

Expresión de cistatinas y su relación con la resistencia a *Tilletia indica* en trigo*

Cystatin expression and its relation with resistance to *Tilletia indica* in wheat

Luis Abraham Chaparro Encinas¹, Fannie Isela Parra Cota², Miguel Alfonso Camacho Casas², Guillermo Fuentes Dávila² y Pedro Figueroa López^{2§}

¹Instituto Tecnológico de Sonora. Calle 5 de febrero 818 Sur, Colonia Centro, Cd. Obregón, Sonora. CP. 85130. (bramchaparro@outlook.com). ²Campo Experimental Norman E. Bourlaug-INIFAP. Norman Borlaug km 12, Cd. Obregón, Sonora. CP. 85000. (parra.fannie@inifap.gob.mx; camacho.miguel@inifap.gob.mx; fuentes.guillermo@inifap.gob.mx). [§]Autor para correspondencia: figueroa.pedro@inifap.gob.mx.

Resumen

Desde el punto de vista económico, el mejoramiento genético es una de las mejores opciones para combatir al carbón parcial causado por el hongo *Tilletia indica*. Las cistatinas son una familia de proteínas inhibidoras de proteasas cuyos patrones de expresión podrían explicar un mecanismo eficaz de resistencia a carbón parcial. Los objetivos fueron evaluar la resistencia/susceptibilidad de líneas de trigo harinero (*Triticum aestivum*) y cristalino (*T. turgidum* ssp. *durum*) a *T. indica* y determinar los niveles de expresión relativa de genes de cistatinas; así como, determinar la correlación de dicha expresión con la resistencia fenotípica. Se estableció un ensayo con nueve líneas de trigo harinero y nueve líneas de trigo cristalino con diferentes grados de resistencia. Se inocularon 30 espigas por línea con esporidios alantoides y se determinó el porcentaje de infección. Los genes de cistatinas (Wheat Cystatin) WC1, WC3 y WC5 fueron amplificados mediante PCR en tiempo real para cuantificar la expresión normalizada (Δ Ct) de cistatinas. Posteriormente se obtuvo el coeficiente de correlación para la expresión normalizada y el porcentaje de infección. Los porcentajes estuvieron dentro de los rangos de 15.85% a 36.78% en trigo harinero y de 0.19% a 54.87% en trigo cristalino. Además, los niveles de expresión normalizada de cistatinas fueron comparativamente mayores

Abstract

From the economic point of view, genetic improvement is one of the best options to fight karnal bunt caused by *Tilletia indica* fungus. Cystatin is a family of protease inhibitory proteins whose expression patterns may explain an effective resistance mechanism to karnal bunt. The objectives of this research were to evaluate the resistance/susceptibility of bread wheat lines (*Triticum aestivum*) and durum (*T. turgidum* ssp. *durum*) to *T. indica* and to determine the relative expression levels of cystatin genes; as well as to determine the correlation of that expression with phenotypic resistance. A trial with 9 lines of wheat flour and 9 lines of durum wheat with different degrees of resistance was established. Thirty spikes per line with allantoic sporidia were inoculated and the percentage of infection determined. The cystatin genes (Wheat Cystatin) WC1, WC3 and WC5 were amplified by real-time PCR to quantify the normalized expression (Δ Ct) of cystatin. The correlation coefficient was then obtained for normalized expression and percentage of infection. The percentages of infection were within the range of 15.85% to 36.78% in wheat flour and from 0.19% to 54.87% in durum wheat. Furthermore, normalized levels of cystatin expression were comparatively higher in resistant lines ($p > 0.05$).

* Recibido: marzo de 2017
Aceptado: junio de 2017

en líneas resistentes ($p > 0.05$). Se presentaron coeficientes de correlación significativos ($p < 0.05$) de los genes WC3 y WC5 durante todas las etapas de muestreo, destacándose en estado vegetativo (0.969), embuche (0.841) y post-antesis (-0.789).

Palabras clave: *Triticum aestivum*, *Triticum turgidum*, carbón parcial.

Introducción

El trigo es el principal cultivo en Sonora, aportando alrededor de 48% de la producción nacional (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2015); sin embargo, diferentes factores bióticos y abióticos en la región propician la incidencia de algunos organismos fitopatógenos, los cuales, a través de diferentes mecanismos y vías de infección, pueden causar enfermedades en distintas etapas del desarrollo vegetal. Las enfermedades más importantes que afectan al trigo en la región es el carbón parcial, causado por el hongo *Tilletia indica* (Mitra), el cual se caracteriza por infectar desde el embrión al resto del grano, evidenciando manchas de café a negras y afectando las propiedades organolépticas a partir de 3% de infección (Bhat *et al.*, 1980). No tener un impacto significativo sobre el rendimiento del cultivo, ha sido una enfermedad de importancia cuarentenaria internacional que ha dificultado la exportación de las regiones donde la enfermedad se manifiesta, influyendo en la preferencia de los agricultores por el cultivo de trigo cristalino (*Triticum turgidum* subsp. *durum*). Lo anterior, debido a que notablemente se ha comprobado la alta resistencia de las variedades de trigo cristalino sobre las de trigo harinero (*Triticum aestivum*), generalmente susceptibles a la enfermedad (Camacho-Casas *et al.*, 2010).

El mejoramiento genético es una de las mejores opciones para combatir la enfermedad, ya que no incrementa el costo de producción y disminuye la utilización de sustancias nocivas. Aunque no se ha detectado inmunidad en variedades comerciales actuales, se han observado diferencias genéticas en la susceptibilidad a la enfermedad, en los últimos años se han liberado variedades de trigo obtenidas por los programas de mejoramiento considerando factores de rendimiento, calidad y el grado de resistencia a carbón parcial (Fuentes-Dávila y Singh, 2007; Figueroa-López *et al.*, 2012).

Las cistatinas son una familia de proteínas con actividad inhibitoria de proteasas; existe evidencia que las cistatinas juegan un papel determinante en la activación de los

Significant correlation coefficients ($p < 0.05$) of WC3 and WC5 genes during all stages of sampling were shown, highlighting in vegetative (0.969), boot stage (0.841) and post-anthesis (-0.789) stages.

Keywords: *Triticum aestivum*, *Triticum turgidum*, karnal bunt.

Introduction

Wheat is the main crop in Sonora, accounting for approximately 48% of the national production (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera, 2015); however, different biotic and abiotic factors in the region favor the incidence of some phytopathogenic organisms, which, through different mechanisms and infection pathways, can cause diseases in different stages of plant development. One of the most important diseases affecting the wheat crop in the region is karnal bunt, caused by *Tilletia indica* fungus (Mitra), which is characterized by infecting from the embryo to the rest of the grain, showing coffee to black stains and affecting the organoleptic properties from 3% of infection (Bhat *et al.*, 1980). Despite not having a significant impact on crop yield, it has been an international significance quarantine disease that has hindered exports from regions where the disease occurs, influencing the preference of farmers for the cultivation of durum wheat (*Triticum turgidum* subsp. *durum*). This because it has been found a remarkably high resistance of durum wheat varieties over bread wheat (*Triticum aestivum*), generally susceptible to the disease (Camacho-Casas *et al.*, 2010).

