

Identificación de secuencias que se expresan diferencialmente en la interacción no compatible *Musa acuminata* - *Mycosphaerella fijiensis* Morelet

Milady Mendoza-Rodríguez¹, Aminaél Sánchez-Rodríguez¹, Orelvis Portal¹, Mayra Acosta-Suárez¹, Berkis Roque¹, Monica Hofte², Elio Jiménez¹. *Autor para correspondencia

¹ Instituto de Biotecnología de las Plantas. Universidad Central Marta Abreu de Las Villas. Carretera a Camajuani, km 5.5. Santa Clara, Villa Clara, Cuba. CP 54 830

² Laboratory of Phytopathology. Department of Crop Protection. Faculty of Bioscience Engineering. University of Gent. Belgium. e. mail: milady@ibp.co.cu

RESUMEN

La Sigatoka negra se considera la enfermedad foliar más destructiva y costosa a nivel mundial que afecta la producción de bananos y plátanos. El conocimiento acerca de los genes involucrados en la respuesta de defensa en la planta ante el ataque por patógenos, constituye un paso importante para la elucidación de los mecanismos moleculares de resistencia a enfermedades. En este estudio a partir de una biblioteca sustractiva de ácido desoxirribonucleico complementaria (ADNC) realizada en el genotipo resistente 'Calcutta 4' (*Musa acuminata*, AA) en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis* (6 a 12 días posteriores a la inoculación), se realizó la identificación de las secuencias expresadas diferencialmente. Como resultado del ensamblaje con la herramienta bioinformática CAP3, de 97 secuencias de la biblioteca sustractiva fueron obtenidas 63 secuencias blanco expresadas, que incluían 42 secuencias aisladas y 21 ensamblajes. La identificación de las mismas según su homología con secuencias anotadas en la base de datos para proteínas no redundante (GenBank), permitió agruparlas en: destino de proteínas (1.6%), estrés oxidativo (4.8%), metabolismo (6.3%), producción de energía (6.3%), función desconocida (38.1%) y sin homología (42.8%). Los resultados obtenidos contribuirán a un mejor entendimiento del patosistema, lo cual permitirá el diseño de nuevas estrategias relacionadas con el mejoramiento genético en banano.

Palabras clave: biblioteca sustractiva, clasificación funcional de genes, *Musa* spp., secuencias blanco expresadas, Sigatoka negra

ABSTRACT

Black leaf streak disease caused by *Mycosphaerella fijiensis* Morelet is considered the most destructive and costly foliar disease of bananas and plantain. An important step for the elucidation of molecular mechanisms of the disease resistance is to know about genes involved in plant defense response to pathogens. Identification of differentially expressed sequences in resistant genotype 'Calcutta 4' (*Musa acuminata*, AA) at an early stage of infection with *M. fijiensis* (6 to 12 days post inoculation) from a suppressed subtractive library (SSH) was carried out. A number of 63 ESTs, which include 42 singletons and 21 contigs were obtained by assembling 97 sequences with CAP3 algorithm. Identification of sequences according to their homology with sequences stated at protein non-redundant database GenBank, allowed to gather them in six functional categories: protein destiny (1.6%), oxidative stress (4.8%), metabolism (6.3%), energy production (6.3%), unknown function (38.1%) and without homology (42.8%). Results obtained will contribute to a better understanding of pathosystem, which allow the design of new strategies related to genetic improvement of banana.

Keywords: Black leaf streak disease, expressed sequence tags, functional gene classification, *Musa* spp., subtractive library

INTRODUCCIÓN

Desde el punto de vista molecular, las investigaciones referidas a la búsqueda de resistencia a la Sigatoka negra en el género *Musa*, han estado encaminadas hacia el estudio de los genomas, aunque el mayor interés se ha centrado en el estudio de los genes expresados durante la interacción *Musa*-*M. fijiensis*, a partir de genotipos resistentes como aspecto importante para la identificación de genes relacionados con la resistencia a patógenos.

Para este propósito, varias técnicas moleculares han sido utilizadas, con el objetivo de determinar los patrones de transcripción o para la identificación de genes regulados diferencialmente, las cuales parten de la purificación inicial de ácido ribonucleico total (ARN). Dentro de ellas están: el despliegue diferencial de ácido ribonucleico mensajero (ARNm) y reverso transcripción (DDRT-PCR, del inglés *Differential Display Reverse Transcription*) (Liang y Pardee, 1992), el análisis serial de expresión génica (SAGE, del inglés:

Serial Analysis of Gene Expression) (Velculescu *et al.*, 1995), los polimorfismos para la longitud de los fragmentos amplificados basado en las huellas de ARNm (cDNA-AFLP, del inglés *Complementary Deoxyribonucleic Acid-Amplified Fragment Length Polymorphism*) (Bachem *et al.*, 1996), hibridación sustractiva por supresión (SSH, del inglés *Suppression Subtractive Hybridization*) (Diatchenko *et al.*, 1996) y los microarreglos (Brown y Botstein, 1999).

