Optimización de un diseño experimental para el estudio de la interacción Citrus - *Candidatus* Liberibacter spp., causante de la enfermedad *HuangLongBing* mediante análisis de RNA-seq.

Machado, R. (1) *; Moschen, S.N. (2); Conti, G. (3); González, S.A. (3); Burdyn, L. (1); Hopp, H.E (3); Di Rienzo, J. A. (4); Fernández. P.

(1) EEA INTA Concordia, Argentina (2) EEA INTA Famaillá, Argentina. (3) Instituto de Agrobiotecnología y Biología Molecular (IABIMO), UEDD INTA CONICET. (4) Facultad de Ciencias Agropecuarias, UNC, Argentina. machado.rodrigo@inta.gob.ar

INTRODUCCIÓN Y OBJETIVOS

HuangLongBing (HLB) es la enfermedad más devastadora de los cítricos, que hasta el momento no cuenta con un tratamiento efectivo. Es causada por bacterias del género *Candidatus* Liberibacter. Son parásitos obligados de floema y se transmiten por un insecto vector (el psílido *Diaphorina citri*). En Argentina se ha detectado la especie *Ca.* Liberibacter *asiaticus* (CLas). Los síntomas del HLB incluyen alteraciones sistémicas en la fisiología y el desarrollo y, en etapas avanzadas, la muerte de la planta.

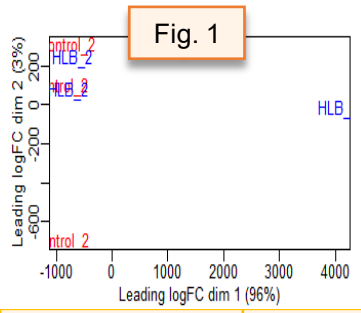
El método por excelencia actualmente utilizado para la detección de HLB es la PCR en tiempo real basada en la secuencia 16S rDNA de la bacteria. Sin embargo, la distribución irregular de las bacterias en las plantas, genera dificultades en el proceso de muestreo y posterior análisis. Además, la detección suele darse en estadios avanzados de la enfermedad. El objetivo de este trabajo es establecer, basándose en colecciones públicas de transcriptomas CLas-Citrus spp., un protocolo in-silico para optimizar el diseño experimental de un ARN-seq que se adapte a nuestro modelo de interacción CLas-Citrus y nos permita una detección temprana de biomarcadores, importantes para un diagnóstico temprano.

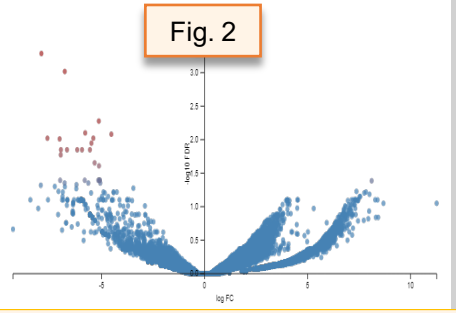
METODOLOGÍA Y RESULTADOS

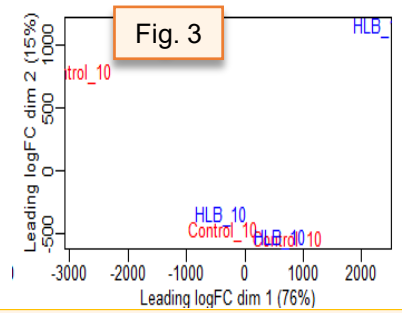
Se analizó un conjunto de bases de datos biológicos a partir de secuenciación masiva de ARN, haciendo especial énfasis en PRJNA348468 (muestras de limón) y PRJNA417324 (muestras de naranja), cuyo diseño experimental es similar al que nuestro grupo de investigación busca adoptar: especies cítricas injertadas sobre un pie, infectadas con HLB por injerto y seguimiento en el tiempo de las plantas con secuenciación masiva de muestras de hojas. En ambos estudios se comparó muestras infectadas versus no infectadas para distintos tiempos. Se realizó un análisis inicial de las lecturas con el software *FastQC*. Aquellas lecturas de baja calidad fueron removidas usando *Trimmomatic*. Luego se mapearon las lecturas contra el genoma de *Citrus clementina* (mandarina) con *STAR*, se contaron las lecturas con *featureCounts*. Al conjunto de genes expresados diferencialmente (DEG) se los identificó usando *edgeR* con un | log2 (tasa de cambio) | > 1.0 y una tasa de falsos descubrimientos (FDR) ≤0.05. Los perfiles agrupados con p ≤ 0.05 se consideraron estadísticamente significativos.

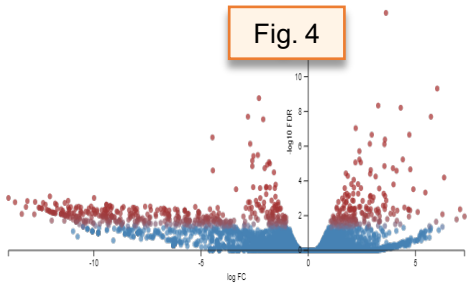
La asignación de las lecturas al genoma fue de 80-90%. Se realizaron diversos ensayos para decidir utilizar finalmente el genoma de mandarina. Los porcentajes mejoraron considerablemente en la mayoría de casos.

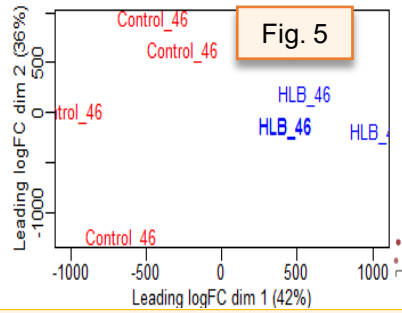
Tras varias semanas de la infección, las muestras son mas fácil de agrupar, ya que presentan patrones similares de expresión génica, lo cual se puede apreciar en los gráficos de escalado multidimensional (MDS) de las muestras a 2 semanas post injerto(spi) (Fig. 1), 10 spi (Fig.3) y 46 spi (Fig. 5). A 10 spi las muestras comienzan a describir cierta tendencia. Los DEG son detectable en los primeros estadios de infección y aumenta con el correr de los días: 2 spi = 29 genes (Fig. 2), 10 spi= 720 genes (Fig.4) y 46 spi= 33929 (Fig. 6)

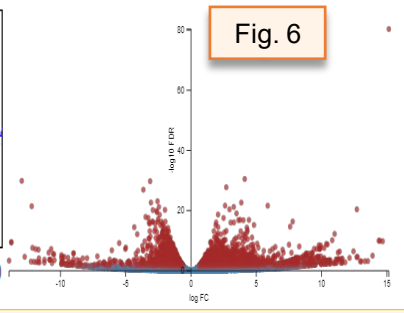












CONCLUSIONES

Estos análisis permitieron optimizar los tiempos de muestreo a 12, 16, 20 y 24 spi a fin de poder detectar los cambios transcriptómicos en etapas tempranas. El análisis exhaustivo de datos permitió seleccionar a mandarina (*Citrus clementina*) y a naranja (*Citrus sinensis*) como especies candidatas para nuestro estudio posterior. A diferencia de otros cítricos, sus genomas y transcriptomas están secuenciados y anotados, son especies altamente susceptibles a CLas y resultan de gran importancia para la región mesopotámica. Es de destacar que por la naturaleza híbrida de los cítricos, los mapeos de lectura pueden darse interespecie como en el presente trabajo.