



**Centro de Investigación en Alimentación y
Desarrollo, A.C.**

**ESTUDIO TRANSCRIPCIONAL DEL SISTEMA DE
TRANSDUCCIÓN DE SEÑALES MEDIADO POR
PROTEÍNAS G EN PIMIENTO MORRÓN (*Capsicum
annuum* L.) BAJO ESTRÉS POR RADIACIÓN UV-B**

Por:

Talia Fernanda Martínez Bastidas

TESIS APROBADA POR LA

COORDINACIÓN CULIACÁN DEL CIAD EN CIENCIA Y TECNOLOGÍA PARA
PRODUCTOS AGRÍCOLAS DE ZONAS TROPICALES Y SUBTROPICALES
NUTRICIÓN

Como requisito parcial para obtener el grado de

DOCTOR EN CIENCIAS

Culiacán, Sinaloa

Noviembre de 2017

APROBACIÓN

Los miembros del comité designado para la revisión de la tesis de Talía Fernanda Martínez Bastidas, la han encontrado satisfactoria y recomiendan que sea aceptada como requisito parcial para obtener el grado de Doctor en Ciencias



Dra. Josefina León Félix
Director de Tesis

Saúl Barajas J. Adriana

Dra. Josefina Adriana Saúl Barajas
Asesor



Dr. José Basilio Heredia
Asesor



Dr. Tomás Osuna Enciso
Asesor



Dra. Melina López Meyer
Asesor



Dra. Hilda Karina Ramírez Medina
Asesor

DECLARACIÓN INSTITUCIONAL

La información generada en esta tesis es propiedad intelectual del Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A.C. (CIAD). Se permiten y agradecen las citas breves del material contenido en esta tesis sin permiso especial del autor, siempre y cuando se dé crédito correspondiente. Para la reproducción parcial o total de la tesis con fines académicos, se deberá contar con la autorización escrita del Director General del CIAD.

La publicación en comunicaciones científicas o de divulgación popular de los datos contenidos en esta tesis, deberá dar los créditos al CIAD, previa autorización escrita del manuscrito en cuestión del director de tesis.

Dr. Pablo Wong González

Director General

AGRADECIMIENTOS

Al Consejo Nacional de Ciencia y Tecnología (CONACYT) por el apoyo económico brindado durante el posgrado.

Al Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo (CIAD) por darme la oportunidad de formar parte de su programa de posgrado.

Al proyecto de Ciencia Básica de CONACYT No. 285292 por el financiamiento otorgado para llevar a cabo esta investigación.

A la empresa Bioteksa y al Instituto de investigación Lightbourn, por apoyarnos con el uso de sus instalaciones y el financiamiento otorgado para la realización de este trabajo.

Al Laboratorio Nacional para la Investigación en Inocuidad Alimentaria (LANIIA) por el apoyo otorgado para hacer uso de sus instalaciones y equipos durante la realización de experimentos.

A la Dra. Josefina León Félix, quien fue mi directora de tesis y me brindó su confianza para realizar este trabajo. Gracias por compartirme su conocimiento, por su apoyo, por guiarme, por sus consejos, por darme esta gran oportunidad de formarme y formar parte de su grupo de trabajo.

A los miembros de mi comité de tesis, la Dra. Melina López Meyer gracias por el gran apoyo que me brindó en la realización de este trabajo. Le agradezco enormemente su tiempo, enseñanza, por compartir su experiencia, por sus reconfortantes palabras en momentos que parecían difíciles. Agradezco a la Dra. Hilda Karina Ramírez Medina, por sus importantes aportaciones a este proyecto, por su disponibilidad, sus consejos y gran apoyo durante este trayecto. A la Dra. Adriana Sañudo Barajas, Dr. Tomás Osuna Enciso y al Dr. José Basilio Heredia, por su valiosa participación en este trabajo, por enseñarme y guiarme en este camino.

