



Identificación de genes relacionados con la tolerancia a la sequía en 41 variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd)

Identification of genes related to drought tolerance in 41 varieties of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd)

Serna F.*; Montenegro, J.D.; Cruz, W.; Koc G.

Instituto Nacional de Innovación Agraria. La Molina 15024, Lima, Peru.

Received September 2, 2019. Accepted February 16, 2020.

Resumen

El objetivo de la investigación fue identificar los genes relacionados con la tolerancia a la sequía en la quinua. Para ello, se evaluaron 41 variedades de *Chenopodium quinoa* Willd con seis repeticiones; en la etapa de floración, se seleccionaron al azar tres macetas/material, de cada variedad, para ser inducidas a sequía total por dos semanas, reanudándose el riego después de ese periodo, las otras tres fueron el control. A partir del día 27 después de la siembra, se midió el nivel de clorofila y se clasificó como tolerante o susceptible a la sequía, en función de su índice de contenido clorofila (ICC). Para la identificación de genes se tomaron muestras de hoja de tres variedades (Red head, Salcedo INIA y Kankolla 1). La Extracción del ARN se realizó usando el reactivo reagent® TRI y para el secuenciamiento de transcriptomas se utilizó la plataforma de Illumina. Se identificaron 26 genes en las tres variedades de quinua, pero en las variedades tolerantes a la sequía; tres de ellos son regulados al alza ante la exposición a la sequía y cinco genes (AUR62037809, AUR62000271, AUR62037807, AUR62042825 AUR62009791) tienen un cambio en su patrón de expresión como consecuencia de la exposición a la sequía.

Palabras clave: quinua; RNA-Seq; transcriptoma; sequía; Clonación al Azar.

Abstract

The objective of the research was to identify the genes related to drought tolerance in quinoa. For this, 41 varieties of *Chenopodium quinoa* Willd were evaluated with six repetitions; in the flowering stage, three pots/material, of each variety, were randomly selected to be induced to total drought for two weeks, resuming irrigation after that period, the other three were the control. From day 27 after sowing, the chlorophyll level was measured and classified as tolerant or susceptible to drought, based on its chlorophyll content index (CCI). For the identification of genes, leaf samples of three varieties were taken (Red head, Salcedo INIA and Kankolla 1). RNA Extraction was performed using reagent® TRI reagent and for the transcriptome sequencing the Illumina platform was used. 26 genes were identified in the three varieties of quinoa, but in the drought tolerant varieties; three of them are regulated upwards when exposed to drought and five genes (AUR62037809, AUR62000271, AUR62037807, AUR62042825 AUR62009791) have a change in their pattern of expression as a result of drought exposure.

Keywords: quinoa; RNA-Seq; transcriptome; drought; Random Cloning.

1. Introducción

La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd) es un importante cultivo nativo andino (Graf *et al.*, 2016), originaria del Ande Sudamericano (Nuñez, 2015; Vidueiros *et al.*, 2015), fue domesticada hace más de 7000 años (Bazile *et al.*, 2016a). Ha sido protegida y

conservada por las poblaciones indígenas de América del Sur (Bojanic, 2011). Está adaptada para crecer en una gran variedad de sistemas agrícolas, particularmente en la meseta andina a más de 3500 m.s.n.m. y ha desarrollado tolerancia a varios tipos de estrés abiótico como a la helada, sequía,

How to cite this article:

Serna, F.; Montenegro, J.D.; Koc, G. 2020. Identificación de genes relacionados con la tolerancia a la sequía en 41 variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd). Scientia Agropecuaria 11(1): 31-38.

* Corresponding author
E-mail: mfserna@gmail.com (F. Serna).

salinidad (Ruiz, 2016) y a diferentes tipos de suelo (Bazile et al., 2016a). Sin embargo, presenta baja tolerancia al calor (Bazile et al., 2016a), pero buenas cualidades nutricionales (Ahumada et al., 2016); contiene entre 13,81 y 21,9% de proteínas, más aún la calidad de estas son del tipo albúmina y globulina (Nuñez, 2015). Es considerada como el único alimento vegetal que contiene todos los aminoácidos esenciales y es rica en vitaminas, minerales, ácidos grasos y fibra (Avalos, 2016; FAO, 2018), lo que podría resolver problemáticas de seguridad alimentaria (Bazile et al., 2016b). En las últimas décadas ha surgido el interés por cultivar la quinua fuera de Sudamérica (Bazile y Baudron, 2014; Ramírez et al., 2016). Esto, debido a su riqueza nutricional, así como a su habilidad para adaptarse a un amplio rango de condiciones agroecológicas y a su alto nivel de resistencia en ambientes marginales (Iqbal, 2015). En el año 2013, a la quinua se le otorgó un alto perfil como cultivo con el potencial de crecer en importancia en la agricultura mundial (Ruiz et al., 2016). La habilidad adaptativa a diferentes ambientes del cultivar dentro de una especie radica en gran medida a su diversidad genética (Gilchrist et al., 2006). En Sudamérica el mejoramiento genético de la quinua se ha enfocado en desarrollar variedades de semillas grandes, de tipo dulce y amarga, con un mayor potencial de rendimiento (Zurita-Silva et al., 2014). Se han realizado estudios sobre los efectos del estrés de sequía temprana en quinua (Morales et al., 2011) y sobre el impacto del estrés hídrico y salino en las plantas de quinua (Aly et al., 2018). Sin embargo, no hay estudios realizados a la fecha que se enfoquen a profundidad sobre los genes que son resistentes a la sequía en esta especie. Por otro lado, la quinua es un alotetraploide con un número básico de cromosomas de 9 ($2n = 4x = 36$), con un tamaño genómico de aproximadamente 1,5 Gbp (Kolano et al., 2016), que exhibe herencia disómica para la mayoría de los caracteres cualitativos y es principalmente autógama (Ward, 2000). En las plantas superiores el estudio de herencia monoparental y biparental se ha basado en estudios de genes del cloroplasto, dado que por su haploidía presenta una sola copia (Mulo et al., 2009). El objetivo de este trabajo fue identificar los genes relacionados con la tolerancia a la sequía en la quinua (*Chenopodium quinoa Willd.*).

