

EVALUACIÓN GENOMICA DE LOS GENES PR1 Y TCTP EN ESPECIES Y VARIEDADES DE TABACO (*Nicotiana tabacum* L.)

Sandra Pérez*, D. Cabezas*, Y. Domínguez*, O. Coto**, H. García**

*Universidad Agraria de la Habana – C.P. 32700 - Mayabeque - Cuba; **Instituto de Fruticultura Tropical – C. P. 11300 - Habana – Cuba; ***Instituto de Investigaciones del Tabaco, San Antonio de los Baños, Mayabeque, Cuba

RESUMEN: La identificación de genes novedosos relacionados con estrés biótico y abiótico en *Nicotiana tabacum* L. puede contribuir al mejoramiento genético del cultivo en todo el mundo. El objetivo de este trabajo fue la identificación de genes novedosos en variedades de tabaco, así como, la caracterización molecular de algunas secuencias marcadas expresadas (ESTs) en variedades cubanas y algunas especies de tabaco. La tecnología del microarreglo se utilizó conjuntamente con las ESTs para la construcción de una genoteca de ADNc. Lo más novedoso de esta investigación fue que 265 ESTs no se habían informado con anterioridad en especies vegetales y un gen, la Proteína Tumoral Controlada durante la Transcripción (TCTP) no se había informado en *N. tabacum*. Los resultados del microarreglo se confirmaron utilizando la RT-PCR cuantitativa en tiempo real. Los genes TCTP y proteína relacionada con la patogénesis (PR1) se utilizaron para la caracterización molecular de algunas especies y variedades de tabaco cubano. En el caso de la TCTP se caracterizaron seis especies y cuatro variedades y para la PR1 ocho variedades. La TCTP solamente se expresó en dos especies (*Nicotiana glutinosa* L. y *Nicotiana tomentosiformis* Goodsp.) y la PR1, después de la digestión, mostró diferentes bandas entre las variedades susceptibles y resistentes. La presencia de estos genes en una parte del germoplasma analizado constituye un paso inicial para la utilización de este conocimiento en el mejoramiento genético del tabaco.

(Palabras clave: Secuencias marcadas expresadas (ESTs); microarreglo; caracterización molecular)

GENOMIC EVALUATION OF PR1 AND TCTP GENE IN TOBACCO (*Nicotiana tabacum* L.) SPECIES AND VARIETIES

ABSTRACT: The identification of novel genes related to biotic and abiotic stress in *Nicotiana tabacum* L. can contribute to the genetic improvement of plants around the world. The aim of this research was to identify novel genes in tobacco varieties, as well as the molecular characterization of some expressed sequences tags (ESTs) in some Cuban tobacco varieties and species. The microarray technology was used with ESTs for the construction of a cDNA library. The most interesting finding in this study was that 265 ESTs had never been reported before in vegetable species and one gene, the Transcriptional Controlled Tumor Protein (TCTP), had never been reported before in *N. tabacum*, with the studies about this gene being focused on human and animals mostly. The microarray results were confirmed using quantitative RT-PCR. TCTP and pathogenesis-related protein 1 (PR-1) ESTs were used to design primers for the molecular characterization of some species and Cuban tobacco varieties. In the case of TCTP, six species and four varieties were characterized, and eight varieties for PR1. TCTP was only expressed in two species (*Nicotiana glutinosa* L. and *Nicotiana tomentosiformis* Goodsp.) and PR1, after a digestion, exhibited different bands for susceptible and resistant varieties. The detection of these genes in some species and Cuban tobacco varieties is the first step to go further in the molecular characterization of Cuban germoplasm.

(Key words: Expressed sequence tag (ESTs), cDNA microarray, molecular characterization)

INTRODUCCIÓN

El tabaco es uno de los productos de mayor demanda en el mundo y es objeto de gran intercambio comercial. En Cuba la producción tabacalera ocupa un lugar cimero en la economía por ser una de las principales fuentes de ingreso por su reconocimiento internacional al considerarse entre los mejores del mundo (1).

