

## **Identificación de nuevos genes de resistencia a enfermedades en el tabaco mediante la genómica funcional**

✉ Orlando Borrás<sup>1</sup>, Osmani Chacón<sup>2</sup>, Roxana Portieles<sup>1</sup>, Cyrelys Collazo<sup>1</sup>, Yúnior López<sup>1</sup>, Carlos J Borroto<sup>1</sup>, Camilo Ayra<sup>1</sup>, Merardo Pujol<sup>1</sup>, Raiza Rodríguez<sup>1</sup>, Mercedes Sunchis<sup>1</sup>, Margarita Simón<sup>1</sup>, Osvaldo Oliva<sup>1</sup>, José A Crespo<sup>2</sup>, Humberto García<sup>2</sup>, Vladimir Andino<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Centro de Ingeniería Genética y Biotecnología, División de Plantas, Laboratorio Genómica Funcional de Plantas, Ave 31 e/ 158 y 190, Cubanacan, Playa, CP 10 600, Ciudad de La Habana, Cuba

<sup>2</sup>Instituto de Investigaciones del Tabaco  
E-mail: orlando.borras@cigb.edu.cu

### **RESUMEN**

Para la identificación, la caracterización y el análisis de la función de algunos genes relacionados con la resistencia a enfermedades en el tabaco, se emplearon herramientas de genómica funcional de última generación, como la técnica de hibridación por supresión substractiva (SSH) y los vectores virales para inducir el silenciamiento de los genes (VIGS). Se identificaron genes que participan en la resistencia al moho azul del tabaco, tales como el factor transcripcional de respuesta a etileno (EIL2) y la glutatión sintetasa.

### **Introducción**

El aislamiento de genes que son específicamente regulados en un tejido, ciclo de vida o condición fisiológica, constituye una importante estrategia llevada a cabo por varios científicos en el mundo para obtener más información acerca de las funciones relevantes que ocurren en procesos tales como la diferenciación celular, los cambios metabólicos o morfológicos, el desarrollo de enfermedades, así como la patogenicidad y la especificidad hospedera de los parásitos.

La emergencia de tecnologías de menores costos, así como el empleo de nuevos métodos de secuenciación de ADN, ha permitido a los biólogos entrar en la era genómica de las plantas. En particular, se están desarrollando proyectos que involucran el secuenciamiento, a gran escala, de ácido desoxirribonucleico complementario (ADNc) en una amplia variedad de plantas. Estas secuencias de ADNc brindan un panorama de los genes expresados en un tipo de célula o estado de desarrollo particular. Cuando esta estrategia se combina con análisis bioinformáticos, permite un rápido y exhaustivo análisis de genes transcritos, que son inducidos o expresados constitutivamente en interacciones transcriptómicas.

Para conocer los componentes moleculares responsables del establecimiento de la resistencia de *Nicotiana megalosiphon* al moho azul del tabaco, se creó una librería de ADNc por hibridación por supresión substractiva (SSH) que contuviera fragmentos derivados de transcritos de genes de *N. megalosiphon*, los cuales se indujeron durante la interacción con *P. hyoscyami*. Seguidamente, se realizó el silenciamiento de genes inducidos por virus (VIGS) en *N. megalosiphon*, así como la ganancia de función, con el objetivo de analizar la función génica. Esta estrategia permitiría resultados con elevado valor práctico para los programas de mejoramiento genético de los cultivos, ya sea como marcador molecular para la selección asistida por marcadores, para la obtención de plantas transgénicas con elevados niveles de resistencia a las enfermedades o para el empleo de bioproductos para el control de enfermedades.

### **Resultados y discusión**

#### **Identificación y aislamiento de genes relacionados con la resistencia a enfermedades en el tabaco**

A continuación se presenta una estrategia a partir del empleo de herramientas de genómica funcional, con el objetivo de identificar, caracterizar y analizar la función de genes relacionados con la resistencia al moho azul del tabaco:

1. Establecimiento de la interacción entre *N. megalosiphon* y *P. hyoscyami f. sp. tabacina*.
2. Identificación y aislamiento de los genes que son activados diferencialmente durante la interacción mediante el empleo de hibridación por supresión substractiva (SSH).
3. Secuenciación y análisis de los genes en bases de datos internacionales.
4. Caracterización molecular de los genes por *Northern-blot* y RT-PCR.
5. Análisis de la función mediante el empleo de vectores virales para el silenciamiento (VIGS) o la expresión constitutiva de genes (ganancia de función).