2. Materiales y métodos

La presente investigación fue conducida en el Invernadero del Centro Experimental y

Laboratorio Multipropósito del Instituto Nacional de Innovación Agraria (INIA), distrito de La Molina, departamento de Lima, Perú. Localizado a 12° 4' 36,03" S y 76° 56' 42,857" O con una altitud de 112 m.s.n.m.

Tabla 1
Lista de variedades de plantas

N°	Código	Nombre	Región	País
1	cq01	Red head		USA
2	cq02	INIA 431 – Altiplano	Puno	Perú
3	cq03	Illpa INIA	Puno	Perú
4	cq04	INIA 415 – Pasankalla	Puno	Perú
5	cq05	Salcedo INIA	Puno	Perú
6	cq06	INIA 420 - Negra Collana	Puno	Perú
7	cq07	Blanca de Junín	Junín	Perú
8	cq08	Huancayo	Junín	Perú
9	cq09	INIA 433 - Santa Ana/AIQ/FAO	Junín	Perú
10	cq10	Hualhuas	Junín	Perú
11	cq11	Compuesto A	Junín	Perú
12	cq12	Compuesto B	Junín	Perú
13	cq13	Chucuito	Lima	Perú
14	cq14	Compuesto Tolerante a Sequía Rojo	Puno	Perú
15	cq15	Compuesto Tolerante a Sequía Amarillo	Puno	Perú
16	cq16	Compuesto Tolerante a Sequía Rosado	Puno	Perú
17	cq17	Compuesto Tolerante a Sequía Anaranjado	Puno	Perú
18	cq18	Compuesto Tolerante a Sequía Blanco grano grande	Puno	Perú
19	cq19	Compuesto Tolerante a Sequía Blanco grano pequeño	Puno	Perú
20	cq20	Misquinua Compuesto	Puno	Perú
21	cq21	Compuesto Tolerante a Sequía Púrpura	Puno	Perú
22	cq22	Compuesto Tolerante a Sequía Rosado medio	Puno	Perú
23	cq23	Compuesto Tolerante a Sequía negro	Puno	Perú
24	cq24	Quillahuaman	Cusco	Perú
25	cq25	Amarillo Marangani	Cusco	Perú
26	cq26	Amarillo Sacaca	Cusco	Perú
27	cq27	INIA 433 - Santa Ana/AIQ/FAO	Cusco	Perú
28	cq28	INIA 431 – Altiplano	Cusco	Perú
29	Cq29	Salcedo INIA	Cusco	Perú
30	cq30	Illpa INIA	Lima	Perú
31	cq31	INIA 415 – Pasankalla	Cusco	Perú
32	cq32	INIA 420 - Negra Collana	Cusco	Perú
33	cq33	Blanca de Junín	Cusco	Perú
34	cq34	Hualhuas	Cusco	Perú
35	cq35	Huancayo	Cusco	Perú
36	cq36	Kancolla 1	Puno	Perú
37	cq37	Kancolla 2	Puno	Perú
38	cq38	Kancolla 3	Puno	Perú
39	Cq39	Kancolla 4	Puno	Perú
40	cq40	Real Boliviana Amarillo	Puno	Bolivia
41	cq41	Real Boliviana Rojo	Puno	Bolivia

El material vegetal utilizado fue de la especie *Chenopodium quinoa* Willd, obtenida de la Colección Nacional de Germoplasma de Quinoa del Perú (Tabla 1). El experimento se condujo en invernadero bajo iguales condiciones de temperatura, humedad e iluminación. Las macetas utilizadas eran de 22 cm de profundidad x 29 cm de diámetro, el suelo utilizado fue esterilizado y estuvo conformado por abono orgánico y vermiculita (~ 280 g/maceta).

Se cultivaron 41 variedades de *Chenopodium quinoa* Willd, cinco semillas de cada variedad en una maceta, se realizó seis réplicas (30 plantas por accesión). Las plantas recibieron el primer día una irrigación de aproximadamente (200 ml/bote), Además se añadió, cada 48 horas, una solución de agua hidropónica (100 ml/bote). 27 días después de la siembra, de las seis macetas de cada variedad, se seleccionaron al azar tres macetas para ser expuestas a una sequía completa (tratamiento) durante dos semanas. Luego de ese periodo se reanudó el riego regular. Las tres macetas restantes (control) continuaron con el sistema de riego.

