

"Biotecnología de tercera generación para la obtención de variedades de maíz resistentes a *Fusarium verticillioides* con la potencialidad de proveer plantas con múltiples aptitudes mejoradas"

Juan Pablo, Zubimendi

CEFOBI-CONICET. Facultad de ciencias bioquímicas y farmacéuticas. Universidad Nacional de Rosario.

Área: Ciencias Biológicas, Sub-Área: Biotecnología

"Biotecnología de tercera generación para la obtención de variedades de maíz resistentes a *Fusarium verticillioides* con la potencialidad de proveer plantas con múltiples aptitudes mejoradas" Director: Marcos Ariel Tronconi , Co-directora: Valeria Alina Campos Bermudez

Introducción

El hongo *Fusarium verticillioides* causa graves daños en la producción y rendimiento de los cultivos de maíz. La sintomatología de la infección se caracteriza por la putrefacción de los granos en desarrollo colonizados por el hongo, llevando en algunos casos a la pérdida completa de la mazorca. Esta problemática toma mayor dimensión al considerar que *F. verticillioides* produce una serie de micotoxinas con efectos nocivos en la salud de animales y humanos. En la actualidad, la contaminación fúngica puede ser disminuida mediante métodos tradicionales de protección de cultivos y el uso de variedades moderadamente resistentes. En el germoplasma nacional de maíz existen variedades que exhiben diferencias muy claras en la sensibilidad a la infección por *F. verticillioides*, siendo algunas de ellas notoriamente susceptibles mientras que otras presentan una marcada resistencia. Las bases bioquímicas y moleculares de estas diferencias entre variedades aún no han podido ser determinadas. Resulta evidente la necesidad de plantear un estudio sistemático de los mecanismos involucrados en la respuesta al ataque por este hongo, con vistas a aplicar este conocimiento en nuevos programas de investigación y desarrollo del cultivo de maíz. Estudios de microarreglos realizados por nuestro grupo en granos de maíz de dos líneas que difieren en su susceptibilidad a *F. verticillioides*, indican que los componentes bioquímicos involucrados en el metabolismo del ARN constituyen la segunda categoría de transcritos que modifican su perfil de expresión por la inoculación con el hongo. Entre las proteínas codificadas por este grupo de transcritos se identificaron varios componentes del sistema de maduración alternativo (SA) de los pre-ARNm un proceso que aporta diversidad en el proteoma y regula la expresión de otros genes. En esta dirección, el presente trabajo aborda el estudio de proteínas reguladoras de la expresión génica de maíz que definen el patrón global temporal, espacial y el alcance de las respuestas a la infección por *F. verticillioides*.

Objetivo general

Analizar la participación proteínas reguladoras de la expresión génica de maíz involucradas en los mecanismos de defensa al ataque por *Fusarium verticillioides*, identificando las rutas de señalización a través de las cuales se integran las respuestas, y su potencial como blanco modificable para la obtención de nuevas variedades de maíz.

Objetivo particular

Aislamiento y caracterización de los distintos transcritos de proteínas involucradas en el SA en líneas de plantas resistentes y susceptibles a *Fusarium verticillioides*.

Metodología de trabajo y actividades realizadas.

En este trabajo se evaluó la existencia de diferentes transcritos que den lugar a proteínas SR (pertenecientes a la subfamilia RS2Z), las cuales tienen un rol central en la regulación del SA. Según la información depositada en la base de datos (www.maizegenome.org) y por resultados obtenidos por nuestro grupo de trabajo, el

número de transcritos derivados de los genes *RS2Z* sería mayor. Estas diferencias radican principalmente por el SA que sufrirían estos transcritos.

Para poder verificar la existencia de diferentes transcritos *RS2Z* se realizaron reacciones de amplificación mediante la técnica PCR (reacción en cadena de la polimerasa) de los ADNc, estos fueron obtenidos mediante transcripción reversa de ARN extraído de granos de maíz de las variedades bajo estudio antes y después de la infección con *F. verticillioides*. Para la reacción de amplificación se utilizaron oligocebadores específicos que permitieron amplificar las secuencias de los transcritos derivados de los genes *RS2Z39*, *RS2Z37A* y *RS2Z37B*. Los fragmentos de ADN obtenidos fueron ligados en vectores de clonado y transferidos mediante la técnica de transformación química al huésped bacteriano *E.coli* DH5 α , con el fin de replicar aún más la cantidad de ADN. Finalmente, se seleccionaron aquellas colonias transformantes que incorporaron el vector con el fragmento de ADN amplificado por PCR, y tras crecer cultivos de las mismas se pudo extraer el ADN plasmídico de interés en un mayor número de copias. Estos ADN plasmídicos serán secuenciados para posteriormente realizar un análisis en búsqueda de diferencias a nivel de la composición de bases de los transcritos derivados de los genes *RS2Z*.

