



Transferencia horizontal de una caleosina entre *Phaseolus vulgaris* y *Colletotrichum lindemuthianum*

Alejandra Alcalá-Ramírez | Erick Saúl Leandro-Pérez
| Lenin Sánchez-Calderón | Saúl Fraire-Velázquez | César Díaz-Pérez

Laboratorio de Biología Integrativa de Plantas y Microorganismos | UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE ZACATECAS

correo-e: cdp276@gmail.com

Resumen

Con el avance de los proyectos de secuenciación masiva se ha encontrado que existen eventos de transferencia horizontal de genes entre eucariotes, sobre todo entre aquellos que comparten nichos ecológicos. El patosistema *Phaseolus vulgaris* (frijol) y *Colletotrichum lindemuthianum* es importante desde el punto de vista económico en México, por lo que el estudio de la interacción entre esas dos especies ha sido abordado anteriormente. En tales investigaciones se percibió que ambas especies compartían un gen con una identidad de más del 90%, lo que sugiere un evento de transferencia de genes. Por su parte, en este trabajo se encontró que el gen pertenece a la superfamilia de las caleosinas; además, presenta un dominio conservado en dicha familia y cuenta con un segmento transmembranal, lo que concuerda con las proteínas de ese tipo. Asimismo, se verificó que se efectuó un evento de transferencia de genes de la planta de frijol al hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum*.

Palabras clave: HGT, transferencia génica lateral, caleosina.

Introducción

La transferencia horizontal (o lateral) de genes (HGT) se define como el intercambio y la integración de material genético entre diferentes especies (Doolittle, 1999). Se pensaba que la HGT en eucariotes era limitada, sin embargo, con el rápido avance de los proyectos de secuenciación de eucariotas se ha notado un impacto mayor de la HGT en la evolución de los eucariotes (Fitzpatrick, 2012).

Debido al impacto económico que causan los hongos a los cultivos, más de 400 especies fúngicas han sido secuenciadas; ello permitió observar casos de HGT en Ascomicetos y en sistemas planta-hongo fitopatógeno, donde la HGT ha sido tanto del hongo hacia la planta como de la planta hacia el hongo (Richards *et al.*, 2009).

Las caleosinas también están presentes en cuerpos lipídicos de semillas de angiospermas, son responsables de dirigir a los cuerpos oleosos nacientes. Los genes que codifican para caleosina se localizan en algas y hongos (Jiang y Tzen, 2010).

El frijol común (*Phaseolus vulgaris* L.) es una de las especies económicas más sobresalientes en México. Varios patógenos originan enfermedades en la planta, entre estos, *Colletotrichum lindemuthianum* como agente causal de la antracnosis, considerada como la principal causa de la baja productividad de frijol en América Latina (Gepts *et al.*, 2008).

En la respuesta de defensa temprana de plantas contra el hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum*, se encontró la sobreexpresión de una proteína de unión a calcio. Ese gen se manifiesta en ambos genomas (planta y hongo) (Alvarado-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Por lo anterior, esta investigación tiene como objetivo estudiar la proteína de unión a calcio, conocer la secuencia completa de la misma, y verificar en posible evento de HGT de ese gen entre frijol y *C. lindemuthianum*.

Metodología

Amplificación de los genes de caleosina

Las cepas de *C. lindemuthianum* fueron cultivadas en medio Harina de Maíz-Agar. *Fusarium solani*, *Rhizoctonia solani* y *Fusarium oxysporum* fueron cultivados en medio PDA. La extracción del DNA genómico se hizo con el método NTES. Los oligonucleótidos usados para la amplificación de los genes caleosina fueron: 5'-AGGCAAACATGGAAGTGACA-3' y 5'-TGGGAAATACAAGAATGATGAAG-3'.

3'. Se corrieron 35 ciclos (94°C por 1 minuto, 56°C por 45 segundos y 72°C por un minuto).

Análisis bioinformáticos

Se efectuaron búsquedas de dominios en el programa CDD del NCBI. La búsqueda de marcos de lectura abiertos se hizo con GENESCAN (Burge y Karlin, 1997), el análisis de segmentos transmembranales (STM) se hizo con el programa Toppred2.

