

# ANÁLISIS DE EXPRESIÓN TRANSCRIPCIONAL DE EL GEN AtCaMBP INDUCIDO EN *Capsicum chinense* BG-3821 EN RESPUESTA A HORMONAS VEGETALES.

Soria Saborío M. B.<sup>1</sup>, Guevara González R. G.<sup>2</sup>,

<sup>1</sup>Licenciatura en Biotecnología Universidad Autónoma de Querétaro, <sup>2</sup>Departamento de Ingeniería Bioquímica Instituto Tecnológico de Celaya

## RESUMEN

En este proyecto se planea estudiar la expresión de un gen inducible en plantas de *C. chinense* BG-3821 resistentes a geminivirus, el cual probablemente sea un nuevo tipo de gen relacionado con resistencia en plantas a diversos tipos de estrés biótico/abiótico al que las plantas mencionadas están sometidas. El gen a estudiar presenta similitud a un gen denominado AtCaMBP de *Arabidopsis thaliana*, y se le ha relacionado con respuesta a estrés hídrico (estrés osmótico).

## INTRODUCCION

La agricultura es una de las actividades económicas que han dado sustento a la alimentación mundial, pero todos los cultivos son atacados por diferentes organismos que llegan a causar grandes pérdidas de recursos y productos. Uno de los cultivos con mayor tradición en mesoamérica es el chile (*Capsicum spp*), ya que entre otras cosas, constituye un elemento básico dentro de la dieta de la población. Todos los cultivos están sometidos a situaciones de estrés que pueden ser de dos diferentes fuentes; biótico (virus, bacterias, hongos e insectos) y abiótico (luz, temperatura, agua, altas concentraciones de iones metálicos y no metálicos y contaminantes atmosféricos, entre otros). En cuanto a las respuestas a estrés abiótico en plantas, se puede comentar que “Frente a una situación de estrés, las plantas activan complejos mecanismos de respuesta que conducen a la expresión de un grupo de proteínas cuya función es proteger a la célula” (Rafael Piñol Dastis, 2006). Estos mecanismos son mediados por moléculas de origen vegetal que tiene un papel importante dentro de la planta como el ácido salicílico, metil jasmonato, etileno, óxido nítrico, ácido Benzoico, entre otros (Bleecker y Kende, 2000; Chang-Jin, *et al.*, 2001).

El ácido salicílico se encuentra involucrado en la señal de activación de la Resistencia Sistémica Adquirida, al igual que el ácido jasmónico, óxido nítrico y etileno, además induce la resistencia en plantas a una variedad de patógenos como virus, hongos y bacterias (Delaney *et al.*, 1994).

El ácido jasmónico y derivados son considerados componentes de la vía de transducción de señales en los mecanismos de defensa y se han registrado aumentos en sus niveles endógenos en plantas sometidas a estrés. Los jasmonatos inducen la expresión de genes que codifican proteínas específicas (JIPs), entre las que pueden citarse inhibidores de proteasas, enzimas involucradas en la biosíntesis de flavonoides, osmotinas y lipoxigenasas, y diferentes proteínas relacionadas a patogénesis.(Kim *et al.*, 2006)

La producción de etileno está influenciada por otras fitohormonas como el ácido abscísico (ABA). Diferentes tipos de estrés ambientales están relacionados con incremento en la producción de etileno como el frío, la sequía, daño mecánico y anegamiento (Park *et al.*, 2004).

En estudios previos relacionados con este proyecto, se demostró la existencia de resistencia a geminivirus en plantas criollas de chile habanero (accesión BG-3821) colectadas en el estado de Yucatán. (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003, 2005) Posteriormente se realizaron trabajos de caracterización molecular de la resistencia a geminivirus de esta planta de chile habanero, que han permitido aislar 918 ESTs en donde varios de ellos mostraron similitud con genes que en otros sistemas se han relacionado con fenómenos de resistencia en plantas a

patógenos (Anaya-López *et al.*, 2005; León-Galván, 2004; Zamora-Avella, 2004; Gasca-González, 2004). Así, el objetivo de este trabajo fue conocer si el gen AtCaMBP el cuál fue inducido por estrés biótico ocasionado en plantas de chile habanero BG-3821 en respuesta a infecciones virales (geminivirus), y al que se le ha involucrado como regulador negativo de tolerancia a estrés osmótico, es también inducido por diferentes aplicaciones hormonales que están relacionadas con diversos tipos estrés biótico y abiótico en plantas. Lo anterior, con la finalidad de aportar elementos sobre el posible papel de este gen en el mecanismo de resistencia a diversos tipos de estrés en las plantas de chile habanero BG-3821.