Resultados

Tras realizar la PCR utilizando como molde los diferentes ADNc, se obtuvieron varios fragmentos amplificados que mostraron diversos tamaños (en pares de bases). Estos resultados pueden deberse a la existencia de transcritos derivados de un mismo gen que han experimentado corte y empalme alternativo. En la *Figura 1* se muestra un gel de agarosa 1% teñido con SYBR safe, donde se sembraron los productos de PCR y se resolvieron mediante electroforesis.

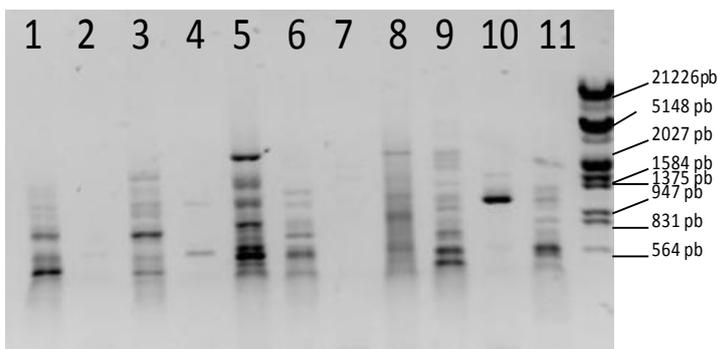


FIGURA1: Gel de agarosa 1% teñido con SYBR safe. Productos de amplificación obtenidos luego de PCR. Referencia según el set de oligocebadores utilizados en PCR: Calles 1,3,6,9,11: Amplificación de transcritos *RS2Z37A*; Calles 2,4,7,10: Amplificación de transcritos *RS2Z37B*; Calles 5,8

Amplificación de transcritos *RS2Z39*. **Referencia según la fuente del ADNc utilizado como molde en PCR: Calles 1,2:** ADNc obtenido a partir de granos de la línea L4674 (variedad sensible) inoculada con *F.verticillioides*, **Calles 3,4,5:** ADNc obtenido a partir de granos de la línea L4674 sin inocular con el hongo, **Calles 6,7,8** ADNc obtenido a partir de granos de la línea L4637 (variedad resistente) inoculada con *F.verticillioides*, **Calles 9,10,11** ADNc obtenido a partir de granos de la línea L4637 sin inocular con el hongo.

Los productos de amplificación, fueron ligados en el vectores de clonado pBluescript y con ellos se transformaron células competentes de *E.coli* DH5 α . Las células transformantes que contenían el vector con el inserto se identificaron como colonias blancas en placas de Petri que contenían medio LB-agar suplementado con ampicilina,

IPTG y X-gal. Una vez seleccionadas las colonias transformantes, se crecieron cultivos de las mismas, y posteriormente se les extrajo el ADN plasmídico (Figura 2).

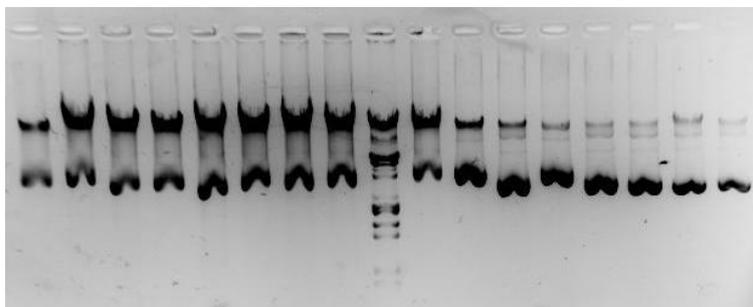


FIGURA2: Gel de agarosa 1% teñido con SYBER safe. Extracción de ADN plasmídico.En la figura se muestran las extracciones de ADN plasmídico de 16 colonias seleccionadas de una placa de Petri (mediante el método de detección con

reportero *lacZ* que permite diferenciar las transformantes como colonias blancas). Este caso corresponde al clonado de transcritos derivados del gen *RS2Z39*.

Para chequear si las colonias seleccionadas incorporaron el inserto de ADN, se analizó mediante digestión con enzimas de restricción o bien por PCR, tras realizar electroforesis en gel de agarosa, por el tamaño molecular de los fragmentos liberados o amplificados se pudo deducir si el vector recuperado por la extracción de ADN plasmídico contenía un inserto. Como puede observarse en la Figura 3, tras realizarse el chequeo mediante PCR utilizando como molde los ADN plasmídicos de las colonias transformantes (Figura2), se observan fragmentos de diferentes tamaños incorporados en los vectores de clonado, de esta manera tras realizar la secuenciación de los mismos, podremos entender la naturaleza de los cambios producidos a nivel de secuencia en los transcritos alternativamente generados.

