

AISLAMIENTO DE SECUENCIAS DIFERENCIALMENTE EXPRESADAS EN CULTIVARES RESISTENTES Y SUSCEPTIBLES DE BANANO (*Musa spp.*) DURANTE LA INTERACCIÓN CON *Mycosphaerella fijiensis* *

Javier Correa Álvarez¹, Zulma Isabel Monsalve², Aura Inés Urrea² y Rafael Arango³

¹Unidad de Biotecnología vegetal UNALMED-CIB, Corporación para Investigaciones Biológicas, Medellín, Colombia.

²Laboratorio de Biología Molecular de Plantas, Instituto de Biología, Universidad de Antioquia, Medellín, Colombia.

³Escuela de Biociencias, Universidad Nacional de Colombia sede Medellín, Colombia.

Contacto: E-mail jcorrea@cib.org.co

*Trabajo galardonado con el Premio Nacional de Fitopatología Rafael Obregón, categoría profesional, auspiciado por la compañía Bayer CropScience y otorgado durante el 29 congreso de ASCOLFI, Medellín, Junio de 2009.

RESUMEN

La Sigatoka Negra causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis* es la enfermedad más importante que afecta la producción comercial de bananos y plátanos en el mundo. Los daños causados por este patógeno han resultado en pérdidas económicas substanciales y en una importante reducción de la producción anual. El presente estudio se realizó, con el fin de aislar genes involucrados con la resistencia en cultivares de banano resistente (Calcutta 4) y susceptible (Williams) a *M. fijiensis*, por medio de comparaciones de perfiles de expresión en condiciones controladas con y sin infección. Se logró determinar genes putativos expresados diferencialmente relacionados con la defensa en plantas; como la puroindolina b, quitinasa y una proteína de choque térmico. Además dos genes involucrados con las respuestas oxidativas, relacionados con la acumulación de ROS bajo condiciones de estrés.

Palabras Claves: Expresión Diferencial, Sigatoka Negra, *Musa acuminata*, RT-PCR, expresión génica

SUMMARY

Black Sigatoka caused by the fungus *Mycosphaerella fijiensis* is the most important disease affecting the commercial production of bananas and plantains in the world. Damage by this fungus has resulted in substantial economic losses and a significant increase in annual banana production costs. The present study isolated genes are involved in resistance among cultivars included in the study. Identified putative differentially expressed genes related to defense, as puroindolina b, chitinases and a heat shock protein. Two genes involved in oxidative response, related to the accumulation of ROS under stress conditions.

Key words: fruits, banana diseases, gene expression, RT-PCR, *Musa acuminata*

INTRODUCCIÓN

El Banano y el plátano (*Musa spp.*) constituyen dos de los cultivos más importantes a nivel mundial, y son considerados como un alimento básico en los países en vía de desarrollo (Stover y Simonds, 1987). El banano es ampliamente cultivado para su exportación, mientras que el plátano y algunas cultivares de banano, están confinadas al consumo local en los países tropicales.

La Sigatoka Negra es una de las enfermedades más comunes y severas que afectan las plantaciones de banano y plátano en el mundo. Esta enfermedad, causada por el hongo *Mycosphaerella fijiensis*, puede ocasionar pérdidas económicas substanciales y causaría la pérdida total del cultivo de no ser controlada. La aplicación de fungicidas químicos es la forma más común de controlarla, sin embargo, su efectividad ha empezado a disminuir debido a la aparición de cepas del hongo resistentes, lo que resulta en un aumento en los ciclos de aspersión de los fungicidas (Guzmán, 2003; Espinal *et al.*, 2005) y el consiguiente impacto ambiental.

En la actualidad existe un número de cultivares diploides de banano con resistencia a la enfermedad, pero debido a sus pobres

características agronómicas no son adecuadas para el cultivo. Por ejemplo, Calcutta 4, un banano fértil diploide (AA), es resistente a la Sigatoka Amarilla y Negra pero produce poca cantidad de fruta y de baja calidad. Algunas de estas cultivares diploides se han utilizado como base genética para desarrollar híbridos tetraploides resistentes, mediante técnicas de mejoramiento convencional. Sin embargo, aunque estas metodologías han sido exitosas en la generación de cultivares de banano y plátano resistentes, la calidad de su fruta no ha sido lo suficientemente buena para satisfacer las necesidades de los mercados de exportación, a pesar de muchos años de esfuerzo. Las cultivares de banano Cavendish, continúan dominando el mercado de exportación, pero son altamente susceptibles a la Sigatoka Negra.

De otro lado, existen evidencias que sugieren que en algunas cultivares de *Musa* la resistencia podría ser debida al efecto de un grupo de compuestos microbicidas llamados fitoalexinas, sustancias de bajo peso molecular que se acumulan en las plantas cuando se activan las vías enzimáticas del metabolismo secundario. Es decir ante el ataque del patógeno, la planta responde con un mecanismo de modificación de su perfil genético expre-

sado. Algunos de los genes implicados en la síntesis de estos metabolitos han sido estudiados por Cramer *et al.*, 1989; Fukasawa-Akada *et al.*, 1996; Dixon y Steele, 1999; Lehfeldd *et al.*, 2000; Reddy *et al.*, 2005. Sin embargo, se han realizado muy pocos trabajos encaminados al aislamiento y caracterización de los genes involucrados en las respuestas de defensa en *Musa*. Es así como en este estudio se adoptó una estrategia metodológica general que permitió la visualización de estos cambios, lo cual puede llegar a ser un gran aporte en la identificación, caracterización y aislamiento de genes de importancia en los patosistemas, con miras a su uso en futuros programas de mejoramiento.

MATERIALES Y MÉTODOS

Material vegetal.