Filogenia molecular de la familia de caleosinas

Se indagó la secuencia del completa del gen de caleosina en el ensamblado del genoma de frijol, se usó el fragmento de la secuencia reportado (AAZ23153). Para obtener las secuencias para construir la filogenia, la secuencia del gen se tradujo y se empleó para hacer una búsqueda con blastp. Las secuencias se descargaron, catalogaron y depuraron. Se alineó el grupo final con ayuda de clustalw 2.0 (Larkin *et al.*, 2007) y se realizó una corrección del alineamiento a mano. Para reconstruir la filogenia se utilizó el programa MEGA5 (Tamura *et al.*, 2014) con el método de ML (Maximum Likelihood). Como prueba estadística se efectuó análisis Bootstrap de 1000 repeticiones para cada árbol.

Resultados y discusión

Se reportó la existencia de un gen similar a calmodulina en frijol y en el hongo fitopatógeno *C. lindemuthianum* (Alvarado-Gutiérrez *et al.*, 2008). Los genes reportados tienen más del 90% de identidad entre ellos, por lo que es factible que se haya dado un evento de HGT entre esos dos organismos eucariotas.

Para hallar más información sobre aquel gen se hizo una búsqueda de dominios conservados en el servidor CDD del NCBI, se obtuvo que el gen tiene un dominio de la superfamilia de las caleosinas (número de acceso cl40635). Por lo anterior, el gen se nombró como caleosina en lugar de calmodulina.

Las caleosinas han sido recientemente descritas como una clase de proteínas de unión a calcio presentes en plantas y hongos que se unen a cuerpos lipídicos y al retículo endoplasmático (RE). En *Brassica napus* la isoforma 25-kDa se ubica sólo en tejidos como embriones en desarrollo y cotiledones, que contienen cuerpos de lípidos de almacenamiento. En contraste, la isoforma 27-kDa de unión al RE se sitúa en raíces, tallos y hojas.

La relativa abundancia y la localización de caleosinas en RE y en cuerpos lipídicos posiblemente tienen un rol en el tráfico membrana/lípidos (Hernández-Pinzón *et al.*, 2004). Recientemente se ha notado que las caleosinas también se expresan en respuesta a patógenos y estrés (Partridge y Murphy, 2009; Feng *et al.*, 2011), lo que concuerda con lo advertido para la caleosina de frijol (Alvarado-Gutiérrez *et al.*, 2008).

Para observar si ese gen se encuentra en otras variedades de *C. lindemuthianum* se llevó a cabo una reacción de PCR diseñando oligos para la secuencia reportada de la caleosina de *C. lindemuthianum* (número de acceso EU045571), en las diferentes cepas de hongos fitopatógenos. Hubo amplificación de este gen en distintas cepas de *C. lindemuthianum*, pero no se vio amplificación en *Fusarium oxysporum*, *Fusarium solani* ni en *Rhizoctonia solani* (figura 4); ello

sugiere que la transferencia sólo se ha dado en *C. lindemuthianum*.

Se tuvo acceso a los supercontigs del genoma ensamblado de frijol a fin de conseguir la secuencia del gen de caleosina en frijol. Se obtuvo una secuencia con parecido a la caleosina, la cual se extrajo de la base de datos más 5 Kb en ambos sentidos para averiguar el gen completo. Se buscaron los marcos de lectura abiertos en esa secuencia; se halló un solo marco de lectura de 205 aa, que tiene 100% de identidad con el fragmento (35 aa) de la secuencia traducida de la caleosina de frijol, por lo que se concluye que ese es el gen completo.

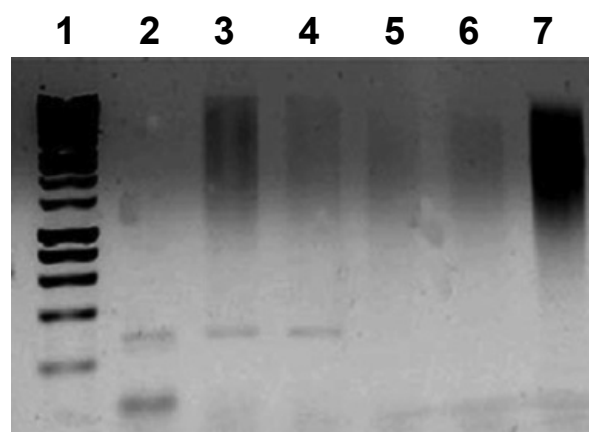


Figura 4. Amplificación del gen de caleosina en diferentes cepas de *C. lindemuthianum*. 1) Marcador de tamaño molecular. 2) *C. lindemuthianum* cepa 2. 3) *C. lindemuthianum* cepa 448. 4) *C. lindemuthianum* cepa 1472. 5) *Fusarium oxysporum*. 6) *Fusarium solani*. 7) *Rhizoctonia solani*.

