

Caracterización de Cisteín Proteasas Asociadas a la Resistencia de *Brachiaria* (*Poaceae*) al Salivazo (*Cercopidae*)

Roda F¹., Rodríguez F¹., Romero C² and Tohme J¹

¹CIAT, Conservation and Use of Tropical Genetic Resources, AA 6713 , Cali, Colombia.

²Harvard University email: cromero@fas.harvard.edu

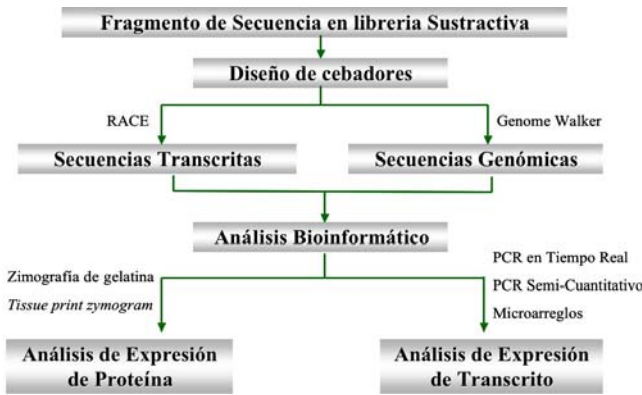


INTRODUCCION

El ataque del salivazo es un serio limitante para el cultivo de *Brachiaria*, el forraje más promisorio del neotrópico. Mediante mejoramiento clásico han sido desarrolladas líneas del pasto con efecto antibiótico sobre ninfas del insecto. En una aproximación a las bases moleculares de esta resistencia se realizó un librería sustractiva enriquecida en secuencias inducidas por el ataque de la plaga en plantas resistentes. Dentro de los genes aislados, un transcrito de proteasa (*bcp*) se constituye en el principal candidato a efector de la antibiosis.

bcp codifica para una cisteín proteasa de la familia de las papaínas, grupo al cual pertenecen enzimas que participan de varias formas en respuestas a estrés biótico. Con el fin de averiguar cual es el papel jugado por *bcp* en la interacción *Brachiaria*-Salivazo se aislaron las secuencias genómica y transcrita del gen y se estudió su patrón de expresión.

MATERIALES Y METODOS



RESULTADOS Y DISCUSION

Existen dos copias de *bcp* en el genoma de *Brachiaria* diferenciadas en la secuencia y longitud de único intrón. El aislamiento de pseudogenes y parálogos sugiere que el gen está sometido a un dinámico proceso evolutivo. *bcp* es objeto de poliadenilación alternativa por lo que su transcripción produce cuatro mARNs distintos. Estos presentan una corta región 5'UTR, una zona codificante de 1014 pb y una amplia 3'UTR de longitud variable en la que se localizan posibles elementos reguladores (figura 1).

La traducción de *bcp* genera papaínas producidas como zimógenos con una señal de localización N-terminal que las dirigiría hacia la ruta secretoria, un propeptido inhibitorio con los dominios conservados ERFNIN y GNFD, y una región catalítica en la cual se localizan los cuatro aminoácidos del sitio activo (figuras 1 y 3)

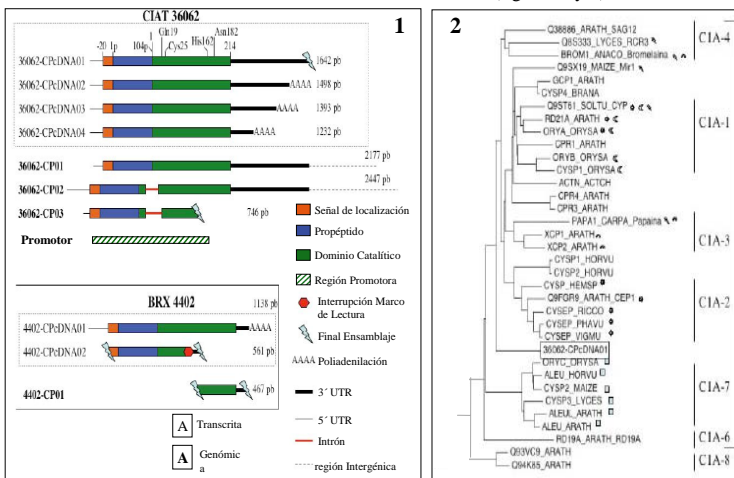


Figura 1: Estructura de las versiones transcritas y genómicas (en negrilla) de los genes *bcp* en un genotipo resistente (CIAT 36062) y un genotipo susceptible (BRX 4402).

Figura 2: Arbol filogenético (modelo JTT) a partir de secuencias de papaínas vegetales. Las BCPs aparecen encuadradas. Los 6 grupos de la parte superior son similares a catepsinas L. A la derecha se indican grupos propuestos por Beers et al. 2004. (□) Vacuolares y expresadas en semilla. (◊) Implicadas en resistencia a plagas o patógenos. (◌) Expresadas en xilema y (o) laticíferos. (✱) Señal KDEL de localización vacuolar. (()) Dominio inhibitorio terminal tipo Granulina.