Genetic improvement is one of the best options to combat the disease, since it does not increase the production cost and decreases the use of potentially harmful substances. Although no immunity has been detected in current commercial varieties, genetic differences in susceptibility to disease have been observed, in recent years wheat varieties obtained by breeding programs have been released, considering not only yield and quality factors, but also the resistance degree to karnal bunt (Fuentes-Dávila and Singh, 2007; Figueroa-López *et al.*, 2012).

Cystatin is a family of proteins with protease inhibitory activity; there is evidence that cystatins play a role in activating the defense mechanisms of plants, having been

mecanismos de defensa de las plantas, habiéndose identificado en variedad cultivos (Margis *et al.*, 1998). La expresión de cistatinas difiere en determinadas fases de desarrollo de la planta y en respuesta a condiciones de estrés debido a la interacción que realiza con el patógeno. Algunos estudios han relacionado la expresión de cistatinas con la inhibición de plagas (Santamaría *et al.*, 2012) y enfermedades en diferentes cultivos como soya, arroz y papa (Azzouz *et al.*, 2005; Munger *et al.*, 2012). En trigo, varios autores señalan a las cistatinas como inhibidoras de patógenos como *Microdochium nivale*, causante del moho nival (Christova *et al.*, 2006), *Fusarium graminearum*, causante de la fusariosis de la espiga (Gottwald *et al.*, 2012) y *Tilletia indica*, agente causal del carbón parcial (Gupta *et al.*, 2010; Purwar *et al.*, 2010).

El mecanismo de defensa en el que participan las cistatinas comprende la inhibición de las cisteín-proteasas propias de *T. indica*, enzimas líticas cuya función es facilitar la nutrición del hongo a partir del grano; esta interacción afecta la viabilidad del desarrollo de la infección (Valdés-Rodríguez *et al.*, 2010). Por lo anterior los patrones de expresión de cistatinas en trigo pueden dilucidar un mecanismo eficaz para explicar la resistencia a carbón parcial. Encontrar evidencias de la relación entre niveles de expresión génica de cistatinas con la resistencia a carbón parcial puede confirmar su aptitud para ser integrados como marcadores genéticos en programas de mejoramiento. El objetivo del presente estudio fue determinar los patrones de expresión de tres genes de la familia cistatinas y su correlación con el porcentaje de infección de *T. indica* durante tres etapas de desarrollo del trigo.

Materiales y metodos

Ensayo en campo

El experimento se llevó a cabo en el Campo Experimental Norman E. Borlaug (CENEB) ubicado en el valle del Yaqui, Sonora (27° 22' 10.2" N, 109° 55' 51.5" W) durante el ciclo otoño-invierno 2014-2015. El ensayo consistió en nueve líneas de trigo harinero (Cuadro 1) y nueve líneas de trigo cristalino (Cuadro 2) seleccionadas de acuerdo al grado de susceptibilidad a carbón parcial manifestado en tres ciclos anteriores. Estas fueron inoculadas con esporidios de *T. indica* durante la etapa de embuche ó GS41-45 de la escala de Zadoks *et al.* (1974). La producción del inóculo (aislamiento, propagación y concentración esporidial) se realizó con la metodología de Fuentes-Dávila y Figueroa-López (2009).

identified in several cultures (Margis *et al.*, 1998). The expression of cystatin differs in certain stages of plant development and in response to stress conditions due to the interaction with the pathogen. Some studies have linked the expression of cystatins with inhibition of pests (Santamaría *et al.*, 2012) and diseases in different crops such as soybeans, rice and potato (Azzouz *et al.*, 2005; Munger *et al.*, 2012). In wheat, several authors point to cystatin as inhibitors of pathogens such as *Microdochium nivale*, causing the ptarmigan mold (Christova *et al.*, 2006), *Fusarium graminearum*, which causes *Fusarium* head blight (Gottwald *et al.*, 2012) and *Tilletia indica*, causal agent of karnal blunt (Gupta *et al.*, 2010; Purwar *et al.*, 2010).

The defense mechanism in which cystatin involves the inhibition of the cysteine proteases of *T. indica*, which are lytic enzymes whose function is to facilitate the nutrition of the fungus from the grain; this interaction affects the viability of infection development (Valdés-Rodríguez *et al.*, 2010). Because of the above, the expression patterns of cystatin in wheat can elucidate an effective mechanism to explain the resistance to partial carbon. Finding evidence of the relationship between cystatin gene expression levels with partial carbon resistance may confirm their ability to be integrated as genetic markers in breeding programs. The aim of this research was to determine the expression patterns of three genes of the cystatine family and their correlation with the percentage of *T. indica* infection during three stages of wheat development.

Materials and methods

Field test

The experiment was carried out at the Campo Experimental Norman E. Borlaug (CENEB) located in the Yaqui Valley, Sonora (27° 22' 10.2" N, 109° 55' 51.5" W) during the autumn-winter cycle 2014- 2015. The trial consisted of nine lines of wheat flour (Table 1) and nine lines of durum wheat (Table 2) selected according to the susceptibility degree to karnal blunt manifested in three previous cycles. These were inoculated with *T. indica* sporidia during step boot stage or GS41-45 of Zadoks *et al.* (1974) scale. The inoculum production (isolation, propagation and sporidial concentration) was carried out using the methodology of Fuentes-Dávila and Figueroa-López (2009).

Cuadro 1. Líneas de trigo harinero seleccionadas y su respuesta fenotípica histórica a *T. indica*.
Table 1. Selected lines of bread wheat and its historical phenotypic response to *T. indica*

Clave	Línea	Ciclos evaluados	Infección promedio (%)	Clasificación
BW1	ONAVAS F2009	2011-12, 2012-13, 2013-14	28.69	Susceptible
BW2	PBW343//CAR422/ANA/3/ELVIRA	2011-12, 2012-13, 2013-14	10.67	Resistente
BW3	SOKOLL*2/TROST	2011-12, 2012-13	6.95	Resistente
BW4	SOKOLL*2/3/BABAX/LR 42//BABAX	2011-12	17.7	Intermedio
BW5	ROLF07/4/BOW/NKT//CBRD/3/CBRD/5/FRET2/TUKURU//FRET2	2012-13, 2013-14	16.03	Intermedio
BW6	TACUPETOF2001/6/CNDO/R143//ENTE/MEXI_2/3/AEGILOPSSQUARROSA(TAUS)/4/WEAVER/5/PASTOR/7/ROLF07	2012-13	15.51	Intermedio
BW7	CHYAK/PAURAQ	2012-13, 2013-14	34.11	Susceptible
BW8	KACHU/BECARD//WBLL1*2/BRAMBLING	2012-13, 2013-14	35.03	Susceptible
BW9	INIA CHURRINCHE/KIRITATI	2013-14	7.87	Resistente

Fuente: Programa de Mejoramiento Genético de Trigo (CENEB).

Cuadro 2. Líneas de trigo cristalino seleccionadas y su respuesta fenotípica histórica a *T. indica*.
Table 2. Selected crystal wheat lines and their historical phenotypic response to *T. indica*.

