

# ESTUDIO DEL TRANSCRIPTOMA EN *Capsicum chinense* Jacq. RESISTENTE AL VIRUS HUASTECO VENA AMARILLA DEL CHILE

## STUDY ON THE TRANSCRIPTOME IN *Capsicum chinense* Jacq. RESISTANT TO PEPPER HUASTECO YELLOW VEIN VIRUS (PHYVV)

Ma. Rosario Gasca-González<sup>1</sup>, Yadira Rivera-Herrera<sup>3</sup>, Irineo Torres-Pacheco<sup>4</sup>, Mario M. González-Chavira<sup>2</sup>, Lorenzo Guevara-Olvera<sup>1</sup>, Claudia I. Muñoz-Sánchez<sup>1</sup> y Ramón G. Guevara-González<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Instituto Tecnológico de Celaya. Departamento de Ingeniería Bioquímica. Avenida Tecnológico y Antonio García-Cubas, S/N. Colonia FOVISSSTE. 38010. Celaya, Guanajuato, México. <sup>2</sup>Universidad Autónoma de Querétaro. Facultad de Ingeniería. 76010. Querétaro, Querétaro, México. <sup>3</sup>Programa de Posgrado en Alimentos del Centro de la República (PROPAC). Facultad de Química. <sup>4</sup>Facultad de Ingeniería. Universidad Autónoma de Querétaro. 76010. Querétaro, Querétaro, México. (gerardo@itc.mx).

### RESUMEN

Para enriquecer el conocimiento del transcriptoma en la interacción incompatible entre el PHYVV y plantas de chile habanero (*Capsicum chinense* Jacq.) de la colecta de INIFAP denominada BG-3821, se estudió el perfil de expresión de genes. Estos estudios son fundamentales para el conocimiento a nivel molecular de los mecanismos de señalización para el reconocimiento mutuo y en su caso la respuesta de defensa del hospedante al patógeno, lo que puede contribuir al diseño de nuevas estrategias de protección de los cultivos. Se usó un modelo de expresión diferencial en las plantas infectadas por el PHYVV y la metodología de hibridación sustractiva por supresión (SSH), para obtener una biblioteca de 99 fragmentos de genes (EST) cuya expresión fue inducida específicamente. La secuencia de los EST obtenidos mostró que los genes expresados en esta interacción se pueden agrupar en las siguientes categorías: a) posibles genes de resistencia; b) genes involucrados en rutas de regulación genética; c) genes con función desconocida. Mediante el análisis tipo Northern se confirmó la expresión diferencial de un EST (clona R-100) seleccionado con base en su similitud de secuencia con genes con una función potencial en mecanismos de resistencia. Con nuestros resultados, se presentan las primeras evidencias de genes que posiblemente estén implicados en las rutas de reconocimiento y señalización en *C. chinense* en respuesta a PHYVV.

**Palabras clave:** *Capsicum chinense*, geminivirus, transcriptoma, PHYVV.

### INTRODUCCIÓN

La familia *Geminiviridae* está integrada por virus de plantas con estructura geminada, su genoma está formado por uno (monopartita) o dos (bipartita) componentes de ADN de cadena sencilla circular covalentemente cerrado y se dividen en cuatro

### ABSTRACT

In order to enrich the knowledge of transcriptome in incompatible interaction between PHYVV and Havana chili pepper plants (*Capsicum chinense* Jacq.) from the INIFAP collection denominated BG-3821, the profile of gene expression was studied. These studies are essential for the knowledge at molecular level of signaling mechanisms for mutual recognition and, in its case, the defense response of the host to the pathogen, which may contribute to the design of new crop protection strategies. A differential expression model was used in plants infected by PHYVV and subtractive hybridization methodology by suppression (SSH), in order to obtain a library of 99 gene fragments (EST), whose expression was specifically induced. The sequence of the obtained EST's showed that the genes expressed in this interaction may be grouped in the following categories: a) possible resistance genes; b) genes involved in genetic regulation routes; c) genes with unknown function. By Northern-type analysis the differential expression of one EST (R100 clone) was confirmed, selected on the basis of its similarity of sequence with genes playing a potential role in resistance mechanisms. With the results of this research, first evidence of genes is presented, that possibly may be involved in recognition and signaling routes in *C. chinense* in response to PHYVV.

**Key words:** *Capsicum chinense*, geminivirus, transcriptome, PHYVV.

### INTRODUCTION

The *Geminiviridae* family is integrated by plant viruses with geminated structure, their genome is made up by one (monopartite) or two (bipartite) DNA components of single circular covalently closed chain, and divided into four genera, based on their level of hosts, vector insect, and genomic organization (Hanley-Bowdoin *et al.*,

Recibido: Noviembre, 2006. Aprobado: Octubre, 2007.

Publicado como ARTÍCULO en *Agrociencia* 42: 107-117. 2008.

géneros con base en su rango de hospedantes, insecto vector y organización genómica (Hanley-Bowdoin *et al.*, 1999; Van Regenmortel *et al.*, 2000). El virus huasteco de la vena amarilla del chile (PHYVV, antes PHV) es miembro del género *Begomovirus*, tiene genoma bipartita, es transmitido por mosquitos blancos, e infecta dicotiledóneas incluyendo chile (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Anaya-López *et al.*, 2005). El PHYVV es uno de los patógenos virales más importantes en plantas de chile y se ha identificado varias fuentes de resistencia natural en chiles silvestres y criollos recolectados en México (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003).

Una fuente identificada de resistencia a geminivirus corresponde a la colecta BG-3821 de *Capsicum chinense* perteneciente al banco de germoplasma del INIFAP (Anaya-López *et al.*, 2003), la cual es un genotipo excelente para estudiar su interacción a nivel molecular con el PHYVV. El mecanismo de resistencia que presenta la colecta BG-3821 de *C. chinense* a las infecciones del PHYVV se debe probablemente a la restricción del movimiento viral dentro de la planta (Godínez-Hernández *et al.*, 2001). Para evaluar la interacción a nivel molecular entre el PHYVV y *C. chinense*, se ha estudiado la expresión genética diferencial mediante la técnica de despliegue diferencial de genes, encontrando 45 fragmentos de genes expresados (EST) específicamente en plantas infectadas con PHYVV, entre los que destacaron un EST similar a una metil transferasa (CbiL) y uno similar a una enzima málica de *Sorghum bicolor* (Anaya-López *et al.*, 2005).