La clasificación de las 41 variedades como tolerantes o susceptibles a la sequía se basó en la comparación del índice de contenido clorofila (ICC) del control y del tratamiento de cada variedad. El ICC fue medido en prefloración, floración y posfloración utilizando el medidor MC-100 CCI (instrumentos Apogee). Se realizaron tres comparaciones de cada variedad: control de prefloración - posfloración y sequía posfloración.

Secuenciación de ARN

El ARN total fue extraído a partir de las hojas usando el reactivo reagent® TRI, siguiendo el protocolo de la compañía proveedora. Sin embargo, en el paso final del protocolo se realizó una precipitación adicional con acetato de sodio pH 5,2. Las librerías se prepararon a partir de ARN total utilizando el kit TruSeq Strandedm RNA (Illumina) siguiendo las recomendaciones del fabricante. La secuenciación se realizó con el sistema NovaSeq 6000 (Illumina) por 200 ciclos (2 x 100 pb).

Análisis diferencial de expresión génica

Los adaptadores fueron seleccionados y retirados junto con los tramos de baja calidad usando el programa Trimmomatic v0.36 (Bolger et al., 2014), con los parámetros siguientes SLINGWINDOWS: 4: 15 y MINLEN: 75. Las librerías limpias se evaluaron con el programa FastQC (Wingett y Andrews, 2018) y se mapeó al genoma de

referencia de *Chenopodium quinoa* Cq_PI614886_V1_pseudomolecule (Jarvis et al., 2017) utilizando el alineador STAR v2.7a (Dobin et al., 2013) con parámetros estándar. Las alineaciones ordenadas por coordenadas (BAM) se utilizaron para producir una tabla de conteo utilizando el Programa featureCounts del paquete Subread v1.6.4 (Liao et al., 2013) con parámetros estándar.

El análisis de expresión génica diferencial se realizó con el paquete estadístico R usando la librería bioconductor edgeR v3.26.5 (Robinson et al., 2010; McCarthy et al., 2012). Se realizó un filtrado inicial de los genes de recuento bajo (logCPM \leq 1 en menos de 3 bibliotecas) antes de la normalización del recuento con la media recortada de los valores M (TMM). La estimación de dispersión, el ajuste del modelo binomial negativo y la prueba de expresión diferencial se realizaron utilizando el método de cuasi likelihood (QLF). Se seleccionaron resultados significativos utilizando un umbral de FDR \leq $1e^{-2}$ y LFC $>$ 1. Se produjeron mapas de calor (Heat maps) de genes expresados diferencialmente con el programa Complex Heatmap v2.0.0 (Gu et al., 2016).

Análisis funcional

Los genes seleccionados fueron anotados funcionalmente con la herramienta en línea InterProScan v5.0 (InterPro, 2019).

3. Resultados y discusión

Selección de plantas e índice de contenido de clorofila

En la Tabla 2 se muestran las variedades de *Chenopodium quinoa* Willd clasificadas como tolerantes y susceptibles a la sequía. Las variedades evaluadas presentaron una respuesta fisiológica diferente a la sequía, principalmente durante el proceso posterior a la floración; cq01, fue la variedad más susceptible, disminuye su contenido de clorofila al sexto día de estrés por sequía y recupera su nivel de clorofila 14 días después de recibir nutrientes y agua. Ello se debe a la capacidad de la quinoa en recuperar rápidamente su nivel fotosintético anterior y su área foliar después de un periodo de sequía (Jacobsen, 2009). Mientras que, cq05 y cq37 muestran mejor respuesta a la exposición a la sequía, Según Issa et al. (2019) la tolerancia de la quinoa a la sequía sea el resultado de su capacidad para mantener el estado de salud celular. Similar resultado fue reportado por INIA

(2013) para la variedad cq05; sin embargo, Apaza et al. (2013) reportaron moderada tolerancia a la sequía acq05 y tolerante a la sequía a cq37. Mientras que, Al-Naggar et

al. (2017) y Iqbal et al. (2018) reportaron los genotipos CICA-17 y, 2-Want e IESP como tolerantes a la sequía respectivamente.

