

## Transcriptómica aplicada al viñedo (*Vitis vinifera*): caso práctico de Triumphalis

La sociedad y la agricultura del siglo XXI demanda cada vez más productos más sostenibles, ecológicos y que aporten un incremento de la productividad y la calidad, sin un incremento del coste para el consumidor. Para ello, el agricultor necesita soluciones 'inteligentes'; es decir, soluciones que no solo demuestren que funcionan, sino también 'por qué' funcionan, para optimizar su aplicación y resultado final.

D. García-Seco (PhD),  
G. Vázquez y C. Comas

Departamento I+D  
AFEPASA (Tarragona,  
España)

### Introducción

Este punto se hace más importante en el sector de los bioestimulantes, definidos como las sustancias o microorganismos que, al aplicarse a las plantas, son capaces de mejorar la eficacia de éstas en la absorción y asimilación de nutrientes, tolerancia a estrés biótico o abiótico o mejorar alguna de sus características agronómicas, independientemente del contenido en nutrientes de la sustancia. Existen dos razones fundamentales de esta mayor importancia en los bioestimulantes que en los fertilizantes tradicionales. En primer lugar, porque el impacto de un bioestimulante es más indirecto que en los fertilizantes, los bioestimulantes generalmente refuerzan a la planta metabólicamente, no un nutriente en concreto; es decir, es un efecto robusto pero pocas veces inmediato, sino en un medio plazo, por lo que a veces no es tan llamativo para el cliente final. Y, en segundo lugar, por la avalancha de 'productos milagro' o *'snake oil'* que reclaman ser bioestimulantes cuando como mucho son levemente 'reverdecedores', y muchas veces ni siquiera son beneficiosos.

Para conocer por qué funciona un bioestimulante es fundamental conocer la fisiología de la planta y entender la compleja red biológica de procesos que ocurren dentro de una planta. En las últimas dos décadas se ha dado un salto importantísimo en este aspecto, se han desarrollado tecnologías que nos permiten conocer qué está ocurriendo dentro de la planta, de una manera impensable hace pocos años. Este conjunto de tecnologías se les llaman las '*ómicas*' (*omics* en inglés). Las *ómicas* son varias disciplinas de la biología cuyos nombres terminan en el sufijo *-ómica*, como genómica, proteómica, metabolómica, metagenómica y transcriptómica. Las *ómicas* tienen como objetivo la caracterización y cuantificación colectiva a gran escala de grupos de moléculas biológicas que se traducen en la estructura, función y dinámica de un organismo u organismos. En nuestro caso nos ayudan a entender lo que les ocurre a las plantas una vez aplicamos un bioestimulante determinado.

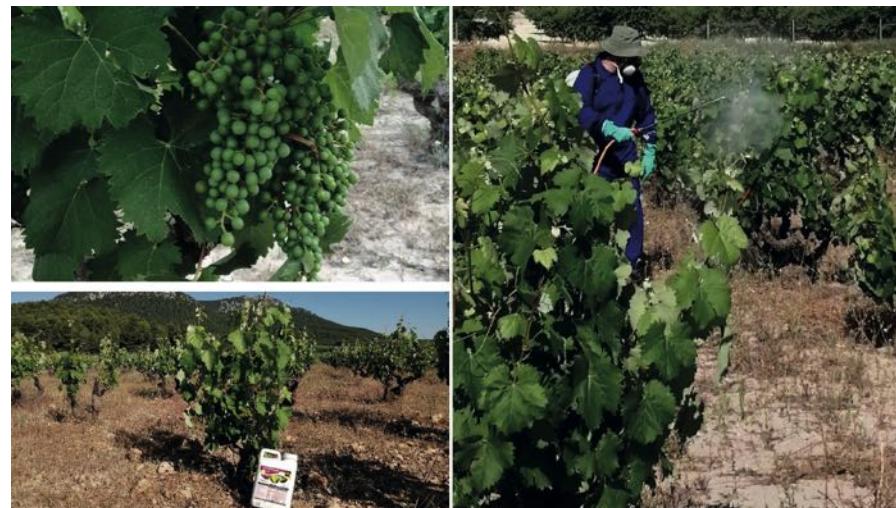


Figura 1. Aplicación de Triumphalis en el viñedo durante el desarrollo del proyecto en Mula (Murcia).