Se utilizaron plantas de banano de la cultivar Williams con una edad aproximada de 40 días, obtenidas por medio del cultivo *in vitro* realizado en el laboratorio de la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Universidad Católica de Oriente. Este cultivar se caracteriza por ser de amplio uso en el sistema agri-

cola bananero del país, especialmente en la región de Urabá, donde se ha catalogado como una cultivar susceptible al ataque de *M. fijiensis*. Además, se utilizaron plantas de banano del cultivar Calcutta 4 entre 20 y 30 cm. de altura, colectadas directamente de campo en la finca Universidad de Caldas, municipio de Palestina (Caldas), vereda Santágueda, latitud 5° 05' N, longitud 75° 40' O. La finca se encuentra a 1010 msnm, con una temperatura promedio de 23°C, precipitación anual de 1800 mm y humedad relativa de 76%. Este cultivar se caracteriza por presentar una marcada respuesta hipersensible al ataque de *M. fijiensis* y ser resistente a este patógeno. Todas las plantas fueron aclimatadas en las condiciones de cámara de infección durante un tiempo mínimo de una semana antes de ser inoculadas con el patógeno.

Aislamiento del hongo e infección vegetal

Cultivo monospórico de *M. fijiensis*. Para obtener un cultivo monospórico virulento con el cual inducir infecciones controladas, se partió de hojas con estadios 5 y 6 de la enfermedad de la siguiente manera; el material vegetal infectado se dispuso en una cámara húmeda que consiste en recubrir las hojas con toallas húmedas y almacenarlas en bolsas plásticas durante dos días a temperatura ambiente. Se permitió las descargas de las ascosporas sobre medio agar bacteriológico al 2% durante 30 min a temperatura ambiente. (Mira, 2004). Luego de la descarga, se capturaron ascosporas individuales con capilares estériles y se dispusieron en medio PDA a 24 °C hasta observar crecimiento del micelio, aproximadamente 15 días después (Carlier y Zapater, 2000).

Preparación del inóculo. Después de observar crecimiento del micelio en el medio PDA (Becton Dickinson BD, USA), se procedió a macerarlo con un asa y agua estéril. Este macerado fue transferido a un medio nutritivo V8 y creció durante 15 días bajo luz roja para favorecer la conidiación. Posteriormente, el micelio junto con las conidias fueron colectados con la ayuda de un asa y agua destilada estéril. Se filtró la solución a través de una membrana de etamina hasta obtener volúmenes finales de 50 mL. Los filtrados se centrifugaron a 6000 r.p.m. durante 20 min. Se colectaron los precipitados y se determinó la concentración de las conidias mediante una cámara de Neubauer. Se ajustó la concentración a 1×10^6 conidias por mL con solución de gelatina microbiológica al 2%, esto con el fin de mejorar la distribución y adherencia del inóculo sobre la superficie del envés de la hoja después de la inoculación (Mira, 2004).

Inoculación en hojas. La inoculación se realizó con un aerógrafo Picasso K-3 a 50 libras por pulgada² (psi) a una distancia aproximada de 20 cm en el envés de la tercer-

ra o cuarta hoja para cada una de las plantas de los cultivares Williams y Calcutta 4. Se asperjó un volumen de un mL de solución de conidias por hoja. Las plantas controles de ambos cultivares se asperjaron con la solución de gelatina microbiológica al 2% libre de conidias.

Condiciones de cámara de infección. Para las pruebas de patogenicidad se utilizó una cámara de infección diseñada en la Unidad de Biotecnología Vegetal de la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB). La instalación tenía un metro de alto por 1,30 m de ancho, y capacidad para albergar de 12 a 15 plántulas. La cámara se acondicionó con un sistema de aspersión de agua automático, programado para funcionar durante cinco segundos cada 90 min, con el propósito de mantener la humedad relativa por encima del 95 %. El sistema de iluminación estaba constituido por ocho lámparas de luz día de 20 wattios cada una, controladas por programado automático brindando luz cada 12 horas. El control de la temperatura, 29 °C constantes, se lograba por medio de un calentador Navoplus RI.1016 a través de un control Vertex VT4810.

Aislamientos de ARN y síntesis del ADN copia

Extracción de ARN de tejido foliar de banano. Se aisló el ARN total a diferentes tiempos de infección, recolectando muestras de tejido foliar a las cero, tres, seis, 12, 18 horas; uno, dos, tres, seis y 11 días después de la inoculación con *M. fijiensis*, en las cultivares Williams y Calcutta 4 y sus respectivos controles asperjados con gelatina microbiológica. Se extrajo el ARN total siguiendo el protocolo "Small Scale ARN Isolation" (Invitrogen Corporation, CA). Los resultados de la extracción se analizaron mediante electroforesis en gel de agarosa teñido con Bromuro de Etidio.

Purificación de ARNm. Se tomaron dos microgramos de ARN total de cada muestra seleccionada, determinados mediante por medición de la absorbencia a 260 nm usando un Espectrofotómetro Spectropho™ (BioRad Technologies, USA), los cuales se trataron luego con DNasa I (Fermentas, USA) durante una hora a 37°C y posteriormente se purificaron con "MinElute Cleanup columns" (Quiagen, USA) siguiendo las especificaciones del fabricante.

Síntesis del ADN copia. Para la síntesis del ADN copia se conformaron agrupaciones "pools" de ARN total. Un grupo se constituyó con ARN total de puntos infectados desde cero horas a 11 días, tanto para el cultivar resistente como para el susceptible. El otro se conformó con ARN total de las plantas

control (sin infección) de los cultivares resistente y susceptible. Adicionalmente, en cada punto de infección y en los controles se tomó ARN molde para hacer el ADN copia. Se adicionaron 8 µL de ARN total libre de ADN para sintetizar la primera cadena de ADN copia, utilizando 200U de la Transcriptasa SuperScript III (Invitrogen, CA, USA), 2,5µL de Oligo (dT)₂₀ y se sintetizó siguiendo las indicaciones del fabricante.