Tabla 2
Variedades tolerantes y susceptibles a la sequía

Tolerante		Susceptible	
cq03	Ilpa INIA	cq01	Red head
cq04	INIA 415- Pasankalla	cq02	INIA 431-Altiplano
cq05	Salcedo INIA	cq07	Blanca de Junin
cq06	INIA 420 -Negra Collana	cq08	Huancayo
cq12	Compuesto B	cq09	INIA 433 - Santa Ana /AIQ/FAO
cq23	Compuesto tolerante a sequía	cq10	Hualhuas
cq27	INIA 433 - Santa Ana /AIQ/FAO	cq11	Compuesto A
Cq29	Salcedo INIA	cq13	Chucuito
Cq30	Ilpa INIA	cq14	Compuesto Tolerante a Sequía Rojo
Cq31	INIA 415-Pasankalla	cq15	Compuesto Tolerante a Sequía Amarillo
Cq32	INIA 420-Negra Collana	cq16	Compuesto Tolerante a Sequía Rosado
Cq33	Blanca de Junin	cq17	Compuesto Tolerante a Sequía Anaranjado
Cq34	Hualhuas	cq18	Compuesto Tolerante a Sequía Blanco grano grande
Cq35	Huancayo	cq19	Compuesto Tolerante a Sequía Blanco grano pequeño
Cq36	Kankolla 1	cq20	Misiquina
Cq37	Kankolla 2	cq21	Compuesto tolerante purpura
Cq38	Kankolla 3	cq22	Compuesto tolerante
Cq40	Real Boliviana amarillo	cq24	Quillahuaman
		cq25	Amarillo marangani
		cq26	Amarillo Sacaca
		cq28	INIA431 Altiplano
		cq39	Kankolla 4
		cq41	Real Boliviano rojo

Tabla 3
Librerías de las tres variedades

Librería	Total de lecturas (PE)	Trimmed	Mapeado	Mapeado (%)	Asignado	Asignado (%)
s1	21235460	15958645	13195695	82,69%	22010142	83,40%
s2	26042624	17496768	15207256	86,91%	25870676	85,06%
s3	21359320	23116067	15634594	67,64%	22739986	72,72%
s4	22487349	19291454	17032021	88,29%	28937511	84,95%
s5	18934513	19080219	15951328	83,60%	25563908	80,13%
s6	20138341	19107699	15765109	82,51%	26643179	84,50%
s7	17652281	16883653	13686491	81,06%	22531919	82,31%
s8	20785782	21192538	18304907	86,37%	30238746	82,60%
s9	25020732	17311826	8832200	51,02%	10043666	56,86%
s10	24709355	21110813	17642316	83,57%	29490980	83,58%
s11	22510468	21071159	18805370	89,25%	30170053	80,22%
s11_b	23463593	19528151	8691231	44,51%	10393715	59,79%
s12	18440773	18869351	16250968	86,12%	26759953	82,33%
s13	23263746	21047103	18311306	87,00%	30081114	82,14%
s14	24915800	21931420	19467683	88,77%	32451811	83,35%
s15	20059027	20337430	17879369	87,91%	29700693	83,06%
s16	24172363	21864578	19560180	89,46%	32772462	83,77%
s17	21520144	23053829	19743744	85,64%	32880582	83,27%
s18	22306438	21186853	18632001	87,94%	32290632	86,65%
s19	20974163	18248062	16266915	89,14%	27218929	83,66%
s20	24269140	21458480	19084316	88,94%	32580420	85,36%
s21	17847231	19303327	17384596	90,06%	29927863	86,08%
s21_b	21781546	19968566	16421097	82,23%	27245013	82,96%
s22	19525463	23243950	20674874	88,95%	36178582	87,49%
s23	23236139	18135367	15452969	85,21%	26373832	85,34%
s24	20074005	22134633	19736612	89,17%	34089813	86,36%
s25	14365584	19725364	17502019	88,73%	30140595	86,11%
s26	20460588	19052930	16487966	86,54%	27492948	83,37%
s27	20075552	18780641	15308324	81,51%	25771809	84,18%
s28	22344813	2196843	1915365	87,19%	2979298	77,77%
s29	22788852	15967918	12131351	75,97%	18757880	77,31%
s30	25126159	20322328	18340595	90,25%	31130610	84,87%
s31	21081252	18255301	15913717	87,17%	26926513	84,60%
s32	21249826	12071401	8701460	72,08%	13835950	79,50%
s33	20623528	17598152	15397344	87,49%	26155554	84,94%
s34	18807678	17427587	15242037	87,46%	25953891	85,14%
s35	21664660	21624342	18328768	84,76%	31425594	85,73%
s36	22350282	24566008	21931894	89,28%	37919484	86,45%

Tecnología de secuenciación de ARN (RNA-seq)

En total se produjeron y secuenciaron 12 librerías (Tabla 3) por variedad (seis en prefloración, tres controles posfloración y tres sequías posfloración). En promedio, se produjeron 21 millones de lecturas emparejadas por librería (42 millones de lecturas) y alrededor del 10% de las lecturas se eliminaron después del recorte de calidad. De los 19 millones de lecturas emparejadas por biblioteca restante, el 83,5% se asignó al genoma de referencia del *C. quinoa* y el 82,1% de ellas se asignaron a una característica anotada en el genoma de referencia de las variedades en estudio.

De los ~ 44 mil genes que se encuentran en el genoma de *C. quinoa* (Zou et al., 2017), se mantuvieron aproximadamente 24 mil después del filtrado de genes de bajo conteo.

El número de genes expresados diferencialmente se resume en la Tabla 4. Las comparaciones de los cambios comunes en PRE-CPOS y PRE-DPOS se muestran en la Tabla 5.

En cq01 se encontraron 554 genes expresados diferencialmente (DEG) (351 regulados al alza y 203 de baja regulación) en la comparación PRE - CPOS, mientras que solo se encontró un gen (regulado al alza) en la comparación PRE - DPOS.