Concretamente, la transcriptómica se define como el estudio del conjunto de ARN expresados en un tejido dado en unas condiciones determinadas. Existen varias técnicas para analizar el transcriptoma de un ser vivo; la tecnología que más se utilizaba hace unos años eran los *microarrays*. Esta técnica consiste en colocar miles de secuencias génicas en un chip. Una muestra que contiene ADN o ARN se pone en contacto con el chip. El chip produce una cantidad de luz cuando detecta que una secuencia de esta muestra es similar a una secuencia del chip. Esta tecnología fue muy innovadora en su día, pero tenía una potencia muy limitada a las pocas especies para las que existían chips. La técnica más novedosa e innovadora para analizar el transcriptoma se denomina RNA-seq (secuenciación de ARN), también llamado en inglés *Whole Transcriptome Shotgun Sequencing*. Utiliza la secuenciación masiva para revelar la presencia y cantidad de ARN en una muestra biológica en un momento dado. El RNAseq una de las tecnologías que más han avanzado los últimos años en el ámbito de la biología vegetal y en la interacción planta-microorganismo, aunque su aplicación en el sector agrario está siendo aún muy limitada y pocas empresas las utilizan como forma de demostrar el modo de acción de sus productos.

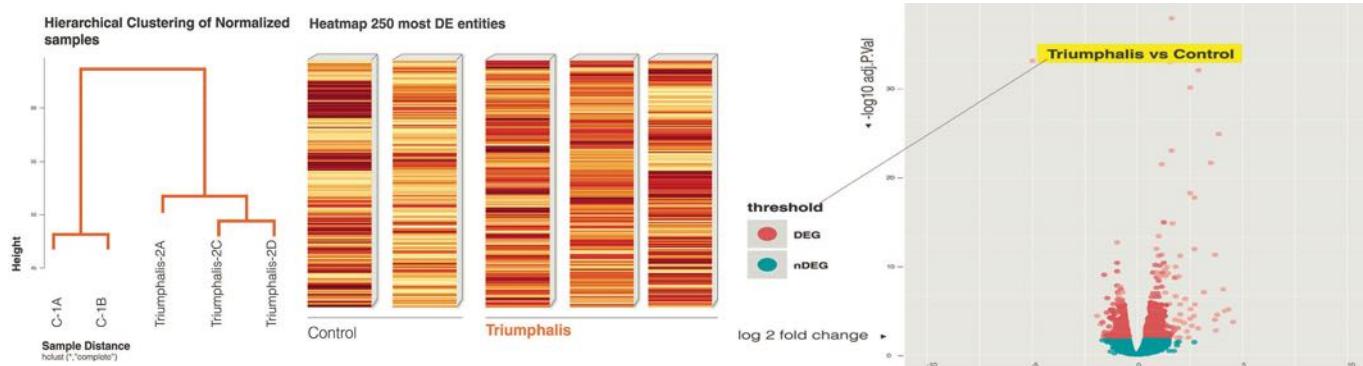


Figura 2a. Hieratical Cluster de las muestras normalizadas. 2b. Heatmap de los 250 genes con mayor expresión diferencial. 2c. Volcano Plot.

## Material y métodos

El objetivo del departamento de I+D de AFEPASA en este proyecto era buscar una explicación científica, biológica, molecular, pero a la vez intuitiva a los buenos resultados observados en campo con el bioestimulante *Triumphalis*, producto desarrollado por los laboratorios de I+D de AFEPASA que combina la tecnología Sultech con aminoácidos libres y extractos vegetales.

