

## Extracción de proteínas a partir del fluido intercelular en hojas de banano, cultivar 'Grande naine' (*Musa AAA*)

Milady Mendoza-Rodríguez, Aminael Sánchez-Rodríguez, Michel Leiva-Mora, Mayra Acosta-Suárez, Luis Rojas, Elio Jiménez, Orelvis Portal. \*Autor para correspondencia.

Instituto de Biotecnología de las Plantas (IBP). Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Carretera a Camajuaní km 5 ½, Santa Clara, Villa Clara, CP 54 830, Santa Clara, Villa Clara, Cuba, e-mail: milady@ibp.co.cu

### RESUMEN

La extracción y caracterización de las proteínas involucradas en los procesos de patogénesis en plantas ha sido una herramienta fundamental para el estudio de diferentes patosistemas. El estudio de las proteínas secretadas a los espacios intercelulares de las hojas, en respuesta a factores bióticos y abióticos, constituye un paso fundamental para lograr este propósito. Se realizó la extracción de proteínas intercelulares, a partir de tejido de hojas de plantas adultas, de banano *Musa AAA* (subgrupo Cavendish) cultivar 'Grande naine', sanas y enfermas con síntomas en diferentes estadios de desarrollo de la enfermedad Sigatoka negra. Fragmentos de hoja de 2 cm<sup>2</sup> se infiltraron al vacío, se centrifugaron y al recobrado obtenido se le añadió sulfato de amonio al 80% (p/v) para la precipitación de las proteínas, las que posteriormente se analizaron en un gel de poliácridamida desnaturante al 12%. Se obtuvo una concentración de proteínas promedio de 0.43 mg.ml<sup>-1</sup> para muestras sanas y de 0.83 hasta 1.0 mg.ml<sup>-1</sup> en las infectadas. Los resultados constituyen el paso inicial en el estudio del patosistema *Musa-Mycosphaerella fijiensis*, lo que permitirá conocer acerca de las proteínas involucradas en la interacción, como aspecto esencial a tener en cuenta para el desarrollo de las futuras estrategias de resistencia a patógenos.

Palabras clave: electroforesis desnaturante, precipitación salina, purificación de proteínas

### ABSTRACT

The extraction and characterization of proteins involved in plant pathogenesis process, has been an important tool for pathosystem study. The study of secreted proteins to intercellular space of leaves in response to biotic and abiotic factors constitutes an important step to reach this purpose. Intercellular proteins, from healthy and infected leaves tissue of banana plants *Musa AAA* (subgroup Cavendish) cultivar 'Grande naine' at different stages of development of the Black Sigatoka disease were extracted. Leaves fragments of 2 cm<sup>2</sup> were infiltrated at vacuum, centrifuged and 80% (w/v) of ammonium sulphate for protein precipitation was added to the collected intercellular fluid, which were analyzed in a denaturant polyacrilamide gel at 12%. The average protein concentration obtained was 0.43 mg.ml<sup>-1</sup> for healthy and 0.83 until 1.0 mg.ml<sup>-1</sup> for infected samples from intercellular space. The results are the first step in *Musa-Mycosphaerella fijiensis* pathosystem study, allowing to know about the proteins involved in the interaction, as an essential aspect to take into account for the development of future strategies of resistance to pathogen.

Key words: denatured electrophoresis, protein purification, salt precipitation

### INTRODUCCIÓN

Desde la aparición de la enfermedad Sigatoka negra, causada por el hongo ascomiceto *Mycosphaerella fijiensis* Morelet (*Pseudocercospora fijiensis* Morelet, anamorfo) (Crous, 2003), numerosas han sido las pérdidas en el cultivo de bananos y plátanos a nivel mundial. Sin embargo, pocas han sido las investigaciones llevadas a cabo en esta interacción, por lo que la información existente es muy limitada. Aún se desconoce el mecanismo empleado por el patógeno para infestar *Musa* spp., así como las interacciones específicas que ocurren durante el proceso infeccioso (Lepoivre *et al.*, 2003; Pérez *et al.*, 2003).