## **OBJETIVO**

Determinar la expresión transcripcional del gen AtCaMBP de *Capsicum chinense* BG-3821 en respuesta a la aplicación de etileno, metil jasmonato y ácido salicílico.

## **HIPOTESIS**

El gen AtCaMBP de *Capsicum chinense* BG-3821 responderá con una inducción a nivel transcripcional a la aplicación de tratamientos hormonales sobre plantas de *Capsicum chinense* resistente a geminivirus.

## **METODOLOGÍA**

### **Experimentos de inducción con fitohormonas:**

Ocho plantas de chile habanero BG-3821 proporcionadas por el Centro de Investigación Regional del Centro-INIFAP, se utilizaron para ser inducidas con 3 diferentes hormonas; dos plantas se asperjaron con etefon (precursor del etileno) a una concentración 50  $\mu$ M, otras dos plantas con ácido salicílico a 5 mM, otras dos con metil jasmonato que es precursor el ácido jasmónico a 150  $\mu$ M y las ultimas dos fueron asperjadas únicamente con agua para tener un control negativo. Después de la aspersión fueron cubiertas con bolsa de plástico nuevas para evitar la contaminación entre tratamientos. Con un bisturí nuevo y estéril se cortaron dos hojas una de cada planta por cada tratamiento al minuto, 30 minutos, 4 y 6 horas post- aspersión. Inmediatamente se congelaron en nitrógeno líquido para la extracción de ARN total con fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1).

### **Elaboración de la sonda:**

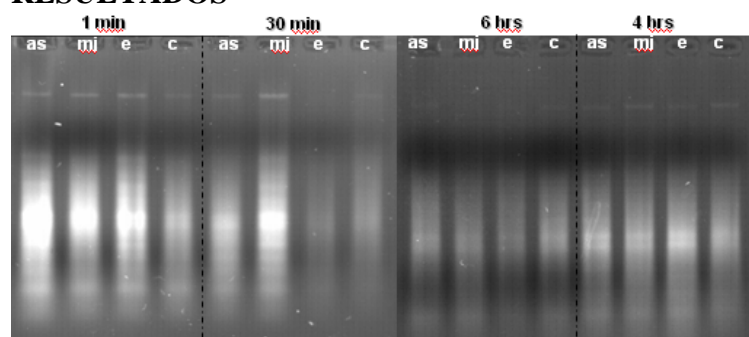
El gen AtCaMBP se encuentra introducido en células de *E. coli* dentro del plasmido TOPO TA 2.1 por lo que para obtener la sonda se puso a crecer la bacteria en medio liquido LB con ampicilina y kanamisisina ambas a una concentración 50 mg/mL durante 24 horas. Transcurrido el tiempo se llevo acabo el método mini prep descrito por J. Sambrook *et al.*, para obtener el plasmido, el cual después de corroborar su presencia en un gel de agarosa al 1% (Sambrook *et al.*, 1989) se le realizó una digestión con la enzima de restricción *Eco* RI para liberar el gen de interés, al cual se le realizo gen clean para limpiar el fragmento del gen de interés y ser marcado como sonda molecular por un método no radioactivo siguiendo el protocolo “Gene Images Random Prime Labeling Kit” (Amersham Biosciences).

### **Análisis tipo Northern:**

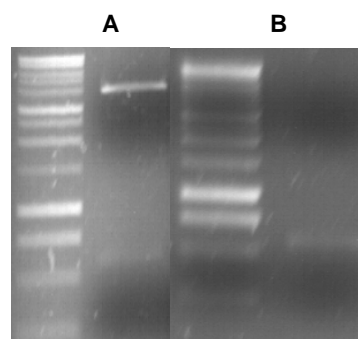
15  $\mu$ g de ARN de las plantas asperjadas con precursores de fitohormonas y control negativo, cada muestra d ARN se desnaturalizaron en 50  $\mu$ L de una mezcla que contenía MOPS 12.5 % v/v, Formamida 62.5% v/v y formaldehído 25% v/v y se fijaron en una membrana de nylon que se

puso a hibridar durante 16 horas a 60 °C con la sonda del gen AtCaMBP. Los lavados de astringencia y revelados se hicieron siguiendo el protocolo de Amersham Bioscience.

