

GENES DE FUNCIÓN DESCONOCIDA DE AMARANTO DE GRANO QUE SE EXPRESAN EN CONDICIONES DE ESTRÉS BIÓTICO (i.e., INFECCION BACTERIANA)

Rodríguez Álvarez Brenda Liliana¹, Cabrales Orona Gabriela², Délano Frier John Paul³

¹ Ingeniería Bioquímica, Instituto Tecnológico Superior de Purísima del Rincón | Dirección de correo electrónico: lilianaalvarezitesp@gmail.com

² Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Cinvestav-Unidad Irapuato | Dirección de correo electrónico: gabriela.cabrales@ira.cinvestav.mx

³ Unidad de Biotecnología e Ingeniería Genética de Plantas, Cinvestav-Unidad Irapuato | Dirección de correo electrónico: jdelano@ira.cinvestav.mx

Resumen

El amaranto fue una de las principales plantas cultivadas durante la época prehispánica, en parte por haber sido considerado como el alimento de los dioses. En la actualidad, se ha incrementado el interés del cultivo de amaranto de grano, en gran parte porque la semilla ofrece una proteína de alta calidad nutricia. Asimismo, las semillas y hojas poseen varios compuestos nutracéuticos que pueden contribuir a prevenir, e incluso curar, varias enfermedades crónicas y otros padecimientos, como alergias. Desde el punto de vista agronómico, el amaranto es capaz de adaptarse a diferentes tipos de suelo y climas. A partir de lo anterior, ha surgido el interés por el estudio de genes de amaranto que se sabe que son expresados por varios tipos de estrés (a)biótico, con el fin de obtener plantas mejoradas que puedan ser más tolerantes a condiciones de estrés, incluyendo el causado por patógenos bacterianos. Con este trabajo se pretende identificar los genes de función desconocida que se expresan en condiciones de estrés por infección bacteriana. Para explorar el patrón de inducción de algunos de estos genes, se emplearon dos bacterias de virulencia contrastante: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) (avirulenta), y *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) (virulenta). Posteriormente, se colectó la hoja infectada (respuesta local), la hoja distal (respuesta sistémica), el tallo y la raíz de las plantas a las 6, 12, 24 y 48 horas después de haber sido inoculadas.

Abstract

Amaranth was one of the main cultivated plants during the pre-Hispanic period, partly because it was considered the food of the gods. Currently, increased interest on grain amaranth as a potentially important crop has emerged, largely because of the exceptionally high nutritional quality of the seed protein. Also, seeds and leaves possess several nutraceutical compounds that may help prevent and even cure several chronic diseases and other ailments, such as allergies. From the agricultural point of view, amaranth is able to adapt to different soil types and climates. From these reasons, a renewed interest in the study of amaranth genes known to be expressed by various (a) biotic stresses has been motivated by the possibility of using them to obtain improved plants that may be more tolerant to stress conditions, including those caused by bacterial pathogens. This work aims to identify genes of unknown function expressed in stress conditions, including bacterial infection. To explore the induction pattern of some of these genes, two bacteria with contrasting virulence were used: *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* (*Pss*) (avirulent) and *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* (*Cmm*) (virulent). Subsequently, the infected leaves (local response), the distal, uninfected leaves (systemic response), stems and roots were collected from plants at 6, 12, 24 and 48 hours after being inoculated.

Palabras Clave

Amaranthus caudatus; *pseudomonas syringae* pv. *Syringae*; *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*; avirulencia; virulencia