El estudio de las interacciones hospedante-patógeno, entre otros aspectos, ha estado enfocado

hacia el análisis de las proteínas, que se expresan en los espacios intercelulares en la planta, como respuesta ante diferentes factores bióticos y abióticos (Stressmann *et al.*, 2004). El fluido intercelular es parte del apoplasto de la célula y es el lugar por donde los patógenos comienzan frecuentemente la colonización de la planta y se conoce que a través de este fluido tienen lugar procesos como respuesta de defensa de la planta ante condiciones de estrés (Yu *et al.*, 2001) y frente a microorganismos (Bolwell *et al.*, 2002; Anand *et al.*, 2004), que incluye la síntesis de proteínas con propiedades antimicrobianas, las cuales se secretan fundamentalmente hacia el espacio intercelular (Moy *et al.*, 2002) así como la transmisión de señales (Xia *et al.*, 2004). Todo este conocimiento adquirido ha sido posible por los avances logrados en la extracción y purificación de proteínas, lo que ha permitido la

caracterización de las mismas, aunque solo se conocen las características y regulación de algunas como las taumatinas y quitinasas (Kasprzewska, 2003).

En el modelo *Musa-Mycosphaerella fijiensis*, no se tienen referencias en la literatura científica relacionada con el papel de las proteínas durante el proceso de penetración y colonización del tejido por el patógeno, por lo que existe gran desconocimiento acerca de la temática.

Estudiar las síntesis, características y regulación de las proteínas en especial de aquellas que se acumulan en el espacio intercelular, es esencial para poder entender los procesos infecciosos y de defensa que presenta la planta. Esta información podría contribuir a desarrollar estrategias novedosas para la protección de los cultivos del ataque causado por hongos, en los diferentes programas de mejoramiento genético (Tripathi, 2003; Perea *et al.*, 2004).

Por todo lo anteriormente planteado, en el presente trabajo se realizó la extracción de proteínas intercelulares, a partir de hojas de banano *Musa* AAA (subgrupo Cavendish) cv. 'Grande naine' sanas y enfermas (con síntomas en diferentes estadios de desarrollo de la enfermedad).

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se utilizaron plantas del cultivar susceptible 'Grande naine' *Musa* (AAA) de 9 meses de cultivo, que se encontraban en una plantación de la estación experimental de Remedios, perteneciente al Instituto de Biotecnología de las Plantas.

### Extracción del fluido intercelular

Las hojas se lavaron con agua destilada tres veces, se secaron con papel absorbente y con ayuda de un bisturí se retiró la nervadura central. Se cortaron 100 fragmentos de 2 cm<sup>2</sup> a partir de hojas sanas (control) y enfermas con más de un síntoma en los estadios 2 y 3 de desarrollo de la enfermedad Sigatoka negra según la escala propuesta por Fouré (1985). Los mismos se introdujeron en el tampón de extracción para su infiltración al vacío (100 mM Tris-HCl, pH 8, 10 mM ácido ascórbico, 50 mM ditiotreitol y 5 mM fenilmetilsulfonil fluoruro), por treinta minutos. Posteriormente se secaron los fragmentos con papel absorbente y se colocaron en jeringuillas de 20 ml, las cuales estaban introducidas en tubos de centrifuga de 50 ml. La recuperación del fluido intercelular fue realizada por centrifugación a 3 000 g por 10 minutos a 4 °C. Las proteínas totales de cada muestra se precipitaron con sulfato de amonio al 80 %, durante toda la noche a 4 °C y se recuperaron por

centrifugación a 10 000 g 10 min a 4 °C. El precipitado obtenido se lavó con el mismo porcentaje de sulfato de amonio y se resuspendió en 0.5 ml de tampón fosfato salino PBS (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 100 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> y 2 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7.4). Las muestras fueron dializadas con el mismo tampón y conservadas en un tubo eppendorf a - 80 °C hasta su utilización.

La concentración de proteínas se determinó según el método descrito por Bradford (1976). La albúmina de suero bovina (*Sigma*) se utilizó como patrón.