La detección de genes, a partir de secuencias conocidas, proporciona información de gran relevancia sobre el genoma, lo que puede ayudar de manera eficiente en el mejoramiento del tabaco. Existe un gran número de genes que están relacionados con procesos de importancia en el desarrollo de las plantas. Los genes *tpt1* y *pr1* codifican para la proteína tumoral controlada durante la traducción y para la proteína relacionada con la patogénesis respectivamente; estas proteínas intervienen en procesos como el crecimiento vegetal y la tolerancia a diferentes tipos de estrés (2). Numerosos estudios han demostrado la presencia de estos genes en varias especies vegetales de importancia económica por lo que este trabajo tiene como objetivo detectar la presencia de los genes *tpt1* y *pr1* en el genoma de algunas especies y variedades cubanas de tabaco.

MATERIALES Y MÉTODOS

Para la construcción de la genoteca se utilizaron tallos, raíces y hojas de plantas de cuatro variedades de tabaco ('Hongda', 'NC82', 'YH05' y 'YUN201') provenientes de la provincia de Yunnan, República Popular de China.

Las muestras (5g) se maceraron en mortero con nitrógeno líquido, y se utilizaron para la extracción del ARN total por el método del Trizol.

Las secuencias se editaron con el programa SEQUENCE NAVIGATOR (Perkin Elmer/Applied Biosystems) y los programas BLASTX y BLASTN se utilizaron para buscar similitudes con las proteínas y los ácidos nucleicos en la base de datos dbEST del National Center of Biotechnology (NCBI) de los EUA. Las secuencias de los genes provenientes de los ADNc se depositaron en la base de datos Genbank de EST (www.ncbi.nlm.nih.gov/dbEST/species=tobacco).

Para el análisis de la expresión se utilizó el microarreglo de ADNc en membranas de nylon (Amersham Ltd.) según lo descrito por Pérez *et al.* (2). La hibridación se realizó toda la noche a 60°C en horno de hibridación.

La validación de los resultados de la hibridación con microarreglo se realizó mediante la RT-PCR cuantitati-

va en tiempo real al utilizar el método SYBR® Green. Todos los datos originales de las ESTs y del microarreglo pueden encontrarse en el sitio www.estarray.org.

Con el objetivo de determinar la presencia de los genes *tctp* y *pr1* en las especies *Nicotiana glutinosa* L., *Nicotiana tomentosiformis* Goodsp., *Nicotiana debneyi* Domin., *Nicotiana exigua* H-M Wheeler, *Nicotiana excelsior* (J. M. Black) J. M. Black., *Nicotiana megalosiphon* van Heurck & Müll. Arg. y las variedades de *Nicotiana tabacum* L. Habana-2000, Corojo 99, Criollo 98, Habana 2.1.1, Burley Habana-13 (BH-13), BHmN, Corojo, San Luis 21 y Virginia Resistente -14 se sembraron semillas en casas de cultivo protegido, bajo condiciones semicontroladas, en el Instituto de Investigaciones del Tabaco, Cuba (IIT). Se tomaron muestras de 5 g de hojas de cada especie y variedad en estudio y se realizó la extracción de ADN genómico mediante el método CTAB California según el protocolo de Sabater y Vilumara (3) y se purificó siguiendo el protocolo de Ausubel (4).

Los cebadores se diseñaron mediante el programa Vector NTI a partir de las secuencias identificadas en este trabajo y teniendo en cuenta los resultados del alineamiento, las secuencias de los mismos son para *tpt1* (5'-TGTCTGGTGGAGTGCTTCTG-3', 3'-TCATTTGCTGTGTCCCACAT-5') y para *pr1* (5'-GGGAGTTTTGAGCTTTGGATGAG - 3', 3'-GACACCTAACGGGACTGCTTTC C-5').

Los fragmentos de ADN genómico se amplificaron mediante la técnica PCR en un termociclador Tpersonal (Biometra®). El programa consistió en 5 min iniciales de desnaturalización a 92°C, a continuación 36 ciclos de desnaturalización, alineamiento y extensión a 92°C por 30 s, 55°C por 45 s, 72°C por 45 s y 10 min de extensión final a 72°C.

La visualización de los resultados se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 0,8% teñido con bromuro de etidio.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se generaron 5 927 secuencias desde ambos extremos de los clones seleccionados de la genoteca de ADNc de *N. tabacum* (Tabla 1).

