EFECTO DE NANOTUBOS DE CARBONO DE PARED MÚLTIPLE SOBRE LA EXPRESIÓN DEL GEN *ghs* EN PLÁNTULAS DE GUAYULE (*Parthenium argentatum* Gray)

Robles González Felipe[1], Ortega Ortega Yolanda[1], Rodríguez Hernández Ana Margarita[1] y Kassem Mona[1*]

[1]Centro de investigación en Química Aplicada, Departamento de Biociencias y Agrotecnología, Saltillo, 25294. [*]Autor de Correspondencia: mona.kassem@ciqa.edu.mx

RESUMEN

Los nanotubos de carbono de pared múltiple fueron reportados como estimuladores de la actividad fotosintética y promotores de crecimiento, así como agentes abióticos que pudieran alterar la expresión de genes en varios cultivos hortícolas lo que supondría una oportunidad para explorar este potencial con fines de inducir la ruta de biosíntesis de hule natural en cultivos industriales. En este trabajo se evaluó el efecto de los NTCPM en plántulas de guayule (*Parthenium argentatum* Gray; *Asteraceas*), sobre la expresión del gen que codifica la proteína GHS involucrada en la biosíntesis del hule. El ensayo fue realizado con un total de 160 plántulas propagadas *in vitro* provenientes de una misma línea. Los NTCPM fueron añadidos al medio de cultivo con diferentes niveles de concentración (0, 10, 25 y 50 ppm). Los resultados obtenidos confirmaron el desplazamiento de los nanotubos desde el suelo hacia las raíces a través de los cuales lograron entrar y llegar a las hojas en todas las plántulas expuestas a dichos nanomateriales. Los NTCPM causaron una supresión significativa en la expresión del gen *ghs*, y ésta fue proporcional al aumento de la concentración del nanomaterial en las primeras 24 horas después de la diferenciación de tratamientos. Sin embargo, la expresión del gen comenzó a recuperarse al cabo de 48 horas, manifestando una supresión no significativa en comparación al tratamiento control.

Palabras clave: *Biosíntesis del hule, expresión genética, PCR semicuantitativa.*

ABSTRACT

Multiwall carbon nanotubes “MWCNT” has been reported to increase plant photosynthetic activity and to promote plant growth in different horticultural crops. This work aimed to evaluate the effect of MWCNT on the expression of the gene that encodes the GHS protein involved in rubber biosynthesis in guayule (*Parthenium argentatum* Gray; *Asteraceae*) seedlings. The experiment was carried out on 160 seedlings propagated *in vitro* from the same line. The MWCNT were added to the culture medium at different concentration levels (0, 10, 25 and 50 ppm). The results showed that the nanotubes entered the roots, moved through the stem and reach up to the leaves of all the seedlings exposed to these nanomaterials. Therefore, the expression of the *ghs* gene was significantly suppressed in proportion to the concentration of MWCNT at only 24 hours after the first application through the irrigation solution. However, 48 hours later, the gene expression began to recover but always showing a slight non-significant suppression relatively to control treatment.

