

## Perfil de expresión de una lipasa de tipo GDSL durante interacciones compatible e incompatible entre *Musa* spp. y *Pseudocercospora fijiensis*

Mairenys Concepción-Hernández<sup>1</sup>, Mayra Acosta-Suárez<sup>1</sup>, Milady Mendoza-Rodríguez<sup>1</sup>, Orelvis Portal<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Instituto de Biotecnología de las Plantas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830. e-mail: mairenys@ibp.co.cu

<sup>2</sup>Departamento de Biología, Facultad de Ciencias Agropecuarias, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuaní km 5,5. Santa Clara. Villa Clara. Cuba. CP 54 830.

### RESUMEN

La identificación de genes de interés para el mejoramiento genético de *Musa* spp. contra *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton se ve limitada por el escaso conocimiento de los mecanismos moleculares de la interacción planta-patógeno. Las lipasas de tipo GDSL constituyen blancos promisorios al estar relacionadas con los mecanismos de resistencia y susceptibilidad a patógenos. El objetivo de este trabajo fue determinar mediante PCR cuantitativo los perfiles de expresión del gen de una lipasa de tipo GDSL de *Musa acuminata* Colla durante las interacciones compatible e incompatible con *P. fijiensis*. A partir del análisis realizado se identificó el gen que codifica para la lipasa de tipo GDSL en el genoma de banano y se comprobó su sobreexpresión en la interacción compatible en estadio temprano de infección.

Palabras clave: *Mycosphaerella fijiensis*, PCR cuantitativo, Sigatoka negra

### Expression profile of a GDSL-like lipase during compatible and incompatible interactions between *Musa* spp. and *Pseudocercospora fijiensis*

### ABSTRACT

The identification of genes of interest for the genetic improvement of *Musa* spp. against *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton is constrained by the limited knowledge of the molecular mechanisms of the plant-pathogen interaction. GDSL-like lipases are promising targets since they are related to the mechanisms of resistance and susceptibility to pathogens. The aim of this work was to determine, through quantitative PCR, the expression profiles of a GDSL-like lipase gene from *Musa acuminata* Colla during compatible and incompatible interactions with *P. fijiensis*. Based on this analysis, the gene coding for the GDSL-like lipase was identified in the banana genome and its overexpression was verified in the compatible interaction at the early stage of infection.

Keywords: *Mycosphaerella fijiensis*, quantitative PCR, black Sigatoka

### INTRODUCCIÓN

El cultivo de bananos y plátanos (*Musa* spp.) a nivel mundial se ve afectado por la incidencia de enfermedades y plagas, dentro de las que destaca la Sigatoka negra, causada por *Pseudocercospora fijiensis* (Morelet) Deighton. La transformación genética constituye una alternativa para obtener cultivares resistentes

a esta enfermedad. Sin embargo, no se cuenta con cultivares de bananos comerciales obtenidos por esta técnica con resistencia a *P. fijiensis*, por lo que la búsqueda de nuevos genes y estrategias continúa.

Portal *et al.* (2011) identificaron un grupo de EST (del inglés: *Expressed Sequence Tag*) que se expresaban de forma diferencial durante

la interacción compatible 'Grande naine' (*Musa AAA*)- *P. fijiensis*. Uno de estos genes fue identificado como una posible lipasa de tipo GDSL mediante BLASTX por similitud de secuencias con la proteína AAP05801.1 de arroz (*Oryza sativa* L.).

En otros patosistemas, las lipasas de tipo GDSL se han relacionado con la actividad antifúngica. Por ejemplo, la lipasa de tipo GDSL de *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. AtGLIP1 modula la resistencia a *Alternaria brassicicola* (Schwein.) Wiltshire al provocar la ruptura de las hifas y esporas del hongo (Oh *et al.*, 2005), y a través de la inducción de una respuesta de defensa mediada por etileno (Kwon *et al.*, 2009). Además, en pimiento (*Capsicum annum* L.) CaGLIP1 está involucrada en la respuesta de defensa al daño y a patógenos (Hong *et al.*, 2008). Adicionalmente, AtGLIP2 participa en la defensa contra *Erwinia carotovora* (Jones) Dye mediante la regulación negativa de la vía de señalización por auxinas (Lee *et al.*, 2009).