Las ESTs se utilizan para profundizar en los procesos moleculares que tienen lugar en las plantas y en otros organismos así como para la identificación de genes novedosos. Ji *et al.* (5) realizaron un estudio en plantas de soya (*Glycine max* L.) para analizar posibles respuestas fisiológicas bajo condiciones de estrés;

TABLA 1. Análisis de las secuencias expresadas en tabaco (*N. tabacum*)./Analysis of sequences expressed in tobacco (*N. tabacum*)

Resumen de EST	
Total de ESTs	5 927
Largo de la EST (nt)	351
Número de secuencias contiguas ¹	521
Redundancia (%) ²	48.1
Número de secuencias sencillas	3 079
Contenido de G + C (%)	43.6

- 1- Un grupo de clones que representan regiones superpuestas del genoma.
- 2- Redundancia = ESTs agrupadas en secuencias contiguas /total ESTs.

Jantasuriyarat *et al.* (6) obtuvieron más información sobre los mecanismos de defensa de la planta de arroz (*Oriza sativa* L.) contra el hongo *Magnaporthe grisea* (Herbert) Barr al obtener ESTs de las cuales el 13% fueron secuencias únicas.

TABLA 2. Análisis de las secuencias expresadas obtenidas en el microarreglo./ Analysis of expressed sequences obtained in microarray

Variedades ¹	EST	Anotaciones ²	Taxonomía ³
Hongda - NC82	TBT026C05	PR-1	<i>N. tabacum</i>
	TBT046G07	-	-
Hongda-YH05	TBT040D03	Proteína de unión probable a esteroides	-
	TBT108H08	Proteína serina-treonina	<i>Solanum tuberosum</i> L.
	TBT112A12	Metalotioneína tipo 2	-
Hongda - YUN201	TBT012G08	PR -1	<i>N. tabacum</i>
	TBT087G01	Ubiquitina	Ascomycetos
	TBT069F05	Proteína tumoral controlada en la traducción (TCTP)	<i>O. sativa</i>
	TBT018C04	-	-
NC82- YH05	TBT080G07	Proteína de choque térmico	<i>Solanum lycopersicon</i> L.
	TBT081C03	Proteína serina-treonina	<i>Solanum tuberosum</i> L.
	TBT115D05	-	-
	TBT112A12	Metalotioneína tipo 2	-
NC82- YUN201	TBT012G08	PR -1	<i>N. tabacum</i>
	TBT047H04	Proteína de unión probable a esteroides	-
	TBT053F03	Ubiquitina SMT3	<i>Arabidopsis thaliana</i> y <i>O. sativa</i>
	TBT087G01	Ubiquitina	Ascomycetos
YH05- YUN201	TBT083H01	TCTP	<i>Oriza sativa</i>
	TBT033C05	Ubiquitina SMT3	<i>A. thaliana</i> y <i>O. sativa</i>
	TBT055D02	-	-
	TBT026C05	Quinasa ciclina dependiente	-

- 1- Variedades chinas empleadas en este estudio
- 2- Clasificación de la secuencia expresada en la base de datos del NCBI
- 3- Homología de las ESTs a nivel de especies

Como resultado del microarreglo construido en el presente estudio se obtuvieron 359 ESTs. En la tabla 2 se presentan las que resultaron ser novedosas y las que pueden tener mayor importancia o interés para el mejoramiento del tabaco.

La evaluación de la expresión a través del microarreglo de ADNc de las secuencias únicas identificadas permitió el examen simultáneo de un gran número de secuencias y el análisis de su relación con funciones biológicas.

Las 245 ESTs que resultaron ser novedosas al no encontrarse homología en la dbEST del NCBI sugieren la posibilidad de ser genes importantes específicos para *N. tabacum*. Análisis futuros de estas secuencias podrían contribuir a una mejor comprensión de la función y organización del genoma de esta planta.

Los transcritos de TCTP y la PR1 fueron seleccionados para determinar su presencia en variedades cubanas y especies de tabaco.

Los resultados de las hibridaciones con microarreglos se validaron satisfactoriamente, mediante el empleo de la RT-PCR cuantitativa en tiempo real (Figura 1).

Como se observa en la figura, los valores globales de las expresiones de los genes entre el microarreglo y la cuantificación mediante la amplificación con la RT-PCR cuantitativa en tiempo real, no variaron considerablemente, lo que demuestra la confiabilidad de los resultados obtenidos en el microarreglo construido.

