

ANÁLISIS PROTEÓMICO DE LA INFECCIÓN DE PLANTAS DE *BRASSICA OLERACEA* POR *XANTHOMONAS CAMPESTRIS* PV. *CAMPESTRIS*

M. Tortosa, M. Francisco, P. Velasco y M. E. Cartea

Misión Biológica de Galicia (CSIC). Apdo. 28, 36080, Pontevedra.

Palabras clave: Proteoma, estrés biótico, iTRAQ y espectrometría de masas.

INTRODUCCIÓN

La espectrometría de masas (MS) ha cambiado la forma en la que las plantas son estudiadas, permitiendo conocer cada vez más exhaustivamente los entresijos de sus procesos biológicos. A diferencia de lo que ocurre con el genoma, el proteoma de una planta es dinámico, es decir, está sujeto a cambios a lo largo de su ciclo vital (Bantscheff y Lemeer, 2012). Así mismo, las plantas sufren una gran variedad de condiciones adversas durante su desarrollo, capaces de desencadenar drásticos cambios en su proteoma. Entre estas condiciones encontramos los estreses bióticos, capaces de producir daños significativos en la planta o incluso su muerte. Pese a que en otros campos la proteómica se ha erigido como una excelente herramienta para el estudio de los procesos de patogénesis, su uso para el análisis de la interacción planta-patógeno es todavía anecdótico, siendo pocos los cultivos -y sus patógenos asociados- los que han sido estudiados con esta metodología. En el caso del género *Brassica*, la situación no es diferente y, por tanto, el objetivo de este trabajo es analizar los cambios producidos en el proteoma de plantas de *Brassica oleracea* durante una infección por la enfermedad bacteriana *Xanthomonas campestris* pv. *campestris* (Xcc), causante de la enfermedad de la podredumbre negra.

MATERIAL Y MÉTODOS

Se seleccionaron 16 plantas de una línea pura de *B. oleracea* var. *italica* (Early big). Ocho de ellas se inocularon con la raza 1 de Xcc y las otras 8 plantas se utilizaron como control. Las hojas inoculadas se recogieron a los 3 y 12 días tras la inoculación (4 hojas control y 4 hojas inoculadas cada día). Posteriormente, se llevó a cabo la extracción de proteínas de hoja fresca, y tras un proceso de filtrado y purificación de los extractos proteicos, las proteínas se digirieron con tripsina. Los péptidos resultantes se marcaron mediante derivatización química usando el marcaje iTRAQ ("Isobaric Tag for Relative and Absolute Quantification") (Wiese et al., 2007). Esta técnica permite analizar simultáneamente 8 muestras, por lo que se hicieron dos pools (uno para cada día post-inoculación) mezclando las muestras.

Para separar los péptidos en fracciones, cada pool se sometió a dos cromatografías líquidas en fase reversa. El eluyente de la segunda cromatografía fue depositado gota a gota en una placa para el análisis MS mediante MALDI-TOF-TOF. La identificación y cuantificación de las proteínas se llevó a cabo utilizando el software ProteinPilot™ v.4.0 (ABSciex) y los espectros MS/MS fueron y *Viridiplantae* (UniProt/Swissprot).

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

De entre todas las proteínas identificadas en las distintas muestras, se tomaron como diferencialmente expresadas entre plantas control e inoculadas aquellas cuyo *fold-change* (inoculada/control) era menor de 0,8 o mayor de 1,2 y su *p-value* < 0,05. Se han identificado un total de 15 proteínas a los 3 días después de la inoculación y 63 en el caso de las muestras recogidas 12 días después de la inoculación. Tal y como se puede observar en la figura 1, la mayoría de las proteínas identificadas se sobreexpresan ante una infección por Xcc, debido probablemente a la activación de la "microbial-associated molecular-patterns-triggered immunity" (MTI) y posteriormente la "effector-triggered immunity" (ETI). Entre las proteínas cuya expresión se ve reprimida por la infección, encontramos las distintas cadenas que forman la proteína RuBisCO o proteínas de transferencia de lípidos, éstas últimas implicadas en procesos de transducción de señal. Las proteínas sobreexpresadas identificadas están relacionadas con procesos de señalización (como la ubiquitinación), transporte celular (sistema de chaperonas) o proteínas aso-

ciadas a la mirosinasa, enzima responsable de la degradación de los glucosinolatos, metabolitos secundarios exclusivos del género *Brassica*. Son cada vez más numerosos los trabajos que evidencian que el sistema –glucosinolato/mirosinasa- forma parte de la defensa contra herbívoros y patógenos (Singh et al., 2015). El siguiente paso consistirá en un estudio exhaustivo de los procesos que envuelven a las proteínas identificadas con el fin de construir un retrato de la respuesta proteómica a la infección por Xcc.

AGRADECIMIENTOS

Los autores agradecen la financiación obtenida en el marco de los proyectos AGL2012-35539 y AGL2015-66256-C2-1-R.

REFERENCIAS

- Bantscheff, M. and Lemeer, S. 2012. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. *Ann. Bioanal. Chem.* 404:939–965.
- Wiese, S., Reidegeld, K.A., Meyes, H.E. and Warscheid, B. 2007. Protein labeling by iTRAQ: a new tool for quantitative mass spectrometry in proteome research. *Proteomics* 7:340–350.
- Singh, A., Guest, D. and Copeland, L. 2015. Associations between glucosinolates, white rust, and plant defense activators in Brassica plants: A review. *Int. J. Veg. Sci.* 21:297–313.

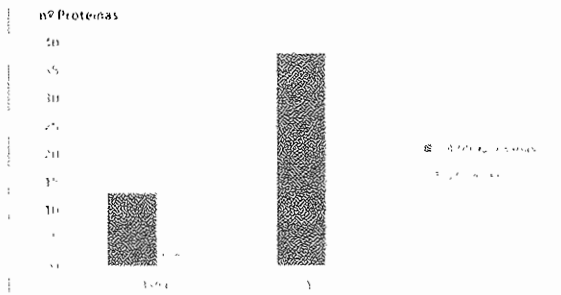


Figura 1. Histograma del total de proteínas diferencialmente expresadas en ambos tiempos y su comportamiento de sobreexpresión o represión.