Sin embargo, la realización de bibliotecas de ácido desoxirribonucleico complementaria (ADNc), específicamente del tipo sustractiva, ha resultado ser la herramienta molecular más poderosa y efectiva para la búsqueda de genes relacionados con la respuesta de defensa en la planta en varios patosistemas. Por los motivos expuestos anteriormente ha sido de gran aceptación en estudios de biología molecular, para la clonación de genes desconocidos, especialmente si el mensaje de interés es poco abundante y diferencialmente expresado entre dos poblaciones de células. En *Musa* solo ha sido referida una a partir del patosistema *Musa-M. fijiensis* por Dagert *et al.* (2002), quienes a partir de plantas *in vitro* del genotipo resistente a la Sigatoka negra Yangambi km5 (*Musa* AAA) inoculadas con conidios de *M. fijiensis*, obtuvieron secuencias expresadas diferencialmente ante la infección con el patógeno.

A pesar de la importancia agrícola y el pequeño tamaño del genoma de *Musa* (Lysák *et al.*, 1999), el género no ha sido investigado extensivamente a escala genómica, ni a nivel de la interacción *Musa-M. fijiensis*, por lo que las investigaciones realizadas resultan insuficientes para el entendimiento de los procesos fisiológicos y bioquímicos implicados en el patosistema. Recientemente se comenzó un estudio relacionado con la búsqueda de resistencia a la Sigatoka negra, mediante la realización de una biblioteca sustractiva, a partir de la inoculación artificial en casa de cultivo de plantas de 'Calcutta 4' con el hongo *M. fijiensis* (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2006), con el cual se obtuvieron los primeros resultados acerca de secuencias de interés expresadas durante la interacción. Por ello, el siguiente trabajo tuvo como objetivo continuar con la identificación de secuencias que se expresan diferencialmente en la interacción no compatible *Musa acuminata* - *Mycosphaerella fijiensis* Morelet, lo cual constituye un paso importante para obtener información acerca de la expresión de genes que pudieran estar involucrados en la respuesta de la planta ante el patógeno. De este modo, se contribuirá a un mejor conocimiento de la enfermedad y sentará las bases para el empleo de estos genes en la modificación genética de plantas.

MATERIALES Y MÉTODOS

A partir de la biblioteca sustractiva realizada en el genotipo resistente 'Calcutta 4' en estadio temprano de la infección con *M. fijiensis* (Mendoza-Rodríguez *et al.*, 2006), por medio del sistema comercial *PCR-Select cDNA Subtraction* (BD BIOSCIENCES CLONTECH), basado en la metodología descrita por Diatchenko *et al.* (1996), se realizó la identificación de secuencias expresadas diferencialmente (EST, del inglés: *Expressed Sequence Tags*).

ESTs: determinación de posible función biológica

Esta etapa del proceso se realizó con el objetivo de asignar una posible función biológica, a cada una de las EST obtenidas de la biblioteca sustractiva. En la figura 1 se representan los pasos a seguir, desde la obtención de la biblioteca sustractiva de ADNc, hasta la identificación de las secuencias expresadas diferencialmente en la interacción.

Secuenciación de los clones de la biblioteca y análisis de las ESTs

La secuenciación, se realizó con el objetivo de obtener información acerca de los resultados de la biblioteca sustractiva realizada y el análisis de las ESTs, con el fin de conocer sobre la calidad de los clones secuenciados.

Se enviaron a secuenciar 192 clones, a la compañía MacroGen (Seoul, Korea del Sur). La misma se realizó a partir de ADN plasmídico con el oligonucleótido universal M13, extremo directo 5' (5'-GTA AAA CGA CGG CCA GT-3').

Las secuencias obtenidas se analizaron independientemente, por medio del programa *VecScreen* (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/VecScreen/VecScreen.html>), para eliminar los restos de vector. Finalmente se realizó un fichero en formato FASTA con todas las secuencias, para su utilización en posteriores análisis.

Ensamblaje de ESTs

A partir del análisis de las ESTs de la biblioteca sustractiva de ADNc en el genotipo 'Calcutta 4' y mediante el empleo de la herramienta bioinformática CAP3 (Huang y Madan, 1999) se obtuvieron los ensamblajes (agrupamiento formado por dos o más secuencias) y las secuencias aisladas (agrupamiento formado por una sola secuencia). Las secuencias obtenidas se exportaron a un fichero FASTA, para su utilización en los alineamientos con secuencias anotadas en base de datos.