La hibridación sustractiva por supresión (SSH) es una metodología molecular usada para identificar los genes que se expresan diferencialmente (Diatchenko *et al.*, 1996). Con esta técnica se puede identificar genes expresados diferencialmente sin necesidad de clonar previamente el ADN complementario de éstos, así como la normalización y amplificación de los genes expresados a niveles muy bajos (Diatchenko *et al.*, 1996). Asimismo, los fragmentos de ADN complementario (EST) se pueden ordenar en membranas de nylon, lo que mediante un procedimiento de hibridación con sondas moleculares provenientes del ARN de la entidad biológica en estudio, permite estudiar de manera simultánea su transcriptoma.

Mediante el estudio del transcriptoma de *C. chinense* infectada con el PHYVV será posible identificar los genes que se inducen y probablemente participan en las rutas de reconocimiento y señalización del patógeno en el hospedante. Por tanto, el objetivo del presente trabajo fue ampliar el estudio a nivel molecular de los mecanismos de resistencia en estas

1999; Van Regenmortel *et al.*, 2000). The pepper Huasteco yellow vein virus (PHYVV, previously PHV) is a member of genus *Begomovirus*, has bipartite genome, is transmitted by the white fly, and infects dicotyledones including chili pepper (Garzón-Tiznado *et al.*, 1993; Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Anaya-López *et al.*, 2005). PHYVV is one of the most important viral pathogens in pepper plants, and several sources of natural resistance in wild and native chili peppers gathered in México have been identified (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003).

One identified source of resistance to geminivirus corresponds to collection BG-3821 of *Capsicum chinense* belonging to the germplasm bank of INIFAP (Anaya López *et al.*, 2003), which is an excellent genotype for studying its interaction at molecular level with BHVVV. The resistance mechanism, presented by collection BG-3821 of *C. chinense*, to infections of PHYVV is probably due to the restriction of viral movement within the plant (Godínez-Hernández *et al.*, 2000). In order to assess the interaction at molecular level between PHYVV and *C. chinense*, differential genetic expression has been studied by the technique of differential gene display finding 45 gene fragments (EST), expressed specifically in plants infected with PHYVV, among which one EST similar to a transferase methyl (CbiL) and one similar to a malic enzyme of *Sorghum bicolor* were outstanding (Anaya-López *et al.*, 2005).

Subtractive hybridization by suppression (SSH) is a molecular methodology used to identify the genes, which are expressed differentially (Diatchenko *et al.*, 1996). With this technique, differentially expressed genes can be identified without the need of previously cloning their complementary DNA, as well as the normalization and amplification of the genes expressed at very low levels (Diatchenko *et al.*, 1996). Likewise, complementary DNA fragments (EST) can be ordered in nylon membranes, which by a hybridization procedure with molecular probes from the RNA of the biologic entity under study, allows studying simultaneously their transcriptome.

Through the study of the transcriptome of *C. chinense* infected with PHYVV, it will be possible to identify the genes that are induced and probably participate in the recognition and signaling route of the pathogen in the host. Therefore, the objective of the present research was to expand the study at molecular level of the resistance mechanisms in these pepper plants to infections of PHYVV, using an SSH combination and DNA arrangements in nylon membranes.

plantas de Chile a infecciones de PHYVV usando una combinación de SSH y arreglos de DNA en membranas de nylon.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Material vegetal

Se usaron plantas autopolinizadas de la colecta BG-3821 de *C. chinense* Jacq., proporcionadas por la Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Bajío del CIRCE-INIFAP en Celaya, Guanajuato, México. Antes de usarse en los estudios de expresión diferencial, se verificó la ausencia del PHYVV en ellas mediante PCR usando los oligonucleótidos específicos para este virus: 240 (5'-GGCTTATTTGTAATAAGAG-3') y 241 (5'-GAATTAAGGTACATGGAC-3'), los cuales amplifican un fragmento de ADN del componente A del virus de 350 pb (Torres-Pacheco *et al.*, 1996; Anaya-López *et al.*, 2003). Para la PCR se usó ADN genómico de las plantas de *C. chinense* BG-3821, obtenido de hojas superiores e inferiores siguiendo el protocolo descrito por Dellaporta *et al.* (1983). En plantas infectadas con PHYVV se realizó la detección del virus 5 d después de su inoculación.

### Inoculación del virus

La inoculación del ADN del PHYVV en 20 plantas de *C. chinense* se hizo mediante biobalística, usando un sistema de bombardeo de micropartículas PDS 1000 (Dupont, Wilmington, Delaware). Se usaron clonas dimericas del ADN de PHYVV o ADN del plásmido bluescript SK+ (Stratagene, La Jolla, California) para la inoculación. La cantidad de ADN del virus, la forma de inocular las plantas y su incubación post-inoculación se hicieron según lo descrito por Anaya-López *et al.* (2005). Se usaron 10 plantas como testigo y se les administró exclusivamente ADN del plásmido bluescript SK+.

### Aislamiento de ARN

El ARN total tanto de las plantas infectadas como de las testigo se obtuvo mediante el protocolo de RNEASY (QIAGEN, Hilden, Alemania). La integridad y tamaño del ARN se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa con formaldehído. La cuantificación y pureza se midió espectrofotométricamente mediante la relación de absorbancia (260/280 nm).

### Síntesis, amplificación y purificación del ADN complementario (ADNc)

Se usó 1  $\mu$ g de ARN total de cada condición en las plantas (problema y testigo), como templado para sintetizar la primera cadena de ADNc con la transcriptasa reversa Superscript II (Life Technologies, Rockville, MD, USA) y el protocolo de Síntesis de ADNc SMART<sup>™</sup>, siguiendo las instrucciones del proveedor (Clontech, Palo Alto, CA, USA). El ADNc se amplificó mediante la

## MATERIALS AND METHODS

### Vegetal material

Selfpollinated plants of collection BG-3821 of *C. chinense* Jacq. were used, provided by Unidad de Biotecnología del Campo Experimental Bajío del CIRCE-INIFAP in Celaya, Guanajuato, México. Before being used in the studies of differential expression, the absence of PHYVV in them was verified through PCR utilizing the oligonucleotides specific for this virus: 240 (5'-GGCTTATTTGTAATAAGAG-3') and 241 (5'-GAATTAAGGTACATGGAC-3'), which amplify a DNA fragment of component A of the virus of 350 pb (Torres-Pacheco *et al.*, 1996, Anaya-López *et al.*, 2003). To carry out PCR, genomic DNA of *C. chinense* BG-3821 plants was employed, obtained from upper and lower leaves, following the protocol described by Dellaporta *et al.* (1983). The virus was detected in plants infected with PHYVV 5 d after their inoculation.