Clave	Línea	Ciclos evaluados	Infección promedio (%)	Clasificación
DW1	HUATABAMPO ORO C2009	2012-13, 2013-14	6.69	Susceptible
DW2	WDRAIL_1/TOSKA_26//PLATA_6/GREEN_17/3/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3/4/SORA/2*PLATA_12//RASCON_37/6/YAV79/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/MINIMUS/COMB DUCK_2//CHAM_3/3/GREEN_19	2012-13, 2013-14	1.45	Resistente
DW3	TARRO_1/2*YUAN_1//AJAIA_13/YAZI/3/SOMAT_44/INTER_8/4/ARMENT//	2010-11	56.73	Susceptible
DW4	SOOTY_9/RASCON_37/3/SOOTY_9/TARRO_1//AJAIA_2/10/PLATA_10/6/MQUE/4/USDA573//QFN/AA_7/3/ALBA-D/5/AVO/HUI/7/PLATA_13/8/THKNEE_11/9/CHEN/ALTAR84/3/HUI/POC//BUB/RUFO/4/FNFOOT/11/RISSA/GAN//POHO_1/3/PLATA_3//CREX/ALLA/4/JUPARE C2001/5/ARMENT//SRN_3/NIGRI	2010-11, 2013-14	0.14	Resistente
DW5	CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN/4/JUPARE C2001/5/CNDO/PRIMADUR//HAI-OU_17/3/SNITAN/6/RISSA/GAN//POHO_1/3/PLATA_3//CREX/ALLA*2/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1	2012-13	2.47	Resistente
DW6	SOMAT_3/GREEN_22/4/GODRIN/GUTROS//DUKEM/3/THKNEE_11/6/YAV79/4/ARMENT//SRN_3/NIGRIS_4/3/CANELO_9.1/5/MINIMUS/COMB DUCK_2//CHAM_3/3/GREEN_19	2012-13, 2013-14	4.5	Intermedio

Fuente: Programa de Mejoramiento Genético de Trigo (CENEB).

Cuadro 2. Líneas de trigo cristalino seleccionadas y su respuesta fenotípica histórica a *T. indica* (continuación).
Table 2. Selected crystal wheat lines and their historical phenotypic response to *T. indica* (continuation).

Clave	Línea	Ciclos evaluados	Infección promedio (%)	Clasificación
DW7	CHEN_1/TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/4/SORA/PLATA_12/5/STOT// ALTAR84/ALD/6/SOMAT_3/PHAX_1//TILO_1/LOTUS_4/7/ AJAIA_12/F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/4/CHEN_1/ TEZ/3/GUIL//CIT71/CII/5/SORA/2*PLATA_12//SOMAT_3	2012-13, 2013-14	6.04	Susceptible
DW8	GERUFTEL-1/BELLAROI/9/CBC509CHILE/6/ECO/ CMH76A.722// BIT/3/ALTAR84/4/AJAIA_2/5/KJOVE_1/7/AJAIA_12/ F3LOCAL(SEL.ETHIO.135.85)//PLATA_13/8/SOITY_9/ RASCON_37//WODUCK/CHAM_3	2013-14	1.2	Intermedio
DW9	TUNSYR-2/BELLAROI/3/SOITY_9/RASCON_37// GUAYACAN INIA	2013-14	0.06	Resistente

Fuente: Programa de Mejoramiento Genético de Trigo (CENEB).

Evaluación de respuesta fenotípica

A la cosecha se trillaron manualmente 30 espigas inoculadas por variedad y se determinó el porcentaje de infección mediante el conteo de granos infectados y sanos por espiga, por unidad experimental y por línea; el porcentaje promedio corresponde a la respuesta fenotípica de cada variedad.

Diseño de oligonucleótidos

Las secuencias de los oligonucleótidos utilizados se listan en el Cuadro 3. Se usaron diversos programas, para la edición y alineamiento de secuencias como CLC Sequence Viewer y la herramienta NCBI Primer Designing Tool, ajustando el tamaño de amplicón a 200 pb. Se incluyó parte de las regiones de la cadena 3' no codificante para asegurar especificidad entre genes de cistatinas. Se probó la amplificación de los oligonucleótidos (sentido y antisentido) mediante RT-PCR punto final y electroforesis en gel de agarosa al 2%.

Evaluation of phenotypic response

To the crop, 30 spikes inoculated by variety were manually harvested and the percentage of infection was determined by the count of infected and healthy grains per spike per experimental unit and per line; the average percentage corresponds to the phenotypic response of each variety.

Oligonucleotides design

The sequences of the used oligonucleotides are listed in Table 3. Various programs were used for both editing and sequence alignment such as CLC Sequence Viewer and the NCBI Primer Designing Tool, adjusting the amplicon size to 200 bp. Part of the non-coding 3' chain regions were included to ensure specificity between cystatine genes. Amplification of the oligonucleotides (sense and antisense) was tested by end-point RT-PCR and 2% agarose gel electrophoresis.

Cuadro 3. Oligonucleótidos para RT-PCR.
Table 3. Oligonucleotides for RT-PCR.

Accesión	Gen	Secuencia	
		Sentido	Antisentido
AB038392	Wheat Cystatin 1 (WC1)	GGCCAATGCCCTGCTGGA	GCGCCTTATGAGTTATGCGCTTG
AB038394	Wheat Cystatin 3 (WC3)	GCCAATGCCCTGCTGGAGT	GCCTCATGCGATTGCAGCG
AF364099	Wheat Cystatin 5 (WC5)	GCTCACCTGCCATAGGCTGT	CCTGCCACTTACCACCTTGTG
M90077	Elongation Factor 1-Alpha (EF1A)	GTGACATGAGGCAAAGTGTGGC	TGACACATCAACAGGGCGCA
AB042193	TaWIN1	AGGAAGCCCCAGCTCCAAAAG	CCAGCCAGCATTATCAGCACC

Muestreo

Se colectaron espigas y tejido foliar por duplicado para cada línea durante tres etapas del desarrollo fenológico, etapa vegetativa (SV), embuche post inoculación (S1Pi), y pos antesis (S2), correspondiente a GS16-19, GS41-45 y GS69 respectivamente. Dichas muestras se congelaron inmediatamente con nitrógeno líquido y se almacenaron a -80°C hasta su procesamiento.

Extracción de ARN

La extracción de ARN total de 100-200 mg de tejido vegetal congelado se realizó con el reactivo Trizol[®] (Invitrogen), siguiendo las instrucciones del fabricante con modificaciones. Estas consistieron en la adición de una solución salina (Citrate de Sodio 0.8 M + NaCl 1.2 M) durante la fase de precipitación en proporción 1:1 v/v con isopropanol y durante la fase de purificación con LiCl (8 M) por hora a 4°C . El RNA fue analizado por electroforesis para verificar su integridad y su concentración y pureza se determinaron por espectrofotometría en el equipo NanoDrop 1000 (NanoDrop Products). Posteriormente, el ARN fue retrotranscrito para generar ADN complementario (ADNc) usando la enzima SuperScript (Invitrogen) de acuerdo a las instrucciones del fabricante.

Reacción en cadena de la polimerasa (PCR) tiempo real

Las amplificaciones se realizaron usando detección química con SYBR Green en reacciones de 20 μl en placas de 96 pozos en un termociclador C1000 con sistema de tiempo real CFX96 (Bio-Rad).

Análisis de expresión génica y correlación

La expresión normalizada de cada gen se calculó usando el método comparativo de Ct (Livak y Schmittgen, 2001). Los datos de abundancia de los transcritos fueron normalizados con la abundancia promedio de los transcritos de genes de referencia endógenos para obtener la expresión normalizada con la fórmula $2^{-\Delta\text{Ct}}$, donde: $\Delta\text{Ct} = (\text{Ct del gen blanco} - \text{Ct promedio de los genes referencia})$.