INTRODUCCIÓN

Las plantas están constantemente expuestas al ataque de microorganismos patógenos. Existe una gran diversidad de microorganismos que atacan a las plantas, estos pueden ser específicos, atacando un órgano o un tejido en particular. Dos patógenos importantes que atacan a una gran diversidad de plantas que son de suma importancia en el consumo humano son: A) *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* y B) *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. *Pseudomonas* es una bacteria con forma bacilar, Gram-negativa, con flagelos polares, estrictamente aeróbica y quimio-organoheterótrofa, la cual produce pigmento fluorescente en medios de cultivo apropiados. Esta bacteria afecta principalmente las hojas. *Clavibacter* es una bacteria Gram positiva, no móvil, aerobio, productor de cápsula, que en agar nutritivo desarrolla colonias de color amarillo claro a naranja, mucoso, cuya temperatura óptima de crecimiento in vitro es de 25 a 28°C [1]. Puede transmitirse a hojas y tallo por medio de una semilla infectada y posteriormente penetra a los tejidos vasculares a través de heridas, estomas, tricomas e hidátides de la hoja [2]. Algunas plantas pueden resistir el ataque por patógenos y otras condiciones ambientales aparentemente desfavorables. Debido a la resistencia que presenta a distintas condiciones de estrés se evaluó la expresión genética de algunas plantas de amaranto al ser infectadas por dichos microorganismos. El estrés es un factor ambiental externo biótico o abiótico que reduce la tasa de algún proceso fisiológico (por ejemplo, crecimiento o fotosíntesis) de un organismo, por debajo de la tasa máxima que podría alcanzar. El amaranto pertenece a la familia de las amarantáceas y al género *Amaranthus*, es una planta dicotiledónea de cultivo anual que puede alcanzar de 0.5 a 3m de altura, posee hojas anchas y abundantes de color brillante, espigas y flores purpura, naranjas, rojas y doradas, según la especie y variedad. Existen tres especies de amaranto que producen semilla y que, a su vez, son las más apreciadas, *Amaranthus caudatus*, *A. cruentus* y *A. hypochondriacus*.

MATERIALES Y MÉTODOS

Se sembraron semillas de amaranto (*A. caudatus*) en charolas de germinación de 60 cavidades. Dos semanas después de su germinación, las plántulas se trasplantaron en macetas 1.3L que contenían un substrato estéril, una semana posterior a su trasplante fueron fertilizadas con una mezcla 20: 10: 20 (N: P: K), hasta completar cuatro semanas en un cuarto de crecimiento iluminado, bajo condiciones de temperatura de 26°C, simulando el día y la noche (16 h luz/ 8 h oscuridad).

Por otro lado, se prepararon medios de cultivo para el crecimiento de las bacterias. Para *Cmm* (acr42) se usó el medio 802 (peptona 1gr/ L, extracto de levadura 2 g/ L, MgSO₄ 7 H₂O 0.92 g/ L y Agar 15 g/ L), empleando 20 µl de la bacteria en la placa, mediante siembra por estría, incubando durante 48 h a 28°C. Para *Pss* (3525) se usó el medio KB (bactopeptona 10 g/ 500 mL, fosforo dibásico potásico 0.75 g/ 500mL, glicerol 0.75 mL/ 500 mL, Agar 705 g/ 500 mL) y al igual que el caso de *Cmm* (acr42) se sembró 20 µl de la bacteria en la placa con el medio y se incubó durante 24 h en un cuarto de crecimiento a 28°C. Una vez pasado el tiempo de crecimiento se diluyeron las dos muestras en un buffer de fosfatos estéril 0.05 M a pH 7.0, hasta lograr una densidad óptica de 0.2 en el caso de las *Pseudomonas* y 0.3 para *Clavibacter*.

Se inocularon 48 plantas de amaranto de cuatro semanas de edad para cada una de las bacterias, 24 plantas fueron inoculadas con un volumen de 400 µL de la solución de *Pss* (3525) por planta, distribuido en el envés de cuatro hojas jóvenes cercanas al meristemo y el grupo restante inoculado con buffer de fosfatos por cada tiempo de colecta, utilizando una jeringa de 1 mL. Se colectaron en una poza de 3 plantas por cada tiempo de colecta, considerando la hoja infectada (respuesta local) y la hoja distal (respuesta sistémica), para el caso de las plantas tratadas con *Cmm* el número de plantas fue el mismo, al inocular se utilizó un volumen de 500 µl de la solución con bacteria distribuidos 400 µL de la solución por planta, distribuido en el envés de cuatro hojas jóvenes cercanas al meristemo, y 100 µl en el tallo. Se colectó hoja infectada, hoja distal, tallo y raíz para cada tratamiento, a las 6, 12, 24 y 48 h posteriores a su inoculación, ambas especies se congelaron en nitrógeno líquido y se almacenó

a -80°C.