### Inoculation of the virus

The DNA inoculation of the PHYVV in 20 *C. chinense* plants was made by bio-ballistics, using a system of bombarding with PDS 1000 microparticles (Dupont, Wilmington, Delaware). Dimeric clones of PHYVV DNA or of SK+ bluescript plasmid DNA (Stratagene, La Jolla, California) were used for inoculation. The quantity of virus DNA, the way of inoculating the plants and their incubation after inoculation was made according to the description by Anaya-López *et al.* (2005). Ten plants were used as control and they were exclusively administered DNA of SK+ bluescript plasmid.

### RNA isolation

Total RNA of infected plants as well as that of control plants was obtained by RNEASY protocol (QIAGEN, Hilden, Germany). Integrity and size of RNA was analyzed by means of electrophoresis in agarose gel with formaldehyde. Quantification and purity were measured spectro-photometrically by relation of absorbance (260/280 nm).

### Synthesis, amplification, and purification of complementary DNA (cDNA)

One  $\mu$ g of total RNA of each condition in plants (problem and control) was used as template for synthesizing the first cDNA chain with Superscript II reverse transcriptase (Life Technologies, Rockville, MD, USA) and the protocol of SMART<sup>™</sup> cDNA Synthesis, following the instructions of the supplier (Clontech, Palo Alto, CA, USA). The cDNA was amplified by long distance PCR (LD-PCR) with 15, 18, 21, 24, and 27 cycles separately (Diatchenko *et al.*, 1996), and it was analyzed by electrophoresis in 1.2% agarose gel in order to identify the optimal number of cycles to obtain the adequate amount of PCR products for the elaboration

PCR de larga distancia (LD-PCR) con 15, 18, 21, 24 y 27 ciclos separadamente (Diatchenko *et al.*, 1996) y se analizó mediante electroforesis en geles de agarosa 1.2% para identificar el número de ciclos óptimo para tener la cantidad adecuada de productos de PCR para elaborar la biblioteca de ADNc. Como testigo en este método se usó ARN total de placenta. Para la purificación del ADNc se usaron columnas CROMA-SPIN 1000 (Clontech, Palo Alto, CA, USA).

#### Aislamiento de fragmentos de ADNc expresados diferencialmente

La hibridación subtractiva por supresión (SSH) se hizo con el protocolo de Clontech (Clontech PCR-Select™ cDNA subtraction kit, Clontech, Palo Alto, CA, USA). Los ADNc problema y testigo fueron digeridos con la enzima *Rsa* I, la cual es una enzima de restricción que reconoce cuatro pares de bases (5'-GTAC-3') y deja extremos romos en el ADN digerido. El ADN problema se dividió en dos alícuotas y cada una se ligó en forma separada con los adaptadores 1 y 2 resultando en dos poblaciones de ADNc problema. Una pequeña cantidad de cada población problema y un exceso de ADNc testigo (5 µg) fueron mezclados, desnaturalizados por calor, e hibridados por 8 h a 68 °C. Las dos muestras de esta primera hibridación se combinaron e hibridaron con un excedente de ADNc testigo desnaturalizado toda la noche a 68 °C. Luego se hizo una PCR para amplificar los ADNc que representaban genes expresados diferencialmente. Un segundo PCR se hizo con oligonucleótidos anidados (1 R y 2 R) para reducir el nivel de amplificación inespecífica (Clontech PCR-Select™ cDNA subtraction kit). Los productos de amplificación de la segunda PCR se sometieron a electroforesis y los fragmentos mayores a 500 pb se cortaron del gel de agarosa usando un bisturí estéril y se purificaron con un protocolo QIAEXII (Qiagen, Hilden, Alemania).

#### Clonación y selección de fragmentos sustraídos de ADNc

Se ligaron 2 µL de los fragmentos de ADNc amplificados por PCR con 1 µL del vector de clonación pCR2.1-TOPO según las instrucciones del proveedor (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Se transformaron 2 µL de estas reacciones de ligación en 50 µL de células químicamente competentes de *Escherichia coli* cepa TOP 10. El cultivo de transformación se sembró en cajas de Petri conteniendo medio Luria Bertani (LB)/kanamicina/IPTG/X-gal, y se seleccionaron las colonias blancas. Cada colonia blanca se cultivó en medio LB/kanamicina/ampicilina, incubada 12 h a 37 °C y 250 rpm, y en los plásmidos se analizó la presencia de insertos usando la enzima de restricción *Eco* RI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Cada colonia modificada se cultivó separadamente en el mismo medio y las mismas condiciones, y se almacenó en viales criogénicos conteniendo 500 µL de cada cultivo y 500 µL de glicerol 100% esterilizado. La colección de colonias modificadas (biblioteca de genes expresados diferencialmente) se mantuvo a -80 °C.

of the cDNA library. As control in this method, total RNA of placenta was utilized. For the purification of cDNA, CROMA-SPIN 1000 columns (Clontech, Palo Alto, CA, USA) were used.

#### Isolation of differentially expressed cDNA fragments

Subtractive hybridization by suppression (SSH) was performed by the Clontech protocol (Clontech PCR-Select™ cDNA subtraction kit, Clontech, Palo Alto, CA, USA). The problem and control cDNA were digested with *Rsa* I enzyme, which is a restriction enzyme recognizing four pairs of bases (5'-GTAC-3') and leaving obtuse ends in the digested DNA. The problem DNA was proportionally divided in two, and each part was linked separately to the adaptors 1 and 2, resulting in two problem cDNA populations. A small amount of each problem population and a surplus of control cDNA (5 µg) were mixed, denatured by heat, and hybridized during 8 h at 68 °C. The two samples of this first hybridization were combined and hybridized with a surplus of denatured control cDNA all over the night at 68 °C. Afterwards, a PCR was made to amplify the cDNA that represented differentially expressed genes. A second PCR was carried out with nested oligonucleotides (1 R and 2 R) to reduce the level of unspecific amplification (Clontech PCR-Select™ cDNA subtraction kit). The amplification products of the second PCR were subjected to electrophoresis, and the fragments larger than 500 pb were cut out of the agarose gel using a sterile scalpel and purified by a QIAEXII protocol (QIAGEN, Hilden, Germany).