Despliegue diferencial

Amplificación de ESTs con iniciadores arbitrarios. Cada reacción de amplificación se realizó usando 50 µM de dNTPs, 20 µM de iniciador Oligo (dT)_{NM}, 20 µM de iniciador arbitrario P, 1X de buffer PCR, 2 U de *Taq* polimerasa (Fermentas, USA) y 500 ng de ADN copia. Se realizó un ciclo a (94°C durante cinco minutos, 40 °C durante cinco minutos, 68 °C durante cinco minutos), dos ciclos a (94°C durante dos minutos, 40 °C durante cinco minutos, 68 °C durante cinco minutos), y 37 ciclos a (94°C durante un minuto, 60 °C durante un minuto, 68 °C durante dos minutos) y la extensión final fue a 68°C durante siete minutos.

Gel de poliacrilamida y tinción con plata. Los ESTs (Marcadores de secuencia expresada, por sus siglas en Inglés) previamente amplificados se separaron mediante electroforesis en geles de poliacrilamida (acrilamida/bis-acrilamida 19:1) en condiciones desnaturalizantes al 6%, en un "BioRad Sequen-Gen® Nucleic Acid Electrophoresis" (BioRad, USA). Previo a la corrida electroforética, 10 µL de cada muestra fueron incubados a 94°C en 5 µL de buffer de carga. Se corrió a 70W y 30 mA por 2,75 horas, usando buffer TBE 0,5 X. Se realizó tinción con plata como lo describió previamente Bassam *et al.*, (1991) con algunas modificaciones: nitrato de plata al 3% activado con formaldehído al 0,15% por 30 min, tiosulfato de sodio al 2%. La reacción se detuvo con ácido acético al 10% (v/v). La imagen de las bandas diferenciales obtenidas en los geles se digitalizaron con un lector y se analizaron para los fines consiguientes.

Reamplificación de los fragmentos cortados. Cada fragmento observado, como expresado diferencialmente, se cortó del gel y se diluyó en 100 µL de agua estéril a 90°C por 30 min. Para reamplificar los fragmentos, mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR, por sus siglas en Inglés), se tomó un 1µL de cada preparación. Se utilizó la enzima *Taq* Polimerasa (Fermentas) y se realizó bajo las mismas condiciones de la DD-PCR (37 ciclos a 94°C durante un minuto, 60 °C durante un minuto, 68 °C durante dos minutos). Se corrieron 5 µL de cada reamplificado en un gel de agarosa al 1%.

Para secuenciación se tomaron 15 μ L de cada amplificado. Adicionalmente, se guardó una alícuota de 20 μ L a -20°C para posteriores ensayos.

Secuenciación y análisis de secuencias. Las bandas de ADNc (ESTs) reamplificadas y seleccionadas como expresadas diferencialmente, se secuenciaron en MACROGEN Inc. (Korea del Sur) por el servicio de "single extension". Los datos obtenidos se editaron para la eliminación de secuencias provenientes del vector y regiones de mala calidad utilizando la aplicación VecScreen del NCBI. Las secuencias resultantes se sometieron a análisis en programas de agrupamiento y edición como SeqMan (Lasergene, DNASTar, USA). Posteriormente se realizaron comparaciones con las principales bases de datos de genes y proteínas (NCBI, EMBL y DDBJ) utilizando aplicaciones con algoritmos rápidos de búsqueda: BlastX, BlastN y tBlastX. Los ESTs que mostraron valores significativos (E-value $<0,05$) se catalogaron en grupos funcionales.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Infección de plantas de banano cv. Calcutta 4 y cv. Williams con *Mycosphaerella fijiensis* en condiciones controladas.

Los síntomas característicos de la infección causado por *M. fijiensis* en tejidos foliares, fueron evidentes a los 11 días después de la inoculación (d.d.i) con conidias en el cultivar susceptible Williams, bajo las condiciones controladas (ver materiales y métodos). Las hojas presentaron los síntomas característicos del estadio tres de la enfermedad, mostrando manchas marrón oscuro de uno a dos mm de largo en el envés de la hoja, estas manchas aumentaron de tamaño formando lesiones necróticas con halos amarillos alargados y centro gris claro (Figura 1a, b).

En el material resistente, Calcutta 4, al sexto día posterior a la infección se observó claramente una respuesta de hipersensibilidad, caracterizada por una zona necrosada oscura, delimitada al punto de infección, que inducen a una muerte rápida de las células huésped (Figura 1c, d), una reacción que se encuentra en las interacciones incompatibles planta-patógeno y que involucra genes de resistencia a patógenos.

Extracción del ARN total a partir de tejido foliar de plantas de banano de los cultivares Calcutta 4 y Williams.