El objetivo de este trabajo fue determinar mediante PCR cuantitativo los perfiles de expresión del gen de una lipasa de tipo GDSL de *Musa acuminata* Colla durante las interacciones compatible e incompatible. A partir del análisis realizado se identificó el gen que codifica para dicha lipasa en el genoma de banano y se comprobó su sobreexpresión en la interacción compatible en estadio temprano.

## MATERIALES Y MÉTODOS

Las dos secuencias clasificadas previamente como lipasas de tipo GDSL, a partir de la biblioteca sustractiva de ADNc (Portal *et al.*, 2011) fueron comparadas mediante BLAST con la base de datos del genoma de *M. acuminata* (D'hont *et al.*, 2012), a través de la plataforma *Banana Genome Hub* (<http://banana-genome-hub.southgreen.fr/>), con el objetivo de identificar el gen correspondiente en *Musa* spp.

Las plantas de 'Calcutta 4' y 'Grande naine' se propagaron *in vitro* y se cultivaron durante tres meses en condiciones de casa de cultivo (Orellana, 1994). La inoculación con una suspensión micelial de *P. fijiensis* (cepa CCIBP-Pf-83) se realizó de acuerdo con el protocolo descrito por Leiva-Mora *et al.* (2010).

El ARN total se aisló a partir de hojas infectadas y no infectadas de acuerdo con el protocolo descrito por Liao *et al.* (2004). Se tomaron tres réplicas biológicas en cada tiempo de muestreo (3, 6, 9, 12 y 15 días posteriores a la inoculación; dpi).

La amplificación por PCR cuantitativo se realizó según lo descrito por Portal *et al.* (2011) en placas ópticas de 96 pocillos con el sistema de detección en tiempo real Mx3005P (Stratagene) con la mezcla maestra SYBR Green (Stratagene). Para la amplificación de la lipasa de tipo GDSL se emplearon los cebadores siguientes: *Gdsl\_Fwd*: 5'-CCCATCACAAAAGAAGAAG-3' y *Gdsl\_Rev*: 5'-CCCCGTCAACATTCATCAG-3' y para el gen constitutivo de referencia *actina 1* de *M. acuminata* (GenBank EF672732.1) *Act1\_Fwd*: 5'-GGTTAGACATCCTTTCTCTC-3' y *Act1\_Rev*: 5'-GCATCATCTCCAGCGAAAC-3', que generan amplicones de 120 pb y 130 pb, respectivamente. Los niveles de expresión del gen se expresaron como relativos a los niveles en plantas no infectadas (Control) en cada tiempo de muestreo.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

La comparación de las secuencias de Portal *et al.* (2011) con la base de datos del genoma de *M. acuminata* mostró que los dos EST obtenidos en la biblioteca sustractiva correspondieron a un único gen, identificado como *Ma02\_g12980* y anotado como lipasa de tipo GDSL (D'hont *et al.*, 2012).

Este gen está localizado en el cromosoma 2, y consta de cinco exones distribuidos en 1591 pb y codifica para un polipéptido de 356 aa, según la información disponible en *Banana Genome Hub* (Droc *et al.*, 2013).

El análisis realizado mostró una sobreexpresión del gen de la lipasa de tipo GDSL en el cultivar susceptible a los 3 dpi con *P. fijiensis* (Figura 1).

Por otro lado, en el cultivar resistente se reprimió la expresión del gen de la lipasa durante el período analizado (Figura 1). Este resultado podría indicar un posible papel de esta enzima en los procesos de susceptibilidad, en lugar de resistencia, al estar relacionada con una respuesta inadecuada ante la presencia del patógeno.