#### Cloning and selection of extracted cDNA fragments

Two µL of the cDNA fragments amplified by PCR were joined with 1 µL of PCR 2.1-TOPO cloning vector, according to the instructions of the supplier (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Two µL of these ligation reactions were transformed into 50 µL of chemically competent cells of *Escherichia coli* TOP 10 stock. The transformation culture was sown in Petri dishes containing Luria Bertani (LB)/kanamycin/IPTG/X-gal medium, and the white colonies were selected. Each white colony was cultivated in LB/kanamycin/ampicillin medium, incubated at 37 °C and 256 rpm during 12 h, and in the plasmids the presence of inserts was analyzed, employing the restriction enzyme *Eco* RI (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). Each modified colony was cultivated separately in the same culture medium and under the same conditions; it was kept in cryogenic vials with 500 µL of each culture and 500 µL of 100% sterilized glycerol. The collection of modified colonies (library of differentially expressed genes) was kept at -80 °C.

#### Construction of cDNA arrangements

Five µg of each recombinant plasmid of the library of genes were placed in positively charged nylon membranes of 7×10 cm (BrightStar™-Plus, Ambion Inc, Austin, TX, USA). To construct



### Construcción de arreglos de ADNc

Se colocaron 5  $\mu$ g de cada plásmido recombinante de la biblioteca de genes en membranas de nylon (7 $\times$ 10 cm) cargadas positivamente (BrightStar™-Plus, Ambion Inc, Austin, TX, USA). Para construir arreglos de clones se usó un dispositivo multicopiador conectado a bomba de vacío (Hofer PR 648, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK).

### Preparación y marcaje de sondas de ADNc e hibridación de membranas

Las replicas de la biblioteca de genes se hibridaron mediante análisis tipo Southern (Sambrook *et al.*, 1989) con sondas obtenidas de ADNc problema o testigo. Estas sondas se generaron incorporando dUTP-11-fluoresceína con el protocolo descrito en Gene Images CDP-Star Random prime labeling module (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA). La detección de la sonda se hizo mediante un conjugado anti fluoresceína-fosfatasa alcalina y el reactivo de detección CDP-Star (Amersham Pharmacia Biotech Inc, Piscataway, NJ, USA).

### Análisis tipo Northern

El análisis tipo Northern se realizó como se describe en Anaya-López *et al.* (2005).

### Secuenciación del ADNc y comparación con bases de datos

Las secuencias de nucleótidos de fragmentos de genes inducidos específicamente por infecciones por PHYVV en las plantas de *C. chinense* se determinaron usando un secuenciador ABI PRISM 310 (Gene Analyzer; Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Se hizo análisis de comparación de secuencias con bases de datos realizados con el algoritmo blastx (Altschul *et al.*, 1990) del Centro Nacional para Información en Biotecnología (NCBI). La secuencia de la clona R100, correspondiente a una proteína tipo germina, se depositó en la base de datos del NCBI con el número de accesoión DQ677335.

## RESULTADOS Y DISCUSIÓN

### Detección de PHYVV en plantas inoculadas

La detección de PHYVV en las plantas infectadas y testigo se muestra en la Figura 1. El virus se detectó en la parte basal y en la parte apical de las plantas, lo que indica que 5 d fueron suficientes para que el virus se moviera por la planta. El virus estuvo presente en la planta pero ésta no presentó síntomas, confirmando los resultados de estudios anteriores (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003, 2005). La eficiencia de la inoculación por

clone arrangements, a duplicator device connected to a vacuum pump (Hofer PR 648, Amersham Biosciences, Buckinghamshire, UK) was used.

### Preparation and marking of cDNA probes and hybridization of membranes

The replications of the gene library were hybridized by Southern-type analysis (Sambrook *et al.*, 1989) with probes obtained from problem or control cDNA. These probes were generated incorporating dUTP-11-fluorescein by the protocol described in Gene Images CDP-Star Random prime labeling module (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ, USA). The detection of the probe was made by means of a conjugate alkaline phosphatase-antifluorescein and the detection reactive CDP-Star detection (Amersham Pharmacia Biotech Inc. Piscataway, NJ, USA).

### Northern-type analysis

The Northern-type analysis was made as described in Anaya-López *et al.* (2005).

### Sequencing of cDNA and comparison with data bases

The sequences of gene fragment nucleotides induced specifically by infections through PHYVV in *C. chinense* plants were determined using a 310 ABI PRISM sequencer (Gene Analyzer; Perkin Elmer, Norwalk, CT, USA). Analyses of sequence comparison were made, based on data conducted with the blastx algorithm (Altschul *et al.*, 1990) of the National Center Biotechnology Information (NCBI). The sequence of the R100 clone, corresponding to a germin-like protein, was deposited in the data base of the NCBI with accession number DQ677335.

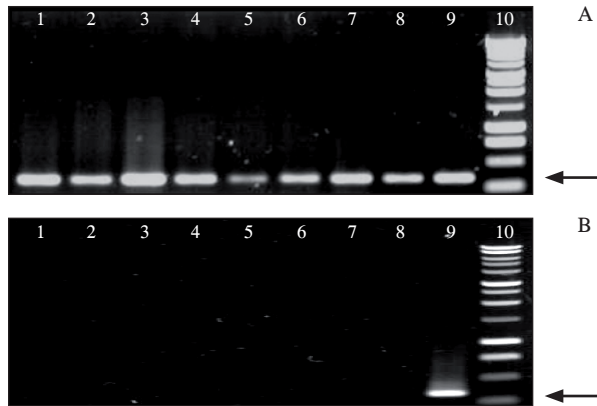
## RESULTS AND DISCUSSION

### PHYVV detection in inoculated plants

PHYVV detection in infected plants and control is shown in Figure 1. The virus was found at the basal part as well as at the apical part of the plants, which indicates that 5 d were enough for the virus to move about the plant. The virus was present in the plant, but this did not show any symptoms, which supports the results of previous studies (Godínez-Hernández *et al.*, 2001; Anaya-López *et al.*, 2003, 2005). The inoculation efficiency by bio-ballistics was 100% due to the fact that the virus was detected in all the plants.

### RNA isolation and synthesis of cDNA for SSH

The result of RNA extraction is shown in Figure 2. The RNA is of good quality and quantity, and its



**Figura 1.** Detección del PHYVV mediante PCR en plantas inoculadas (Panel A) o no (Panel B) con el virus. Carriles 1-4, y 5-8, muestras de hojas basales y apicales. Carril 9 testigo positivo para PHYVV; carril 10 marcador de tamaño molecular. La flecha indica 350 pb.