Key words: *rubber biosynthesis, genetic expression, semiquantitative PCR.*

Recibido: 17 sep 2021
Aceptado: 18 nov 2021

INTRODUCCIÓN

El guayule *Parthenium argentatum* es un arbusto nativo de las zonas áridas de la parte centro-norte de México, particularmente se encuentra en los estados de Coahuila, Chihuahua, Durango, Zacatecas, San Luis Potosí, Nuevo León y en el sur de Texas en los EUA (Jasso de Rodríguez *et al.,*2006). Las plantas maduras de guayule producen hule natural de alta calidad en el tejido del parénquima de la corteza, sobre todo durante el invierno (Benedict *et al.,* 2010). El hule natural es un polímero cis-1,4-polyisopropeno que tiene características y propiedades únicas no igualables por ninguno de los hules de origen sintético, por lo cual tiene una importancia económica que exige su producción a gran escala y de manera continua. Dado que el contenido de hule no supera el 20% del total de biomasa de la planta de guayule y tarda de 2 a 3 años para alcanzar dicho porcentaje, muchos esfuerzos científicos buscan producir nuevas variedades con características agrícolas mejoradas, incluyendo técnicas avanzadas de cultivo *in vitro*, técnicas para la identificación de especies y líneas nuevas, estudios y análisis de variabilidad genética, secuenciación y estrategias de ingeniería genética (Cherian *et al.,* 2019). Otros esfuerzos buscan identificar factores capaces de inducir o acelerar la biosíntesis de hule, la cual se desarrolla en las vesículas cubiertas de una sola capa lipídica conocida como “partículas de hule”, a partir de un iniciador de pirofosfato alílico, como el pirofosfato de farnesilo (FPP), seguido por la adición progresivas de moléculas de isopentenil pirofosfato (IPP). El monómero de IPP se sintetiza por la vía del ácido mevalónico (MVA) en el citosol de las células vegetales. También, IPP y su isómero pirofosfato de dimetilo alilo (DMAPP) se sintetizan en los plástidos a través de la vía alternativa de 2-C-metil-D-eritritol-4-fosfato (MEP) (Rousset *et al.,* 2021). Este proceso de acumulación de hule mostró ser susceptible a factores de estrés abiótico tal como el frío (Stonebloom y Scheller, 2019) y la falta de agua (Dong *et al*., 2021) pero se desconoce todavía su respuesta en presencia de nanoparticles que podrían producir un efecto similar. En presencia de nanotubos de carbono, la planta reacciona con una expresión selectiva de ciertos genes y manifiesta cambios morfológicos similares a una respuesta provocada por un estrés ambiental Yan *y al*. (2013). Estos autores, observaron la supresión de los genes *RTH1* y *RTH3* como responsables de una reducción en la elongación de raíces principales, y un aumento en la expresión de los genes *SLR1* y *RTCS* asociados con el crecimiento de raíces secundarias en maíz. En plantas de arroz, Lin *et al.* (2009) reportaron el efecto de los nanotubos de carbono sobre la expresión genética y sus correspondientes vías de señalización. En plantas de tomate, la aplicación de NTCPM provocó una regulación positiva en la expresión del gen *LeAqP2* que codifica la proteína aquaporina causando por tanto alteraciones en su balance hídrico (Khodakovskaya *et al.,* 2011). De igual manera los mismos autores confirmaron que los NTCPM promueven el desarrollo de plantas de tabaco mediante regulación positiva de 3 genes: uno relacionado con el transporte de agua *NtPIP1*, y dos relacionados con la división celular *NtLRX* y *NycB.* A su vez, Yuan *et al*. (2017) detectó la capacidad de los NTCPM a aumentar el número de nódulos en un sistema de simbiosis rizobio-leguminosa y mejorar su actividad nitrogenasa. El aumento de la nodulación fue correlacionado con la regulación positiva de algunos genes involucrados en la correspondiente vía de señales, específicamente el gen *NIN* considerado como regulador principal de la misma.

Muchas proteínas involucradas en la ruta de biosíntesis del hule en guayule fueron caracterizadas y reportadas en la literatura, sin embargo, queda mucho por saber sobre los factores y/o condiciones que provocan su producción y su papel en la formación del rendimiento final de hule en la planta. Las proteínas de pequeñas partículas de hule o SRPP por sus siglas en inglés (Small Rubber Particle Protein) pueden ser inducidas por factores de estrés y contribuyen a fortalecer la tolerancia de la planta en condiciones adversas (Balbuena *et al.,* 2011; Fricke *et al.,* 2013). En *Hevea brasiliensis* o árbol de caucho, la proteína SRPP es la más abundante, lo que hace pensar que tiene un papel importante en la biosíntesis de hule (Men *et al.,* 2019). El silenciamiento del gen que codifica esta proteína no mostró una disminución en la biosíntesis de hule en lechuga, mientras en *Taraxacum brevicorniculatum* o diente de león causó una reducción en el contenido de hule seco (40-50%), sin afectar la masa molecular ni la polidispersidad del hule producido (Hillebrand *et al.,* 2012; Chakrabarty *et al.,* 2015). En guayule, la GHS es una proteína homóloga a la SRPP que fue descrita por primera vez en 2004 y se localiza en la membrana de la partícula de hule con una función poco evidente hasta la fecha. Se ha demostrado *in vitro* que la GHS contribuye en la incorporación de IPP en la cadena de hule durante el proceso de biosíntesis (Kim *et al*., 2004). Por todo lo anterior, en este trabajo se pretende estudiar el comportamiento del gen que codifica la proteína GHS y su posible relación con la presencia de NTCPM como factor de estrés abiótico.