Para ello se realizó un ensayo en el viñedo ecológico en vaso en Mula (Murcia) (Figura 1) de la variedad Monastrell, en un marco de plantación 2 x 2 (tresbolillo) con una densidad de 2.500 plantas por hectárea en secano. Se realizaron dos tesis (con tres réplicas de 50 plantas por tesis) en un mismo mantenimiento ecológico, una como control y otra realizando dos aplicaciones foliares de *Triumphalis* (15 de junio y 15 de julio de 2020).

Se realizó el muestreo seis días después de la última aplicación, para que el producto diera tiempo a hacer efecto. Se muestrearon las plantas realizando un pool de hojas de cada réplica, congelando las muestras inmediatamente y manteniendo las muestras a -80°C hasta la extracción del ARN y su secuenciación.

Se analizaron mediante RNAseq con la tecnología Illumina Next Seq nueve muestras de RNA de hoja de vid, de las que tres correspondían al tratamiento control (1A, 1B y 1C) y tres al tratamiento *Triumphalis* (2A, 2C y 2D). Se obtuvo un output total de 26,04 Giga base pairs (Gbp), con 336 millones de lecturas totales, un Q30 del 92,38% y una media de 36M de lecturas (Pair End reads) por muestra. La profundidad mínima fue de 35M de PE reads y la máxima de 37,1M PE reads.

## Resultados y discusión

Los datos obtenidos mediante RNAseq son considerados un 'big-data biológico'. La inmensidad de datos (26,04 Gbp) que se obtienen mediante el RNAseq precisa de un análisis bioinformático muy complejo. En primer lugar, se llevó a cabo un análisis de expresión diferencial incluyendo un análisis de enriquecimiento funcional; es decir, analizar los genes y las funciones de estos de forma global.

Para poder visualizar esta ingente cantidad de datos se han utilizado complejas herramientas bioinformáticas

que se describirán a continuación. Una forma muy visual que muestra la complejidad del análisis que se estudia es una 'sencilla' hoja de Excel; esta muestra todos los genes identificados y sus datos estadísticos de expresión tiene 17.829 filas. En primer lugar, se analizaron cada uno de estos genes mediante un análisis de Hieratical Clustering y un Heatmap para observar si las muestras de Control y las muestras tratadas con *Triumphalis* agrupaban entre ellas. En las Figuras 2a y 2b se puede observar claramente como las muestras control tienen un perfil transcriptómico muy diferente a las muestras de las plantas tratadas. El Volcano Plot (Figura 2c) ayuda a visualizar la gran cantidad de genes que se expresan de forma diferencial en las muestras.

En el análisis comparativo del tratamiento respecto al control existen 1.054 genes de un total de 17.920 que están diferencialmente expresados, lo que supone aproximadamente un 6% de los genes del genoma de la vid diferencialmente expresados con el tratamiento *Triumphalis*. De estos genes diferencialmente expresados, 566 (un 54%) muestran un valor de expresión mayor en el tratamiento que en el control, y los 448 genes restantes (46%) muestran un valor de expresión menor en el tratamiento que en el control.

Una vez identificado que existe un fuerte efecto bioestimulante de *Triumphalis* en la planta, se tuvo que identificar qué grupos de genes y qué funciones tienen estos genes diferencialmente expresados. Para ellos se realizó el análisis de expresión diferencial basándose en la base de datos de KEGG<sup>1</sup> y la ontología de genes GO, que anota cada gen en base a tres grupos: procesos biológicos (BP), función molecular (MF) y componentes celulares (CC). En este análisis se hizo un corte de 0,05, por lo que todos los genes incluidos son significativos.

En cuanto al análisis de enriquecimiento funcional, el análisis de enriquecimiento basado en la base de datos KEGG muestra que hay genes diferencialmente expresados en las rutas del metabolismo del almidón y la sacarosa (Figura 3), en el metabolismo de la galactosa, en las rutas de biosíntesis de flavonoides, y en las rutas de biosíntesis de tropano, piperidina y alcaloides piridínicos.