Al instructor de la materia de Seminario de Investigación, el Dr. J. Benigno Valdéz Torres. Quien nos brindó parte de las herramientas necesarias para desarrollar nuestra investigación de manera satisfactoria. Gracias por su enseñanza, por compartir sus experiencias durante las clases. Gracias por su apoyo, sus consejos, por involucrarse con esta investigación en todo momento y por su valiosa contribución en la parte estadística.

Al Dr. Luis A. Lightbourn Rojas por abrirme las puertas del Instituto Lightbourn, gracias por darme esta gran oportunidad de aprender y de crecer profesionalmente. Gracias por confiar en mí y por todo el apoyo que nos ha dado en la realización de este trabajo.

Al QFB. J. Héctor Carrillo Yañez, por el apoyo técnico brindado para la realización de esta investigación. Por su disposición en el laboratorio, por facilitarnos el material requerido para los experimentos, por enseñarme a operar los equipos y software. Por escucharme, aconsejarme y por su amistad.

Gracias a mis compañeros de generación Miriam González, Rubén León, Indira Rojo, Brando Álvarez, Nayely Leyva y José Luis Lagarda, con quienes compartí grandiosos momentos dentro y fuera del aula. Gracias por sus aportaciones a este trabajo durante las clases, por su apoyo en todo momento y por supuesto por su amistad.

A mis compañeros del programa de posgrado con quienes compartí también la materia de Seminario de investigación, y que me apoyaron con sus importantes observaciones: Daniel Lira, Erick Gutierrez, Karla Baez, Luis Amarillas, Dulce Ambriz, Adrián Félix, Ramón Castillo, Mercedes Verdugo, Anabel Altamirano y Paola Picos.

Al laboratorio de Biología Molecular y Genómica Funcional del CIAD, Unidad Culiacán, por permitirme realizar mis experimentos dentro de sus instalaciones, por el apoyo de mis compañeros y los buenos momentos compartidos con cada uno de los miembros que lo integran: Julián García, Daniel Ibarra, Rubén León, Wendy López, Ana

Vargas, Dalmira Félix, René Rodríguez, Lucía Rubí, Miguel Gúzman, María José Martínez, Daizha Salazar, Yessenia Romero, Emmanuel León, Johansen Acosta, Idania López, Jorge Bastidas, Irving Corrales, Héctor Carrillo, Dres. Luis Amarillas, Claudia Villicaña y Josefina León.

Al Dr. Luis Amarillas, además de su confianza, sus consejos y amistad, por su valiosa contribución con esta investigación. A la Dra. Claudia Villicaña por sus aportaciones en la tesis y sus acertados comentarios durante las presentaciones.

A la MC. Mercedes Verdugo por el apoyo técnico, por compartir conmigo su conocimiento, pero sobre todo por su amistad, por escucharme y apoyarme siempre. Al MC. Daniel Lira por compartir su conocimiento, apoyo y amistad. Al Dr. Juan Ramón Ibarra por su apoyo y amistad.

A mis estudiantes Mario A. Miguel, Sofía Herrera, Abigail López, Alán González, Paulina Aguilar y Juan J. Campos, por el apoyo que me brindaron durante los experimentos, porque además de ser una grata experiencia el ser su instructora en el laboratorio, fue muy importante para mi crecimiento profesional. Gracias a todos por brindarme su amistad.

Al todo el personal académico de CIAD Unidad Culiacán, por contribuir con sus comentarios durante los Seminarios de Investigación. A la Dra. Ma. Dolores Muy Rangel y la IBQ. Evelia Araiza por el apoyo brindado en la Coordinación de CIAD Culiacán. A la Dra. Nohelia Castro Del Campo, por el apoyo en el área de Docencia.

Al personal que conforma el área de Administración en CIAD Unidad Culiacán, LCPF. Mayra Ibarra, CP. Marcela Carrillo, CP. Basilio Beltrán, CP. Karen Sosa, CP. Xiomara Urrea, CP. Patricia Hernández y al Sr. Víctor Arana, por el apoyo brindado desde el área administrativa.