MATERIALES Y MÉTODOS

Cultivo *in vitro*. Plántulas de guayule previamente propagadas a partir de una planta desarrollada en condición *in vitro* fueron cultivadas en medio basal Murashige & Skoog MS (1962) con NTCPM con pureza de 97.7 %, diámetro externo / interno de 23.90/ 6.60 nm, espesor de pared de 9.45 nm, aproximadamente de 35 capas. La preparación del medio se realizó en dos pasos: (i) suspensión de NTCPM a 3 concentraciones 10, 25 y 50 ppm en medio acuoso usando ultrasonicador Branson 2800 (100 W, 40 KHz) durante 30 min, (ii) agregación del medio MS y ajuste del pH a 5.8. Tras la esterilización del medio, todos los frascos se agitaron constantemente hasta la solidificación. Todas las plántulas se mantuvieron en condiciones controladas de luz y temperatura (12 h luz a 25°C) durante todo el experimento.

Espectro Raman. Para confirmar la presencia de NTCPM en el interior de las plántulas, se realizó un muestreo destructivo de 3 ejemplares por tratamiento. Las muestras se prepararon utilizando el método desarrollado por Das *et al.,* (2018) para su posterior análisis en espectroscopia Laser-Micro-Raman de Horiba-Jobin Yvon LabRam HR800 (50X, 100-4000 cm-1, 6 mW, 532 nm, 10 s). Este método consiste en una digestión ácida, optimizada para liberar los nanotubos de tejido molido.

RT-PCR semicuantitativa. Para la extracción del ARN total de la planta, se usó el reactivo TRI Reagent (Ambion), siguiendo las instrucciones del fabricante. Se llevó a cabo una transcripción reversa de los ARN mensajeros en cada muestra usando un cebador poli-T y la enzima Superscript III Reverse Transcriptase (Invitrogen Corporation). La cuantificación de transcritos *ghs* se realizó mediante la

técnica de PCR dúplex semi cuantitativa usando la enzima Taq DNA polimerasa recombinante (Invitrogen Co.) y dos pares de cebadores específicos a los mensajeros del gen *ghs* (sentido: 5'-TGAATCCAATCAGTCCGC-3' y antisentido: 5'-GTACAATGTGTTGGCCAC-3') y el factor de transcripción *E1F4A* (sentido:5'-TGTACCATTCACCAAGGG-3´ y antisentido: 5'-TCCTCACGAACACTAGTC-3') descrito por Ponciano *et al*., 2012 como endógeno de guayule. La PCR se llevó a cabo utilizando un termociclador Labnet MultiGene Mini, en tres pasos: 30 s a 94 °C, 30 s., a 50 °C y 1 min a 72 °C y 23 ciclos. La cuantificación relativa se llevó a cabo utilizando Adobe Photoshop mediante la determinación de intensidad, o luminosidad, de cada banda correspondiente a *ghs* y al endógeno presente en los geles de agarosa al 1.5%. Para la determinación de la luminosidad de bandas, se tomó en cuenta el promedio de la luminosidad de píxeles en un área que delimita a cada banda de manera individual.

Diseño experimental. El diseño utilizado fue con un arreglo completamente al azar con un total de 160 plántulas de los cuales 40 corresponden a cada uno de los tratamientos del estudio (0 (control), 10, 25 y 50 ppm). A las 24, 48 y 72 HDDT (Horas Después la Diferenciación de los Tratamientos), se realizaron muestreos de 10 plántulas por tratamiento para la extracción de ácido ribonucleico (ARN) total. Las plantas restantes se usaron para detectar la presencia de NTCPM en éstas.

Análisis estadístico. Todos los análisis estadísticos se realizaron utilizando el paquete de software SPSS 19 para el cálculo del ANOVA de una vía, seguido de la prueba de comparación múltiple de Duncan ($P \leq 0.05$). Los valores presentados son las medias ± SE.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Detección de penetración y presencia de NTCPM en los órganos de la planta. La confirmación de la penetración y la localización de los NTCPM en los órganos de las plántulas (raíz, tallo y hoja) se realizó comparando los espectros Raman generados por NTCPM en estado puro con aquellos procedentes de aglomeración de NTCPM recuperados de las muestras por medio de una digestión con ácido nítrico. Todas las plántulas tratadas con el nanomaterial manifestaron espectros Raman similares a aquellos de NTCPM en el estado puro, caracterizados por las tres bandas: 1,300-1,350 cm^{-1}, 1,500-1,600 cm^{-1} y 2,600-2,700 cm^{-1} conocidas como banda D, G y D' respectivamente (Fig. 1).