**Figure 1.** PHYVV detection by PCR in inoculated (Panel A) or not inoculated plants (Panel B) with the virus. Tracks 1-4 and 5-8 samples of basal and apical leaves; track 9 positive control for PHYVV; track 10 marker of molecular size. The arrow indicates 350 pb.

biobalística fue 100%, dado que se detectó el virus en todas las plantas.

#### Aislamiento de ARN y síntesis de ADNc para SSH

El resultado de la extracción de ARN se observa en la Figura 2. El ARN es de buena calidad y cantidad, y su extracción fue homogénea y reproducible a partir de diferentes individuos. Las extracciones de este tipo fueron adecuadas para la síntesis posterior de ADNc para realizar la SSH.

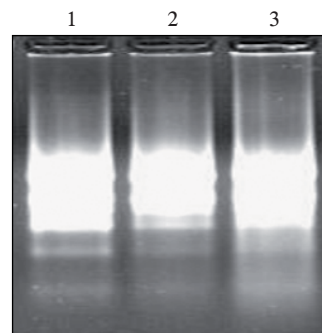
Para la síntesis de ADNc de cadena sencilla se usó ARN total de la condición testigo y problema (Figura 2); una vez sintetizada la primera cadena de ADNc se procedió con la estandarización del número de ciclos de PCR necesarios para la amplificación de ADNc de doble cadena (Figura 3). Los ciclos de PCR evaluados para tal estandarización referente a las condiciones testigo y problema se muestran en la Figura 3. A los 27 ciclos se obtuvo la condición más adecuada para la sustracción, pues se encontraron mejor representados los ADNc de ambas condiciones ya que el barrido es homogéneo y en concentración adecuada (Figura 3). La condición anterior asegura que los ADNc de doble cadena permanecerán en la fase exponencial de la amplificación, permitiendo que la mayor parte de los ARN mensajeros estén representados. Cuando el número de ciclos de PCR es mayor al óptimo (sobreciclado), el ADNc es un templado muy pobre. Un número de ciclos menor al óptimo (subciclado) resulta en un bajo rendimiento del producto de PCR (Diatchenko *et al.*, 1996).

extraction was homogeneous and reproducible from different individuals. The extractions of this type were adequate for subsequent synthesis of cDNA in order to carry out SSH.

For cDNA synthesis of single chain, total RNA of control and problem condition (Figure 2) was used; once the first cDNA chain was synthesized, the standardization of the number of PCR cycles, needed for double-chain cDNA amplification, was initiated (Figure 3). The PCR cycles assessed for such standardization, regarding control and problem conditions, are shown in Figure 3. For the 27 cycles, the most adequate condition for the subtraction was obtained, because cDNA of both conditions were better represented, since the sweeping is homogeneous and in adequate concentration (Figure 3). The previous condition guarantees that the double-chain cDNA will remain in the exponential phase of amplification, allowing that the larger part of the RNA messengers be represented. When the number of PCR cycles is larger than the optimum (over-cycled), the cDNA is a very poor template. A cycle number less than optimal (sub-cycled) results in low yield of the PCR product (Diatchenko *et al.*, 1996).

#### Subtractive hybridization by suppression through PCR

The cDNA population of control and problem plants at the 27 cycles, shown in Figure 3, was purified and digested with the *Rsa* 1 enzyme so that each cDNA remains divided into multiple fragments. After this digestion, cDNA was purified again and subjected to subtractive hybridization under conditions of suppression. The problem condition (plant with virus) was divided proportionally in two, and in each



**Figura 2.** Integridad de ARN en gel de agarosa desnaturalizante teñido con bromuro de etidio. Carril 1: ARN de la condición testigo. Carriles 2 y 3: ARN de la condición problema (de dos individuos diferentes).

**Figure 2.** Integrity of RNA in denaturing agarose gel dyed with etidio bromide. Track 1: RNA of control condition. Tracks 2 and 3: RNA of problem condition (of two different individuals)

### Hibridación subtractiva por supresión por PCR

La población de ADNc de planta testigo y problema a los 27 ciclos mostrados en la Figura 3, se purificaron y se digirieron con la enzima *Rsa* I de tal manera que cada ADNc queda dividido en múltiples fragmentos. Después de esta digestión el ADNc se volvió a purificar y se sometió a hibridación subtractiva en condiciones de supresión. La condición problema (planta con virus) se dividió en dos alícuotas y en cada una se ligó un diferente adaptador como se describe en Materiales y Métodos. En el carril 2 de la Figura 4 se observa en una corrida electroforética el ADNc resultado de la sustracción y sólo están los fragmentos de genes expresados diferencialmente. Se observan los barridos que corresponden a ADNc de diversos tamaños, enriquecidos principalmente en la zona de 500 pb y 700 pb, lo cual es similar a otros resultados usando la misma metodología para construir bibliotecas de ADNc específicas a estrés osmótico en plantas de *Haloxylon ammodendron* (Jiang *et al.*, 2004). Para construir los bancos subtractivos de *C. chinense* a partir de los fragmentos de ADNc expresados diferencialmente, se continuó con los protocolos descritos en Materiales y Métodos. Se seleccionaron las zonas de alrededor de 500 y 700 pb; las bandas se cortaron del gel de agarosa con un bisturí para eluir el ADN, se procedió con la ligación en el vector pCR 2.1 TOPO<sup>®</sup> y se transformaron células químicamente competentes de *E. coli*.

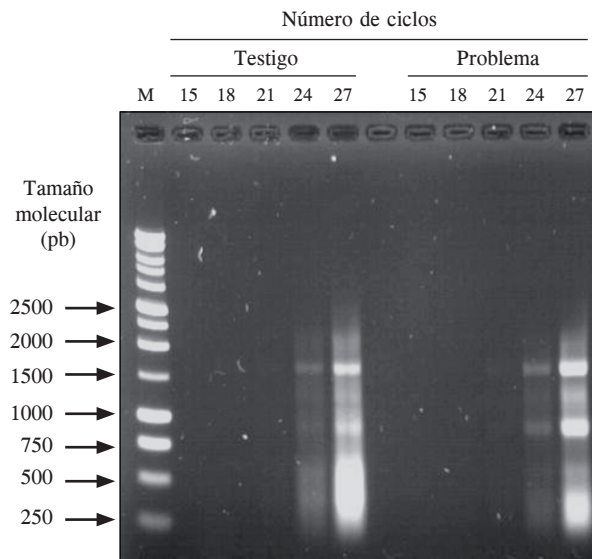


Figura 3. Determinación del número de ciclos óptimo de PCR con el procedimiento SMART LD-PCR. M: marcador de tamaño molecular.

