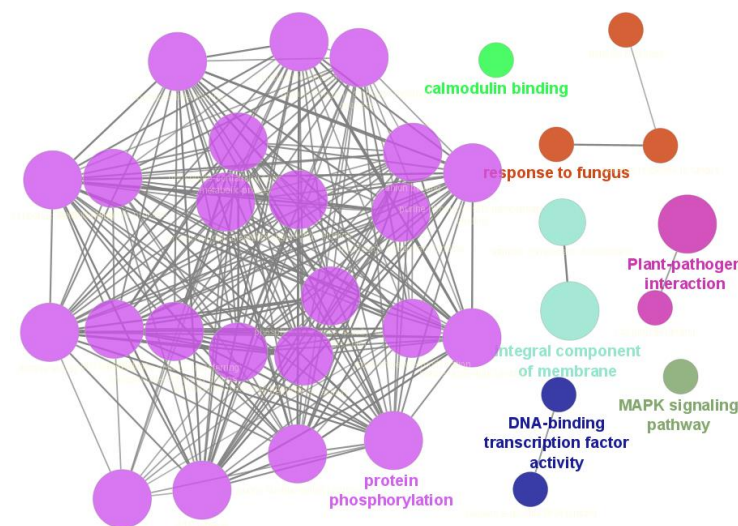


Figura 5. Genes de defensa obtenidos a partir del enriquecimiento funcional del módulo amarillo del consenso PRJNA348468 - PRJNA645216.