La detección por medio del espectro Raman confirmó que, desde las primeras 24 horas, los NTCPM fueron absorbidos por las plántulas y transportados mediante los tejidos conductores del tallo hasta llegar a la hoja. En caso de las plántulas control, no se detectaron las tres bandas correspondientes a los NTCPM. Cabe mencionar que la absorción de los NTCPM en plantas de guayule en condiciones *in vivo*, y su detección en raíces, tallos y hojas por espectroscopía Raman, fueron confirmadas previamente en los laboratorios del departamento de Biociencias y Agrotecnología de CIQA/CONACYT (tesis de maestría: Daniel Soto Muñoz, 2019, programa de Posgrado En Agroplasticultura). La absorción de NTC se describió en cultivos como tomate (*Solanum lycopersicum*; Khodakovskaya *et al.,* 2011; Miralles *et al*., 2012), mostaza (*Brassica juncea*; Chen *et al.,* 2015) y lechuga (*Lactuca sativa*; Das *et al.,*

2018). No obstante, la absorción y movimiento de los nanomateriales de carbono y su translocación al interior de la planta depende de su nivel de aglomeración/dispersión y de su interacción con las diferentes moléculas orgánicas presentes en el medio (Villagarcia *et al.,* 2012).

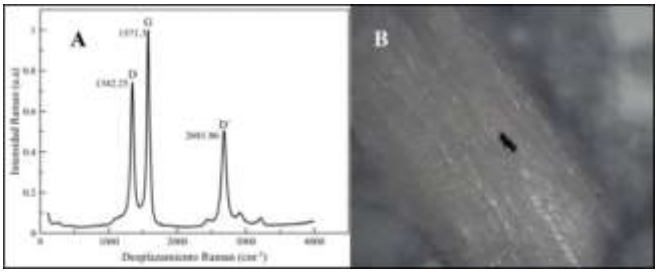

Fig. 1. A) Patrón de espectros característico de NTCPM puros mostrando las tres bandas D, G y D'. B) Imagen mostrando la aglomeración de NTCPM en tejido de hojas de guayule después de haber sido sometidos a una digestión con ácido nítrico.

Expresión genética de *ghs* por RT-PCR semicuantitativa. Las reacciones de RT-PCR duplex resultaron en la generación de fragmentos de 434 y 239 pb correspondientes a *ghs* y al gen endógeno, respectivamente en cada reacción. Los promedios de los valores de luminosidad de las bandas de *ghs* respecto al endógeno en cada muestra se calcularon para cada tratamiento a las 24, 48 y 72 HDDT (Fig. 2). A las 24 HDDT y como se puede apreciar en la Fig. 2, en todos los tratamientos suplementados con NTCPM hubo una supresión significativa en la expresión del gen *ghs*. La expresión genética del gen *ghs* se manifestó inversamente proporcional al aumento de la concentración de los NTCPM. Los promedios del ratio de intensidad del producto *ghs*/endógeno fueron: 0.704 ± 0.103; 0.550 ± 0.135; 0.427 ± 0.154 y 0.074 ± 0.181 respectivamente en los tratamientos 0, 10, 25 y 50 ppm. Registrando los valores más bajos en plántulas sometidas a una concentración de NTCPM de 50 ppm.

A las 48 HDDT, la supresión en la expresión del gen *ghs* sigue detectada en las muestras de las plántulas sometidas a NTCPM respecto a las plántulas control (Fig. 2, 48 HDDT), sin embargo, no se presentó la misma tendencia observada en las muestras con exposición a tratamiento después de 24 HDDT. Estadísticamente, la supresión detectada a las 48 HDDT no fue significativa. Los valores promedios de intensidad fueron: 0.433 ± 0.106 para el control, 0.320 ± 0.111, 0.309 ± 0.184, 0.395 ± 0.093 para las concentraciones 0, 10, 25 y 50 ppm de NTCPM, respectivamente. A 72 HDDT los análisis estadísticos no muestran diferencia significativa entre los tratamientos en comparación al control (Fig. 2, 72 HDDT) con los valores de promedio de intensidad de 0.581 ± 0.159, 0.481 ± 0.125, 0.606 ± 0.228 y 0.432 ± 0.137 para las concentraciones 0,10, 25 y 50 ppm de NTCPM, respectivamente.