Tabla 4
Número de genes expresados diferencialmente

CQ01		CQ05		CQ37	
CPOS-DPOS		CPOS-DPOS		CPOS-DPOS	
Baja expresión	33	Baja expresión	0	Baja expresión	0
Sin cambios	24546	Sin cambios	24789	Sin cambios	24450
Alta expresión	49	Alta expresión	0	Alta expresión	0
PRE-CPOS		PRE-CPOS		PRE-CPOS	
Baja expresión	203	Baja expresión	807	Baja expresión	9
Sin cambios	24074	Sin cambios	22615	Sin cambios	24374
Alta expresión	351	Alta expresión	1367	Alta expresión	67
PRE-DPOS		PRE-DPOS		PRE-DPOS	
Baja expresión	0	Baja expresión	284	Baja expresión	0
Sin cambios	24627	Sin cambios	23491	Sin cambios	24421
Alta expresión	1	Alta expresión	1014	Alta expresión	29

Tabla 5
Comparación de los genes en los cambios comunes en PRE-CPOS y PRE-DPOS

cq01					cq05					cq37						
CPOS-DPOS					CPOS-DPOS					CPOS-DPOS						
	B	A			B	A			B	A			B	A		
PRE-CPOS	0	43	160	203	0	0	807	807	0	0	9	9	0	0	67	67
	31	0	320	351	0	0	1367	1367	0	0	67	67	0	0		
	2	6			0	0			0	0			0	0		
	33	49			0	0			0	0			0	0		
	9,8%					100%					100%					
CPOS-DPOS					CPOS-DPOS					CPOS-DPOS						
PRE-DPOS	0	0	0	0	0	0	284	284	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	1	0	1	0	0	1014	1014	0	0	29	29	0	0		
	33	48			0	0			0	0			0	0		
	33	49			0	0			0	0			0	0		
	98,8%					100%					100%					
PRE-CPOS					PRE-CPOS					PRE-CPOS						
PRE-DPOS	0	0	0	0	196	1	87	284	0	0	0	0	0	0	0	0
	0	0	1	1	0	746	268	1014	0	24	5	29	0	43		
	203	351			611	620			9	43			9	67		
	203	351			807	1367			9	67			9	67		
	100%					57%					68,4%					

B: Baja expresión
A: Alta expresión

En la comparación CPOS - DPOS, se encontraron 82 DEG (33 regulados al alza en DPOS y 49 regulados a la baja). La comparación de los DEG de PRE-CPOS y PRE-DPOS mostró que en ambas situaciones los genes afectados son completamente diferentes y todos los cambios que ocurren naturalmente bajo riego regular después de la floración se neutralizan cuando se exponen a la sequía. En cq05 se encontró un total de 2 174 DEGs entre CPOS y PRE (1367 regulados al alza y 807 de baja regulación) mientras que 1298 DEGs se encontraron entre DPOS y PRE (1014 regulados al alza y 284 de baja regulación). No se encontraron diferencias entre DPOS y CPOS. Similar a cq01, la comparación entre los DEG en los grupos PRE-CPOS y PRE-DPOS mostró que el 57% de los DEG en PRE-CPOS no se expresan diferencialmente en PRE-DPOS, lo que sugiere que la mayoría de los cambios naturales que se producen en la hoja después de la floración se neutralizan por exposición a la sequía. El 43% restante mantuvo un patrón de expresión similar, a excepción del gen AUR62002318 que se reguló rápidamente bajo condiciones de riego regular y se redujo bajo sequía. Este gen es un análogo de gen resistente a la enfermedad que contiene un dominio de unión a ADN B3, 2 regiones ricas en leucina y un dominio NB-ARC. Este dominio regula la muerte celular programada y es capaz de enlazar nucleótidos de adenosina o guanina (Giménez *et al.*, 2006). Finalmente, el 73% de los DEG bajo tratamiento de sequía también se encontraron en condiciones de riego normales. Los resultados obtenidos indican que 355 genes son parte de la respuesta real a la sequía en cq05, mientras que los 943 genes restantes también son parte del desarrollo natural de la planta. Este resultado está en contraste con cq01, donde ninguno de los cambios que ocurrieron naturalmente se mantuvo en la respuesta a la sequía.

En cq37 se encontró un total de 76 DEG (nueve de baja regulación y 67 regulados al alza) en el análisis PRE-CPOS; mientras que, se encontraron 29 genes regulados al alza en el análisis PRE-DPOS. No se encontraron DEG entre los grupos DPOS y CPOS, similar resultado se obtuvo en cq05. Lo que sugiere que ambos grupos tienen patrones de expresión similar. En cq05, la gran mayoría de los cambios de expresión (68%) bajo riego normal se neutralizaron cuando se expusieron a la sequía. En cq37, 24 de los 29 (83%) genes regulados al alza en la comparación PRE-DPOS también se encontraron regulados al alza bajo riego regular. Estos

resultados sugieren que la mayoría de los cambios causados por la floración bajo riego regular no ocurren cuando se exponen a la sequía. Además, solo cinco genes (AUR62037809, AUR62000271, AUR62037807, AUR62042825 y AUR62009791) tuvieron un cambio en su patrón de expresión como consecuencia de la exposición a la sequía. Tres de los cinco genes eran tiolasas con actividad de transferencia de acilo prevista, mientras que los dos restantes eran una proteína de unión a fosfatidiletanolamina y una oxidoreductasa dependiente de NADP.