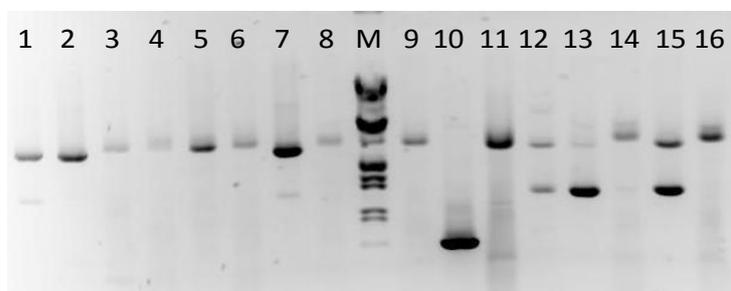


FIGURA3: Gel de agarosa 1% teñido con SYBER safe. Chequeo de las colonias transformantes mediante PCR.En la figura se muestran las reacciones de amplificación utilizando como molde los ADN plasmídicos obtenidos de las 16 colonias

seleccionadas. En este caso se utilizó un set de oligocebadores que permiten amplificar transcritos derivados del gen *RS2Z39*. En el calle central se colocó el marcador (M) que permitió evaluar los pares de bases aproximados de los fragmentos amplificados.

Conclusiones

Con los resultados obtenidos, se podrán establecer algunos de los mecanismos moleculares desarrollados en las variedades de maíz analizadas. Según los resultados existiría la posibilidad de un respuesta molecular a nivel del metabolismo del RNA que generaría que las plantas manifiesten una resistencia a *F. verticillioides*, donde tal vez la interacción con el patógeno esté disparando el proceso del corte y empalme alternativo en proteínas de la familia RS2Z que modulan procesos regulatorios de la expresión a nivel de la maduración del RNA. Por otro lado se podrá evaluar si estas respuestas están preformadas antes de la infección con el hongo o bien se disparan tras la infección con el mismo.

Bibliografía

-Bush, B. J.; Carson, M. L.; Cubeta, M. A.; Hagler, W.M.; Payn, G.A.(2004). Infection and fumonisin production by *Fusarium verticillioides* in developing maize kernels. *Phytopathology* 94:99-93.

-Campos-Bermudez VA, Fauguel CM, Tronconi MA, Casati P, Presello DA, and Andreo CS. (2013) Transcriptional and metabolic changes associated to the infection by *Fusarium verticillioides* in maize inbreds with contrasting ear rot resistance. *PLoS One*, en prensa.

-Munkvold GP, Desjardins AE (1997). Fumonisin in maize. Can we reduce their occurrence? *Plant Dis.* 81: 556–564.

-Nelson, P. E., A. E. Desjardins, and R. D. Plattner. (1993). Fumonisin, mycotoxins produced by *Fusarium* species: biology, chemistry and significance. *Annu. Rev. Phytopathology* 31:233-252.

-Park JM, Park CJ, LeeSB, Ham BK, Shin R, Paek KH (2001). Overexpression of the tobacco Tsi1 gene encoding an EREBP/AP2-type transcription factor enhances resistance against pathogen attack and osmotic stress in tobacco. *Plant Cell* 2001, 13:1035-1046.

-Pre M, Atallah M, Champion A, De Vos M, Pieterse CMJ, Memelink J. (2008). The AP2/ERF domain transcription factor ORA59 integrates jasmonic acid and ethylene signals in plant defense. *Plant Physiology* 147: 1347–1357.

-Scott PM (1993). Fumonisin. *Int. J. Food Microbiol.* 18: 257–270.

-Shephard GS, Thiel PG, Stockenstrom S, Sydenham EW (1996). Worldwide survey of fumonisin contamination of corn and corn-based products. *J. AOAC Int.* 79: 671–687.

-Singh KB, Foley RC and Oñate-Sánchez L (2002) Transcription factors in plant defense and stress responses. *Current Opinion in Plant Biology* 5: 430–436.

-Thiel PG, Marasas WFO, Sydenham EW, Shephard GS, Gelderblom WCA (1992). The implications of naturally occurring levels of fumonisins in corn for human and animal health. *Mycopathologia* 117: 3–9.

-Zhao Y, Wei T, Yin KQ, Chen Z, Gu H, Qu LJ, Qin G. (2012) Arabidopsis RAP2.2 plays an important role in plant resistance to *Botrytis cinerea* and ethylene responses. *New Phytol.* 195:450-60.