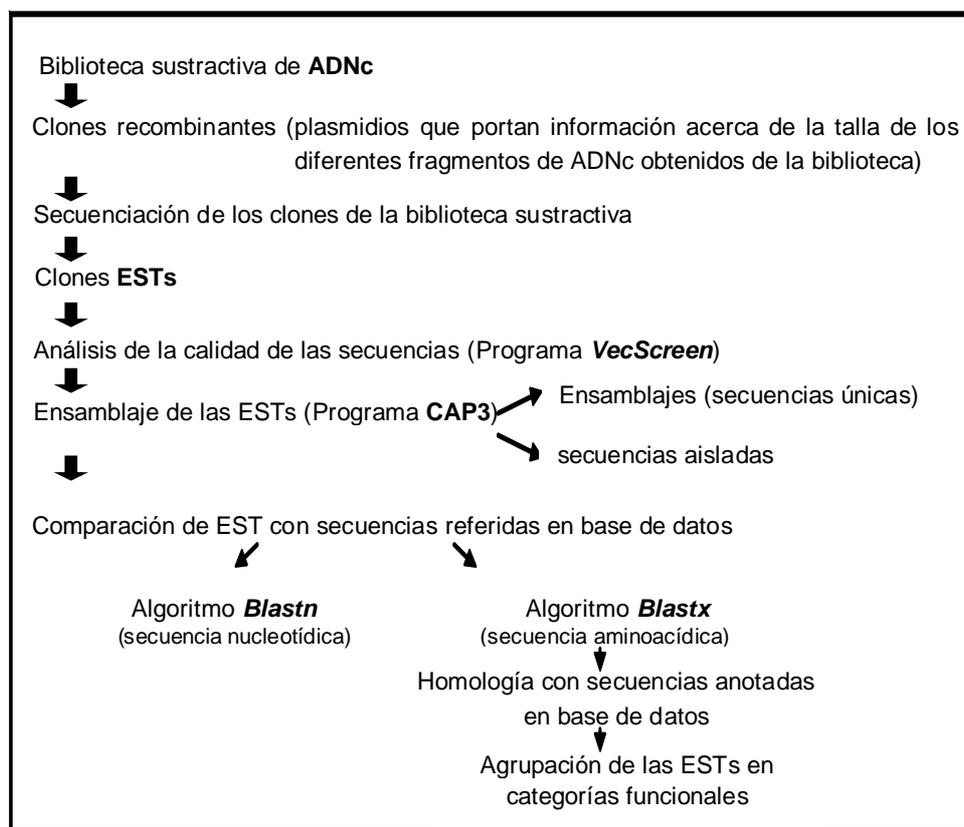


Figura 1. Procedimiento de trabajo a seguir, para la identificación de las EST, a partir de los clones obtenidos de la biblioteca sustractiva de ADNc, en el genotipo resistente 'Calcutta 4', en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*.

Identificación de las ESTs

Este paso se realizó con el objetivo de encontrar la posible función biológica asociada, para cada una de las secuencias, las cuales se tradujeron en su correspondiente secuencia aminoacídica y se compararon contra la base de datos no redundante para proteínas GenBank-NCBI, (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), mediante el empleo del algoritmo *Blastx* (Altschul *et al.*, 1997). El umbral de probabilidad máxima para el alineamiento de una secuencia fue un valor de E, igual o por debajo de $1e-10$ (Newman *et al.*, 1994), para garantizar que se obtuvieran en los alineamientos, secuencias con alto grado de similitud a los clones de ADNc en estudio. También se realizó la comparación en la base de datos *MusaBACs: Nucleic sequences* (algoritmo *Blastn*) (<http://bioinfo.inibap.org/cgi-bin/blast.cgi>), para la búsqueda de homología específica con secuencias almacenadas del género *Musa*, bajo el mismo criterio de selección.

Secuencias que presentaron alineamientos, con secuencias de función conocida en la base de datos, se agruparon basadas en su anotación por *Blastx* en una de las siguientes categorías funcionales: destino de proteínas, energía, estrés oxidativo, y

metabolismo. También se designaron las categorías función desconocida, para ESTs sin función biológica asociada y la de no homología para secuencias sin alineamiento probable en la base de datos, según la clasificación descrita por Lu *et al.* (2004).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

ESTs: determinación de posible función biológica

Secuenciación de los clones de la biblioteca y análisis de ESTs

Del total de clones enviados a secuenciar (192), solo fue posible obtener la secuencia de 98 de ellos. Después de analizada su calidad con el programa *VecScreen* y la eliminación de los segmentos contaminantes, solamente un clon no presentaba inserto.

La secuenciación de los clones de la biblioteca de ADNc verificó que la longitud de los clones secuenciados oscilaba entre 100 y 1 350 pb, con una longitud de inserto promedio de 481 pb y la distribución del número de clones de acuerdo con su longitud se representa en la figura 2.

La utilización de secuencias nucleotídicas con calidad, es de gran importancia, ya que la mayoría de los métodos de comparación de secuencias, asumen que los datos a comparar son confiables, lo cual no sucede si se utilizan las secuencias de ADN originales, obtenidas a partir de la secuenciación automática. Por esta razón, la eliminación de contaminantes de las secuencias, constituye un paso esencial para el éxito de las etapas posteriores de análisis de los datos, ya que la presencia de interrupciones o la incorporación errónea de nucleótidos, puede conllevar a una interpretación errónea de los resultados, durante la aplicación de las herramientas bioinformáticas (Chou y Holmes, 2001).