<sup>1</sup> <https://www.genome.jp/kegg/>

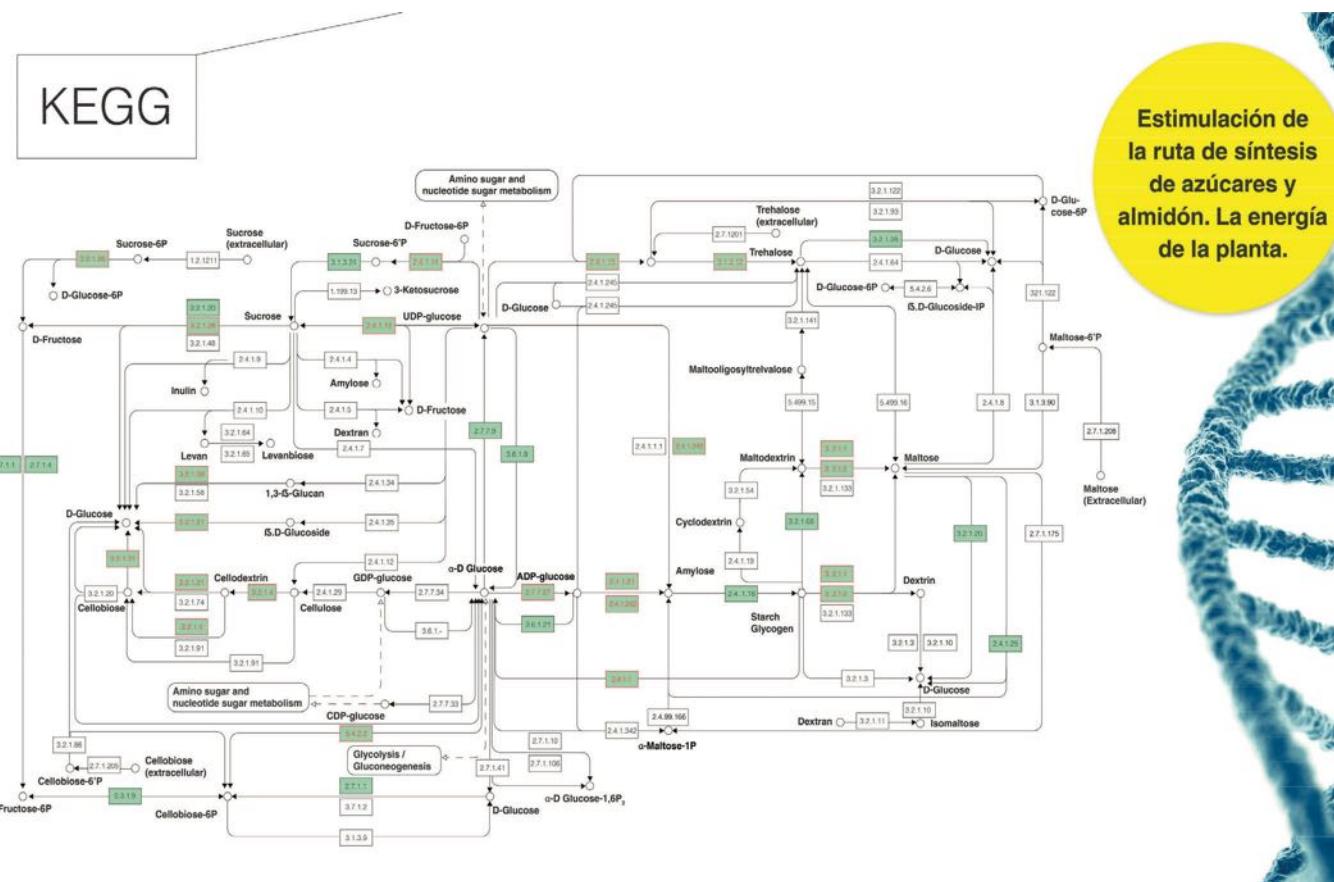


Figura 3. Diagrama KEGG de la ruta de síntesis de azúcares y almidón.