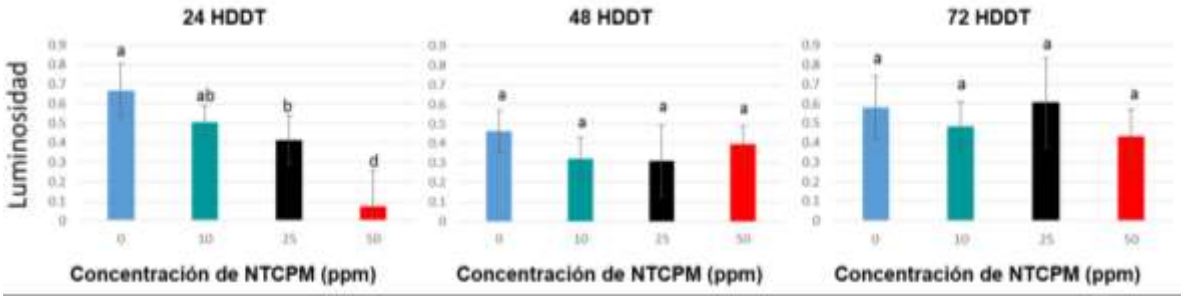

Fig. 2. Promedio de la luminosidad de píxeles de la amplificación del RNAm del gen *ghs* relativamente a la amplificación del endogeno *E1F4A* en plántulas de guayule sometidas a diferentes concentraciones de NTCPM (P≤0.05)

Los resultados mostraron que la exposición de plántulas de guayule a NTCPM causó significativa supresión en la expresión del gen *ghs* a tan solo 24 HDDT. Esto resalta, por un lado, la rapidez con la cual pueden moverse los NTCPM desde el medio de cultivo hacia los diferentes tejidos de la plántula y, por otro lado, indica que el estímulo provocado por estas nanopartículas difiere del estímulo provocado por frío o por falta de agua ya que ambos factores suelen inducir un aumento en la expresión del gen *ghs* (Stonebloom y Scheller, 2019; Dong *et al.,* 2021). La supresión de este último no fue permanente sino se levantó progresivamente a las 48 y 72 HDDT debido a una posible intervención de diferentes compuestos orgánicos como las peroxidasas cuya producción se incrementa en diferentes tejidos vegetales en respuesta a los intrusos exógenos (Kotchey *et al.,* 2013) y que son capaces de eliminar los átomos de carbono desintegrando por tanto las láminas enrolladas de grafeno formando carbono amorfo (You *et al*., 2017).

CONCLUSIONES

La absorción de NTCPM actúa como factor de estrés abiótico diferente al estrés provocado por frío o por falta de agua y su duración es limitada debido a posible intervención de los mecanismos de defensa de la planta.

AGRADECIMIENTOS

El presente trabajo ha sido financiado por el Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología, como Proyecto de Investigación Científica Básica – 2016 (No. de Proyecto: 288207) titulado: Rendimiento fotosintético y expresión genética de proteínas involucradas en la ruta de biosíntesis de hule en plántulas de guayule dopadas con nanotubos de carbono. El agradecimiento se extiende a la Dra. Graciela Elizabeth Morales por habernos facilitado los NTCPM y a la M.C. María del Rosario Rangel Ramírez por su apoyo con los análisis con el equipo Raman.

BIBLIOGRAFÍA

Balbuena TS, Salas JJ, Martınez-Force E, Garces R. and Thelen JJ. (2011). Proteome analysis of cold acclimation in sunflowers. J. Proteome Res. 10:2330–2346.

Benedict CR, Goss R, Greer PJ, Foster MA. (2010). The formation of rubber-producing cortical parenchyma cells in guayule (Parthenium argentatum Gray) by low temperature. Ind Crops Prod. 31:516–520.

Chakrabarty R, Qu Y, Ro DK. (2015). Silencing the lettuce homologs of small rubber particle protein does not influence natural rubber biosynthesis in lettuce (Lactuca sativa). Phytochem. 113:121-129.

Chen G, Qiu J, Liu Y, Jiang R, et al. (2015). Carbon nanotubes act as contaminant carriers and translocate within plants. Scientific Reports. 5: e15682.

Cherian S, Ryu SB, Cornish K. (2019). Natural rubber biosynthesis in plants, the rubber transferase complex, and metabolic engineering progress and prospects. Plant Biotechnol. J. 17:2041–2061

Daniel Soto Muñoz. (2019). Tesis de maestría: programa de Posgrado En Agroplasticultura CIQA-CONACyT. Repositorio Institucional de CIQA 2021.