Figura 3: Alineamiento de secuencias de BCPs aisladas en CIAT 36062 y BRX4402. (◊) Señal de localización celular; En el propeptido se localizan los dominios conservados ERFNIN (E) y GNFD (G) involucrados en la inhibición de la proteasa y en el clivaje de esta región durante la activación de la enzima. (>) Indica el inicio de la región catalítica. (+) aminoácidos del sitio activo. En negrilla y con (■) se muestran zonas conservadas en las papaínas. (S) cisteínas implicadas en formación de puentes disulfuro. (A) Sitios polimórficos. (C) señal de N-glicosilación.

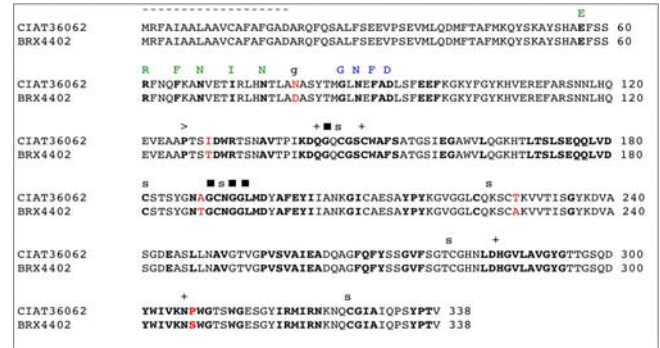
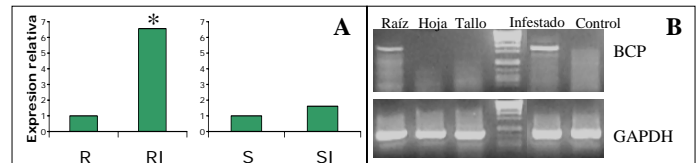


Figura 4: Expresión de *bcp* en órganos de plantas resistentes (R) y susceptibles (S) infestados (RI y SI) con ninfas de salivazo. En (A) resultados de PCR en Tiempo Real corroborados con microarreglos. (*) Valores significativamente diferentes al control (p<0.001). En (B) PCR semi-cuantitativo realizado a partir de RNA de plantas resistentes infestadas.



Las cisteín proteasas de *Brachiaria* (BCPs) forman un clado aislado dentro de las papaínas similares a catepsinas L, lo cual dificulta la realización de predicciones acerca de su función fisiológica (figura 2). No obstante nuestros resultados indicarían que estas proteínas participan en la resistencia de *Brachiaria* al salivazo: Las secuencias de los ortólogos de plantas resistentes y susceptibles presentan diferencias (figura 3). Por otra parte, aunque el gen se expresa constitutivamente en la raíz de todos los genotipos estudiados, el ataque del insecto induce su sobre-expresión únicamente en accesiones resistentes (figura 4-A). Además en los perfiles proteolíticos en zimografías de gelatina se evidencian diferencias inter-varietales (figura 5-A) y se demuestra la existencia de proteasas en el xilema radicular (Figura 5-C), tejido del cual se alimentan las ninfas de la plaga. Esta enzima no se produce en hojas y tallo (figura 4-B), lo cual explicaría que todos las plantas estudiadas sean susceptibles a los insectos adultos (que se alimentan de estos órganos). Finalmente, en el promotor del gen hay elementos cuya intervención en regulación de la expresión de proteínas xilemáticas y de respuesta a estrés ha sido demostrada en otros modelos.

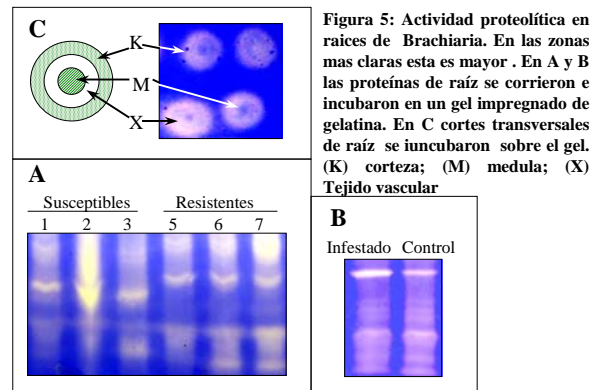


Figura 5: Actividad proteolítica en raíces de *Brachiaria*. En las zonas más claras esta es mayor. En A y B las proteínas de raíz se corrieron e incubaron en un gel impregnado de gelatina. En C cortes transversales de raíz se inocularon sobre el gel. (K) corteza; (M) medula; (X) Tejido vascular

PERSPECTIVAS

- Mapear los *bcp*s en el genoma de *Brachiaria*.
- Secuenciar el promotor genico en variedades susceptibles.
- Evaluar el efecto de la transformación con *bcp*s (en *Brachiaria* u otros modelos) sobre la resistencia al salivazo.