Al M.I. Marco C. Martínez Montoya y a Marco Fabio por el apoyo técnico otorgado en el área de Mantenimiento.

Al L.I. Jorge Manjarrez Vázquez por el apoyo técnico brindado en el área de Tecnologías de la Información y Comunicación. A la MC. Rosabel Vélez por el apoyo técnico durante algunos experimentos. Al MC. Pedro Rojas por el apoyo técnico brindado en experimentos de campo.

A mis compañeros del programa de posgrado Belia Contreras, Isabel Cruz, Irvin González, Ana María López, Jeny Hinojosa que aunque no compartimos clase, hicieron más agradable esta estancia durante el posgrado.

A toda mi familia le agradezco por todo el cariño, por apoyarme y siempre estar al tanto de este trabajo. A mis padres Carmen Bastidas y Jesús Martínez por todo su amor, por darme la oportunidad de formarme académicamente y apoyarme tan fuertemente en este trayecto. A mis hermanos Cynthia Martínez y Salvador Martínez, por su amor y apoyo. A mis suegros Rodolfo Arriaga y Georgina López que me apoyaron en todo momento. A Cameron Arriaga, Andrehy Arriaga y mi hija Frida Arriaga les agradezco los bonitos momentos compartidos y hacer más amena esta tarea. A mi esposo Guillermo Arriaga por todo su amor, comprensión, paciencia, por escucharme, aconsejarme y su gran apoyo todo este tiempo.

DEDICATORIA

Con todo mi amor y enorme gratitud dedico esta tesis a mi familia. En especial a mis padres, esposo e hija.

CONTENIDO

LISTA DE FIGURAS	12
LISTA DE CUADROS	13
RESUMEN.....	14
ABSTRACT	16
SINOPSIS	18
CAPÍTULO I. PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS: SEÑALIZACIÓN DE PLANTAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL	24
RESUMEN.....	24
ABSTRACT	25
INTRODUCCIÓN	26
Proteínas G heterotriméricas	26
La subunidad α	29
El dímero $\beta\gamma$	30
Caracterización de proteínas G en plantas	31
Efectores en plantas.....	32
Mecanismos de regulación de las proteínas G heterotriméricas	34
Mecanismos mediados por un receptor acoplado a proteínas G y por una proteína reguladora de señalización	35
Otros mecanismos de regulación de señales	37
Respuesta a estrés abiótico mediada por proteínas G heterotriméricas	37
Radiación	38
Temperatura	39
Salinidad.....	40
Perspectivas de las proteínas G en la agricultura	42
CONCLUSIONES	43
REFERENCIAS.....	44
CAPÍTULO II. EXPRESSION PROFILE OF HETEROTRIMERIC G PROTEINS, RGS AND GPCR GENES FROM CAPSICUM (<i>Capsicum annuum</i> L.) PLANTS IN RESPONSE TO UV-B RADIATION	54

ABSTRACT	54
INTRODUCTION	55
MATERIALS AND METHODS	57
Plant material and stress treatment.....	57
Primer design	58
Isolation and cDNA synthesis	58
Quantitative real-time PCR (qPCR).....	59
RESULTS AND DISCUSSION	59
Gene expression of G proteins, <i>RGS</i> and <i>GPCR</i> in stems of <i>Capsicum</i> plants	59
Gene expression of G proteins, <i>RGS</i> and <i>GPCR</i> in roots of <i>Capsicum</i> plants.....	62
Summary: expression analysis of G proteins, <i>RGS</i> and <i>GPCR</i> in stems and roots of <i>Capsicum</i>	64
REFERENCES.....	65
CAPÍTULO III. TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF BELL PEPPER (<i>Capsicum</i> <i>annuum</i> L.) IN RESPONSE TO UV-B RADIATION REVEALES STRESS DEFENSE, REGULATION OF TRANSCRIPTION AND RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS ..	
ABSTRACT	69
INTRODUCTION	70
MATERIALS AND METHODS	71
Plant growth and stress conditions.....	71
Libraries construction and RNA-seq.....	72
Sequence assembly.....	72
Functional annotation of the transcriptome.....	73
Differential expression analysis	73
RESULTS AND DISCUSSION	74
Functional annotation of transcriptome in response to UV-B radiation in <i>Capsicum</i> plants	74
Analysis of differentially expressed genes (DEGs) under UV-B radiation exposure.....	75
UV-B radiation increases the expression of genes related to response to stress and ROS scavenging	78
CONCLUSIONS.....	81