Ensamblaje de ESTs

Se favoreció el ensamblaje de pequeñas secuencias, a secuencias de mayor longitud, mediante el empleo de la herramienta bioinformática CAP3 (Huang y Madan, 1999), lo que contribuyó a la eliminación de

la redundancia obtenida en la biblioteca. De las 97 ESTs iniciales, se ensamblaron 63, de las cuales un 66.6% eran secuencias aisladas y un 33.3% se correspondió con secuencias ensambladas (únicas) (Figura 3).

Fueron obtenidos 21 ensamblajes, de ellos catorce agrupaban dos ESTs (66.6%), cinco agrupaban tres ESTs (23.8%) y uno agrupó cinco y siete ESTs (4.76%), por ensamblaje respectivamente (Figura 4).

En cuanto a la distribución de los fragmentos según su longitud, la mayor representatividad se obtuvo con una longitud inferior a 600 pb (66.6%). Este resultado concuerda con el obtenido antes de realizar el agrupamiento de las ESTs, pero con la diferencia que después del ensamblaje, disminuyó el número de secuencias dentro de cada rango de pb establecido (Figura 5). Fue obtenido, además, un 35% de secuencias redundantes dentro de la biblioteca sustractiva.

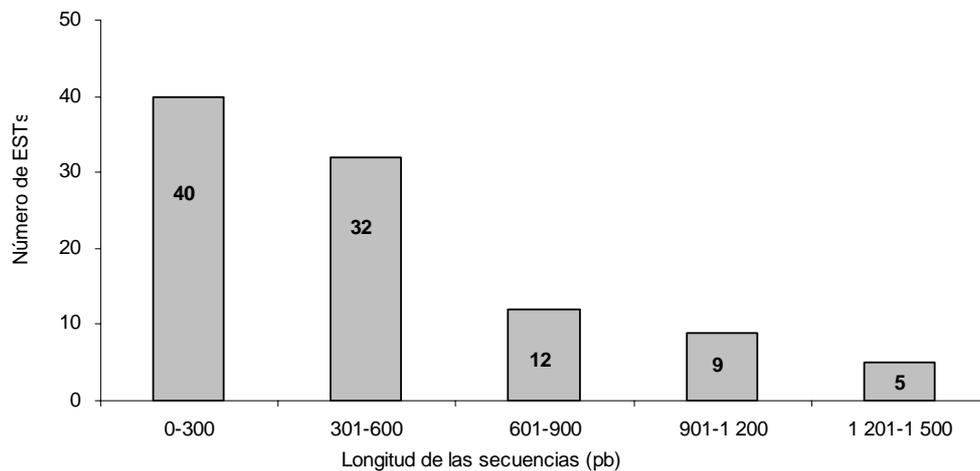


Figura 2. Distribución de la longitud de las ESTs obtenidas, a partir de la secuenciación de la biblioteca sustractiva de ADNc realizada en el genotipo 'Calcutta 4', en estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*.

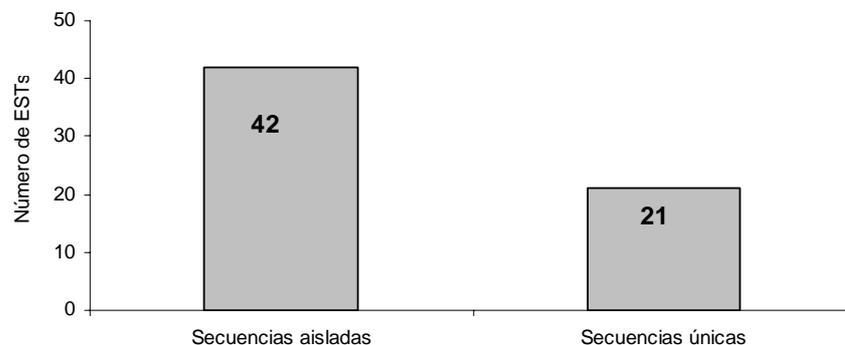


Figura 3. Distribución de secuencias ESTs, obtenidas de la biblioteca sustractiva de ADNc en el genotipo 'Calcutta 4' en estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*, después del ensamblaje con la herramienta bioinformática CAP3.