Das KK, You Y, Torres M, et al. (2018). Development and application of a digestion-Raman analysis approach for studying multiwall carbon nanotube uptake in lettuce. Env Sci: Nano. 5:659–668.

Dong C, Ponciano G, Huo N. et al. (2021). RNASeq analysis of drought-stressed guayule reveals the role of gene transcription for modulating rubber, resin, and carbohydrate synthesis. Sci Rep 11:21610.

Fricke J, Hillebrand A, Twyman RM, Prufer D, Gronover CS. (2013). Abscisic acid-dependent regulation of small rubber particle protein gene expression in Taraxacum brevicorniculatum is mediated by TbbZIP1. Plant Cell Physiol. 54, 448–464.

Hillebrand A, Epping J, Wurbs D, Schulz C, Wahler D, Lenders M, Krzyzanek V, Prüfer D. (2012). Down-Regulation of Small Rubber Particle Protein Expression Affects Integrity of Rubber Particles and Rubber Content in Taraxacum brevicorniculatum. PLoS ONE. 7(7): e41874.

Jasso de Rodríguez D, Angulo-Sánchez JL, Rodríguez-García R. (2006). An overview of guayule research and development in Mexico. Ind Crops Prod. 24 (3): 269-273.

Khodakovskaya MV, deSilva K, Nedosekin DA, et al. (2011). Complex genetic, photothermal, and photoacoustic analysis of nanoparticle-plant interactions. Proc Natl Acad Sci USA. 108(3):1028-33.

Kim IJ, Ryu SB, Kwak YS y Kang H. (2004). A novel cDNA from Parthenium argentatum Gray enhances the rubber biosynthetic activity in vitro. J. Exp. Bot. 55(396): 377-385.

Kotchey GP, Zhao Y, Kagan VE, Star A. (2013). Peroxidase-mediated biodegradation of carbon nanotubes in vitro and in vivo. Adv. Drug Deliv. Rev. 65, 1921-1932.

Lin Ch, Fugetsu B, Su Y, Watari F. (2009). Studies on toxicity of multi-walled carbon nanotubes on Arabidopsis T87 suspension cells. J. Hazard. Mater. 170: 578–583.

Men X, Wang F, Chen G, Zhang H y Xian M. (2019). Biosynthesis of natural rubber: Current state and perspectives. Int J Mol Sci. 20(1): 50.

Miralles P, Church TL, Harris AT (2012). Toxicity, uptake, and translocation of engineered nanomaterials in vascular plants. Environ. Sci. Technol. 46(17):9224-39.

Murashige T & Skoog F. (1962) A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures. Physiol. Plant. 15:473-497.

Ponciano G, McMahan CM, Xie W, et al. (2012). Transcriptome and gene expression analysis in cold-acclimated guayule (Parthenium argentatum) rubber-producing tissue. Phytochem. 79:57-66.

Rousset A, Amor A, Punvichai T, et al. (2021). Guayule (Parthenium argentatum A. Gray), a Renewable Resource for Natural Polyisoprene and Resin: Composition, Processes andApplications. Molecules 26 (664): 1-22.

Stonebloom SH, Scheller HV. (2019). Transcriptome analysis of rubber biosynthesis in guayule (Parthenium argentatum gray). BMC Plant Biol. 19(71): 1-10.

Villagarcia H, Dervishi E, de Silva K, Biris AS, Khodakovskaya MV (2012). Surface Chemistry of Carbon Nanotubes Impacts the Growth and Expression of Water Channel Protein in Tomato Plants. Small 8(15):2328–2334.

Yan S, Zhao L, Li H, Zhang Q, et al. (2013). Single-walled carbon nanotubes selectively influence maize root tissue development accompanied by the change in the related gene expression. J Hazard Mater 246-247:110-118.

You Y, Das KK, Guo H, Chang C-W, et al. (2017). Microbial Transformation of Multiwalled Carbon Nanotubes by Mycobacterium vanbaalenii PYR-1. Environ. Sci. Technol. 51:2068-2076.

Yuan Z, Zhang Z, Wang X, et al. (2017). Novel impacts of functionalized multi-walled carbon nanotubes in plants: promotion of nodulation and nitrogenase activity in the rhizobium-legume system. Nanoscale, 9: 9921-9937.