El tejido de las plantas de amaranto sometido a estrés por infección con patógenos bacterianos con *P. syringae* pv. *syringae* y *C. michiganensis* subsp. *michiganensis*, se pulverizó con nitrógeno líquido. El ARN fue extraído a partir de aproximadamente 200 mg de tejido congelado empleando TRIZOL (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), siguiendo las instrucciones del fabricante con algunas modificaciones. Una vez extraído el ARN se cuantificó su concentración utilizando el NanoDrop, y posteriormente comprobar su integridad mediante electroforesis en gel de agarosa (al 1%). Para la síntesis de cDNA, se partió de 4 µg de ARN, empleando el oligonucléotido Dt20 y 200 unidades de transcriptasa reversa SuperScript II (Invitrogen). El cDNA obtenido se diluyó 25 veces con agua desionizada y se empleó para realizar el análisis de expresión mediante el método 2-ΔΔC.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

El fenotipo que presentaban las plantas frente al ataque de microorganismos patógenos mostraba síntomas de clorosis. La expresión de los genes de función desconocida en *A. caudatus* se comportaba de manera distinta en *Pss* y *Cmm* además de ser dinámica a lo largo del tiempo. Como respuesta al ataque de *Pss*, la expresión en la hoja infectiva del gen *Sensc* a las 48 horas posterior a la inoculación fue significativamente mayor que la expresión de los genes (*Aglu*, *Dzinc*, *DUF3407*, *3844*, *3240*, *DUF642*, *2880*; Délano-Frier et al., 2011) [3] incluso en cualquiera de los cuatro tiempos (Fig.1). La expresión del gen *Sensc* en la hoja distal se encuentra en el promedio de la expresión de los otros genes pero la expresión del gen *Aglu* aumento a las 24 h. El nivel de expresión a las 6 h es cercano a 1.5, sufriendo un cambio drástico a las 12 h cuando el nivel de expresión es cercano a cero y después llega a su punto máximo cercano a 3 y a las 48 h baja el nivel de expresión (Fig.2). En las plantas que fueron inoculadas con *Cmm*, la máxima expresión fue identificada en el gen *3844* a las 48 h, mientras que en el gen *2880* el mayor incremento fue a las 12 h (Fig.3). Para la respuesta sistémica inoculada con *Cmm* (Fig.4) el

nivel máximo de expresión relativa fue en el gen *2880* a las 12 h. Para el resto de los genes y tiempos en la expresión relativa no hay un incremento significativo. En el tallo infectado por *Cmm* (Fig.5) la mayoría de los genes tuvieron un incremento un tanto tardío; el mayor incremento en su nivel de expresión fue a las 48 h, después de ser inoculados con la bacteria. Sin embargo, el gen *Sensc*, *3844* y *2880* incrementaron a las 6 h, en particular el gen *2880* presentó un nivel de expresión relativamente alto en la medición de 12 h.

CONCLUSIONES

El desarrollo del presente trabajo permitió conocer que existen diversos genes de amaranto que presentan niveles relativos de inducción ≥ 1.5 es respuesta a infección por patógenos bacterianos de virulencia contrastante. La expresión relativa de los genes de función desconocida de amaranto varía dependiendo del tejido. Esta investigación por lo tanto ofrece la posibilidad de elegir algún gen candidato para su caracterización funcional en plantas modelo.