Los aislamientos de ARN total de las muestras de tejido foliar a través de los diferentes tiempos de infección, después de la inoculación con *M. fijiensis*, en los cultivares Williams y Calcutta 4 y sus respectivos controles, mostraron integridad en las bandas del ARN ribosomal 28S y 18S (Figura 2), donde

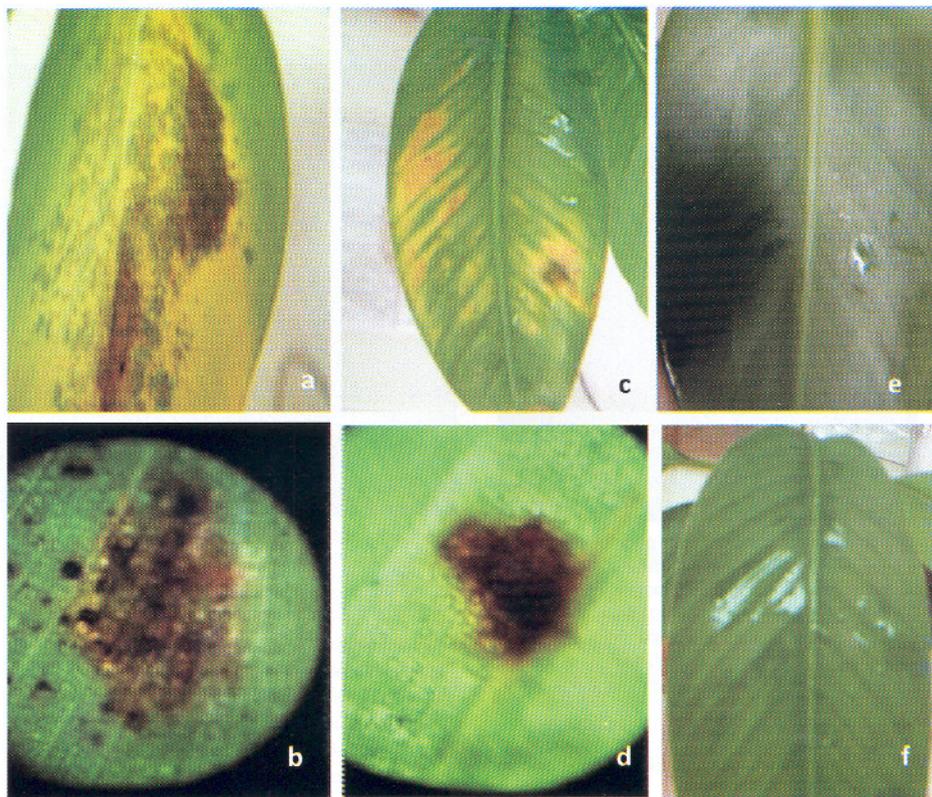


Figura 1. Hojas de plantas de banano de los cultivares Williams (material susceptible) y Calcutta 4 (material resistente) inoculadas con *Mycosphaerella fijiensis*. a. Síntomas en el cultivar Williams 11 días después de inoculación. b. detalle de la lesión en a, con magnificación de 10X. c. Síntomas en el cultivar Calcutta 4, seis días después de inoculación. d. detalle de la lesión en c con magnificación de 10X. e. Control sin infección del cultivar Williams. f. Control sin infección del cultivar Calcutta 4.

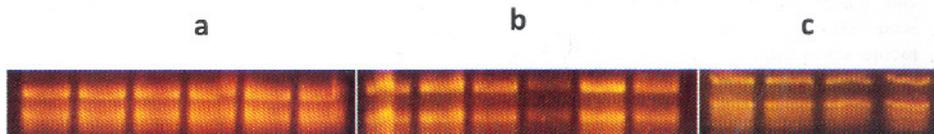


Figura 2. Integridad de la extracción de ARN total en diferentes tiempos post inoculación. a. ARN total de Calcutta 4 infectado y extraído a las seis horas después de inoculación. b. ARNt de Williams infectado y extraído a las 18 horas después de inoculación. c. ARN de Williams control 11 días después de inoculación. Se observan bandas de ARN ribosomal 28S y 18S en a y b, y 28S, 18S y 5S en c.

se observó poca degradación por nucleasas y una buena cantidad de RNA ribosomal, que indirectamente indica una buena cantidad de ARNm en los distintos tiempos de extracción.

Perfiles de expresión genéticos en la interacción banano - *M. fijiensis* por medio de la técnica de despliegue diferencial.

La técnica de despliegue diferencial se utilizó como una estrategia para obtener fragmentos de genes expresados diferencialmente (Marcadores de secuencia expresada, ESTs) en condiciones de estrés biótico. La combinación de varios iniciadores aleatorios de y oligo (dT) NM, fue suficiente para amplificar ADNc de las cultivares resistentes y susceptibles en condiciones de infección y sin infección.

A partir de muestras, bajo condiciones de infección y sus controles para los cultivares Calcutta 4 y Williams, se obtuvieron patrones de bandas diferencialmente expresadas por amplificación (Figura 3).

Se observó el incremento de nuevos transcritos en las condiciones de infección en el rango de tamaños de 300 a 800 pb, lo cual indica una activación de genes involucrados con la infección de patógenos. Para Calcutta 4 en la condición infectada se observaron bandas expresas, no vistas en el cultivar Williams (p.e. banda a los 800 pb). Estas bandas son genes potenciales involucrados con la resistencia del cultivar que posteriormente separaron y aislaron en geles de poliacrilamida.

Se identificaron 55 fragmentos como bandas expresadas diferencialmente en las dos cultivares. Las condiciones de infección proporcionaron el mayor porcentaje de bandas diferenciales, especialmente en la cultivar resistente Calcutta 4.

El total de los fragmentos aislados provenientes de las dos cultivares infectadas se reamplificaron. Se corroboró su tamaño mediante electroforesis en gel de agarosa (Figura 4) y se clonaron para su posterior secuenciación.

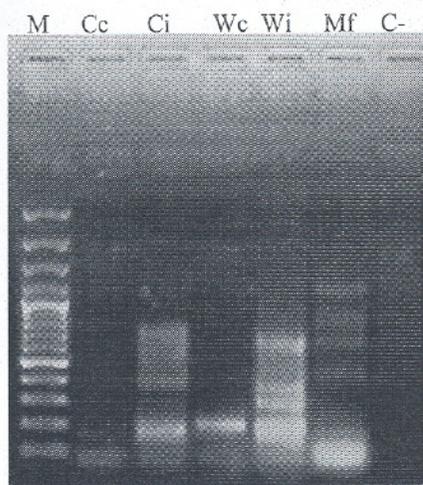


Figura 3. Patrón de expresión génica en la interacción banano- *M. fijiensis* utilizando despliegue diferencial de ESTs. M, marcador de peso molecular 100 pb. Ci, Calcutta infectada. Cc, Calcutta control. Wi, Williams infectado. Wc, Williams control. Mf, *Mycosphaerella fijiensis*. C-, control negativo RT-PCR. Gel de agarosa al 1%, tinción con BrEt.