## RESULTADOS



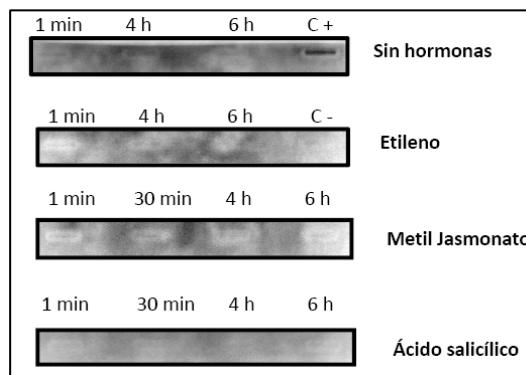
**Figura 1.** Extracción de ARN total por el método fenol:cloroformo:alcohol isoamilico (25:24:1) de plantas de *Capsicum chinense* BG-3821 tratadas con ácido salicílico (as), metil jasmonato (mj), etileno (e) y control negativo(c) recolectadas al minuto, 30 minutos, 4 y 6 horas post-aspersion.



**Figura 2.** Elaboración de sonda. **A** Liberación del gen AtCaMBP por la enzima *Eco* RI. **B** Tratamiento de gen clean para el marcaje del gen.



**Figura 3.** Plantas de chile habanero sometidas a tratamientos hormonales.



**Figura 4.** Análisis de expresión transcripcional del gen R-22 (similar a AtCaMBP25) de *C. chinense* BG-3821, en respuesta a aplicaciones de diferentes tratamientos.

## DISCUSIÓN

El gen AtCaMBP fue inducido débilmente por etileno y metil jasmonato al igual que sin la aplicación de hormonas y no fue inducido por la hormona ácido salicílico (figura 4).

En base a los resultados obtenidos es claro que las rutas de señalización por etileno y jasmonatos no participan en tiempos cortos para el gen estudiado, ya que dieron una respuesta de igual proporción que el control negativo.

Por otra parte la inducción con ácido salicílico fue indetectable para el gen AtCaMBP, lo que revela que el ácido salicílico, “apago” la expresión del gen, he indica que el ácido salicílico se encuentra involucrado en la expresión inducible del gen, y que es muy probable que cuando la ruta de señalización mediada por el ácido salicílico en respuesta a estrés en *Capsicum chinense* este funcionando, la expresión del gen AtCaMBP se encuentre inhibida, hasta que se presente otra molécula de señalización a la que responda mejor (como ejemplo: óxido nítrico).

Esto sugiere que la expresión de este gen en *Capsicum chinense* cuando es infectada con geminivirus debe estar mediada en tiempos tempranos por otro tipo de agentes (por ejemplo

óxido nítrico), lo cual se ha reportado en la literatura para otros sistemas (Park *et al.*, 2004). Esto último es interesante debido a que los tratamientos que se emplearon en este estudio, si lograron inducir a otros genes de la misma planta infectados con geminivirus. Así, el estudio de la red de señales que la planta *C. chinense* BG-3821 tiene como respuesta a infecciones por geminivirus debe ser como era de esperarse complejo, pero con estudios como este se aportan elementos que ayudarán a descifrarlo a mediano plazo y con ello conocer más detalles moleculares de cómo se defienden las plantas contra patógenos, lo que podría a futuro ayudar al diseño de nuevas estrategias de resistencia de las plantas a diferentes tipos de estrés por medios biotecnológicos.

## CONCLUSIONES

En este trabajo se logro descifrar parte del mecanismo de señalización para la expresión del gen AtCaMBP en *Capsicum chinense* BG-3821.

Esto abre una perspectiva para estudiar la expresión de este gen en respuesta a otros tratamientos hormonales que no se alcanzaron a evaluar en este proyecto, para tener un panorama más amplio de la forma de activación de genes involucrados en situaciones de estrés.