Por otra parte, el análisis de enriquecimiento basado en GO referido a procesos biológicos (BP) muestra que hay genes diferencialmente expresados en procesos relacionados con el metabolismo primario; en concreto, con el metabolismo y biosíntesis de carbohidratos, incluyendo metabolismo de oligosacáridos, así como procesos del metabolismo de sustancias orgánicas como la biosíntesis y metabolismo de flavonoides, así como en procesos de transporte como el transporte de aniones inorgánicos, incluyendo transporte transmembrana de estos aniones, transporte de carbohidratos y transporte transmembrana de sulfato. Además, hay genes diferencialmente expresados en procesos biológicos relacionados con respuestas a estrés tales como respuesta a estímulos de temperatura, respuesta al calor. La ontología basada en componentes celulares (CC) muestra genes diferencialmente expresados especialmente en la región extracelular, y también en los espacios intercelulares, plasmodesmos, protoplastos, membrana plasmática, pared celular entre otros. Y, finalmente, la ontología basada en función molecular (MF) muestra genes diferencialmente expresados implicados en actividad catalítica, concretamente actividad transferasa de grupos glicosídicos como glucosiltransferasas y galactosiltransferasas. Asimismo, hay genes diferencialmente expresados implicados en actividad transportadora, incluyendo transporte transmembrana activo, transporte transmembrana de sulfato, etc.

Otra forma de abordar este análisis funcional se realizó mediante la herramienta Mapman que nos da una mejor

visualización de los mecanismos moleculares que se están mejorando en la planta (Figura 4).

En este análisis se pueden visualizar cómo gracias a la aplicación de Triumphalis se han sobreexpresado genes relacionados con la respuesta REDOX de la planta frente a estrés oxidante (Figura 4). Además, podemos visualizar cómo se sobreexpresan genes relacionados con la pared celular y algunas hormonas como auxinas o ácido abscísico.

En este mismo análisis también se ha identificado una mayor expresión de los genes mitocondriales relacionados con la generación de energía. Esto resulta muy lógico, ya que como hemos visto anteriormente, en el tratamiento se puede observar cómo genes relacionados con el ciclo de Calvin, a través del cual la planta transforma  $\text{CO}_2$  y agua en azúcares, se han visto estimulados en el tratamiento. Se están produciendo más azúcares y por tanto la planta dispondrá de más energía para crecer con más recursos, y por tanto con más vigor. Este incremento de la actividad del ciclo de Calvin encaja con el resultado observado de la sobreexpresión de la ruta de señalización de los tetrapirroles. Esta ruta es el inicio de la biosíntesis de la clorofila, fundamental para el buen rendimiento de las plantas. Es decir, toda la planta dispone de más energía, porque el ciclo de Calvin es estimulado, y a su vez se fomenta la formación de más clorofila, todo ello ocurriendo en los cloroplastos de las plantas. Este incremento en la actividad fotosintética y de disposición de más energía explica los resultados obtenidos en campo