En todas las variedades analizadas se observó un patrón similar, donde los cambios transcripcionales normales que siguen a la floración bajo riego regular se ven interrumpidos casi por completo por la exposición a la sequía. En cq01 este cambio fue completo y ninguno de los cambios de expresión que ocurrieron naturalmente se encontró bajo privación de agua. Mientras que, en cq05 y cq37, entre el 32% y el 43% de los cambios naturales no se vieron afectados por el estrés hídrico. Además, en las variedades tolerantes, entre el 73% a 83% de los cambios observados en los grupos expuestos a la sequía también se observaron en los grupos de control, lo que sugiere que estos genes no respondieron a la sequía.

Las variedades estudiadas presentan perfil similar de evolución de ICC para el control y tratamiento, se esperaba que sus patrones de expresión también reflejen este comportamiento. Sin embargo, mientras cq01 (susceptible) bajo estrés por sequía tuvo pocos cambios transcripcionales en comparación con el control (estado vegetativo), cq05 como cq37 (tolerante) permitieron que una fracción (~ 37%) de los cambios transcripcionales permaneciera en su lugar y la mayor parte de su respuesta a la sequía (~ 78%) fue idéntica al control. Este patrón de expresión convergente como respuesta al estrés por sequía es una característica común de *C. quinoa* tolerante a la sequía (Claeys e Inze, 2013). El hecho de que la mayoría de los genes que no responden a la sequía en plantas tolerantes también se expresaron en la planta susceptible, sugiere que estos genes están controlados por un factor de expresión diferente en ambos grupos. Es posible que las regiones promotoras de estos genes hayan mutado y, por lo tanto, no responden a los mismos estímulos que en las plantas susceptibles. También, es posible que el factor de transcripción que controla estos genes se haya desactivado y, por lo tanto, no pueda producir estos cambios.

Finalmente, son 26 genes los que se comportaron de manera similar en las variedades tolerantes a la sequía (cq05 y cq37), 17 de los cuales se encontraron regulados positivamente después de la floración bajo riego regular y estrés por sequía; tres fueron regulados negativamente en las plantas de control, pero no en los expuestos a la sequía y seis en las plantas de control, pero no en los expuestos a la sequía. No se encontraron genes en común entre aquellos que cambiaron el patrón como consecuencia de la exposición a la sequía sola. Solo tres de los 26 genes se encontraron regulados al alza en las plantas de control de cq01. Sin embargo, los 26 genes se encuentran con niveles significativos de expresión en las tres variedades (logCPM promedio = 5,03).

4. Conclusiones

De las 41 variedades utilizadas en el presente estudio se concluye que, 18 variedades son tolerantes a la sequía (Ilpa INIA, INIA 415- Pasankalla, Salcedo INIA, INIA 420 -Negra Collana, Compuesto B, Compuesto tolerante a sequía, INIA 433 - Santa Ana /AIQ/FAO, Salcedo INIA, Ilpa INIA, INIA 415-Pasankalla, INIA 420-Negra Collana, Blanca de Junín, Hualhuas, Huancayo, Kankolla 1, Kankolla 2, Kankolla 3 y Real Boliviana amarillo) y 23 variedades son susceptibles a la sequía (Red head, INIA 431-Altiplano, Blanca de Junín, Huancayo, INIA 433 - Santa Ana /AIQ/FAO, Hualhuas, Compuesto A, Chucuito, Compuesto Tolerante a Sequía Rojo, Compuesto Tolerante a Sequía Amarillo, Compuesto Tolerante a Sequía Rosado, Compuesto Tolerante a Sequía Anaranjado, Compuesto Tolerante a Sequía Blanco grano grande, Compuesto Tolerante a Sequía Blanco grano pequeño, Misiquina, Compuesto tolerante purpura, Compuesto tolerante, Quillahuaman, Amarillo marangani, Amarillo Sacaca, INIA431 Altiplano, Kankolla 4 y Real Boliviano rojo). Siendo la variedad Red head la más susceptible a la sequía; mientras que, las variedades más tolerantes son Salcedo INIA y Kankolla 2.

Las tres variedades de quinua (Red head, Salcedo INIA y Kankolla 2) presentan 26 genes que se comportaron de manera similar en las variedades tolerantes a la sequía; tres de ellos ante la exposición a la sequía son regulados al alza y cinco genes (AUR62037809, AUR62000271, AUR62037807, AUR62042825 y AUR62009791) tienen un cambio en su patrón de expresión como consecuencia de la exposición a la sequía. Este estudio ha

generado información que podrá ser utilizada en futuras investigaciones sobre genes de resistencia a sequía en la quinua. Sin embargo, se necesitan datos de secuenciación adicionales para explorar mutaciones no codificantes alrededor de estos genes, así como datos adicionales de plantas más tolerantes y susceptibles para determinar qué tan extendido es realmente este patrón de expresión convergente. Pocos genes son comunes en la respuesta tolerante a la sequía.