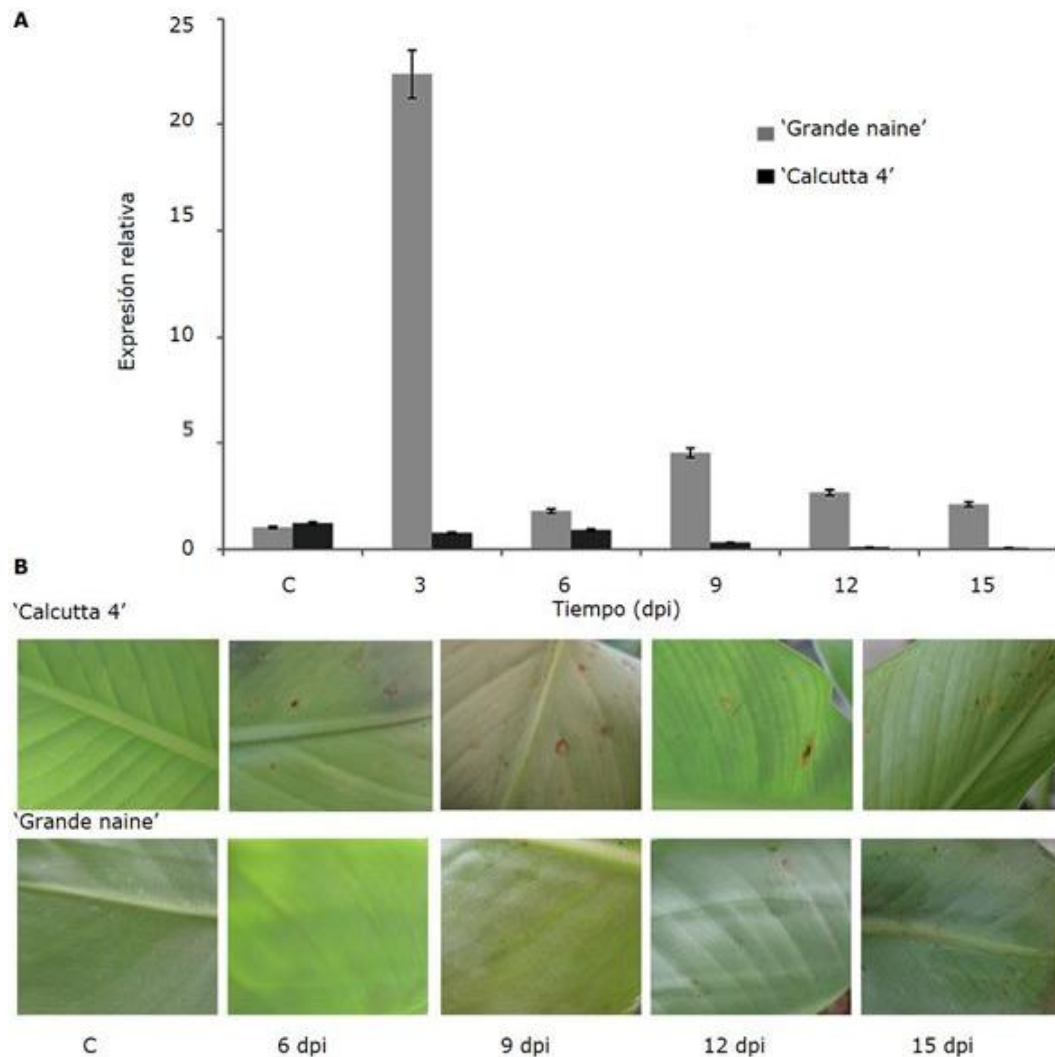


Figura 1. Análisis de expresión cuantitativa de lipasa de tipo GDSL durante la interacción compatible ('Grande naine', *Musa* AAA) e incompatible ('Calcutta 4', *Musa* AA) con *Pseudocercospora fijiensis*. A: Niveles de expresión de relativos a los niveles en plantas no infectadas (C). El gen *actina 1* de *Musa acuminata* (AAA) (GenBank EF672732.1) fue utilizado como gen constitutivo. Las líneas verticales indican errores estándar ( $n = 3$ ). B: Progreso de la enfermedad en las plantas inoculadas en cada uno de los tiempos de muestreo (6, 9, 12, 15 días posteriores a la inoculación).

Al respecto, se ha descrito que la lipasa 1 de tipo GDSL (CaGLIP1) aumenta la susceptibilidad a *Xanthomonas campestris* pv. *vesicatoria* (Doidge) Dye. en pimiento, a *Pseudomonas syringae* pv. *tomato* van Hall 1902 y al oomicete biotrófico *Hyaloperonospora parasitica* (Pers.) Constant., cuando es sobreexpresada en *A. thaliana* (Hong *et al.*, 2008). Adicionalmente, en arroz la represión simultánea de los genes de las lipasas de tipo GDSL, *OsGLIP1* y *OsGLIP2* aumenta la resistencia a patógenos fúngicos y bacterianos, mientras que su sobreexpresión

incrementa la susceptibilidad (Gao *et al.*, 2017). Tanto CaGLIP1, como OsGLIP1 y OsGLIP2 han sido identificados como reguladores negativos de la inmunidad, lo que sugiere una variabilidad de funciones dentro de este grupo de enzimas. Los estudios mencionados contribuyen a la acumulación de evidencias sobre el papel de los lípidos y sus productos en la inmunidad en plantas. Por tanto, el estudio de las lipasas de tipo GDSL como enzimas reguladoras del metabolismo lipídico podría resultar promisorio para el mejoramiento genético en plantas.