Se realizó análisis de correlación de Pearson, considerando los porcentajes de infección contra valores de expresión normalizada ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) individual en tejido foliar y espigas. Se obtuvo el coeficiente de correlación (R), el coeficiente de determinación (R^2) y el nivel de significancia al 95% con el paquete informático STATGRAPHIC Centurion XVI.

Sampling

Spikes and foliar tissue were collected in duplicate for each line during three stages of phenological development, vegetative stage (SV), post inoculation (S1Pi), and post-anthesis (S2), corresponding to GS16-19, GS41-45 and GS69 respectively. These samples were immediately frozen with liquid nitrogen and stored at -80°C until processing.

RNA extraction

Extraction of total RNA from 100-200 mg of frozen plant tissue was performed with Trizol[®] (Invitrogen) reagent, following the manufacturer's instructions with modifications. These consisted of the addition of a saline solution (Sodium Citrate 0.8 M + 1.2 M NaCl) during the precipitation phase in a 1:1 v/v ratio with isopropanol and during the purification phase with LiCl (8 M) per hour at 4°C . The RNA was analyzed by electrophoresis to verify its integrity and its concentration and purity were determined by spectrophotometry in the NanoDrop 1000 (NanoDrop Products). Subsequently, the RNA was retrotranscribed to generate complementary DNA (cDNA) using the enzyme SuperScript (Invitrogen) according to the manufacturer's instructions.

Real-time polymerase chain reaction (PCR)

Amplifications were performed using chemical detection with SYBR Green in reactions of 20 μl in 96-well plates in a C1000 thermocycler with CFX96 (Bio-Rad) real-time system.

Analysis of gene expression and correlation

The normalized expression of each gene was calculated using the comparative method of Ct (Livak and Schmittgen, 2001). The abundance data of the transcripts were normalized with the average abundance of endogenous reference gene transcripts to obtain the normalized expression with the formula $2^{-\Delta\text{Ct}}$, where: $\Delta\text{Ct} = (\text{Ct of the white gene} - \text{average Ct of the reference genes})$.

Pearson correlation analyzes were performed, considering percentage infection data against normalized expression values ($2^{-\Delta\text{Ct}}$) individually in leaf tissue and spikes. The Pearson correlation coefficient (R), the coefficient of determination (R^2) and the level of significance at 95% confidence were obtained using the software package STATGRAPHIC Centurion XVI.

Resultados y discusión

Porcentaje de infección

Se inspeccionaron 30 espigas por línea clasificando los granos en “infectados” y “sanos” de acuerdo a la presencia de daño típico por carbón parcial, posteriormente se calculó el porcentaje de infección por espiga y el porcentaje promedio por línea. El Cuadro 4 muestra que la línea de trigo harinero BW3 presentó el porcentaje más bajo de infección (4.94%), mientras la línea con mayor susceptibilidad fue BW8 con 35.68%. Además, las líneas clasificadas como de respuesta intermedia BW4, BW5 y BW6 se mostraron resistente (8.27%), susceptible (33.39%) y susceptible (32.94%) respectivamente.

El trigo cristalino ha mostrado históricamente menores niveles de infección a comparación con el trigo harinero. En el Cuadro 4 se muestran los porcentajes de infección de carbón parcial en trigo cristalino, en éstos se observa que la línea DW2 presenta 0.19% de infección. En contraste, la línea DW3 fue la más susceptible (60.33%). Es notorio el agrupamiento de las variedades en 3 niveles de resistencia a *T. indica*, resistentes (DW2, DW4, DW5 y DW9), susceptibles (DW1, DW3 y DW7) e intermedios, los cuales tienden a agruparse como resistente (DW6) y susceptible (DW8). Es posible atribuir las variaciones fenotípicas a interacciones genéticas en las líneas de trigo, estas variaciones pueden sugerir la dominancia parcial del atributo de resistencia a carbón parcial.

Expresión normalizada (ΔCt)

Para el cálculo de la expresión génica se requiere normalizar usando datos de expresión de uno o más genes endógenos. Estos se eligieron de la bibliografía con base en la homogeneidad en distintas etapas de desarrollo y tejidos; destacándose EF1A en diferentes tejidos bajo condiciones de estrés biótico y TaWIN1 por su estabilidad en hojas bandera hasta la formación de grano lechoso (Tenea *et al.*, 2011).

Los transcritos de WC1, WC3 y WC5 fueron diferencialmente expresados en genotipos resistentes y susceptibles en todas las etapas de desarrollo evaluadas, asimismo los patrones de expresión normalizada fueron diferentes en tejido foliar y espigas, lo anterior fue determinado mediante pruebas de rangos múltiples Tukey al 95%.

Results and discussion

Percentage of infection

30 spikes per line were analyzed, classifying grains as “infected” and “healthy” according to the presence of typical damage by karnal bunt, then the percentage of spike infection and the average percentage per line were calculated. Table 4 shows that the wheat flour line BW3 showed the lowest percentage of infection (4.94%), while the line with the highest susceptibility was BW8 with 35.68%. In addition, the lines classified as intermediate response BW4, BW5 and BW6 were resistant (8.27%), susceptible (33.39%) and susceptible (32.94%) respectively.

Cuadro 4. Respuesta fenotípica de trigo a *T. indica*.
Table 4. Phenotypic response of wheat to *T. indica*.

Trigo harinero		Trigo cristalino	
Clave	Infección (%)	Clave	Infección (%)
BW1	16.31	DW1	13.99
BW2	15.67	DW2	0.19
BW3	4.94	DW3	54.87
BW4	8.27	DW4	0.87
BW5	32.94	DW5	2.45
BW6	33.39	DW6	0.88
BW7	21.96	DW7	12.68
BW8	35.68	DW8	13.35
BW9	9.85	DW9	1.24

Durum wheat has historically shown lower levels of infection compared to flour wheat. The percentages of karnal bunt infection in durum wheat are shown in Table 4, where the DW2 line shows a 0.19% infection. In contrast, the DW3 line was the most susceptible (60.33%). It is notorious the grouping of the varieties in 3 levels of resistance to *T. indica*, resistant (DW2, DW4, DW5 and DW9), susceptible (DW1, DW3 and DW7) and intermediate, which tend to be classified as resistant (DW6) and susceptible (DW8). It is possible to attribute phenotypic variations to genetic interactions in wheat lines, these variations may suggest the partial dominance of the partial carbon resistance attribute.

En tejido foliar, las cistatinas se expresaron de forma diferencial durante el desarrollo de la planta (Figura 1). Los niveles de expresión de WC1 fueron significativos ($p < 0.05$) mayores en las líneas resistentes BW3 en SV (1.015) y BW2 en S1 (1.610) y S2 (1.132). Este patrón se repite en la expresión de WC3, con BW3 en SV (1.182) y BW2 en S1 (2.88) y S2 (2.186). Por otra parte, el comportamiento de los niveles de WC5 fue mixto, ya que la mayor expresión en SV corresponde a las líneas BW1 (0.003), BW3 (0.0026) y BW2 (0.002), teniendo la primera un valor de respuesta susceptible (16.31%). Por otra parte, en S1 la línea BW8 fue la que más expresó WC5 (0.007), siendo ésta la de mayor susceptibilidad (35.68%), mientras en S2 las líneas BW1 y BW2 mostraron los valores más altos, 0.0043 y 0.0036 respectivamente.