REFERENCIAS

Libro:

- [1] Schaad N W, J Jones B, W Chun (2000) Laboratory Guide for Identification of Plant Pathogenic bacteria. Ed. APS Press. U.S.A. pp:1-15.
- [2] Gleason M, E J Braun, R H Peterson (1993) Survival and dissemination of *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis* in tomatoes. *Phytopathology* 81:1519-1523
- [3] Délano-Frier J P, H Aviles-Araunt, K Casarrubias-Castillo, G Casique-Arroyo, P A Castrillon-Arbelaes, L Herrera-Estrella, J A Massange-Sanchez, N A Martinez-Gallardo, F I Parra-Cota, E Vargas-ortiz, M G Estrada-Hernandez (2011) Transcriptomic analysis of grain amaranth (*Amaranthus Hypochondriacus*) using 454 pyrosequencing: comparison with *A. tuberculatus*, expression profiling in stems and in response to biotic and abiotic stress. *BMC Genomics* 12:363.
- [4] Jones J B, J P Jones, R E Stall, T A Zitter (2001) Plagas y Enfermedades del Tomate. Sociedad Americana de Fitopatología. Ed. Mundi-Persa. España. pp:26-32.

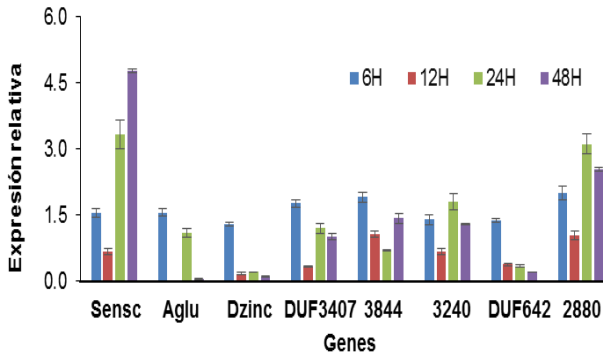


FIGURA 1. Niveles de expresión en hoja infectada (respuesta local) en plantas de *A. caudatus* en respuesta al estrés por infección bacteriana con *Pseudomonas syringae* pv. *syringae*. Las mediciones se hicieron a las 6, 12, 24 y 48 horas post infección.

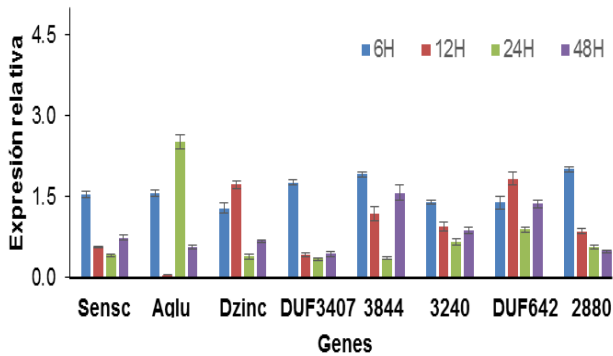


FIGURA 3. Niveles de expresión en hoja infectada (respuesta local) de plantas de *A. caudatus* en respuesta al estrés por infección bacteriana con *Clavibacter michiganensis* subsp. *michiganensis*. Las mediciones se hicieron a las 6, 12, 24 y 48 horas

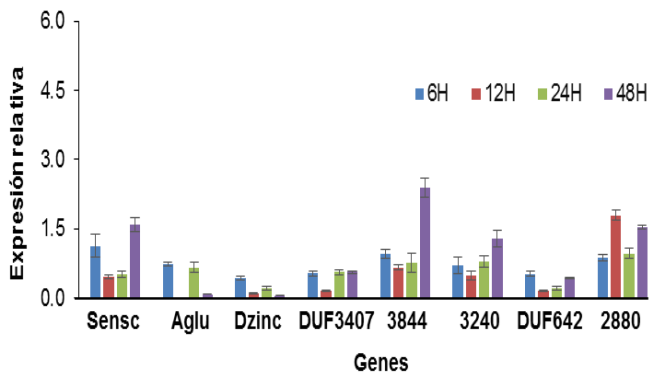


FIGURA 5. Niveles de expresión en tallo en plantas de *A. caudatus* en respuesta al estrés por infección bacteriana con *Clavibacter michiganensis* subsp *michiganensis*. Las mediciones se hicieron a las 6, 12, 24 y 48 horas.