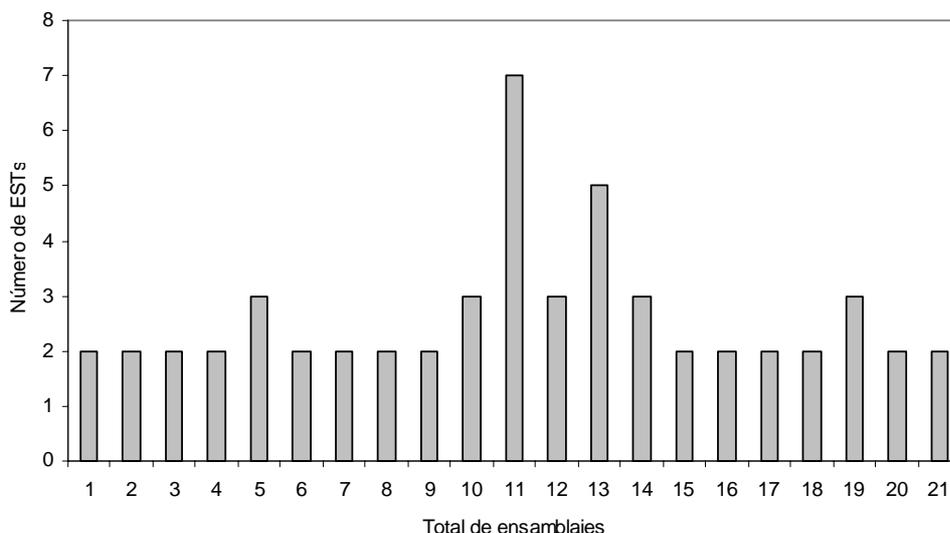


Figura 4. Frecuencia de distribución de los ESTs, de la biblioteca sustractiva de ADNc en el genotipo 'Calcutta 4' en estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*, por ensamblaje, después del agrupamiento con la herramienta CAP3.

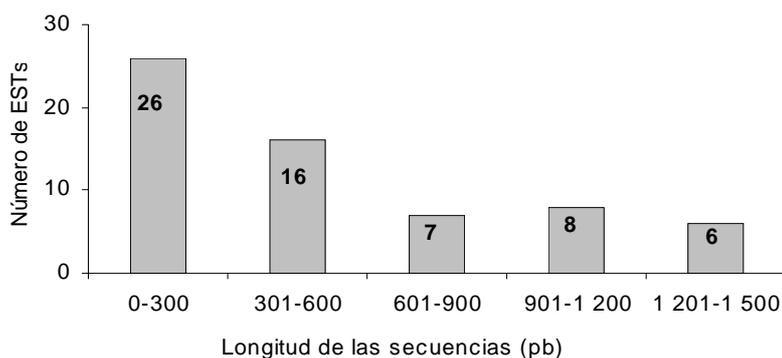


Figura 5. Distribución de la longitud de las ESTs obtenidas, de la biblioteca sustractiva de ADNc realizada en el genotipo 'Calcutta 4', en estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*, como resultado del ensamblaje con la herramienta CAP3.

El ensamblaje de secuencias, mediante el empleo de la herramienta bioinformática CAP3, resultó apropiada para el análisis de la biblioteca de ADNc en el genotipo 'Calcutta 4', en un estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*. Su utilización permitió mejorar la calidad de las secuencias, eliminar posibles errores y la redundancia inherente de la secuenciación de los clones de una biblioteca del tipo sustractiva. Como resultado del solapamiento realizado, se obtuvieron ESTs de mayor longitud, lo cual constituyó una ventaja para el procesamiento de la información, ya que mientras mayor sea la longitud de la secuencia nucleotídica, mejor es la anotación que se puede lograr a través de la búsqueda de homología (Huang y Madan, 1999).

Un problema asociado tradicionalmente con la realización de bibliotecas sustractivas, es la abundancia de secuencias de pequeña longitud, cuya

ligación se ve favorecida. Esto podría ser el resultado de una reverso transcripción incompleta (Moyle *et al.*, 2004) y el segundo problema, se relaciona con la obtención de clones redundantes o sea al número de ESTs agrupados que realizan una misma función. Este fenómeno podría ser el resultado de que varios de los clones expresados diferencialmente, formen parte del mismo ADNc, digerido más de una vez con la enzima *Rsa I* o simplemente que sean genes altamente expresados que no hayan sido sustraídos (Mbéguié *et al.*, 2007).

Identificación de ESTs

Como resultado del análisis de la biblioteca de ADNc, en la interacción incompatible 'Calcutta 4'-*M. fijiensis*, fueron obtenidas 63 secuencias expresadas diferencialmente, las cuales se agruparon a partir de su homología con secuencias anotadas en base de

datos de proteínas en seis categorías (Lu *et al.*, 2004), entre las cuales están: las relacionadas con el destino de proteínas (1.6%), estrés oxidativo (4.8%), el metabolismo (6.3%), producción de energía (6.3%), función desconocida (38.1%) y sin homología (42.8%) (Tabla 1). De la comparación de secuencias realizada contra la base de datos MusaBACs, no se obtuvo homología para ninguna ESTs.

La identificación y caracterización del número de ESTs obtenidas, sin homología con secuencias anotadas en la base de datos para proteínas no redundantes, podrían ser las secuencias de genes noveles, las cuales no han sido identificados con anterioridad en el género *Musa*, lo que aportaría información valiosa para el entendimiento del patosistema *Musa-M. fijiensis*.