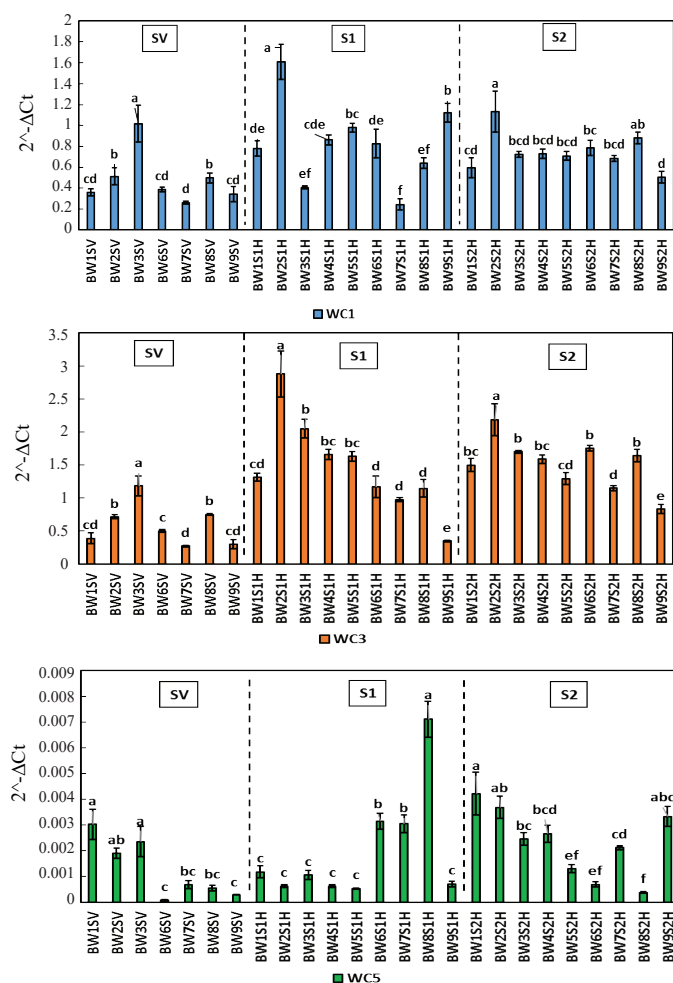


Figura 1. Expresión relativa de cistatinas WC1, WC3 y WC5 en hojas de trigo harinero durante las etapas SV, S1 y S2. Los literales indican diferencia significativa ($p < 0.05$).
Figure 1. Relative expression of cystatins WC1, WC3 and WC5 in wheat flour leaves during stages SV, S1 and S2. Literals indicate significant difference ($p < 0.05$).

Standard expression (ΔCt)

For the calculation of gene expression it is required to normalize using expression data from one or more endogenous genes. These were selected from the literature based on homogeneity at different stages of development and tissues; EF1A standing out in various tissues under biotic stress conditions and TaWIN1 by its stability in flag leaves until the formation of milky grain (Tenea *et al.*, 2011).

The WC1, WC3 and WC5 transcripts were differentially expressed in resistant and susceptible genotypes at all development stages, and the normalized expression patterns were different in leaf tissue and spikes. This was determined using 95% Tukey multiple rank tests.

In leaf tissue, cystatin was differentially expressed during plant development (Figure 1). Expression levels of WC1 were significantly ($p < 0.05$) higher in the resistant lines BW3 in SV (1.015) and BW2 in S1 (1.61) and S2 (1.132). This pattern is repeated in the WC3 expression, with BW3 in SV (1.182) and BW2 in S1 (2.88) and S2 (2.186). On the other hand, the behavior of the WC5 levels was mixed, since it is observed that the greater expression in SV corresponds to the lines BW1 (0.003), BW3 (0.0026) and BW2 (0.002), the first one having a susceptible response value (16.31%). On the other hand, in the S1 the BW8 line was the one that most expressed WC5 (0.007), being this one the one that showed greater susceptibility (35.68%), whereas in S2 the lines BW1 and BW2 showed the highest values, 0.0043 and 0.0036 respectively.

The spike constitutes a focal point of activity in wheat, the nutrients directed to the formation of the grain are mobilized and regulated towards here, is also where *T. indica* finds appropriate conditions to proliferate or reproducing; so that the level of expression of the cystatin can be affected by both the phenological stage and the presence of the pathogen. As shown in Figure 2, the normalized expression of cystatin was comparatively lower than that shown in leaf tissue (Figure 1) for WC1 and WC3, while WC5 was higher.

The WC1 gene was more expressed in the BW5 susceptible line with 0.33 during S1, also during S2 the highest values were in the susceptible BW7 (1.222) and BW8 (0.568). In the expression of WC3 it is observed that during S1 the susceptible line BW5 followed by the resistant BW3 and BW9 showed the highest values (0.434, 0.362 and 0.346

La espiga constituye un punto focal de actividad en el trigo, hacia ésta se movilizan y regulan los nutrientes dirigidos a la formación del grano, además es donde *T. indica* encuentra las condiciones para reproducirse; por lo que el nivel de expresión de las cistatinas puede verse afectado, tanto por la etapa fenológica como por la presencia del patógeno. Como se observa en la Figura 2, la expresión normalizada de cistatinas fue comparativamente menor a la presentada en tejido foliar (Figura 1) para WC1 y WC3, mientras WC5 fue mayor.

respectively). The significant increase in the normalized expression values in S2 (post-anthesis stage) implies an inherent gene activity to the plant development in all evaluated varieties. However, since the normalized expression values of WC3 are greater than those observed for WC1 and WC5, it could suggest that the presence of the pathogen is affecting the expression of WC3, probably as part of a defensive system in the plant. The expression of WC5 decreases from S1 to S2 in most of the lines except for the resistant BW4 (0.583), the susceptible BW7 (0.324) and the resistant BW3 (0.163). When comparing these values with the controls, it was observed that in the controls the normalized expression of WC5 is higher, so that WC5 levels decrease in the presence of the pathogen.

In durum wheat (Figure 3), the resistant lines DW2, DW4, DW6 and DW9 showed significantly higher expression levels in SV and S1 for WC1, WC3 and WC5. During S2 stage the expression levels of WC1 and WC3 (including controls) decreased, so that in durum wheat the levels of WC1 and WC3 appear to be more affected by phenological development than by the interaction with the fungus. The expression patterns of WC5 varied little from S1 to S2; standing out the DW4 and DW6 resistant lines in S1, as well as DW8 and DW5 in S2. The above could indicate a background transcript of WC5 lower or similar to that of the endogenous genes.

The expression patterns of cystatin in spikes of durum wheat (Figure 4) differ markedly from that shown in foliar tissue; WC1 as WC3 reached significantly lower levels. WC5 expression in spikes exceeded the levels reached in leaf tissue during S2, this behavior was also observed in flour wheats. The DW5 and DW9 lines excelled in the two growth stages in all three genes. The latter are resistant (2.45% and 1.24%).