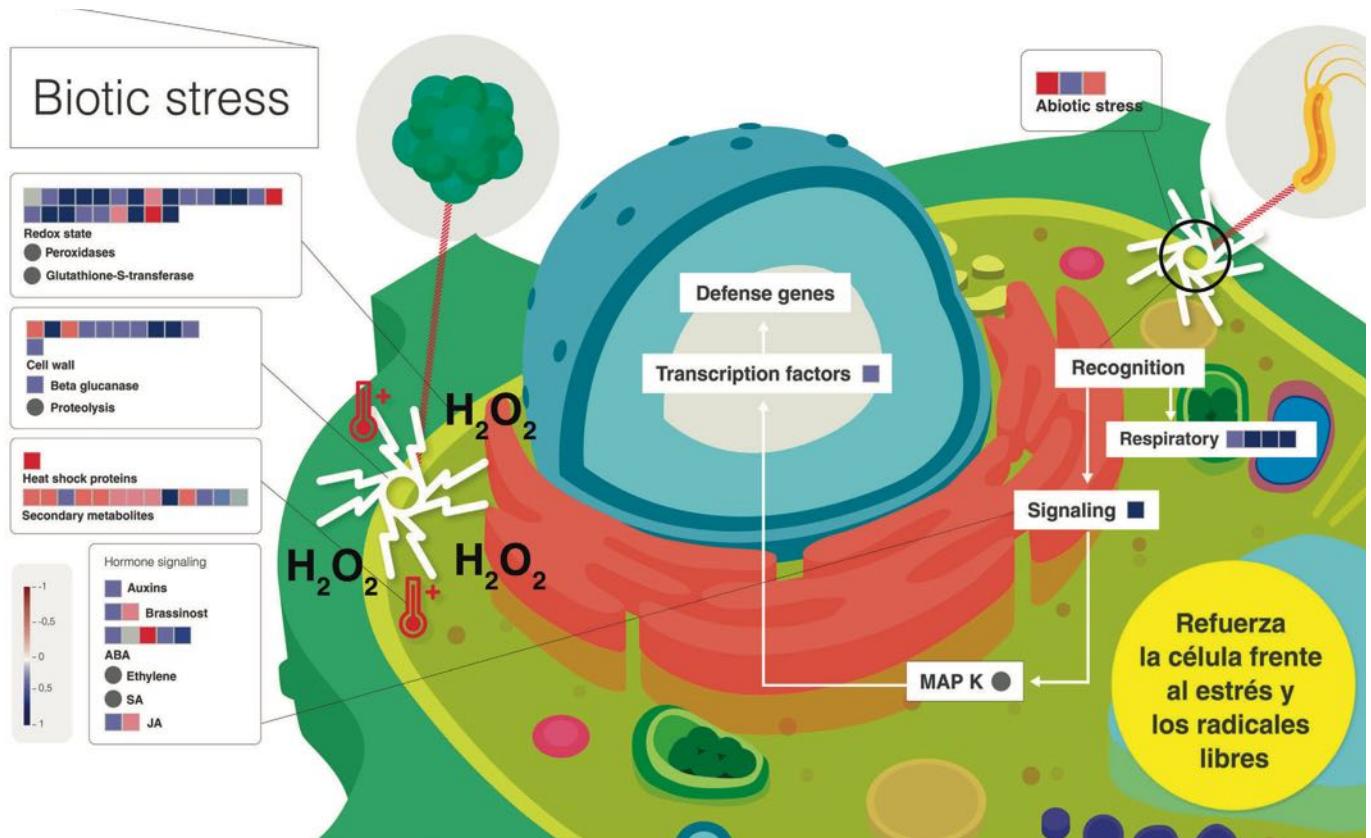


Figura 4. Visualización de Diagrama de Mapman de los genes con expresión diferencial relacionados con estrés biótico y abiótico.

durante los últimos años, no solamente en vid, sino también en olivo, así como en hortícolas. Se ha visto cómo, al aplicar *Triumphalis*, la planta crece con más vigor y más energía, pudiendo defenderse mucho mejor del estrés abiótico.

También se observa que genes relacionados con el metabolismo del azufre y el transporte y metabolismo de sulfatos se han estimulado, así como el del nitrógeno. Este punto es muy importante, ya que demuestra que la combinación de azufre Sultech y el nitrógeno de alta calidad que contienen los aminoácidos de la formulación tiene una gran influencia en la planta, mejorando el crecimiento de ésta.

## Conclusiones prácticas

En resumen, se ha observado una significativa expresión diferencial de genes respecto al tratamiento control, y muchos genes diferencialmente expresados están implicados en la respuesta a estrés de la planta y a procesos importantes del metabolismo primario y biosíntesis de moléculas orgánicas.

Concretamente hemos podido demostrar que:

- *Triumphalis* tiene un efecto bioestimulante en la viña.
- Estimula la ruta de biosíntesis de carbohidratos.
- Moviliza las defensas contra estrés abiótico.
- Estimula la ruta de absorción de nitrógeno y azufre.

Como conclusión, podemos afirmar que en esta investigación se ha demostrado cómo la tecnología transcriptómica (concretamente la técnica RNAseq) es una de las herramientas más potentes en el panorama tecnológico para demostrar el modo de acción de productos bioestimulantes como *Triumphalis*.