Figure 3. Determination of optimal number of PCR cycles with SMART LD-PCR procedure. M: marker of molecular size.

part it joined a different adaptor, as described in Materials and Methods. In Track 2 of Figure 4, the cDNA is observed in an electrophoretic run, result of the subtraction, and only the gene fragments are expressed differentially. The sweeps corresponding to cDNA of various sizes are observed, enriched mainly in the zone of 500 pb and 700 pb, which is similar to other results, using the same methodology to form cDNA libraries specific for osmotic stress in *Haloxylon ammodendron* plants (Jiang *et al.*, 2004). In order to construct the subtractive banks of *C. chinense* from the differentially expressed cDNA fragments, the work continued with the protocols described in Materials and Methods. The zones around 500 and 700 pb were selected; the bands were cut out of the agarose gel with a scalpel to elude DNA, ligation in the PCR 2.1 TOPO<sup>®</sup> vector was initiated, and chemically competent cells of *E. coli* were transformed. Ninety-nine clones with sizes between 250 and 750 pb remained integrated in the subtractive bank.

### Differential expression of genes

DNA of each clone constituting the bank of differentially expressed genes was transferred to nylon membranes and hybridized with marked cDNA from RNA of infected plants as well as from the control. It was observed that the 99 clones obtained in the bank of genes showed a higher expression level in presence of the probe from the problem plant, which indicates the differential expression of the corresponding genes in presence of the PHYVV in the *C. chinense* plant. The expression pattern of cDNA arrangements of 47 clones from the subtractive

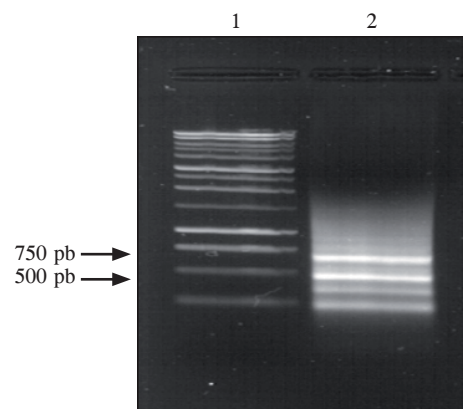


Figura 4. Patrón electroforético del ADNc después del procedimiento de hibridación subtractiva (SSH). Carril 1: marcador de tamaño molecular. Carril 2: sustracción.

Figure 4. cDNA electrophoretic pattern after procedure of subtractive hybridization (SSH). Track 1: marker of molecular size, track 2: subtraction

El banco sustractivo quedó integrado por 99 clonas con tamaños entre 250 y 750 pb.

### Expresión diferencial de genes

El ADN de cada clona que constituyó el banco de genes expresados diferencialmente se transfirió a membranas de nylon y se hibridó con ADNc marcado y proveniente tanto de ARN de plantas infectadas como del testigo. Se observó que las 99 clonas obtenidas en el banco de genes mostraron un nivel de expresión mayor en presencia de la sonda proveniente de la planta problema, lo que indica la expresión diferencial de los genes correspondientes en presencia del PHYVV en la planta de *C. chinense*. En la Figura 5 se muestra el patrón de expresión de arreglos de ADNc de 47 clonas del banco sustractivo obtenido. Las otras 52 clonas mostraron también un patrón de expresión diferencial de inducción en presencia del virus en la planta (no mostrado).

### Análisis de homología de secuencia de las clonas del banco sustractivo

Después del análisis de hibridación de arreglos, se seleccionaron 16 clonas con base en su mayor definición en el patrón de expresión inducible por el PHYVV

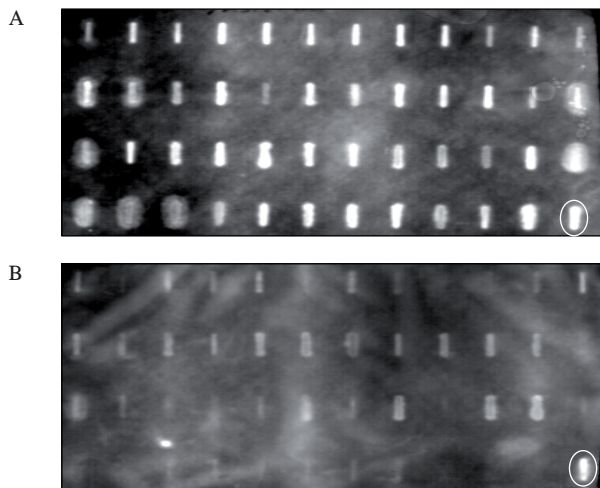


Figura 5. Patrón típico de hibridación de arreglos de ADNc del banco obtenido por SSH. Panel A: sonda proveniente de planta infectada con PHYVV. Panel B: sonda proveniente de planta testigo. En los círculos se encuentra ADN testigo de una clona de un gen constitutivo (gen para ARN ribosomal 28S).

Figure 5. Typical hybridization pattern of cDNA arrangements of the bank obtained by SSH. Panel A: probe from plant infected with PHYVV; Panel B: probe from control plant. In the circles there is the DNA control of a constitutive gene clone (gene for ribosomal NRA 28S).

bank obtained is shown in Figure 5. The other 52 clones also presented a differential expression pattern of induction in presence of the virus in the plant (not shown).

### Analysis of sequence homology of the clones of the subtractive bank

After the analysis of hybridization of arrangements, 16 clones based on its major definition in the expression pattern inducible by PHYVV were selected and sequenced. The sequences of these clones were compared to those of the data base from NCBI by means of the blastx algorithm, and the results of the possible gene functions found are shown in Table 1. Based on the homology shown by the 16 sequenced clones from the subtractive bank, their possible participation in the incompatible interaction of *C. chinense* plants with PHYVV can be grouped in: 1) possible genes involved in resistance and biotic stress of the plant (clones R21, 22, 31, 35, 52, 55, 80, 81, 100, and YRH 6); 2) possible regulator genes of genetic expression (clones YRH3, YRH1, YRH5); 3) genes with so far unknown functions (clones R50, 57, 60).

### Differential expression of a transcript selected from the subtractive bank

With the purpose of verifying at greater detail the expression inducible by PHYVV in *C. chinense* plants, assessed in this paper, the R100 clone was selected (accession number DQ677335), due to the fact that it had similarity with a group of germin-like proteins presenting superoxide dismutase activity (Yamahara *et al.*, 1999; Carter and Thornburg, 2000; Khuri *et al.*, 2001; Druka *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004) and has become related to a direct function in plant response to different types of biotic and abiotic stress (Arter and Thornburg, 2000; Druka *et al.*, 2002). A direct function of germin-like proteins has been suggested in the suppression of wheat mildew caused by *Blumeria graminis* f. sp. tritici by transitory expression with a constitutive promoter (Schweizer *et al.*, 1999).