## CONCLUSIONES

El gen *Ma02\_g12980* presente en el genoma de *M. acuminata* codifica para una lipasa de tipo GDSL y esta se expresa de manera diferencial durante las interacciones compatible e incompatible con *P. fijiensis*.

## ACKNOWLEDGMENTS

Los autores agradecen el apoyo del VLIR-UOS a través de una estancia corta de investigación de Orelvis Portal en el Laboratorio de Fitopatología de la Facultad de Bioingeniería en la Universidad de Gante, Bélgica.

## Conflictos de intereses

Los autores declaran que no existen conflictos de intereses.

## REFERENCIAS

- D'hont A, Denoeud F, Aury JM, Baurens FC, Carreel F, Garsmeur O, Da Silva C (2012) The banana (*Musa acuminata*) genome and the evolution of monocotyledonous plants. *Nature* 488(7410): 213; doi: 10.1038/nature11241
- Droc G, Lariviere D, Guignon V, Yahiaoui N, This D, Garsmeur O, Lengelle J (2013) The banana genome hub. *Database* 2013; doi: 10.1093/database/bat035
- Gao M, Yin X, Yang W, Lam SM, Tong X, Liu J, Wang X, Li Q, Shui G, He Z (2017) GDSL lipases modulate immunity through lipid homeostasis in rice. *PLoS Pathogens* 13(11): e1006724; doi: 10.1371/journal.ppat.1006724
- Hong JK, Choi HW, Hwang IS, Kim DS, Kim NH, Choi DS, Kim YJ, Hwang BK (2008) Function of a novel GDSL-type pepper lipase gene, CaGLIP1, in disease susceptibility and abiotic stress tolerance. *Planta* 227(3): 539-558; doi: 10.1007/s00425-007-0637-5
- Kwon SJ, Jin HC, Lee S, Nam MH, Chung JH, Kwon SI, Ryu CM, Park OK (2009) GDSL lipase like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis*. *The Plant Journal* 58(2): 235-245; doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03772.x
- Lee DS, Kim BK, Kwon SJ, Jin HC, Park OK (2009) *Arabidopsis* GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling. *Biochemical and Biophysical Research Communications* 379(4): 1038-1042; doi: 10.1016/j.bbrc.2009.01.006
- Leiva-Mora M, Alvarado-Capó Y, Acosta-Suárez M, Cruz-Martín M, Sánchez-García C, Roque B (2010) Protocolo para la inoculación artificial de plantas de *Musa* spp. con *Mycosphaerella fijiensis* y evaluación de su respuesta mediante variables epifitológicas y componentes de la resistencia. *Biotecnología Vegetal* 10(2): 79-88
- Liao Z, Chen M, Guo L, Gong Y, Tang F, Sun X, Tang K (2004) Rapid isolation of high quality total RNA from *Taxus* and *Ginkgo*. *Preparative Biochemistry and Biotechnology* 34(3): 209-214; doi: 10.1081/PB-200026790
- Oh IS, Park AR, Bae MS, Kwon SJ, Kim YS, Lee JE, Kang NY, Lee S, Cheong H, Park OK (2005) Secretome analysis reveals an *Arabidopsis* lipase involved in defense against *Alternaria brassicicola*. *The Plant Cell* 17(10): 2832-2847; doi: 10.1105/tpc.105.034819
- Orellana PP (1994) Tecnología para la micropropagación *in vitro* de clones de *Musa* spp. Tesis en opción del Grado Científico de Doctor en Ciencias Agrícolas, Universidad Central Marta Abreu de Las Villas, Santa Clara, Cuba
- Portal O, Izquierdo Y, De Vleeschauwer D, Sánchez-Rodríguez A, Mendoza-Rodríguez M, Acosta-Suárez M, Ocaña B, Jiménez E, Höfte M (2011) Analysis of expressed sequence tags derived from a compatible *Mycosphaerella fijiensis*-banana interaction. *Plant Cell Reports* 30(5): 913-928; doi: 10.1007/s00299-011-1008-z

Recibido: 17-10-2017

Aceptado: 06-12-2017