Los resultados de la amplificación del gen *tpt1* evidenciaron su presencia en las especies *N. glutinosa* y *N. tomentosiformis* (Figura 2). En estas especies se obtuvieron fragmentos de ~850 pb que se corresponden con el tamaño del fragmento esperado según la secuencia conocida (828 pb) a partir de la cual se diseñaron los cebadores.

Khan y Narayan (7) plantearon que la reorganización de las secuencias de ADN, la pérdida de secuencias de bases, así como el aislamiento geográfico fueron procesos fundamentales en el origen y diferenciación de las especies de *Nicotiana*. Al analizar los resultados obtenidos en la amplificación teniendo en cuenta este planteamiento es posible que este gen haya sido eliminado del genoma de *N. debneyi*, *N. exigua*, *N. excelsior* y *N. megalosiphon*. Estas especies pertenecen a la sección *Suaveolentes*, la que según Chase *et al.* (8) es de origen monofilético y ha evolucionado aisladamente en Australia y el Pacífico Sur.

Se ha demostrado que la especie *N. tabacum* se originó por la hibridación natural de *N. sylvestris* y *N. tomentosiformis* por lo que resulta interesante que el gen *tpt1* no se haya detectado en ninguna de las cuatro variedades de tabaco estudiadas.

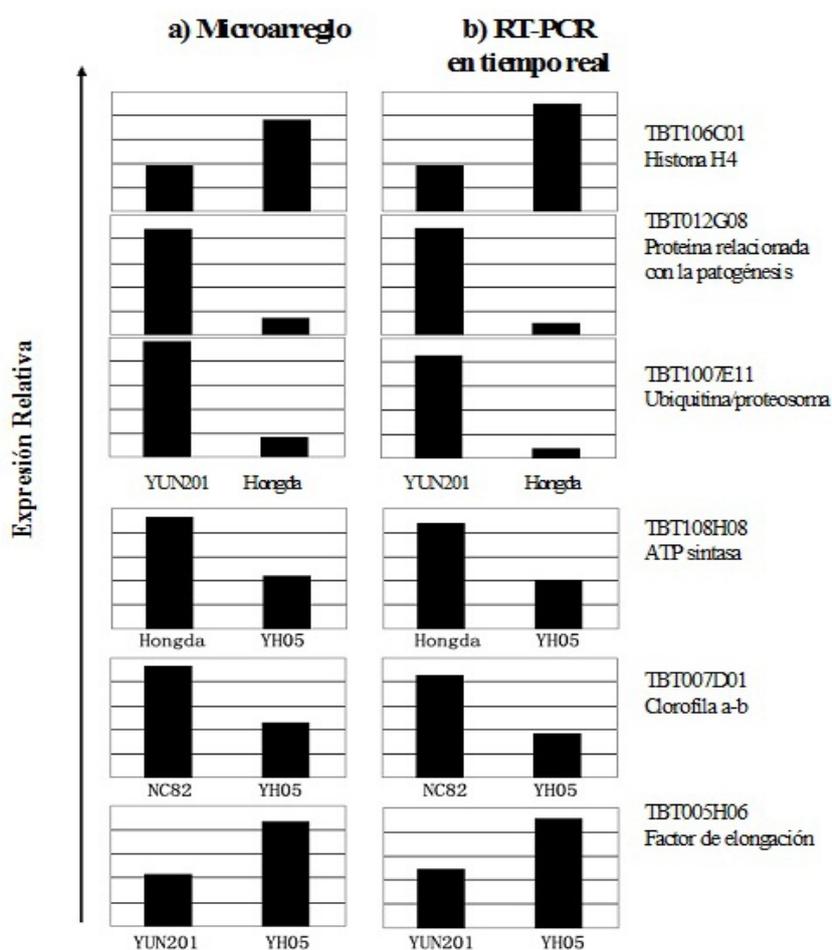


FIGURA 1. RT-PCR cuantitativa en tiempo real para validar los resultados del microarreglo./ *Quantitative RT-PCR real time to validate microarray results.*



FIGURA 2. Amplificación del gen *tpt1*. (M) Marcador de peso molecular 100 bp DNA Ladder, (1) *N. glutinosa*, (2) *N. tomentosiformis*, (3) *N. debneyi*, (4) *N. exigua*, (5) *N. excelsior*, (6) *N. megalosiphon*, (7) var. 'Habana 2000', (8) var. 'Corojo 99', (9) var. 'Criollo 98', (10) var. 'Burley Habana - 13' y (11) control negativo. / *Gen tpt1 amplification.* (M) DNA marker 100 bp, (1) *N. glutinosa*, (2) *N. tomentosiformis*, (3) *N. debneyi*, (4) *N. exigua*, (5) *N. excelsior*, (6) *N. megalosiphon*, (7) var. 'Habana 2000', (8) var. 'Corojo 99', (9) var. 'Criollo 98', (10) var. 'Burley Habana - 13' y (11) negative control.