Likewise, an important function of the germin-like proteins has been demonstrated in plant defense against herbivorous insects (Lou and Baldwin, 2006). The result of Northern-type analysis conducted to corroborate differential expression of the gene corresponding to R100 clone is shown in Figure 6. The induction of the gene corresponding to the R100 clone in plants inoculated with PHYVV is evident, whereas in control plants the expression level was comparatively lower.



y se secuenciaron. Las secuencias de estas clonas se compararon con las de la base de datos del NCBI mediante el algoritmo blastx, y los resultados de las posibles funciones de los genes encontrados se muestran en el Cuadro 1. Con base en la homología mostrada por las 16 clonas secuenciadas del banco sustractivo, su posible participación en la interacción incompatible de las plantas de *C. chinense* con el PHYVV se puede agrupar en: 1) posibles genes involucrados en la resistencia y el estrés biótico de la planta (clonas R 21, 22, 31, 35, 52, 55, 80, 81, 100 y YRH 6); 2) posibles genes regulatorios de expresión genética (clonas YRH3, YRH1, YRH5); 3) genes con función desconocida hasta el momento (clonas R 50, 57, 60).

### Expresión diferencial de un transcrito seleccionado del banco sustractivo

Con la finalidad de verificar con mayor detalle la expresión inducible por PHYVV en las plantas de *C. chinense* evaluadas en este trabajo, se seleccionó la clona R100 (número de accesión DQ677335) debido a que presentó similitud con un grupo de proteínas tipo germina que presentan actividad superóxido dismutasa (Khuri *et al.*, 2001; Druka *et al.*, 2002; Kim *et al.*, 2004) y que se han relacionado con una función directa en la respuesta de plantas a diferentes tipos de estrés biótico y abiótico (Carter y Thornburg, 2000; Druka *et al.*, 2002). Se ha sugerido una función directa de proteínas tipo germina en la supresión del mildiú del trigo ocasionado por *Blumeria graminis* f. sp. tritici por expresión transitoria con un promotor constitutivo (Schweizer *et al.*, 1999).

Asimismo, se ha demostrado una función importante de las proteínas tipo germina en la defensa de

## CONCLUSIONS

To study the transcriptome of *C. chinense* BG-3821 plants infected with PHYVV under a model of differential expression, the use of SSH and DNA arrangements turned out to be an easy, fast, and efficient tool in the isolation of EST's specifically induced by PHYVV. Out of the 99 clones, which constituted the bank of EST's obtained in this study, 16 were sequenced, and 56% of these EST's showed homology with genes suggesting participation in resistance mechanisms of plants to pathogens. Among the EST's with homology to resistance genes, those corresponding to clones R52 and R100 were outstanding, showing similarity with germin-like proteins (GLP), related directly to control of diseases like wheat mildew, caused by *Blumeria graminis* f. sp. tritici. It will be interesting to study the specificity of expression of the EST's found in this research in response to various types of biotic or abiotic stress, as well as to isolate the complete cDNA, in order to elucidate in a more detailed way the function of these genes in response of *C. chinense* BG-3821 to different pathogens and abiotic agents.

—End of the English version—



plantas contra insectos herbívoros (Lou y Baldwin, 2006). En la Figura 6 se muestra el resultado del análisis tipo Northern realizado para corroborar la expresión diferencial del gen correspondiente a la clona R 100. Es evidente la inducción del gen correspondiente a la clona R 100 en plantas inoculadas con el PHYVV,

**Cuadro 1. Homología mostrada por las 16 clonas secuenciadas del banco sustractivo de ADNc de genes inducidos por el PHYVV en plantas de *C. chinense*.**

**Table 1. Homology shown by 16 sequenced clones from the subtractive bank of cDNA of genes, induced by PHYVV in *C. chinense* plants.**

Clona	Gen con alta homología	Posible función
R21	Gen hm2	Confiere resistencia al hongo <i>Cochliobolus carbonum</i> raza 1 en maíz
R22	AtCaMBP25	Regulador negativo a estrés osmótico en <i>A. thaliana</i>
R31	Defensinas	Respuesta de defensa en <i>A. thaliana</i>
R35	CaGLP1	Proteína tipo germina de respuesta a estrés biótico en plantas
R50	Sin nombre	Expresado en raíz de plantas de Chile
R52	ABP	Respuesta a estrés oxidativo
R55	NDR1	Resistencia a bacterias en <i>A. thaliana</i>
R57 y R 60	Desconocido	Desconocida
R80	pks12 y Maa2520	Resistencia multidroga en micobacterias
R81	PARP-1	Reparación de ADN
R100	CaGLP1, ABP	Proteína tipo germina de respuesta a estrés biótico
YRH6	Quitinasa en plantas	Respuesta al ataque por patógenos
YRH3	Proteína con dedos de zinc	Posible factor de transcripción
YRH5	Shc	Factor promotor de apoptosis
YRH1	Sin nombre	Posible función en la regulación del ciclo celular

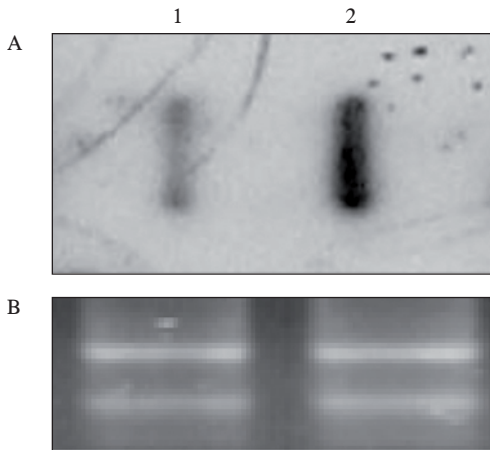


Figura 6. Análisis tipo Northern de la expresión del gen correspondiente a la clona R 100. Panel A: línea 1 ARN total de planta sin virus; línea 2 ARN total de planta inoculada con el PHYVV. Panel B: se muestra un gel de agarosa desnaturalizado con las muestras de ARN total empleadas en el panel A. Se cargaron 10  $\mu$ g de ARN total por cada línea.