Las caleosinas son proteínas asociadas a membrana, por lo que se buscaron STM a la caleosina de frijol; se encontró un posible STM, que sugiere la localización en membrana de esa caleosina. Para probar que exista una HGT entre los genes de *C. lindemuthianum* y frijol, se procedió a reconstruir la filogenia de la superfamilia de caleosinas. Se obtuvieron 226 proteínas de esa familia con base en una búsqueda por similitud, se usó como plantilla la proteína completa de frijol.

La superfamilia de caleosinas tiene miembros en plantas, hongos y una bacteria; se distribuye en

cuatro grupos. Los grupos I, II y III agrupan proteínas de plantas principalmente; el grupo IV está formado por caleosinas de hongos (figura 2A). La caleosina de *C. lindemuthianum* se sitúa en el grupo I, junto a la caleosina de frijol en un grupo compuesto exclusivamente por proteína de plantas (figura 2B), ello confirma el evento de HGT de planta a hongo patógeno.

Hace poco fue reportado un evento similar de HGT donde el gen de una subtilisina se transfirió entre *C. gloeosporioides* y maíz (Jaramillo *et al.*, 2013), lo que sugiere que el intercambio de genes entre plantas y especies de *Colletotrichum* no es raro.

Conclusiones

Se obtuvo la secuencia completa de un gen que codifica para una caleosina, la cual fue transferida desde el frijol (*P. vulgaris*) a *C. lindemuthianum*.

Agradecimientos

Este trabajo se llevó a cabo con fondos de los proyectos Conacyt-Fordecyt-Doctores No. 174509, Promep/103.5/13/6977, Promep-Red de Cuerpos Académicos Biotecnología para el Desarrollo de una Agricultura Sustentable.