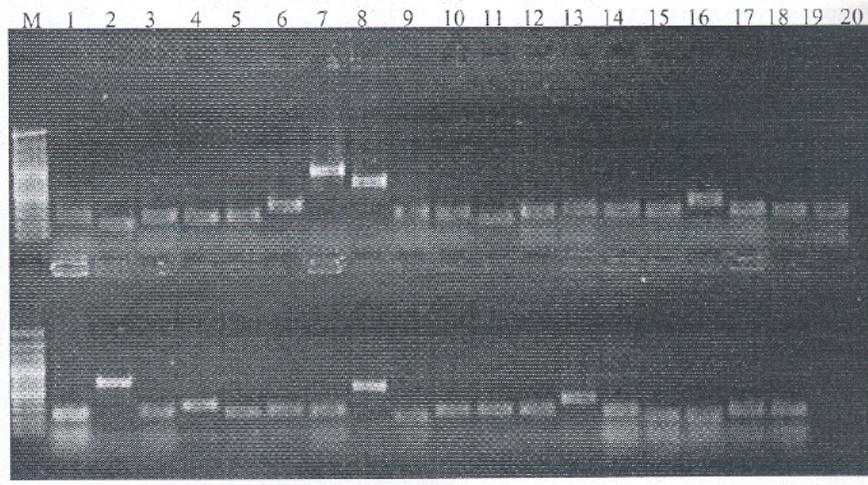


Figura 4. Electroforesis en gel de agarosa al 1% con fragmentos reamplificados expresados diferencialmente en la interacción banano - *M. fijiensis*. M, Marcador de peso molecular 100pb - 3000pb (Fenmetas, USA). Cada carril corresponde a una banda aislada y reamplificada a partir del gel de poliacrilamida. Se muestran diferentes bandas reamplificadas (DD) entre los tamaños de 800pb a 300 pb.

Secuencias de fragmentos expresados diferencialmente

El análisis de los ESTs expresados diferencialmente mostró que 45 clones tenían secuencias adecuadas para búsquedas de homología en bases de datos públicas. De las 45 secuencias informativas aisladas, 31 secuencias tenían alguna función reportada y 14 secuencias no mostraron ser significativamente semejantes a alguna secuencia registrada.

Se tomaron las 45 secuencias y se agruparon por homología. Con este procedimiento se conformaron diez grupos, de los cuales ocho mostraron alguna semejanza significativa a secuencias registradas y cuatro secuencias individuales mostraron tener significancia a secuencias reportadas en bases de datos públicas. En la tabla 1, se muestra las homologías probables de los fragmentos aislados por despliegue diferencial y luego comparados a secuencias de las bases de datos.

Análisis de resultados para ESTs aislados diferencialmente por despliegue diferencial

De las 45 secuencias aisladas informativas, el 33% (15) tienen alta homología con secuencias génicas con funciones biológicas relacionadas con el metabolismo primario celular (fotosíntesis, traducción de proteínas, metabolismo de carbohidratos), 27% (12) relacionadas con respuestas de defensa-estrés, 9% (4) semejantes a secuencias reportadas pero cuya función es aún desconocida y 31% (14) secuencias sin ningún reporte y con potencial de ser genes nuevos.

Las secuencias putativas relacionadas con las respuestas de defensa y estrés, mostraron similitud significativa con genes relacionados con la patogénesis. El contig 1 (secuencias combinadas de dos regiones traslapantes de ADN) mostró similitud con la puroindolina b, un gen importante que cumple funciones de defensa contra hongos fitopatógenos. Los genes de la puroindolina se han reportado ampliamente en diversos grupos de plantas, cumpliendo funciones antifúngicas (Faize *et al.*, 2004). La actividad antifúngica de esta familia génica se ha demostrado *in vitro* contra varios fitopatógenos y se ha encontrado que la Puroindolina B es la proteína más eficiente contra *V. inaequalis* en maíz y manzana (Faize *et al.*, 2004). Adicionalmente, esta proteína posee una baja capacidad para ser inhibida y al combinarse con un gen de resistencia *Vf* en manzana reduce la susceptibilidad a la enfermedad (Dubreil *et al.*, 1998).

Los clones 21DD y 2DD mostraron similitud de secuencia con genes relacionados con la respuesta oxidativa. Una de las respuestas más rápidas de las plantas después del reconocimiento del patógeno, es el llamada "estallido oxidativo", la cual está constituida por la producción de intermediarios de oxígeno reactivo (ROIs, por sus siglas en Inglés), principalmente radicales de oxígeno (O_2) y peróxido de hidrógeno (H_2O_2) en el sitio de la invasión (Grant J y Loake G, 2000; Delledonne *et al.*, 2001). El H_2O_2 es una especie reactiva de oxígeno (ROS, por

Tabla 1. Secuencias obtenidas por despliegue diferencial de la interacción banano - *M. fijiensis*, con homología probable encontradas en BLASTX y BLASTN.