### Electroforesis de proteína

Se tomaron 5 µg de proteínas totales de cada una de las muestras, para ser analizadas en un gel de poliacrilamida desnaturalizante (SDS-PAGE), para ello se les añadió igual volumen de tampón de muestra 2X e incubaron a 100 °C por 5 min. Las bandas se revelaron con tinción plata con el kit Silver Stain (*Bio-Rad*). Los mini geles se realizaron según el método descrito por Laemmli (1970), utilizando un gel separador al 12 % (0.375 M Tris-HCl, pH 8.8, 0.1 % SDS) y un gel concentrador al 4 % (0.125 M Tris-HCl, pH 6.8, 0.1 % SDS). La corrida se realizó en el tampón Tris-glicina (25 mM Tris, 192 mM Glicina, 0.1 % SDS, pH 8.3), en una cámara de electroforesis Mini-PROTEAN (*Bio-Rad*) a voltaje constante de 200 V durante 1 hora. El tampón de muestra 2X contenía (125 mM Tris-HCl, pH 6.8, 4.6 % (p/v) SDS, 20 % (v/v) glicerol y 0.002 % (p/v) bromofenol azul). El marcador de peso molecular empleado fue PageRuler™ Protein Ladder (de 10 a 200 kDa) (*Fermentas*).

### Análisis estadístico

Los datos relacionados con la concentración de proteínas de las muestras, fueron analizados mediante un ANOVA de clasificación simple y la comparación de las medias se realizó por Dunnett's C, para encontrar homogeneidad en la varianza. Para el procesamiento estadístico de los datos se empleó el software SPSS versión 13.0 para Windows.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Extracción del fluido intercelular

Se observaron diferencias significativas entre las muestras en estudio (Tabla 1). Se obtuvo un aumento de la concentración de proteínas en el estadio 3 de desarrollo de la enfermedad Sigatoka negra, al ser comparados con el estadio 2 y la muestra control. Se ha descrito que hay proteínas que se acumulan extracelularmente ante condiciones de estrés abiótico (Yu *et al.*, 2001), biótico (Suo *et al.*, 2002) y que las mismas incrementan su nivel proporcionalmente ante el estímulo presente (Suo *et al.*, 2001). En el caso particular de este

patosistema los resultados evidencian que existe la misma tendencia al aumento de la síntesis de proteínas a medida que se desarrollan los estados de síntomas de la enfermedad.

### Electroforesis de proteína

Se obtuvo un patrón de proteínas las cuales oscilaron en un rango de peso molecular entre 10 y 40 kDa. Dentro de ellas algunas fueron diferenciales con respecto a la muestra control. Estas bandas podrían estar vinculadas con proteínas relacionadas con la patogenicidad del hongo y con la defensa en la planta. Una de las

respuestas comúnmente observadas en la planta ante el ataque por un patógeno, es la síntesis de proteínas con propiedades antimicrobianas y dentro de ellas las relacionadas con la patogénesis (PR, de sus siglas en inglés *pathogenesis-related proteins*) son las más comúnmente encontradas (Rep *et al.*, 2002) (Figura 1).

Con el objetivo de tener una caracterización completa de estas proteínas, se deberán realizar ensayos enzimáticos, así como electroforesis bidimensional para el análisis de los patrones de proteínas, en la medida que transcurre el proceso infeccioso.

Tabla 1. Concentración de proteínas promedio a partir de hojas sanas y enfermas con síntomas en diferentes estadios de desarrollo de la enfermedad Sigatoka negra (según escala de Fouré, 1985).

Muestras (fragmentos de hojas 2 cm <sup>2</sup> )	Conc. Proteínas (mg.ml <sup>-1</sup> )
Sanas	0.43 ± 0.05 c
Estadio 2	0.83 ± 0.51 b
Estadio 3	1.00 ± 0.03 a

Medias con letras desiguales en una misma columna difieren estadísticamente según Dunnett's C para  $P \leq 0.05$ .

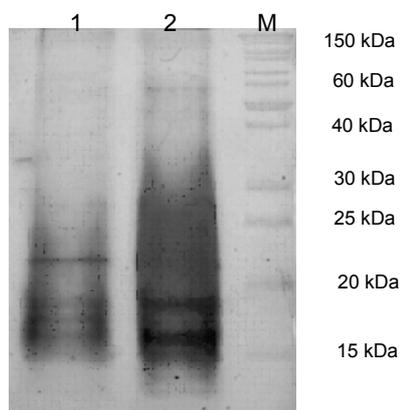


Figura 1: Electroforesis SDS-PAGE al 12% de proteínas intercelulares. (1) Muestra sana (control), (2) Estadio 3 de infección con Sigatoka negra, (M) PageRuler™ Protein Ladder.