La amplificación del gen *pr1* mediante la técnica de la PCR, resultó en un fragmento de aproximadamente 600 pb en todas las variedades estudiadas; estos resultados coinciden con los planteados por Freitas *et al.* (9) quienes realizaron estudios genómicos sobre estos genes PR-1 y no encontraron diferencias entre los diferentes genotipos de trigo estudiados.

El estudio de este gen resulta importante ya que ofrece información que puede servir no solo para la especie en estudio, sino también para otras especies de plantas, sobre todo las pertenecientes a la familia Solanaceae. Con respecto a esto algunos autores como Kyu *et al.* (10) plantearon que estos genes *pr-1* se identificaron en los genomas de diversas especies de organismos dentro de las que se incluyen además de algunas plantas, nematodos y humanos.

A pesar de observarse los mismos patrones de amplificación en las ocho variedades en estudio, estos

presentan diversos comportamientos ante las enfermedades que afectan este cultivo en nuestro país; por tanto, se le realizó a estos productos de amplificación una digestión con la enzima de restricción *Hind III* S-400 Matrix, para buscar polimorfismo, cuyos resultados se muestran en la Figura 3.

Como se observa en esta figura, las dos bandas de restricción de las variedades Corojo, Habana 2000, San Luis 21, Virginia Resistente - 14 (5-8) presentan un tamaño aproximado de 350pb y 250pb respectivamente. El fragmento de amplificación que fue sometido a la digestión enzimática, en el caso de estos progenitores, contenía un solo sitio de restricción, este resultado fue el esperado, ya que la secuencia a partir de la cual se diseñaron los cebadores para la amplificación también contenía un solo sitio de restricción.

Por otra parte las tres bandas de restricción de las variedades Criollo 98, Habana 2.1.1, BH-13, BHmN (1-

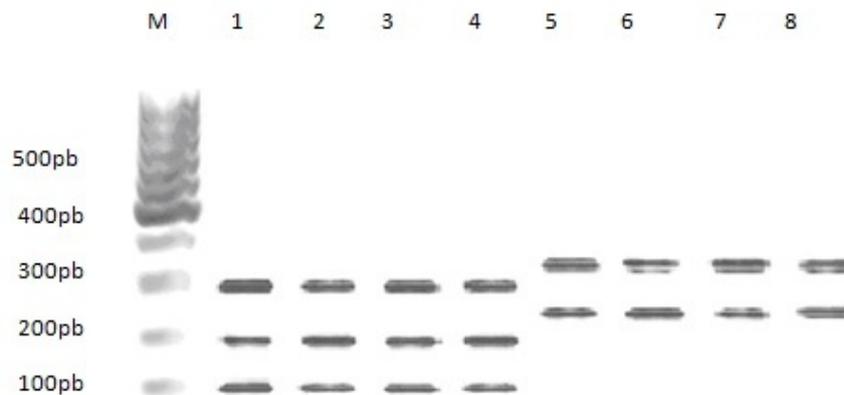


FIGURA 3. Digestión del producto amplificado del gen de la PR-1 de las ocho variedades de tabaco estudiadas. De izquierda a derecha: (M) marcador 100 pb, (1) Criollo 98, (2) Habana 2.1.1, (3) BH-13, (4) BHmN, (5) Corojo, (6) Habana 2000, (7) San Luis 21, (8) Virginia Resistente - 14. / *Amplification product digestion of PR1 gene of eight tobacco varieties studies.* From left to right: (M) marker 100 bp, (1) Criollo 98, (2) Habana 2.1.1, (3) BH-13, (4) BHmN, (5) Corojo, (6) Habana 2000, (7) San Luis 21, (8) Virginia Resistente - 14.