Agradecimientos

Esta investigación fue apoyada por el Programa Nacional de Innovación Agraria (PNIA), proyecto 117-PI “Desarrollo de marcadores genéticos asociados a la maduración temprana y tolerancia a sequía en Quinua: Herramientas para la selección de variedades modernas adaptadas al Cambio Climático”. A los ingenieros Julio Olivera Soto, Juan Loayza Valdivia, Carol Alejos Asencio, al técnico Samuel Martínez y a la Señora Delia Quispe por los aportes y comentarios recibidos para la mejora de la investigación.

Referencias bibliográficas

- Ahumada, A.; Ortega, A.; Chito, D.; Benítez, R. 2016. Saponinas de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.): Un subproducto con alto potencial biológico. Revista Colombiana de Ciencias Químico-Farmacéuticas 45(3): 438-469.
- Al-Naggar, A.M.; El-Salam, R.M.; El-Sayed, A.E.; Abul-Fetouh, M.M. 2017. Effects of genotype and drought stress on some agronomic and yield traits of quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). Bioscience Research 2017 14(4): 1080-1090.
- Aly, A.; Al-Barakah, F.; El-Mahrouky, M. 2018. Salinity Stress Promote Drought Tolerance of *Chenopodium Quinoa* Willd. Communications in Soil Science and Plant Analysis 49(11): 1331-1343.
- Apaza, V.; Cáceres, G.; Estrada, R.; Pinedo, R. 2013. Catálogo de variedades comerciales de quinua en el Perú. Disponible en: <http://www.fao.org/3/as890s.pdf>
- Avalos, H. 2018. El uso de la tecnología y su relación con la cadena productiva de la quinua en los agricultores de la localidad de Cabana de la región de Puno, 2016. Veritas et Scientia 7(1): 781-787.
- Bazile, D.; Baudron, F. 2014. Dinámica de la expansión mundial de la quinua que crece en vista de su alta biodiversidad. In: Estado del arte de la quinua en el mundo en 2013. Bazile Didier (ed.), Bertero Hector Daniel (ed.), Nieto Carlos (ed.). Santiago du Chili: FAO-CIRAD, pp. 49-64.
- Bazile, D.; Jacobsen, S.E.; Verniau, A. 2016a. The Global Expansion of Quinoa: Trends and Limits. Front Plant Sci. 7: 622.
- Bazile, D.; Pulvento, C.; Verniau, A.; Al-Nusairi, M.S.; Ba, D.; Breidy, J.; Hassan, L.; Mohammed, M.I.; Mambetov, O.; Otambekova, M.; Sepahvand, N.A.; Shams, A.; Souici, D.; Miri, K.; Padulosi, S. 2016b. Worldwide evaluation of quinoa: preliminary results from post international year of quinoa FAO project in nine countries. Frontier Plants Science 7: 1-18.
- Bojanic, A. 2011. La quinua: Cultivo milenario para contribuir a la seguridad alimentaria mundial. Oficina Regional de la FAO para América Latina y el Caribe (FAO/RLC).
- Bolger, A.M.; Lohse, M.; Usadel, B. 2014. Trimmomatic: A flexible trimmer for Illumina sequence data. Bioinformatics 30(15): 2114-2120.