#### **Establecimiento de la interacción de *N. megalosiphon* y *P. hyoscyami f. sp. tabacina***

Bajo condiciones controladas, se estableció la interacción entre *P. hyoscyami f. sp. tabacina* y *N. megalosiphon* (especie ampliamente utilizada en el programa de mejora genética del cultivo, debido a los elevados niveles de resistencia que muestra frente a las principales enfermedades que afectan al tabaco) (Figura 1). Se tomaron hojas, tallos y raíces a los cuales se les inoculó agente y el agua en diferentes momentos (2, 4 y 6 días después de la inoculación) como material de partida. Como grupo de control se utilizó la variedad de *N. tabacum*, var. «Sumatra».

#### **Identificación y aislamiento de genes expresados diferencialmente**

✉ Autor de correspondencia

Para la identificación y aislamiento de genes activados durante la interacción de *N. megalosiphon* y *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*, se utilizó la SSH (Figura 2). Se aislaron el ARN de plantas inoculadas con el agente patógeno y con agua (control), y se sintetizó el ADNc en cada uno de los momentos evaluados. Para desarrollar la SSH, se mezcló el ADNc de plantas de *N. megalosiphon* inoculadas con el agente patógeno de los diferentes tiempos (muestra tratada), así como el ADNc de plantas de esta especie inoculada con agua (muestra control). La SSH consistió en una sustracción del ADNc de la muestra tratada y del ADNc de la muestra control. Se obtuvo por primera vez una librería substractiva de la interacción *N. megalosiphon* con el moho azul del tabaco. Esta contó con 182 ADNc expresados diferencialmente, y es la primera librería reportada en tabaco por este método [1].

**Secuenciación y caracterización molecular de genes**

Todos los ADNc de la librería por SSH se secuenciaron y analizaron en bases de datos internacionales mediante el programa BLAST. Se compararon con secuencias reportadas, para tener una aproximación de la función de cada gen identificado, teniendo en cuenta el nivel de significación, mediante el *E value*. Muchos de los genes transcritos identificados están relacionados con la defensa de las plantas frente a factores bióticos y abióticos (16%), el metabolismo celular (20%), la energía (12%), la síntesis de proteínas (8%), la traducción de señales (12%), el transporte (8%) y con una función no conocida (24%). Durante la caracterización molecular se apreciaron regulaciones interesantes de estos genes.

Hibridaciones de ácidos ribonucleicos por *Northern-blot* revelaron cómo una proteína de transferencia de lípidos (LTP), un factor de transcripción de respuesta a etileno (EIL2) y la glutatión sintetasa se activan durante los tiempos evaluados en la especie resistente al moho azul; sin embargo, esta expresión no apareció en la variedad susceptible (Figura 3A) [2]. En la Figura 3B se muestra cómo mediante los RT-PCR estos genes se

activan por el agente patógeno, y también por tratamientos de estas plantas con etileno y ácido salicílico [3]. Durante la estrategia, este momento permitió filtrar el total de ADNc aislados por la SSH, además de utilizar aquellos genes que mostraron una regulación interesante en su expresión en el siguiente paso.

**Análisis de la función génica por silenciamiento y ganancia de función**

Durante la estrategia, el análisis de la función génica por silenciamiento y ganancia de función aporta datos importantes y novedad en los resultados, ya que permite conocer la función real de un determinado gen frente a la resistencia a una enfermedad. En este acápite se muestran resultados interesantes con tres de los genes aislados de *N. megalosiphon* durante la interacción con *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*. El comprometimiento de la resistencia o el mejoramiento de esta constituyen elementos importantes que se deben tener en cuenta para decidir el empleo de un determinado gen o de grupos de estos dentro de los programas de mejoramiento genético de los cultivos de interés agrícola. Básicamente, varios son los métodos para lograr este objetivo: apagar la actividad de un gen (silenciamiento) o la activación constitutiva de este (ganancia de función) y determinar fenotípicamente su comportamiento frente a la enfermedad.