4) son de aproximadamente 100pb, 200pb y 300pb respectivamente, mostrando este fragmento de amplificación dos sitios de restricción.

Estos resultados pudieran indicar que en estas últimas variedades analizadas, se amplificó un fragmento de ADN genómico que presenta una variación en su secuencia de nucleótidos que trajo como consecuencia que apareciera un nuevo sitio de restricción para la enzima *Hind III*. Estos resultados concuerdan con los obtenidos por Rowland *et al.* (11), quienes trabajaron con *Vaccinium* spp. Dichos autores encontraron polimorfismo al realizar amplificaciones a varios genes de interés y luego digerir estos fragmentos de amplificación con la enzima de restricción *Alu I*, obteniendo para algunos genotipos de esta especie diferentes patrones de bandas de restricción.

Como aspecto práctico de las investigaciones de los genes *pr-1*, se puede decir que a partir de la utilización de estos genes se pueden encontrar variedades resistentes a diversas enfermedades (12).

Por estas razones se pudiera afirmar que es importante haber encontrado en el germoplasma analizado la secuencia que pertenece al gen de la *pr-1*, aunque los progenitores muestren características diferentes al ser tratados sus respectivos productos de amplificación con la enzima de restricción.

CONCLUSIONES

- Se demostró la efectividad de los cebadores específicos diseñados para la amplificación de los genes *tpt1* y *pr1*.
- Se detectó la presencia del gen *tpt1* en las especies *N. glutinosa* y *N. tomentosiformis*.
- Se detectaron diferencias con respecto a la secuencia de la *pr-1*, que permitieron caracterizar ocho progenitores utilizados en el Instituto de Investigaciones del Tabaco en el programa de mejoramiento genético de este cultivo.

REFERENCIAS

1. Basalto O. Cuba acapara 68% del mercado mundial de tabacos Premium. Granma Internacional, 7 de Septiembre; 2005.
2. Pérez SP, Cabezas DM, Haitao D. Large-scale identification of ESTs from *Nicotiana tabacum* by normalized cDNA library sequencing. Inter Contributions to Tobacco Resch. 2006; 22(1):114-124.
3. Sabater J, Vilumara A. Buenas Prácticas de Laboratorio (GLP): Principios básicos, E Díaz de Santos S.A, 1988.
4. Ausubel FM. Protocolo de Biología Molecular. Published by Wiley, J & Sons, Inc. Third Edition; 1995. p. 1-18.
5. Ji W, Li Y, Li J, Dai C-H, Wang X, Bai X, et al. Generation and analysis of expressed sequence tags from NaCl-treated *Glycine soja*. BMC Plant Biology. 2006; 6(4):6-22.
6. Jantasuriyarat Ch, Gowda M, et al. Large-Scale Identification of Expressed Sequence Tags Involved in Rice and Rice Blast Fungus Interaction. Plant Physiol. 2005; 138(1): 105-115.
7. Khan MQ, Narayan RKJ. Phylogenetic diversity and relationships among species of genus *Nicotiana* using RAPDs analyses. African Jour of Biotechnology. 2007; 6(2):148-162.
8. Chase NW, Knapp S, Emmerling M, Meath K, Nunan K, O'Neill M, et al. Molecular systematics, GISH and the origin of hybrid taxa in *Nicotiana* (*Solanaceae*). Ann Botany. 2003; 92:107-127.
9. Freitas L, Koehler-Santos P, Salzano FM. Pathogenesis-related proteins in Brazilian wheat genotypes: protein induction and partial gene sequencing. Cienc Rural. 2003; 33 (3): 271-281.
10. Kyu J, Lee ChS, Kook B. Activation of pepper basic PR-1 gene promoter during defense signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses. Gene. 2006; 356:169-180.
11. Rowland L, Ludwig AA, Merrick CJ, Baillieul F, Tracy FE, Durrant WE, et al. Development of EST-PCR markers for DNA fingerprinting and Mapping in Blueberry (*Vaccinium*, section *Cyanococcus*). Jour of American Society of Horticult. Scie. 2003; 128(5): 682 – 690.
12. Edreva A. Pathogenesis-related proteins: research progress in the last 15 years. Gen. Appl. Plant Physiology. 2005; 31(1-2):105-124.

(Recibido 13-4-2010; Aceptado 24-9-2010)