In both, bread wheat and durum wheat the intense reaction produced during S2 was remarkable, this is in agreement with numerous investigations that have reported the occurrence of expression peaks of cystatin during the post-fertilization stage; also this expression is significantly stronger in resistant genotypes than in the susceptible ones (Gupta *et al.*, 2010; Purwar *et al.*, 2010). These results indicate that increased expression of WC1, WC3 (in spikes) and WC5 (leaves) could be related to resistance due to the increase in S2, in the stage of greatest vulnerability to infection of *T. indica*, since the grain where the pathogen will colonize is formed.

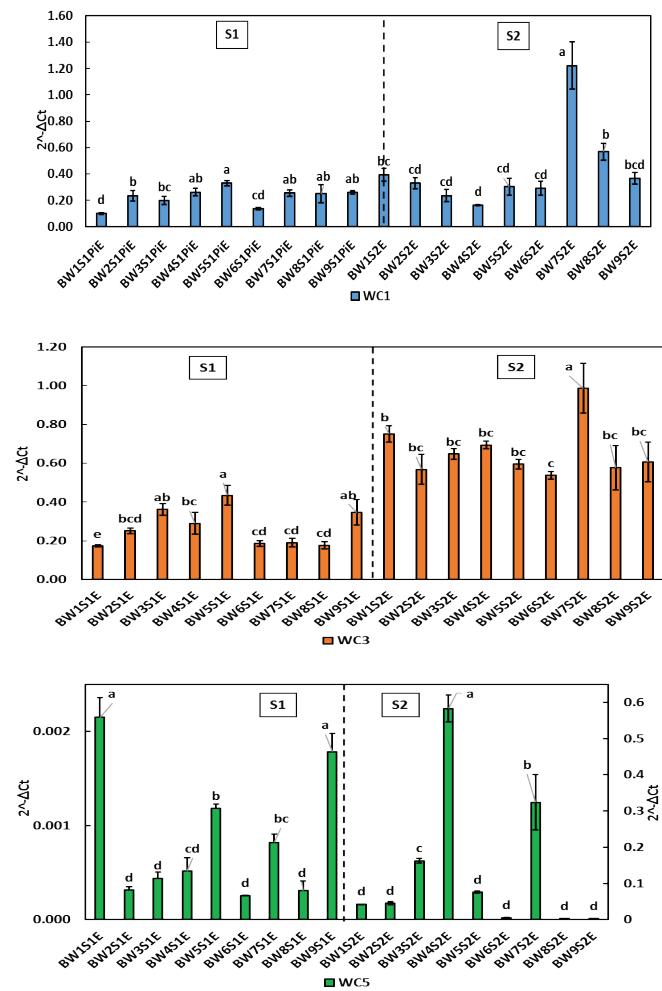


Figura 2. Expresión relativa de cistatinas WC1, WC3 y WC5 en hojas de trigo harinero durante las etapas S1 y S2. Los literales indican diferencia significativa ($p < 0.05$).
Figure 2. Relative expression of cystatins WC1, WC3 and WC5 in wheat flour leaves during S1 and S2 stages. Literals indicate significant difference ($p < 0.05$).

El gen WC1, se expresa más en la línea susceptible BW5 con 0.33 durante S1, a su vez durante S2 los mayores valores fueron en las susceptibles BW7 (1.222) y BW8

(0.568). En la expresión de WC3 se observa que durante S1 la línea susceptible BW5 seguida de las resistentes BW3 y BW9 fueron los valores más altos (0.434, 0.362 y 0.346 respectivamente). El incremento significativo de los valores de expresión normalizada en S2 (etapa de pos antesis) implica una actividad génica inherente al desarrollo de la planta en todas las variedades evaluadas. Sin embargo, dado que los valores de expresión normalizada de WC3 son mayores que los observados de WC1 y WC5 podría sugerir que la presencia del patógeno está afectando la expresión de WC3, probablemente como parte de un sistema defensivo en la planta. Por su parte, la expresión de WC5 disminuye de S1 a S2 en la mayoría de las líneas a excepción de la resistente BW4 (0.583), la susceptible BW7 (0.324) y la resistente BW3 (0.163). Al comparar estos valores con los testigos, se observó que en los testigos la expresión normalizada de WC5 es mayor, por lo que los niveles de WC5 disminuyen en presencia del patógeno.

En trigo cristalino (Figura 3), las líneas resistentes DW2, DW4, DW6 y DW9 presentan los niveles de expresión significativamente mayores en SV y S1 para WC1, WC3 y WC5. Durante la etapa S2 disminuyeron los niveles de expresión de WC1 y WC3 (incluyendo los controles) por lo que en trigo cristalino los niveles de WC1 y WC3 parecen verse más afectados por el desarrollo fenológico que por la interacción con el hongo. Los patrones de expresión de WC5 variaron poco de S1 a S2; se destacan las líneas resistentes DW4 y DW6 en S1, así como DW8 y DW5 en S2. Lo anterior, podría indicar una transcripción de fondo de WC5 inferior o similar a la de los genes endógenos.

Los patrones de expresión de cistatinas en espigas de trigo cristalino (Figura 4) difieren marcadamente de la presentada en tejido foliar; WC1 como WC3 alcanzaron niveles significativamente inferiores. La expresión de WC5 en espigas superó los niveles alcanzados en tejido foliar durante S2, este comportamiento también se observó en los trigos harineros. Las líneas DW5 y DW9 sobresalieron en las dos etapas de crecimiento en los tres genes. Estos últimos son resistentes (2.45% y 1.24%).

Tanto en trigo harinero como en cristalino fue notable la intensa reacción producida durante S2, ésta concuerda con numerosas investigaciones que han reportado la ocurrencia de picos de expresión de cistatinas durante la etapa posterior a la fecundación; además esta expresión es significativamente más fuerte en los genotipos resistentes que en los susceptibles (Gupta *et al.*, 2010, Purwar, *et al.*,

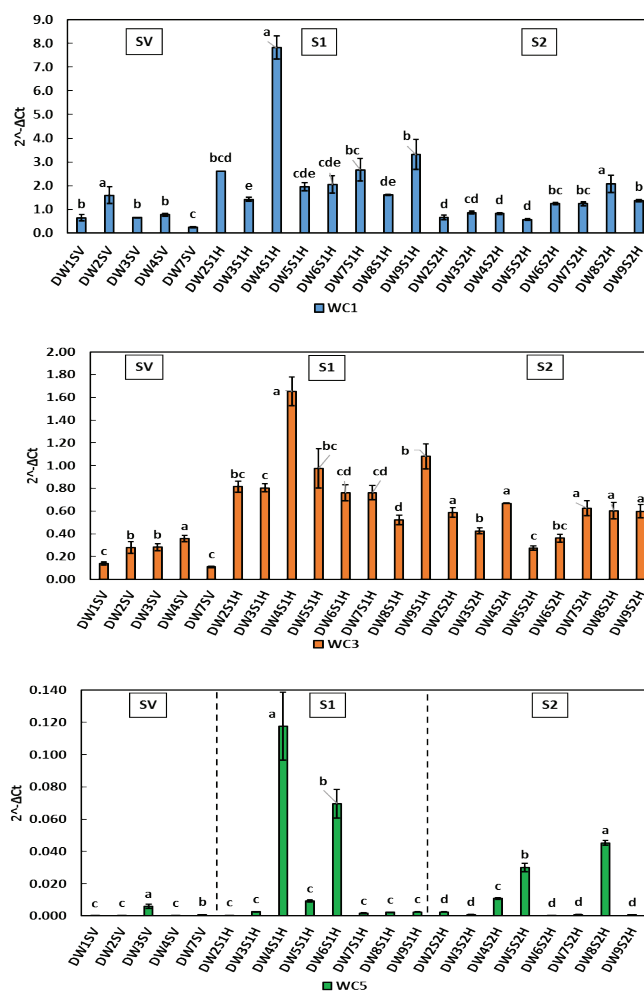


Figura 3. Expresión relativa de cistatinas WC1, WC3 y WC5 en hojas de trigo cristalino durante las etapas SV, S1 y S2. Los literales indican diferencia significativa ($p < 0.05$).
Figure 3. Relative expression of cystatins WC1, WC3 and WC5 in durum wheat leaves during stages SV, S1 and S2. Literals indicate significant difference ($p < 0.05$).