En la figura 4A se observa el silenciamiento del factor transcripcional de respuesta a etileno (EIL2), el cual participa como señalizador de la respuesta defensiva de las plantas frente a agentes patógenos y al estrés abiótico. El silenciamiento de este gen provocó que la especie altamente resistente al moho azul mostrara síntomas de la enfermedad después de la inoculación con el hongo, debido al bloqueo de la activación de este gen, clave en la respuesta a la enfermedad. Este resultado es una gran novedad científica a escala mundial, ya que constituye el primer reporte de la función de este gen en la resistencia a la enfermedad [4]. Adicionalmente, la expresión constitutiva de una proteína de transferencia de lípidos (defensina) en plantas de tabaco dio lugar a clones altamente resistentes al moho

1. Borrás O, Thomma BPHJ, Collazo C, Chacón O, Borroto CJ, Ayra C, Portieles R, López Y, Pujol M. EIL2 transcription factor and glutathione synthetase are required for defense of tobacco against tobacco blue mold. *Molecular Plant - Microbe Interaction* 2006;19:399-406.
2. Borrás O. Plant functional genomic and bioinformatics an overview. *Biología Aplicada* 2003;20(3):183-8.
3. Borrás O. Basic insight in plant-pathogen interaction. *Biología Aplicada* 2004;21(1):1-4.
4. Portieles R, Ayra C, Borrás O. Basic insight on plant defensins. *Biología Aplicada* 2006;23(2):1-4.

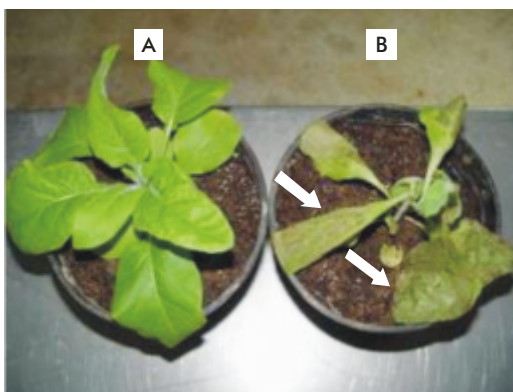


Figura 1. Establecimiento de la interacción de *N. megalosiphon* con *P. hyoscyami* f. sp. *tabacina*. Plantas de *N. megalosiphon* (A) y *N. tabacum*, var. «Sumatra» (B), a los cuales se les inoculó el moho azul, 10 días después de la inoculación. Las flechas indican los síntomas de la enfermedad sobre las hojas.

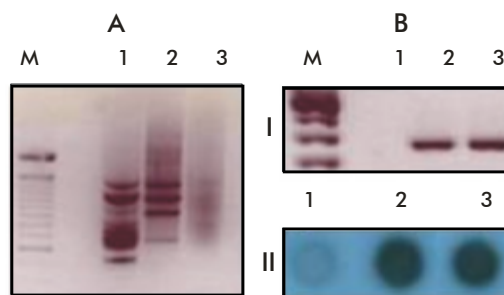


Figura 2. Método para la identificación y aislamiento de genes expresados diferencialmente en la interacción de *N. megalosiphon* y el moho azul del tabaco, mediante el empleo de la SSH. A: SSH (1), control del kit (2) y muestra no sustraída (3). B: Chequeo de la eficiencia de la SSH mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR) con cebadores de actina (I) e hibridaciones de ácidos nucleicos por *Dot-blot* (II), con el empleo de ADNc de la muestra control; 1: sustracción, 2: ADNc no sustraído, 3: ADNc control.

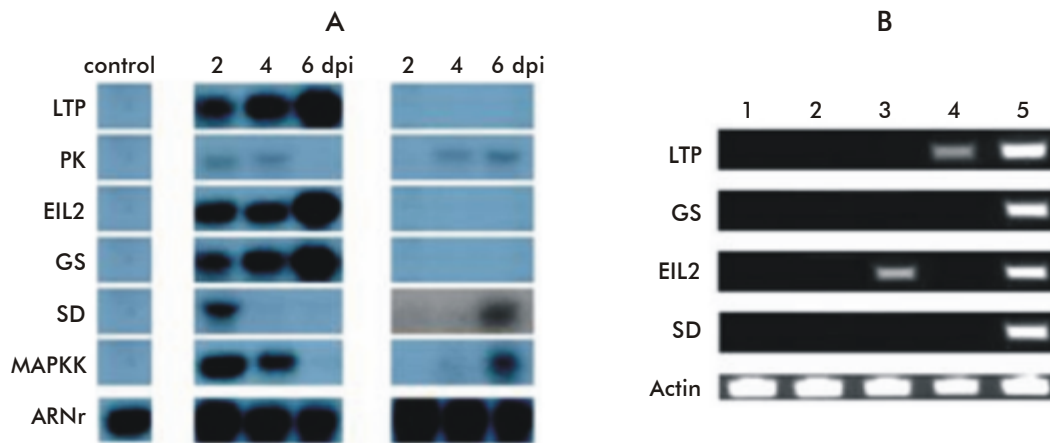


Figura 3. Métodos para la caracterización molecular de los genes identificados. A: Comportamiento de genes aislados durante la interacción de *N. megalosiphon* y *P. hyoscyami f. sp. tabacina* en variedades resistentes (R) y susceptibles (S) al moho azul, con el empleo de la técnica Northern-blot. B: Comportamiento de la transcripción de algunos genes identificados en plantas tratadas con agua (1), ácido jasmónico (2), etileno (3), ácido salicílico (4) y frente al agente patógeno (5).

azul y a la pata prieta en el cultivo del tabaco, lo cual constituye un resultado importante en la búsqueda de plantas resistentes a enfermedades en cultivos de interés (Figuras 4BI y 4BII).