- Dobin, A.; Davis, C.A.; Schlesinger, F.; Drenkow, J.; Zaleski, C.; Jha, S.; Gingeras, T.R. 2013. STAR: Ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics* 29(1): 15-21.
- Claeys, H.; Inze, D. 2013. The Agony of Choice: How Plants Balance Growth and Survival under Water Limiting Conditions. *Plant Physiology* 162(4): 1768-1779.
- FAO. 2018. El estado de la seguridad alimentaria y la nutrición en el mundo 2018. Food & Agriculture Org. Disponible en: <http://www.fao.org/3/I9553ES/I9553es.pdf>
- Gilchrist, E.J.; Haughn, G.W.; Ying, C.C.; Otto, S.P.; Zhuang, J.; Cheung, D.; Cronk, Q.C.B. 2006. Use of Ecotilling as an efficient SNP discovery tool to survey genetic variation in wild populations of *Populus trichocarpa*. *Molecular Ecology* 15(5): 1367-1378.
- Giménez, C.; Palacios, G.; Colmenares, M. 2006. Musa methylated DNA sequences associated with tolerance to *Mycosphaerella fijiensis* toxins. *Plant Mol. Biol. Rep.* 24: 33-43.
- Graf, B.L.; Rojo, L.E.; Delatorre-Herrera, J.; Poulev, A.; Calfio, C.; Raskin, I. 2016. Phytoecdysteroids and flavonoid glycosides among Chilean and commercial sources of *Chenopodium quinoa*: variation and correlation to physico-chemical characteristics. *J Sci Food Agric.* 96(2): 633-643.
- Gu, Z.; Eils, R.; Schlesner, M. 2016. Complex heatmaps reveal patterns and correlations in multidimensional genomic data. *Bioinformatics* 32(18): 2847-2849.
- INIA, 2013. Quinoa Salcedo INIA. Disponible en: <http://www.inia.gob.pe/wp-content/uploads/investigacion/programa/sistProduccion/variedad/quinoa/Quinoa-Salcedo.pdf>
- InterPro. 2019. Protein sequence analysis & classification <InterPro> EMBL-EBI. (s.f.). Disponible en: <https://www.ebi.ac.uk/interpro/>
- Iqbal, M.A. 2015. An Assessment of Quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd) Potential as a Grain Crop on Marginal Lands in Pakistan. *American-Eurasian J. Agric. & Environ. Sci.* 15(1): 16-23.
- Iqbal, H.; Yaning, C.; Waqas, M.; Turab, S. 2018. Differential response of quinoa genotypes to drought and foliage-applied H₂O₂ in relation to oxidative damage, osmotic adjustment and antioxidant capacity. *Ecotoxicology and Environmental Safety* 164: 344-354.
- Issa, O.; Fghire, R.; Anaya, F.; Benlhabib, O.; Wahbi, S. 2019. Physiological and Morphological Responses of two Quinoa Cultivars (*Chenopodium quinoa* Willd.) to Drought Stress. *Gesunde Pflanzen* 71: 123-133.
- Jacobsen, S-E.; Liu, F.; Jensen, C.R. 2009. Does rootsourced ABA play a role for regulation of stomata under drought in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Scientia Horticulturae* 122(2): 281-287.
- Jarvis, D.E.; Ho, Y.S.; Lightfoot, D.J.; Schmöckel, S.M.; Li, B.; Borm, T.J.A.; Tester, M. 2017. The genome of *Chenopodium quinoa*. *Nature* 542(7641): 307-312.
- Kolano, B.; McCann, J.; Orzechowska, M.; Siwinska, D.; Temsch, E.; Weiss-Schneeweiss, H. 2016. Molecular and cytogenetic evidence for an allotetraploid origin of *Chenopodium quinoa* and *C. berlandieri* (Amaranthaceae). *Molecular Phylogenetics and Evolution* 100: 109-123.
- Liao, Y.; Smyth, G.K.; Shi, W. 2013. The Subread aligner: Fast, accurate and scalable read mapping by seed-and-vote. *Nucleic Acids Research* 41(10): 2-17.
- McCarthy, D.J.; Chen, Y.; Smyth, G.K. 2012. Differential expression analysis of multifactor RNA-Seq experiments with respect to biological variation. *Nucleic Acids Research* 40(10): 4288-4297.
- Morales, A.; Zurita, A.; Silva, H. 2011. Quinoa as a Drought Tolerance Genes Source. *Plant and Animal Genome XIX Conference*, San Diego, USA. 15-19.
- Mulo, P.; Sicora, C.; Aro, E.M. 2009. Cyanobacterial psbA gene family: optimization of oxygenic photosynthesis. *Cellular and Molecular Life Sciences* 66(23): 3697-3710.
- Núñez, N. 2015. La quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) Alternativa de seguridad alimentaria para zonas desérticas. *Revista Ciencia & Desarrollo* 19: 19-24.
- Ramírez, C.; Romero, G.; Gómez, J. 2016. Respuesta morfoagronómica y calidad en proteína de tres variedades de quinua (*Chenopodium quinoa* Willd.) en la sabana norte de Bogotá. *Revista U.D.C.A Actualidad & Divulgación Científica* 19(2): 325-332.
- Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. 2010. edgeR: A Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26(1): 139-140.
- Ruiz, K.B.; Biondi, S.; Martínez, E.A.; Orsini, F.; Antognoni, F.; Jacobsen, S.E. 2016. Quinoa – a Model Crop for Understanding Salt-tolerance Mechanisms in Halophytes. *Plant Biosystems* 150: 357-371.
- Vidueiros, M.; Curti, R.N.; Dyner, L.M.; Binaghi, M.J.; Peterson, J.; Bertero, H.D.; Pallaro, A.N. 2015. Diversity and interrelationships in nutritional traits in cultivated quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.) from Northwest Argentina. *Journal of Cereal Science* 62: 87-93.
- Ward, S.M. 2000. Response to selection for reduced grain saponin content in quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.). *Field Crops Research* 68(2): 157-163.
- Wingett, S.W.; Andrews, S. 2018. FastQ Screen: A tool for multi-genome mapping and quality control. *F1000Research* 7: 1338.
- Zou, C.; Zou, C.; Chen, A.; Xiao, L.; Muller, H.; Ache, P.; Haberer, G.; Zhang, M.; Jia, W.; Deng, P.; Huang, R.; Lang, D.; Li, F.; Zhan, D.; Wu, X.; Zhang, H.; Bohm, J.; Liu, R.; Shabala, S.; Hedrich, R.; Zhu, J.; Zhang, H. 2017. A high-quality genome assembly of quinoa provides insights into the molecular basis of salt bladder-based salinity tolerance and the exceptional nutritional value. *Cell Research* 27: 1327.
- Zurita-Silva, A.; Fuentes, F.; Zamora, P.; Jacobsen, S.-E.; Schwember, A.R. 2014. Breeding quinoa (*Chenopodium quinoa* Willd.): potential and perspectives. *Molecular Breeding* 34(1): 13-30.