Correlation analysis

The post-inoculation embedding step (S1) was considered focal point of cystatin gene activity; this behavior was correlated with the resistance level to karnar bunt in bread wheat spikes with the WC3 gene. This correlation follows the linear model with a coefficient of -0.709, a coefficient of determination of 50.30% and an equation of the line of $WC3 = 0.357966 - 0.0056264 * (\%)$ infection at 95% significance. The above allows to attribute 50.30% of the variation of infection percentage to the gene expression; that is, the increase in the relative expression of WC3 causes a decrease in the percentage of infection.

2010). Estos resultados indican que la mayor expresión de WC1, WC3 (en espigas) y WC5 (en hojas) podría estar relacionada con la resistencia debido a su incremento en S2, la etapa de mayor vulnerabilidad a la infección de *T. indica*, ya que se forma el grano donde el patógeno colonizará.

Análisis de correlación

La etapa de embuche post inoculación (S1) se consideró punto focal de actividad génica de cistatinas; este comportamiento se vio correlacionado con el nivel de resistencia al carbón parcial en espigas de trigo harinero con el gen WC3. Esta correlación sigue el modelo lineal con un coeficiente de -0.709, un coeficiente de determinación de 50.30% y una ecuación de la recta $WC3 = 0.357966 - 0.0056264 * (\%)$ infección a 95% de significancia. Lo anterior permite atribuir 50.30% de la variación del porcentaje de infección a la expresión génica; es decir, el aumento de la expresión relativa de WC3 provoca un decremento del porcentaje de infección.

En la etapa post antesis, el comportamiento de la expresión relativa de WC5 en hojas de trigo harinero presentó correlación significativa ($p < 0.05$) con el porcentaje de infección, esta se ajustó al modelo lineal con una ecuación de la recta de la siguiente forma: $(\%)$ infección = $35.9286 - 4937.86 * WC5$. El coeficiente de correlación indica que existe una relación moderadamente fuerte en sentido inverso (-0.789) y un coeficiente de determinación considerable (62.34%).

Estos resultados evidencian una considerable relación entre la expresión de cistatinas y el atributo de resistencia a carbón parcial; además, sugiere cierta sinergia entre WC1, WC3 y WC5 al regular la actividad de las cisteín proteasas durante la maduración de la semilla (Purwar *et al.*, 2012), cuando las proteínas deben ser acumuladas para el almacenamiento en respuesta a la infección de *T. indica*.

Conclusión

Los genes de cistatinas se expresan de forma diferencial en función de la etapa fenológica y el tejido, alcanzando una intensidad sostenida en el posterior a la fecundación. La presencia de *T. indica* induce una respuesta en la expresión de cistatinas a partir de las 12 h posteriores a la inoculación (S1), lo que sugiere que las cistatinas pueden formar parte del mecanismo de defensa de la planta.

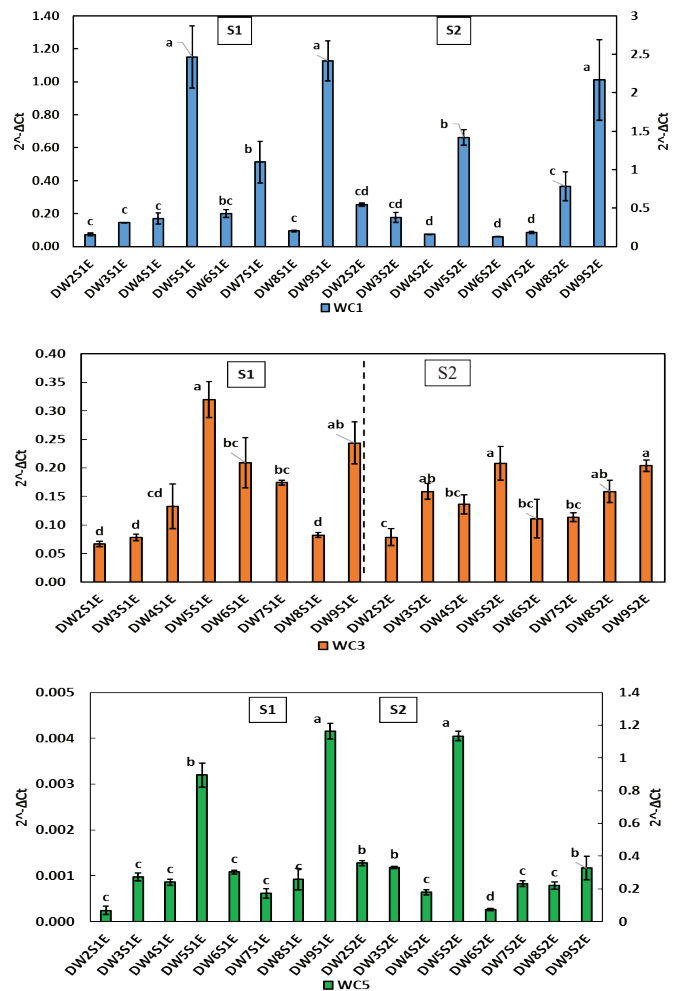


Figura 4. Expresión relativa de cistatinas WC1, WC3 y WC5 en espigas de trigo cristalino durante las etapas S1 y S2. Los literales indican diferencia significativa ($p < 0.05$).
Figure 4. Relative expression of cystatins WC1, WC3 and WC5 in durum wheat spikes during stages S1 and S2. Literals indicate significant difference ($p < 0.05$).

In the post anthesis stage, the behavior of the relative expression of WC5 in bread wheat leaves showed significantly correlation ($p < 0.05$) with the infection percentage, it was adjusted to the linear model with a line equation as follows: $\% \text{ Infection} = 35.9286 - 4937.86 * WC5$. The correlation coefficient indicates that there is a moderately strong inverse relationship (-0.789) and a significant coefficient of determination (62.34%).

These results evidenced a significant relationship between the expression of cystatin and the karnal bunt resistance attribute; it also suggests some synergy between WC1, WC3 and WC5 by regulating the activity of cysteine proteases

Las cistatinas pueden ser buenas candidatas para considerarse como marcadores del mecanismo de defensa de las plantas, no solo a *T. indica*, sino a otros patógenos e incluso áfidos. Por lo tanto, es factible que los patrones de expresión de las cistatinas diluciden el mecanismo de resistencia al carbón parcial y una herramienta eficiente para el mejoramiento genético de trigo. No obstante, es necesario determinar cuáles cistatinas actúan solo sobre los patógenos y cuáles tienen actividad endógena, esto con el propósito de no erosionar la maquinaria genética inherente de la planta.