Clon ó Contig*	Cultivar	Homología probable	Porcentaje Identidad	E-Value
Contig 1 (2)	Calcutta 4	Putativa proteína b puroindolina (<i>Triticum aestivum</i>) gi184991891	92,3	7,5e-06
21DD	Calcutta 4	Súperoxido manganesa dismutasa (<i>T. camphoratus</i>) CAD4238.2	80,2	0,0003
2DD	Williams	Gen relacionado con ROS (Angustifolia) GH229175.1	97	2e-11
Contig 2 (5)	Williams	Gen <i>chit101</i> para Quitinasa de <i>Trichoderma atroviride</i> gi119358779	100	1,7e-08
Contig 10 (3)	Calcutta 4	Proteína de choque térmico (hsp20) de <i>Bemisia tabaci</i> mRNA	100	0,00046
Contig 9 (6)	Calcutta 4	Proteína hipotética de cloroplasto RF1 de <i>Chloranthus spicatus</i> gi149390314	63	3,5e-19
Contig 8 (4)	Williams	Gen de la glucose-6-phosphate-1-dehydrogenase (<i>g6pd</i>) de <i>Nidula niveotomentosa</i> gi134274652	100	0,00019
Contig 6 (5)	Williams	Proteína ribosomal S12 de <i>Platanus occidentalis</i> gi114329770	97,2	1,2e-32
8DD	Calcutta 4	EST asociado a regeneración de tallos en <i>Brassica juncea</i> ck991445.1	83	0,001
3DD	Williams	EST asociado a la maduración de anteras en <i>Oryza sativa</i> ESTId:2150524, AB021957	85	3,2e-5
Contig 4 (2)	Calcutta 4	Proteína hipotética con función desconocida de <i>Arabidopsis thaliana</i> gi2894593[emb CAA17127.1]	84,8	9,3e-10

*El valor indicado en paréntesis representa el número de clones perteneciente a una misma secuencia aislada y ensamblada como grupo. Contig = secuencias combinadas de dos regiones traslapantes de ADN

sus siglas en Inglés) producida presumiblemente de una forma no controlada durante los procesos de transporte de electrones, tales como fotosíntesis y respiración mitocondrial.

Por otra parte, se ha postulado que el óxido nítrico (ON) puede ser requerido, junto con las ROS, para la activación de la HR en las plantas (Desikan *et al.*, 2000). En estos casos el ON actuaría transduciendo señales para la expresión de genes relacionados con defensa como Fenilalanina amonio liasa (PAL) y proteínas relacionadas con patogénesis (PR) como quitinasa, glucanasas y glutathione S-transferasa (GST) (Bishop *et al.*, 2000; Ohashi *et al.*, 1992).

Las peroxidasa, por su lado, cumplen una función activa durante la polimerización dependiente de H₂O₂ de hidroxinamil alcoholes (monolignoles) durante el estado final de biosíntesis de lignina (Campa, 1991). El incremento en la actividad peroxidasa, durante una interacción incompatible planta-patógeno, está relacionado con una progresiva incorporación de compuestos fenólicos en la pared celular (Levinsh, 1992; Jackson, 1994). Este reforzamiento de la pared celular reduce la susceptibilidad a enzimas degradantes de pared, posiblemente restringe la difusión de toxinas derivadas del patógeno hacia el hospedero, y para el caso de hongos, actúa como barrera mecánica para prevenir la penetración física del hongo hacia el protoplasto (Aist y Gold, 1989; Brisson *et al.*, 1994).

El clon 21DD tuvo más expresión en la cultivar resistente Calcutta4 y mostró identidad de secuencias a una súperóxido dismutasa dependiente de manganeso (Mn-SOD). Las súperóxido dismutasas son una familia de metaloenzimas que catalizan la unión de radicales de súperóxido (O₂⁻) y H₂O₂ a OH⁻. Las Mn-SODs están localizadas en las mitocondrias y peroxisomas (Ogawa *et al.*, 1996) y tienen una función importante en la protección contra los efectos tóxicos de las especies reactivas de oxígeno (ROS) producidos en diferentes procesos celulares de las plantas (Halliwell y Gutteridge, 2000). Los niveles de O₂⁻ y H₂O₂ han mostrado estar correlacionados directa o indirectamente con la defensa en plantas y con señales de traducción de proteínas (Vranova *et al.*, 2002).

El contig 2 mostró semejanzas con la secuencia de una quitinasa. Las quitinasas y las endo-β-1,3-glucanasas son catalogadas como proteínas PR, ya que su expresión a menudo está inducida por una infección. Degradan polisacáridos en la pared celular del patógeno invasor (Rose *et al.*, 2002). Ambas enzimas se han estudiado extensivamente y existen evidencias indirectas que apoyan la hipótesis de que estas tienen un papel de protección a través de dos mecanismos distintos. Primero, pueden detener el crecimiento y proliferación del patógeno directamente por hidrólisis de quitina y β-1,3/1,6-glucanos, componentes de la pared celular de algunos microorganismos invasores, tornan-

do susceptibles a lisis las células, y segundo, juegan un papel defensivo indirecto sugerido por la observación de que oligosacáridos específicos de quitina y β-1,3/1,6-glucanos, liberados por la pared celular del patógeno actúan como elicitores que pueden inducir otro rango amplio de respuestas de defensa en las plantas (Coté F y Hanh M, 1994; Ebel y Cosio, 1994).