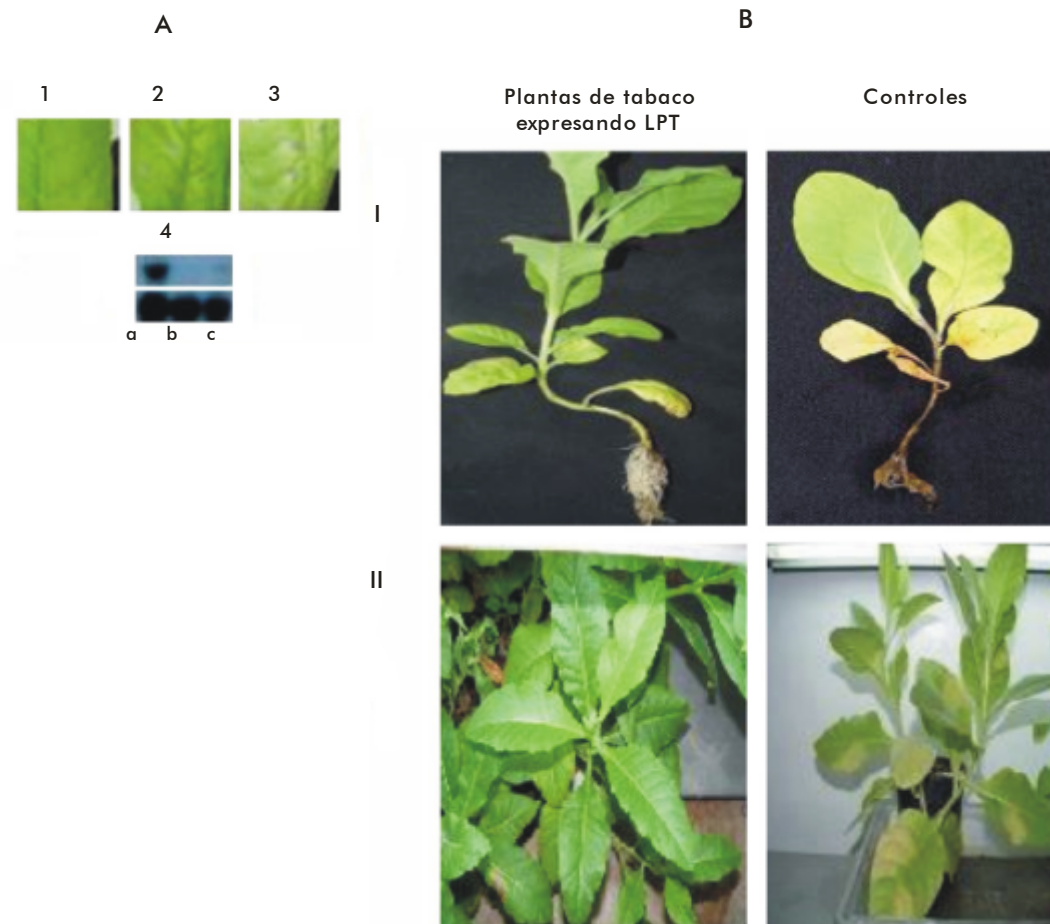


Figura 4. Silenciamiento de genes inducidos por virus (A) y ganancia de función (B) para evaluar función génica. A1: hoja de *N. megalosiphon* inoculada y con el EIL2 no silenciado, A2: hoja de *N. megalosiphon* inoculada y con el EIL2 silenciado, A3: hoja de *N. tabacum* var. «Sumatra» inoculada, A4: Northern-blot del EIL2 no silenciado (a) y silenciado (b) en *N. megalosiphon* y en *N. tabacum* (c). B: Plantas de tabaco expresando constitutivamente la LTP (defensa) inoculadas con la Pata Prieta (I) y el Moho Azul (II) del tabaco mostrando altos niveles de resistencia a estas enfermedades.