Figure 6. Northern-type analysis of the gene expression corresponding to R100 clone. Panel A: line 1 total RNA of plant without virus; line 2 total RNA of plant inoculated with PHYVV. Panel B: denatured agarose gel with samples of total RNA employed in panel A. 10  $\mu$ g of total RNA were changed by each line.

mientras en plantas testigo el nivel de expresión fue comparativamente inferior.

## CONCLUSIONES

Para estudiar el transcriptoma de plantas de *C. chinense* BG-3821 infectadas con el PHYVV bajo un modelo de expresión diferencial, el uso de SSH y arreglos de ADN, resultó ser una herramienta sencilla, rápida y efectiva en el aislamiento de EST inducidos específicamente por el PHYVV. De las 99 clonas que constituyeron el banco de EST obtenido en este trabajo, 16 fueron secuenciados y 56% de estos ESTs mostraron homología con genes que sugieren una participación en mecanismos de resistencia de plantas a patógenos. Dentro de los EST con homología a genes de resistencia destacaron los correspondientes a las clonas R 52 y R 100, que mostraron una similitud con proteínas tipo germina (GLP), las cuales se han relacionado directamente con el control de enfermedades como el mildiú del trigo ocasionado por *Blumeria graminis* f. sp. tritici. Será interesante estudiar la especificidad de la expresión de los EST encontrados en este trabajo en respuesta a diversos tipos de estrés biótico o abiótico, así como aislar los ADNc completos, para dilucidar con mayor detalle la función de estos genes en las respuestas de *C. chinense* BG-3821 a diferentes patógenos y agentes abióticos.

## AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen el financiamiento por parte de SEP-CO-NACYT (CONACYT-2002-C01-41818/A-1), Fondo mixto CO-NACYT-Gobierno del Estado de Guanajuato (FOMIX-GTO-2005-C02-52), PRECI 99999 del INIFAP y al proyecto DGEST (clave 423.05-P). Ma. Del Rosario Gasca-González y Yadira Rivera-Herrera agradecen a CONACYT por el apoyo de beca de posgrado.

## LITERATURA CITADA

- Altschul S. F., W. Gish, W. Miller, E. W. Myers, and D. J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *J. Molecular Biol.* 215, 403-410.
- Anaya-López, J. L., E. Pérez-Mora, I. Torres-Pacheco, C. I. Muñoz-Sánchez, L. Guevara-Olvera, M. M. González-Chavira, N. Ochoa-Alejo, R. F. Rivera-Bustamante, and R. G. Guevara-González. 2005. Inducible gene expresión by Pepper huasteco virus in *Capsicum chinense* plants with resistance to geminivirus infections. *Can. J. Plant Pathol.* 27: 276-282.
- Anaya-López, J. L., M. González-Chavira, J. L. Pons-Hernández, J. A. Garzón-Tiznado, I. Torres-Pacheco, R. F. Rivera-Bustamante, S. Hernández-Verdugo, R. G. Guevara-González, C. I. Muñoz-Sánchez, and L. Guevara-Olvera. 2003. Resistance to geminivirus mixed infections in Mexican wild peppers. *Hortscience* 38: 251-255.
- Dellaporta, S. L., J. Wood, and J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol. Biol. Rep.* 1: 19-21.
- Hanley-bowdoin, L., S. B. Settlage, B. M. Orozco, S. Nagar, and D. Robertson. 1999. Geminiviruses: model for plant replication, transcription and cell regulation. *Critical Rev. Plant Sci.* 18: 71-106.
- Diatchenko, L., Y. F. Lau, A. P. Campbell, A. Chenchik, F. Moqadam, B. Huang, S. Lukyanov, K. Lukyanov, N. Gurskaya, E. D. Sverdlov, and P. D. Siebert. 1996. Suppression subtractive hybridization: a method for generating differentially regulated or tissue-specific cDNA probes and libraries. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 93: 6025-6030.
- Druka, A., D. Kudrna, C. G. Kannangara, D. von Wettstein, and A. Kleinhofs. 2002. Physical and genetic mapping of barley (*Hordeum vulgare*) germin-like cDNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 99: 850-855.
- Garzon-Tiznado, J. A., I. Torres-Pacheco, J. T. Ascencio-Ibañez, L. Herrera-Estrella, and R. F. Rivera-Bustamante. 1993. Inoculation of peppers with infectious clones of a new geminivirus by a biolistic procedure. *Phytopathology* 53: 514-521.
- Godínez-Hernández, Y., J. L. Anaya-López, R. Díaz-Plaza, M. González-Chavira, I. Torres-Pacheco, R. F. Rivera-Bustamante, and R. G. Guevara-González. 2001. Characterization of resistance to pepper huasteco geminivirus in chili peppers from Yucatán, México. *Hortscience* 36: 139-142.
- Jiang, X-C., X-H. Guo, X-L. Pan, and S-Q. Song. 2004. Construction and differential screening of a cDNA library specific to osmotic stress of *Haloxylon ammodendron* seedlings. *J. Biochem. Mol. Biol.* 37: 527-532.
- Khuri, S., F. T. Bakker, and J. M. Dunwell. 2001. Phylogeny, function, and evolution of the cupins, a structurally conserved, functionally diverse superfamily of proteins. *Mol. Biol. Evol.* 18: 593-605.
- Kim, H. J., T. C. Pesacreta, and B. A. Triplett. 2004. Cotton-fiber germin-like protein. II: Immunolocalization, purification, and functional analysis. *Planta* 218: 525-535.
- Lou, Y., and I. T. Baldwin. 2006. Silencing of a germin-like gene in *Nicotiana attenuata* improves performance of native herbivores. *Plant Physiol.* 140: 1126-1136.

- Sambrook J., E. F. Fritsch, and T. Maniatis. 1989. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 1531 p.
- Schweizer, P., A. Christoffel, and R. Dudler. 1999. Transient expression of members of the germin-like gene family in epidermal cells of wheat confers disease resistance. *The Plant J.* 120: 541-552.
- Torres-Pacheco, I., J. A. Garzón-Tiznado, J. K. Brown, A. Becerra-Flora, and R. F. Rivera-Bustamante. 1996. Detection and distribution of geminiviruses in Mexico and Southern United States. *Phytopathology* 86: 1186-1192.
- Van Regenmortel, M. H. V., C. M. Fauquet, D. H. L. Bishop, E. Carstens, M. Estes, S. Lemon, J. Maniloff, M. A. Mayo, D. McGeoch, C. R. Pringle, and R. B. Wickner (eds). 2000. *Virus Taxonomy. Seventh Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses.* Academic Press, San Diego, California. pp: 367-369.