El contig 10 mostró semejanza de secuencias con una proteína de choque térmico hsp20, también reportada en el trabajo de Tian *et al.* (2009). Las proteínas de choque térmico (HSP, por sus siglas en Inglés) son comúnmente expresadas en organismos que han sido estimulados por frío, drogas, salinidad y estrés por lesiones (Wang *et al.*, 2004; Linda-Chang *et al.*, 2007). Adicionalmente, Sabehat *et al.* (1998) sugiere que una respuesta al estrés podría conducir a la protección una proteína contra otra (protección cruzada). Es motivo de discrepancias la función que cumplen las HSPs en respuesta a las lesiones. En algunas especies de plantas (arabidopsis y arroz) las HSPs tienen una inducción considerable cuando son ocasionadas lesiones. En contraste en mora, las HSPs no parecen tener un efecto inducible. El trabajo de Chen *et al.* (2009) con pulpa de banano mostró una acumulación de transcritos *Ma-HSP70-1*, *Ma-sHSP-1-CI*, *Ma-sHSP-3-CII*, *HSP90* y *HSP101* cuando fueron sometidos a estrés por lesión y correlacionados con cambio en la expresión del gen PAL. Se desconoce aún si la síntesis de HSPs interfiere en la síntesis de enzimas del metabolismo secundario como la enzima PAL.

Secuencias semejantes a la Hsp20 se han encontrado sobre expresadas en bancos de sustracción de *Medicago truncatula* y *Glycine max* bajo condiciones de estrés por temperatura. Las secuencias semejantes a la Hsp20, mostraron tener alta homología a proteínas chaperonas con dominios semejantes a p23, una proteína de choque térmico 90 co-chaperona que estabiliza el heterocomplejo Hsp90 en levaduras, mamíferos y plantas y está relacionada con la tolerancia al estrés de temperatura (Zhang *et al.*, 2003).

En conclusión, con este estudio se logró aislar genes relacionados con los procesos de defensa en plantas de banano de los cultivares Calcutta 4 y Williams ante el ataque de *Mycosphaerella fijiensis* y secuencias nuevas que prometen tener información de otros genes involucrados con el patosistema, validando la metodología de infección en condiciones controladas y la técnica de despliegue diferencial empleada para observar genes diferencialmente expresados.

Se identificaron genes relacionados con la defensa como la puroindolina b, quitinasa y una proteína de choque térmico reportados en otras interacciones planta - patógeno, además de otros genes involucrados con las respuestas oxidativas, los cuales están relacionados con la acumulación de ROS bajo

condiciones de estrés y actuarían como moléculas intermediarias de señalización celular, con el fin de regular los niveles de expresión de genes involucrados con la defensa (Tian *et al.*, 2009).

La respuesta que muestra el banano en la interacción con *Mycosphaerella fijiensis* concuerda con lo evidenciado experimentalmente con mediciones de actividades de enzimas relacionadas con la patogénesis (quitinasas y glucanasas) y la estimación de contenidos fenólicos en el transcurso de la infección (Datos no publicados, Torres, 2008). Lo que supone una fuerte activación del metabolismo secundario en cultivares de plantas que presentan una interacción incompatible con el patógeno.

AGRADECIMIENTOS

Al Comité para el Desarrollo de la Investigación (CODI) de la Universidad de Antioquia por el financiamiento (código IN549CE), A GENTECH® Colombia por la donación de los cebadores, A la Corporación para Investigaciones Biológicas (CIB) por el soporte técnico.

REFERENCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aist J. R., Gold R. E. 1987. Prevention of fungal ingress: the role of papillae and calcium. In: S Nishimura, CP Vance, N Duke, (ed.), Molecular Determinants of Plant Disease. Japan Scientific Societies Press, Tokyo, pp 47-59.
- Bassam B. J., Caetano-Anolle's G. y Greshoff, P. M. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrylamide gels. Anal. Biochem 196: 80-83.
- Bishop J. G., Dean A. M. y Mitchell-Olds T. 2000. Rapid evolution in plant chitinases: Molecular targets of selection in plant-pathogen coevolution. PNAS 97 (10): 5322-5327.
- Brisson L. F., Tenhaken R. y Lamb C. J. 1994. Function of oxidative cross-linking of cell wall structural proteins in plant disease resistance. Plant Cell 6: 1703-1712.
- Campa A. 1991. Biological roles of plant peroxidases: known and potential function. In: J Everse, MB Grisham, (ed.), Peroxidases in Chemistry and Biology, Vol II. CRC Press, Boca Raton, FL, pp 25-50
- Carlier J. y Zapater M. F. 2000. Septoria Leaf Spot of Banana: A Newly Discovered Disease caused by *Mycosphaerella eumusae* (Anamorph *Septoria eumusae*). Phytopathology 90: 884-890.
- Chen J.Y., He, L. H., Jiang, Y. M, Kuang, J.F, Lu, C. B, Joyce, D. C., Macnish, A., He, Y. X. y Lu, W.J. 2009. Expression of PAL and HSPs in fresh-cut banana fruit. Environmental and Experimental Botany 66: 31-37.