## BIBLIOGRAFIA

Anaya-López, J. L., Godínez-Hernández, Y., Muñoz-Sánchez, C. I., Guevara-Olvera L., Guevara-González, R. G., Rivera-Bustamante, R. F., González-Chavira M., Torres-Pacheco, I. 2002. Identificación de resistencia contra infecciones simples y mixtas por el virus del mosaico dorado del chile (PepGMV) en plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* jacq.) Chapingo serie Horticultura, 9:225-234.

Anaya-López, J. L., González-Chavira, M., Pons-Hernández, J. L., Torres-Pacheco, I., Rivera-Bustamante, R. F., Hernández-Verdugo, S., Guevara-González, R. G., Muñoz-Sánchez, C. I., and Guevara-Olvera, L. 2003. Resistance to geminivirus Mixed infections in Mexican wild pepper. HortScience, 38(2):251-255.

Anaya-López, J.L, E. Pérez-Mora, I. Torres-Pacheco, C.I. Muñoz-Sánchez, L. Guevara-Olvera, M.M. González-Chavira, N. Ochoa-Alejo, R.F. Rivera-Bustamante, and R.G. Guevara-González. 2005. Inducible gene expresión by Pepper huasteco virus in *Capsicum chinense* plants with resistance to geminivirus infections. Can J. Plant Pathol., 27: 276-282.

Bleecker, A. B. and Kende, H. 2000. Ethylene: a gaseous signal molecule in plants. Ann. Rev. cell Biol., 16:1-18.

Chang-Jin, P., Ryoung Shin, Jeong Mee Park, Gil-je, Tae Hyung Yoo, and Kyung-Hee Paek. 2001. A Hot Pepper cDNA Encoding a Pathogenesis-related Protein 4 Is Induced during the Resistance Response to Tobacco Mosaic Virus. Molecules and Cells, 11(1):122-127.

Delaney, T. P., Uknes, S., Vernooij, B., Friedrich, L., Weymann, K., Negrotto, D., Gaffney, T., Gut-Rella, M., Kessmann, H., Ward, E., and Ryals, J. 1994. A central Role of Salicylic Acid in Plant Disease Resistance. Science, 266:1247-1250.

Gasca-González, M. R. 2004. Detección de Genes Expresados Diferencialmente en la Interacción *Capsicum chinense* (BG – 3821) – Virus Huasteco del chile (PHV) Empleando Hibridación

Sustractiva por Supresión (SSH). Tesis de maestría. Dpto. de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Celaya.

Godínez-Hernández, Y., Anaya-López, J. L., Díaz-Plaza, R., González-Chavira, M., Torres-Pacheco, I. 2001. Characterization of resistance to Pepper Huasteco Geminivirus in chili peppers from Yucatán, México. HortScience 36(1): 139-142.

Kim, Y.C, S.Y. Kim, K.H. Paek, D. Choi, and J.M. Park. 2006b. Suppression of CaCYP1, a novel cytochrome P450 gene, compromises the basal pathogen defense response of pepper plants. Biochem Biophys Res Commun., 345: 638-645.

León-Galván, M. F. 2004. Determinación de la expresión genética diferencial de plantas de chile *Capsicum chinense* Jacq BG – 3821 (UX-SMH-1-4), resistentes a infecciones mixtas causadas por los geminivirus PHV (Virus Huasteco del chile) y el PepGMV (Virus Mosaico Dorado del chile). Tesis de maestría. Dpto. de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Celaya.

Park, C.J, J.M. An, Y.C. Shin, K.J. Kim, B.J. Lee, and K.H. Paek. 2004. Molecular characterization of pepper germin-like protein as the novel PR-16 family of pathogenesis-related proteins isolated during the resistance response to viral and bacterial infection. Planta., 219: 797-806.

Rafael Piñol Dastis, Fisiología de las plantas bajo condiciones de estrés, Encuentro Iberoamericano de Olivicultura Chile 2006 VII Jornadas Olivícolas La Serena, CHILE Octubre 2006.

Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T., Molecular Cloning a Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2<sup>a</sup> edición, 1989.

Zamora-Avella, C. A. 2004. Determinación de la Expresión Genética Diferencial de Plantas de chile *Capsicum chinense* Jacq BG – 3821 (UX-SMH-1-4) Infectadas con el Virus Mosaico Dorado del chile (PepGMV). Tesis de maestría. Dpto. de Ingeniería Bioquímica. Instituto Tecnológico de Celaya.