### REFERENCIAS

Anand, A, Lei Z, Sumner LW, Mysore KS, Arakane Y, Bockus WW y Muthukrishnan S (2004) Apoplastic Extracts from a Transgenic Wheat Line Exhibiting Lesion-Mimic Phenotype Have Multiple Pathogenesis-Related Proteins That Are Antifungal. *Molecular Plant-Microbe Interactions* 17 (12): 1306-1317

Bolwell, GP, Bindschedler LV, Blee KA, Butt VS, Davies DR, Gardner SL, Gerrish C y Minibayeva F (2002) The apoplastic oxidative burst in response to biotic stress in plants: a three-component system. *Journal of Experimental Botany* 53 (372): 1367-1376

Bradford, MM (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248-254

Crous, PW, Groenewald JZ, Aptroot A, Braun U, Mourichon X y Carlier J (2003) Integrating morphological and molecular data sets on *Mycosphaerella*, with specific reference to species occurring on *Musa*. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (Eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2nd International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases in San José, Costa Rica, pp. 43-58. INIBAP. Montpellier

Fouré, E (1985) Black Leaf Streak Disease of Bananas and Plantains (*Mycosphaerella fijiensis* Morelet). Study of the symptoms and stages of the disease in Gabon. IRFA-CIRAD, París

Kasprzewska, A (2003) Plant Chitinases-regulation and function. *Cellular & Molecular Biology Letters* 8: 809-824

- Laemmli, UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680-685
- Lepoivre, P, Busogoro JP, Etame JJ, El Hadrami A, Carlier J, Harelimana G, Mourichon X, Panis B, Stella Riveros A, Sallé G, Strosse H y Swennen R (2003) Banana-*Mycosphaerella fijiensis* interactions. En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (Eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, pp. 151-159. INIBAP
- Moy, M, Li HM, Sullivan R, White JF, Belanger FC (2002) Endophytic fungal  $\beta$ -1,6-Glucanase expression in the infected host grass. *Plant Physiology* 130: 1298-1308
- Perea, I, Pantoja MC, Ortiz JL, Rosales FE, Aguilar ME, Arango R, Gómez M (2004) Transformación genética de plátano (*Musa* AAB, subgrupo plátano Cv Curraré) empleando múltiples genes antifúngicos. En: Memorias de XVI Reunión Internacional ACORBAT 2004, pp. 165-169. Oaxaca, Mexico
- Pérez, L, Alvarez JM, Pérez M (2003) Economic impact and management of black leaf streak disease in Cuba En: Jacome, L, Lepoivre P, Marín D, Ortiz R, Romero R y Escalant JV (Eds) *Mycosphaerella* leaf spot disease of bananas: present status and outlook. Proceedings of the 2<sup>nd</sup> International workshop on *Mycosphaerella* leaf spot diseases held in San José, Costa Rica, pp. 71-84. INIBAP. Montpellier
- Rep, M, Dekker HL, Vossen JH, de Boer AD, Houterman PM, Speijer D, Back JW, de Koster CG, Cornelissen BJC (2003) Mass Spectrometric Identification of Isoforms of PR Proteins in Xylem Sap of Fungus-Infected Tomato. *Plant Physiology* 130: 904-917
- Stressmann, M, Kitao S, Griffith M, Moresoli C, Bravo LA, Marangoni AG (2004) Calcium Interacts with Antifreeze Proteins and Chitinase from Cold-Acclimated Winter Rye. *Plant Physiology* 135: 364-376
- Suo, Y, Leung DWM (2002) Accumulation of extracellular pathogenesis-related proteins in rose leaves following inoculation of in vitro shoots with *Diplocarpon rosae*. *Scientia Horticulturae* 93: 167-178
- Suo, Y, Leung D (2001) Elevation of extracellular -1,3-glucanase and chitinase activities in rose in response to treatment with acibenzolar-S-methyl and infection by *D. rosae*. *Journal of Plant Physiology* 158 (8): 971-976
- Tripathi, L (2003) Genetic engineering for improvement of *Musa* production in Africa. *African Journal of Biotechnology* 2 (12): 503-508
- Xia, Y, Suzuki H, Borevitz J, Blount J, Guo Z, Patel K, Dixon RA y Lamb C (2004) An extracellular aspartic protease functions in *Arabidopsis* disease resistance signaling. *EMBO Journal* 23 (4): 980-988
- Yu, XM, Griffith M, Wiseman SB (2001) Ethylene Induces Antifreeze Activity in Winter Rye Leaves. *Plant Physiology* 126: 1232-1240