- Coté, F. y Hanh, M. G. 1994. oligosaccharins: Structures and signal transduction. *Plant Mol. Biol.* 26: 1379-1411.
- Cramer, C.L., Edwards, K., Dron, M., Liang X., Dildine, S. L., Bolwell, P., Dixon, R. A., Lamb, C.J. y Schuch, W. 1989. Phenylalanine ammonia-lyase gene organization and structure. *Plant Mol Biol* 12: 367-383.
- Delledonne M, Seier J, Marocco A, Lamb C. 2001. Signal interactions between nitric oxide and reactive oxygen intermediates in the plant hypersensitive disease resistance response. *PNAS* 98 (23): 13454-13459.
- Desikan R., Neill, S.J. y Hancock, J. T. 2000. Hydrogen peroxide induced gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Free Radical in biology and medicine* 28: 773-778.
- Dixon, R. A. y Steele, L., 1999. Flavonoids and isoflavonoids a gold mine for metabolic engineering. *Trends Plant Sci.* 4 (10): 394-400.
- Dubreil, L., Gaborit, T., Bouchet, B., Gallant, D. J, Broekaert, W. F., Quillien, L. y Marion, D. 1998. Spatial and temporal distribution of the major isoforms of puroindolines (puroindoline-a and puroindoline-b) and non specific lipid transfer protein (ns-LTPe1) of *Triticum aestivum* seeds. Relationships with their in vitro antifungal properties. *Plant Sci.* 138: 121-135.
- Ebel, J. y Cosio, E. G. 1994. Elicitors of plant defense responses. *Int. Rev. Cytol.* 148: 1-36.
- Espinal, G., Martínez, C. F., Marín, H. J. y Peña, Y. 1991-2005. La cadena del banano en Colombia, una mirada global de su estructura y dinámica, Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural Observatorio Agrocadenas Colombia Documento de Trabajo No. 60.
- Faize, M., Sourice, S., Dupuis, F., Parisi, L., Gautier, M. F y Chevreau, E. 2004. Expression of wheat puroindoline-b reduces scab susceptibility in transgenic apple (*Malus × domestica* Borkh.). *Plant Science* 167: 347-354.
- Fukazawa-Akada, T., Kung, S. D. y Watson, J. C. 1996. Phenylalanine ammonia-lyase gene structure, expression, and evolution in *Nicotiana*. *Plant Mol Biol* 30: 711-722.
- Grant, J. J y Loake, G. J. 2000. Role of reactive oxygen intermediates and cognate redox signalling in disease resistance. *Plant physiology* 124: 21-29.
- Guzmán M. 2003. Situación de la sigatoka negra en banano y plátano en el trópico americano. In: Taller manejo convencional y alternativo de la sigatoka negra, nemátodos y otras plagas asociadas al cultivo de musáceas. Rivas, G. (editor). MUSALAC, INIBAP, FUNDAGRO. Guayaquil, Ecuador. pp. 11, 12.
- Halliwell, B. y Gutteridge, J. M.C. 2000. Free radicals in biology and medicine. 3rd ed. Oxford university press, uk. 936 p.
- Ievinsh, G. 1992. Characterization of the peroxidase system in winter rye seedlings: compartmentation and dependance on leaf development and hydrogen donors used. *J Plant Physiol.* 140: 257-263.
- Jackson, P. y Ricardo, C.P.P. 1994. An examination of the peroxidases from *Lupinus albus* L. hypocotyls. *Planta* 194: 311-317
- Lehfeldt, C., Shirley, A.M., Meyer, K., Ruegger, M. O., Cusumano, J. C., Viitanen, P.V., Strack, D. y Chapple, C. 2000. Cloning of the SNG1 gene of *Arabidopsis* reveals a role for a serine carboxypeptidase - like protein as an acyltransferase in secondary metabolism. *Plant Cell* 12: 1295-1306.
- Linda-Chang, P.F., Jinn, T. L., Huang, W. K., Chen, Y., Chang, H.M. y Wang, C.W. 2007. Induction of a cDNA clone from rice encoding a class II small heat shock protein by heat stress, mechanical injury, and salicylic acid. *Plant Sci.* 172: 64-75.
- Mira, J. J. 2004. Caracterización mediante métodos biológicos de aislamientos de *Mycosphaerella fijiensis* Morelet resistentes y sensibles a fungicidas utilizados en su manejo químico en la zona de Urabá (Colombia). Universidad Nacional de Colombia, Medellín. Facultad de Ciencias Agrarias. Maestría en ciencias Agrarias. pp.99
- Ogawa, K., Kanematsu, S. y Asada, K. 1996. Intra- and extra-cellular localization of "cytosolic" cuzn-superoxide dismutase in spinach leaf and hypocotyl. *Plant and cell physiology* 37 (6): 790-799.
- Ohashi, Y. y Ohshiro. 1992. Stress-induced expression of genes for pathogenesis-related proteins in plants. *Plant cell Physiol.* 33: 819-826.
- Reddy, M. S. S, Chen, F., Shadle, G., Jackson, L., Aljoe, H. y Dixon, R. A. 2005. Targeted down-regulation of cytochrome P450 enzymes for forage quality improvement in alfalfa (*Medicago sativa* L). *PNAS* 102: 16573-16578.
- Rose, J. K., Kyung-Sik, H., Darvill, A. y Albersheim P. 2002. Molecular cloning and characterization of glucanase inhibitor proteins: Coevolution of a counterdefense mechanism by plant pathogens. *The Plant Cell* 14: 1329-1345.
- Sabehat A, Lurie S. y Weiss D. 1998. Expression of small heat-shock proteins at low temperatures. *Plant Physiol.* 117: 651-658.
- Stover, R. H. y Simonds, N.W. 1987. Bananas Third ed. Longman Scientific and Technical, New York.
- Tian, J., Belangera, F. C. y Huang, B. 2009. Identification of heat stress-responsive genes in heat-adapted thermal *Agrostis scabra* by suppression subtractive hybridization. *Journal of Plant Physiology* 166: 588-601.
- Torres, J., Arango, R. y Ocampo, M. 2007. Inducción de la actividad pal y β -1,3 glucanasa en interacciones compatibles e incompatibles en banano (*Musa acuminata*) durante la infección por *Mycosphaerella fijiensis* bajo condiciones controladas. (Tesis de grado, Universidad del Tolima)
- Vranova, E., Inze, D. y van Breusegem F. 2002. Signal transduction during oxidative stress. *Journal of experimental botany* 53 (372): 1227-1236.
- Wang, ., Vinocur, B., Shoseyov, O, Altman A. 2004. Role of plant heat shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response. *Trends Plant Sci.* 9: 244-252.
- Zhang, Z. M., Quick, M. K., Kanelakis, K.C., Gijzen, M. y Krishna, P. 2003. Characterization of a plant homolog of hop, a co-chaperone of Hsp90. *Plant Physiol* 131: 525-535.