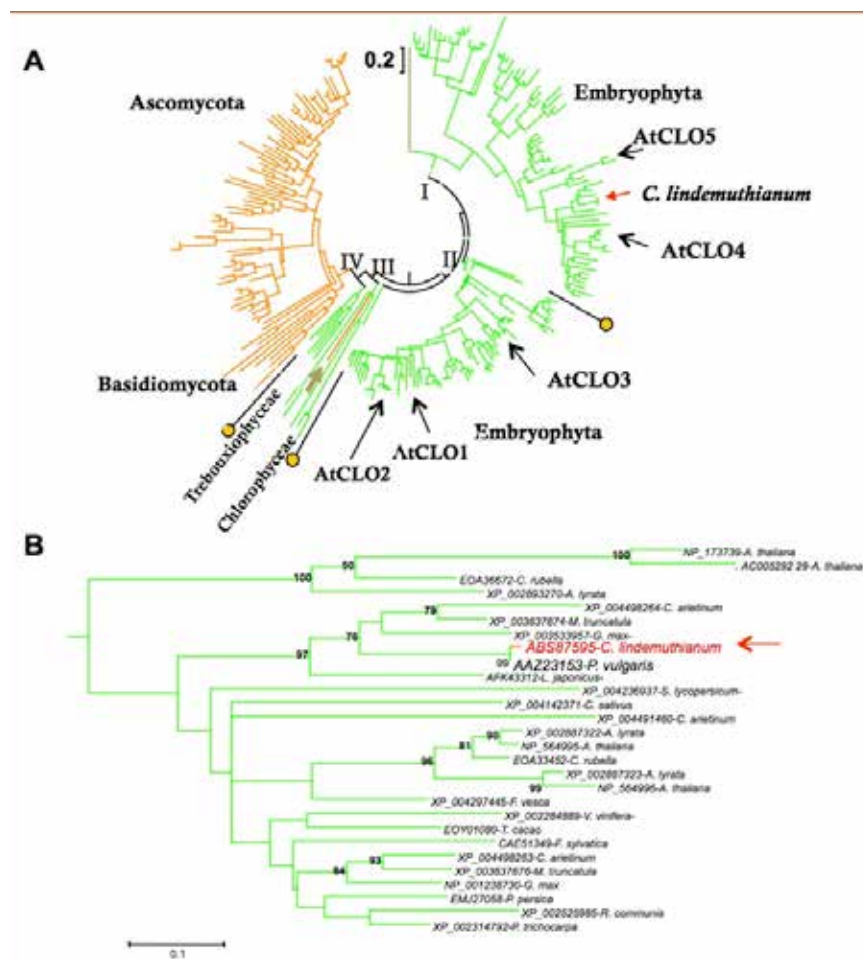


Figura 2. Árbol filogenético de la familia de las caleosinas. a) La familia de las caleosinas se divide en cuatro grupos. Las flechas señalan secuencias de hongos en grupos donde predominan proteínas de plantas. b) Rama del grupo I donde se ubican las caleosinas de *P. vulgaris* y *C. lindemuthianum* (flecha roja).

Referencias

- Alvarado-Gutiérrez, A., Del Real-Monroy, M., Rodríguez-Guerra, R., Almanza-Sánchez, L., Lozoya-Gloria, E., Fraire-Velázquez, S. (2008). A Phaseolus vulgaris EF-hand calcium-binding domain is induced early in the defense response against Colletotrichum lindemuthianum and by abiotic stress: Sequences shared between interacting partners. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 72(4-6):111-121.
- Burge, C., Karlin, S. (1997). Prediction of complete gene structures in human genomic DNA. *Journal of Molecular Biology*, 268(1):78-94.
- Doolittle, W.F. (1999). Lateral genomics. *Trends in Cell Biology*, 9(12):M5-M8.
- Feng, H., Wang, X., Sun, Y., Wang, X., Chen, X., Guo, J., Duan, Y., Huang, L., Kang, Z. (2011). Cloning and characterization of a calcium binding EF-hand protein gene TaCab1 from wheat and its expression in response to *Puccinia striiformis f. sp. tritici* and abiotic stresses. *Molecular Biology Reports*, 38(6):3857-3866
- Fitzpatrick, D.A. (2012). Horizontal gene transfer in fungi. *FEMS Microbiology Letters*, 329:1-8.
- Gepts, P., Aragão, F.J., de Barros, E., Blair, M.W., Brondani, R., Broughton, W., Galasso, I., Hernández, G., Kami, J., Lariguet, P. (2008). Genomics of Phaseolus beans, a major source of dietary protein and micronutrients in the tropics. *Genomics of Tropical Crop Plants*, (1)113-143.
- Hernandez-Pinzon, I., Patel, K., Murphy, D.J. (2004). The Brassica napus calcium-binding protein, caleosin, has distinct endoplasmic reticulum-and lipid body-associated isoforms. *Plant Physiology and Biochemistry*, 39(7-8):615-622.
- Jaramillo, V.D.A., Vargas, W.A., Sukno, S.A., Thon, M.R. (2013). Horizontal transfer of a subtilisin gene from plants into an ancestor of the plant pathogenic fungal genus Colletotrichum. *PloS one*, 8(3):e59078.
- Jiang, P.L., Tzen, J.T. (2010). Caleosin serves as the major structural protein as efficient as oleosin on the surface of seed oil bodies. *Plant Signaling & Behavior*, 5(4):447-449.
- Larkin, M.A., Blackshields, G., Brown, N., Chenna, R., McGettigan, P.A., McWilliam, H., Valentin, F., Wallace, I.M., Wilm, A., Lopez, R. (2007). Clustal W and Clustal X version 2.0. *Bioinformatics*, 23(21):2947-2948.
- Partridge M., Murphy, D. (2009). Roles of a membrane-bound caleosin and putative peroxygenase in biotic and abiotic stress responses in Arabidopsis. *Plant physiology and biochemistry*, 47(9):796-806.
- Richards T.A., Soanes, D.M., Foster, P.G., Leonard, G., Thornton, C.R., Talbot, N.J. (2009). Phylogenomic analysis demonstrates a pattern of rare and ancient horizontal gene transfer between plants and fungi. *The Plant Cell Online*, 21(7):1897-1911.
- Tamura, K., Peterson, D., Peterson, N., Stecher, G., Nei, M., Kumar, S. (2011). MEGA5: molecular evolutionary genetics analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Molecular Biology and Evolution*, 28(10):273.