Agradecimientos

Los autores(a) agradecen al Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP) por sufragar el presente estudio a través del Proyecto de Investigación Recursos Fiscales Núm. 11591832543. Asimismo, al Instituto Tecnológico de Sonora y al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por su apoyo financiero a través de la beca Núm. 539689.

Literatura citada

- Azzouz, H.; Campan, E.; Cherqui, A.; Saguez, J.; Couty, A.; Jouanin, L.; Kaiser, L. and Giordanengo, P. 2005. Effects of plant protease inhibitors, oryzacystatin I and soybean Bowman-Birk inhibitor, on the aphid *Macrosiphum euphorbiae* (Homoptera, Aphididae) and its parasitoid *Aphelinus abdominalis* (Hymenoptera, Aphelinidae). *J. Insect. Physiol.* 51(8):941-951.
- Bhat, R.; Deosthale, Y. G.; Roy, D. N.; Vijayaraghavan, M. and Tulpule, P. G. 1980. Nutritional and toxicological evaluation of Karnal bunt affected wheat. *Ind. J. Exp. Biol.* 18:1333-1335.
- Camacho, C. M. A.; Chávez, V. G.; Figueroa, L. P.; Fuentes, D. G.; Peña, B. R. J.; Valenzuela, H. V.; Félix, F. J. L. y Mendoza, J. A. 2010. Samayoa c2004, nueva variedad de trigo cristalino para el sur de Sonora, México. *Rev. Mex. Cienc. Agríc.* 1(5):657-661.
- Christova, P. K.; Christov, N. K. and Imai, R. 2006. A cold inducible cystatin from winter wheat inhibits growth of the snow mold fungus *Microdochium nivale*. *Planta.* 223:1207-1218.
- Figueroa, L. P.; Fuentes, D. G.; Valenzuela, H. V.; Chávez, V. G.; Félix, F. J. L. y Mendoza, L. J. A. 2012. 'Sáwali Oro C2008': nueva variedad de trigo cristalino para el noroeste de México. *Rev. Mex. Fitopatol.* 30(1):91-94.
- Fuentes, D. G. y Figueroa, L. P. 2009. Técnicas de laboratorio para la producción de inóculo de *Tilletia indica*. Instituto Nacional de Investigaciones Forestales, Agrícolas y Pecuarias (INIFAP). Cd. Obregón, Sonora. 32 p.
- during seed maturation (Purwar *et al.*, 2012), when proteins must be accumulated for storage in response to the infection of *T. indicates*.

Conclusions

The cystatin genes are differentially expressed as a function of the phenological stage and the tissue, reaching a sustained intensity in the post-fertilization period. The presence of it *T. indica* induces a response in the expression of cystatin from 12 h after inoculation (S1), suggesting that cystatins may form part of the defense mechanism of the plant.

Cystatins can be considered as good candidates for markers of the defense mechanism of plants, not only against *T. indica* but also to other pathogens and even aphids. Therefore, it is feasible that the expression patterns of cystatin elucidate the resistance mechanism to karnal bunt and an efficient tool for the genetic improvement of wheat. However, it is necessary to determine which cystatin acts only on pathogens and which have endogenous activity, with the purpose of not eroding the inherent genetic machinery of the plant.

End of the English version



- Fuentes, D. G. and Singh, R. P. 2007. Evaluation of advanced bread wheat (*Triticum aestivum*) lines and synthetic hexaploid wheat derivatives (*T. turgidum/Aegilops squarrosa/T. aestivum*) for resistance to karnal bunt (*Tilletia indica*). *Rev. Mex. Micol.* (24):56-58.
- Gottwald, S.; Samans, B.; Lück, S. and Friedt, W. 2012. Jasmonate and ethylene dependent defence gene expression and suppression of fungal virulence factors: two essential mechanisms of Fusarium head blight resistance in wheat?. *BMC Genomics.* 13:369.
- Gupta, V.; Jaiswal, J.; Sharmac, I. and Kumar, A. 2010. Investigating the role of cystatin in conferring stage dependent resistance against Karnal bunt of wheat. *Food Agric.* 21(1):65-79.
- Livak, K. and Schmittgen, T. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the DDCT Method. *Methods.* 25:402-408.
- Margis, R.; Reis, E. M. and Villeret, V. 1998. Structural and phylogenetic relationships among plant and animal cystatins. *Arch. Biochem. Biophys.* (359):24-30.
- Munger, A.; Coenen, K.; Cantin, L.; Goulet, C.; Vaillancourt, L. P.; Goulet, M. C.; Tweddell, R.; Sainsbury, F. and Michaud, D. 2012. Beneficial 'unintended effects' of a cereal cystatin in transgenic lines of potato. *Solanum tuberosum.* *BMC Plant Biol.* 12:198.

- Peña, R. J.; Amaya, A. y Del Toro, E. 1992. Efecto del almacenamiento y del lavado de grano en las características de calidad de muestras de trigo (variedad Seri 1982) con diferentes niveles de Carbón Parcial (*Tilletia indica*). In: estado actual de la investigación sobre el carbón parcial en México. Fuentes-Dávila, G. y Hettel, G. P. (Eds.). Reporte Especial de trigo Núm. 7. Centro Internacional de Mejoramiento de Maíz y Trigo (CIMMYT). El Batán, Estado de México. 24-32 pp.
- Purwar, S.; Marla, S.; Singh, U. and Kumar, A. 2010. Basal expression studies of cystatins during specific growth stages of wheat spikes for defining their possible role in differential and stage dependent immunity against Karnal bunt (*Tilletia indica*). Mol Biol Rep. 37:1377-1389.
- Purwar, S.; Sundaram, S.; Verma, P.; Srivastava, S. and Kumar, A. 2012. A physiologically regulated multidomain cystatin of wheat shows stage-dependent immunity against karnal bunt (*Tilletia indica*). Appl. Biochem. Biotechnol. 168:2344-2357.
- Santamaria, M. E.; Hernández, C. P.; Ortego, F.; Grbic, V.; Grbic, M.; Diaz, I. and Martinez, M. 2012. Cysteine peptidases and their inhibitors in *Tetranychus urticae*: a comparative genomic approach. BMC Genomics. 13:307.
- SIAP (Servicio de Información Agroalimentaria y Pesquera). 2016. Atlas agroalimentario 2016. Secretaría de Agricultura Ganadería Pesca y Alimentación (SAGARPA). Primera edición. México, D. F. 160-162 pp.
- Tenea, G.; Peres, B. A.; Cordeiro, R. F. and Maquet, A. 2011. Reference genes for gene expression studies in wheat flag leaves grown under different farming. BMC Research Notes. 4:373.
- Valdés, R. S.; Cedro, T. A.; Aguilar, H. V.; Cortes, O. E.; Blanco, L. A. and Guerrero, R. A. 2010. Recombinant amaranth cystatin (AhCPI) inhibits the growth of phytopathogenic fungi. Plant Physiol. Biochem. 48:469-475.
- Zadoks, J.; Chang, T. and Konzak, C. 1974. A decimal code for the growth stages of cereals. Weed Res. 14:415-421.