El no haber encontrado función biológica asociada a la mayoría de las ESTs, pudiera corresponderse a que solo comparten pequeñas regiones de homología con las secuencias almacenadas o que debido al pequeño marco de lectura de las secuencias, no se obtenga un alineamiento con un valor de E mejor que el valor de corte establecido. Específicamente la homología con secuencias pertenecientes al género *Musa* fue de un (6.3%). Esto se debe fundamentalmente a que a pesar de existir un gran

número de ESTs en la base de datos, la información relacionada con estas es muy limitada. Hasta el 21 de Febrero de 2008, el número de ESTs disponible en el GenBank era de: en *Musa acuminata* (9 029), en *Musa acuminata* (*Musa* AAA) cv. 'Grande naine', (6 708), *Musa acuminata* ssp. *burmannicoides* genotipo 'Calcutta 4' (2 289) y en *Musa x paradisiaca* (22) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

A pesar del interés creciente en el estudio del género *Musa*, para la búsqueda de genes relacionados con la resistencia a la Sigatoka negra, las investigaciones realizadas resultan insuficientes. El número de secuencias referidas en bases de datos públicas es relativamente pequeño y esto representa una problemática que impide el descubrimiento de nuevos genes, por medio del análisis de la homología de secuencias parcialmente conocidas de transcritos expresados.

La clasificación funcional de las ESTs obtenidas las ubicó en categorías que se corresponden con el metabolismo primario en la planta, lo cual es un resultado esperado, pues la biblioteca se realizó en un estadio temprano de la infección con el hongo. Además de las funciones generales asociadas para cada secuencia, ha sido descrito su papel en la respuesta de defensa en la planta ante la infección por microorganismos.

Tabla 1. Clasificación funcional de las ESTs obtenidas de la biblioteca sustractiva de ADNc en el genotipo 'Calcutta 4' en estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*.

Categoría funcional	No ESTs	Organismo	No Accesoión
I. Es estrés oxidativo			
Metaloionina	3	<i>Musa acuminata</i>	Q40256
II. Destino de proteínas			
Enzima E2 ubiquitina ligasa	1	<i>Oryza sativa</i>	BAD25096.1
III. Metabolismo			
Glicosiltransferasa	2	<i>Triticum aestivum</i>	CAI30081.1
Tioredoxina	1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP197144.1
S-adenosimetionina sintetasa	1	<i>Musa acuminata</i>	ABG74576.1
IV. Energía			
Subunidad PSI-N del fotosistema I	1	<i>Arabidopsis thaliana</i>	NP201209.1
Polipéptido de 10kDa del fotosistema II	1	<i>Nicotiana tabacum</i>	Q40519
Proteína de 10kDa del fotosistema II	1	<i>Xerophyta humilis</i>	AAN60205.1
NADH-plastoquinona oxidoreductasa, subunidad 2	1	<i>Platanus occidentalis</i>	YP740610.1
V. Función desconocida	24		
VI. No homología	27		

Estrés oxidativo: En esta categoría fueron incluidas tres ESTs, que codificaban para proteínas del tipo metalotioninas.

La respuesta oxidativa, está considerada como el componente principal de la maquinaria de defensa de la planta y una de las primeras respuestas celulares, después del reconocimiento del patógeno, que conlleva a la acumulación de intermediarios activos de oxígeno (ROS, del inglés: *Reactive Oxygen Species*). Sin embargo, la acumulación de estos compuestos en la célula ocasiona serios daños, los cuales son contrarrestados, por la activación de mecanismos enzimáticos y no enzimáticos. De forma general, las metalotioninas son proteínas no enzimáticas, de bajo peso molecular, con un alto contenido de residuos de cisteína, que se diferencian en 15 familias y en plantas se dividen en cuatro familias principales. Su función está relacionada con la detoxificación de metales, homeostasis y más recientemente se propuso como detoxificadora de ROS en células dañadas, para la protección contra el estrés oxidativo (Freisinger, 2007).

Destino de proteínas: Como parte de esta categoría, se ubicó una EST que codificaba para una proteína del tipo ubiquitina.

La degradación de proteínas en procesos biológicos tales como la transcripción, transducción de señales y biogénesis en peroxisoma, está mediada por la ruta de la ubiquitinación. Se conoce que la proteólisis está implicada en diferentes vías de señalización en plantas, incluyendo aquellas que median la respuesta a fitohormonas, fotomorfogénesis, sacarosa, patógenos y que además, tiene un papel importante en los mecanismos de defensa en la planta. Esta información fue corroborada, por el descubrimiento de que varios componentes de la vía, son elementos clave en el crecimiento, desarrollo y defensa de la planta (Vierstra, 2003). Las proteínas reguladoras del tipo ubiquitinas, se encuentran conservadas en todos los organismos eucarióticos y dentro del complejo ubiquitina/proteasoma, la E3 ubiquitina ligasa tiene la función principal, clasificándose según la presencia de dominios RING, HECT o U-box. Consisten de 76 aminoácidos y tienen una masa molecular cercana a 8.5 kDa. Sus rasgos principales incluyen una cola C-terminal y la presencia de residuos lisina (Johnston y Burrows, 2006).

Metabolismo: Dentro de esta categoría funcional, fueron agrupadas cuatro ESTs que codificaban para proteínas tales como: glicosiltransferasa, S-adenosil metionina sintetasa y tioredoxina.

La inducción de la defensa en la planta produce una demanda creciente de nutrientes, además de

una alteración en su metabolismo, lo que conlleva a cambios en el nivel de transcritos relacionados con el proceso. Se conoce que los mecanismos de defensa ante estrés (biótico), están acompañados por un aumento en las vías metabólicas y en la transducción de señales en las plantas, lo cual tiene su efecto en la expresión de genes de resistencia (Keurentjes *et al.*, 2006).

Glicosiltransferasas

Dentro del metabolismo, la glicosilación, incluye la conversión de los productos de la fotosíntesis en azúcares, la producción de pequeñas moléculas, que tienen residuos de azúcar unidos (fitoalexinas, precursores de la pared y hormonas de plantas), para regular su actividad, toxicidad o disponibilidad para el transporte, por la importancia que tienen para la defensa de la planta, homeostasis celular y señalización (Keegstra y Raikhel, 2001; Glombitza *et al.*, 2004). De forma general, las glicosiltransferasas, catalizan la transferencia de azúcar hacia un elevado número de moléculas aceptoras y tienen una secuencia aminoacídica, cuya longitud va desde 435 hasta 507 aminoácidos, con regiones altamente conservadas (Ross *et al.*, 2001).

S-Adenosil metionina sintetasa

La S-Adenosil metionina sintetasa, es una enzima clave en el metabolismo de las plantas, ya que cataliza la biosíntesis de S-adenosil-metionina (AdoMet o SAM), a partir de metionina y ATP. A su vez SAM es precursora de la biosíntesis de etileno y poliaminas, además de estar involucrada en reacciones de metilación, como principal donador de grupos metilo en la metilación de lípidos, proteínas o ácidos nucleicos (Komoto *et al.*, 2004). Aún cuando no se conoce con exactitud el mecanismo de resistencia involucrado en la respuesta de defensa en el genotipo resistente 'Calcutta 4', se conoce que ante la explosión oxidativa se producen especies reactivas de oxígeno como el peróxido de hidrógeno (H_2O_2), el anión superóxido (O_2^-), por lo que es posible que se haya activado la ruta de las poliaminas y del etileno durante la interacción incompatible.

Tioredoxinas

Las tioredoxinas, están involucradas en la regulación de varios procesos celulares incluyendo la expresión de genes, transducción de señales, proliferación, apoptosis y pueden actuar como antioxidantes en la protección contra ROS en sistemas procariotes y eucariotes (Rivas y Thomas, 2005). El control redox provee a la célula con un mecanismo por el cual ella puede responder a cambios en su ambiente a través de la modulación de ciertos genes. Este sistema tiene

un papel fundamental regulando la actividad de factores de transcripción, enzimas y protegiendo a la célula del estrés oxidativo (Nelson y Cox, 2005).

Producción de energía

La luz, es un factor predominante en el control del crecimiento de las plantas, desarrollo y respuesta ante el estrés. Investigaciones realizadas han brindado modelos de cómo las vías de señalización que están involucradas en la percepción de la luz y en la defensa podrían operar e interactuar para formar una red de defensa en la planta (Karpinski *et al.*, 2003).

El fotosistema I en plantas contiene 18 subunidades de proteínas diferentes y solo tres están involucradas en el transporte de electrones. Las proteínas que lo constituyen son responsables del ordenamiento preciso de cofactores y determina las propiedades redox de los centros de transferencia de electrones, además tienen un papel fundamental en la red metabólica y respuesta fisiológica de la planta (Nelson y Yocum, 2006).

De forma general en la literatura científica referida al estudio de patosistemas, específicamente en *Musa-M. fijiensis*, aún no han sido publicados resultados relacionados con la expresión de los genes anteriormente mencionados.

En la investigación realizada el análisis preliminar de los datos obtenidos de la biblioteca sustractiva de 'Calcutta 4' en estadio temprano de la infección con *M. fijiensis*, ha permitido la identificación de varias secuencias reguladas diferencialmente. El uso de esta información guiará trabajos futuros para establecer la conexión entre los genes expresados diferencialmente, la correspondiente proteína traducida y su función biológica en esta etapa temprana de la infección.

REFERENCIAS

Altschul, SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic Acids Res* 25: 3389-3402

Bachem, CW, Van der Hoeven RS, de Bruijn SM, Vreugdenhil D, Zabeau M, Visser RG (1996) Visualization of differential gene expression using a novel method of RNA fingerprinting based on AFLP: analysis of gene expression during potato tuber development. *Plant* 9: 745-753

Brown, PO y Botstein D (1999) Exploring the new world of the genome with DNA microarrays. *Nat Genet* 21 (Suppl): 33-37

Chou, H-H, Holmes MH (2001) DNA sequence quality trimming and vector removal. *Bioinformatics* 17 (12): 1093-1104

Dagert, M, Boscán K, Briceño A, Rangel S (2002) Búsqueda de genes de defensa contra la Sigatoka negra en musáceas. Memorias XV reunión Internacional ACORBAT 2002.

Realizada en Cartagena de Indias, Colombia, Medellín (COL) Asociación de bananeros de Colombia Augura

Diatchenko, L, Lau Y-FC, Campbell AP, Chenchick A, Moqadam F, Huang B, Lukyanov S, Lukyanov K, Gurskaya N, Sverdlov ED, Siebert PD (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

Freisinger, E (2007) Spectroscopic characterization of a fruit-specific metallothionein: *M. acuminata* MT3. *Inorganica Chimica Acta* 360: 369-380

Glombitza, S, Dubuis P-H, Thulke O, Welzl G, Bovet L, Götz M, Affenzeller M, Geist B, Hehn A, Asnaghi C, Ernst D, Seidlitz HK, Gundlach H, Mayer KF, Martinoia E, Werck-Reichhart D, Mauch, F, Schäffner AR (2004) Crosstalk and differential response to abiotic and biotic stressors reflected at the transcriptional level of effector genes from secondary metabolism. *Plant Molecular Biology* 54: 817-835

Huang, X, Madan A (1999) CAP3: a DNA sequence assembly program. *Genome Research*, Cold Spring Harbor. *US* 9 (9): 868-877

Johnston, JA, Burrows JF (2006) De-ubiquitinating enzymes: intracellular signalling and disease. *Biochemical Society Transactions* 34, part 5: 764-769

Karpinski, S, Gabrys H, Mateo A, Karpinska B, Mullineaux PM (2003) Light perception in plant disease defence signalling. *Current Opinion in Plant Biology* 6 (4): 390-396

Keegstra, K, Raikhel N (2001) Plant glycosyltransferases. *Current Opinion in Plant Biology* 4: 219-224

Keurentjes, JJB, Fu J, Ric de Vos CH, Lommen A, D Hall R, Bino RJ, Van der Plas LHW, Jansen RC, Vreugdenhil D y Koornneef M (2006) The genetics of plant metabolism. *Nature Genetics* 38: 842 – 849

Komoto, J, Yamada T, Takata Y, Markham GD, Takusagawa F (2004) Crystal structure of the s-adenosylmethionine synthetase ternary complex: a novel catalytic mechanism of s-adenosylmethionine synthesis from ATP and met. *Biochemistry* 43 (7): 1821-1831

Liang, P, Pardee AB (1992) Differential display of eukaryotic messenger RNA by means of the Polymerase Chain Reaction. *Science* 257 (5072): 967-971

Lu, G, Jantasuriyarat C, Zhou B, Wang G-L (2004) Isolation and characterization of novel defense response genes involved in compatible and incompatible interactions between rice and *Magnaporthe grisea*. *Theor Appl Genet* 108: 525-534

Lysak, MA, Dolezelová M, Horry JP, Swennen R, Dolezel J (1999) Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in *Musa*. *Theor Appl Genet* 98: 1344-1350

Mbéguié-A-Mbéguié, D, Hubert O, Sabau X, Chillet M, Fils-Lycaond B, Baurens F-C (2007) Use of suppression subtractive hybridization approach to identify genes differentially expressed during early banana fruit development undergoing changes in ethylene responsiveness. *Plant Science* 172 (5): 1025-1036

Mendoza-Rodríguez, MF, Sánchez A, Portal O, Acosta M y Jiménez E (2006) Construcción de una biblioteca sustractiva a partir de *Musa acuminata* (AA) cv. 'Calcutta 4' inoculada con *Mycosphaerella fijiensis* Morelet. *Biotecnología Vegetal* 6 (4): 213-217

Moyle, R, Fairbairn DJ, Ripi J, Crowe M, Botella JR (2004) Developing pineapple fruit has a small transcriptome

- dominated by metallothionein. *Journal of Experimental Botany* 56 (409): 101-112
- Nelson, D, Cox M (2005) *Lehninger principles of Biochemistry*. Fourth Edition, pp. 616-617. W.H. Freeman and Company. New York
- Nelson, N, Yocum CF (2006) Structure and function of photosystems I and II. *Annual Review of Plant Biology* 57: 521-565
- Newman, T, de Bruijn FJ, Green P, Keegstra K, Kende H, McIntosh L, Ohigge L, Raikhel N, Sormeville S, Thomasshow M, Retzel E, Sormeville C (1994) Gene galore: a summary of methods for accessing results from large-scale partial sequencing of anonymous *Arabidopsis* cDNA clones. *Plant Physiol* 106: 1241-1255
- Rivas, S, Thomas CM (2005) Molecular interactions between tomato and the leaf mold pathogen *Cladosporium fulvum*. *Annual Review of Phytopathology* 43: 395-436
- Ross, J, Li Y, Lim E-K, Bowles DJ (2001) Higher plant glycosyltransferases. *Genome Biology. Reviews* 2 (2): 3004.1-3004.6
- Velculescu, VE, Zhang L, Vogelstein B, Kinzler KW (1995) Serial analysis of gene expression. *Science* 270: 484-487
- Vierstra, RD (2003) The ubiquitin/26S proteasome pathway, the complex last chapter in the life of many plant proteins. *Trends in Plant Science* 8 (3): 135-142