REFERENCES..... 82
CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES..... 85

LISTA DE FIGURAS

FIGURA	PÁGINA
1. Estructura de las subunidades G α , G β y G γ de las proteínas G en plantas.....	31
2. Expression profile of G-protein genes of <i>Capsicum annuum</i> determined by qPCR. ..	61
3. Expression profile of G-protein genes of <i>Capsicum annuum</i> determined by qPCR....	63
4. Venn diagram of transcriptome of Capsicum plants exposed to UV-B radiation.. ..	76
5. Gene Ontology Classification	76

LISTA DE CUADROS

CUADRO	PÁGINA
1. Componentes de proteínas G heterotriméricas en plantas.	28
2. Respuesta de las proteínas G a condiciones de estrés ambiental	42
3. List of top 20 up-regulated genes and 20 down-regulated genes in <i>Capsicum</i> plants irradiated with UV-B according to RNA-seq	77
4. DEGs in UV-B irradiated <i>Capsicum</i> plants related with UV-B response in other plants	81

RESUMEN

La radiación ultravioleta B (UV-B) afecta el crecimiento, morfología y fisiología de las plantas. Los daños observados a nivel fisiológico se relacionan con cambios en la expresión de genes inducidos por la radiación UV-B. Las plantas pueden responder a este tipo de estímulos de manera temprana a través de mecanismos de transducción de señales que activan rutas de señalización como adaptación de la planta al daño ocasionado. Uno de los principales sistemas de transducción de señales en organismos eucariotas es el mediado por proteínas G, cuyas moléculas se encuentran implicadas en la respuesta a la radiación UV-B en plantas como *Arabidopsis*. En el presente estudio se sometieron plantas de pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) cv. Cannon a radiación UV-B durante 1, 2, 3, 6, 12, 18, 25 y 30 h y se evaluó en cada uno de estos tiempos mediante qPCR, la expresión de los genes que codifican para proteínas G (*CaGα1*, *CaGβ1*, *CaGγ1* y *CaGγ2*), una proteína reguladora de la señalización de proteínas G (*CaRGS1*) y un receptor acoplado a proteínas G (*CaGPCR1*) de *Capsicum annuum*. También se obtuvieron los transcriptomas (RNA-seq) de plantas con y sin exposición a la radiación UV-B. El análisis de expresión génica muestra evidencias de la sobreexpresión de *CaGα1* y *CaGβ1* en tejido de tallo a las 18 h de exposición de las plantas a la radiación UV-B. El perfil de expresión génica en este estudio se asoció a procesos fisiológicos como cambios morfológicos en tallos, así como la síntesis de pigmentos, que involucran la participación de las proteínas G sugiriendo su activación en respuesta al daño por radiación UV-B. Estos resultados muestran evidencia de la participación de las proteínas G en la respuesta de *Capsicum* a la radiación UV-B. El RNA-seq mostró que los genes expresados diferencialmente (DEGs) se relacionan con proteínas de respuesta a estrés, actividad oxidoreductasa, fotosíntesis, regulación de la transcripción y defensa contra patógenos. Dentro de los DEGs, se encontraron algunos factores de transcripción de la familia WRKY, citocromo P450 y algunos genes relacionados con patogénesis, los cuales se han reportado que son regulados por proteínas G. Esto sugiere que algunas de las rutas implicadas en la respuesta de *Capsicum* a la radiación UV-B son

reguladas por este sistema de transducción de señales, principalmente aquellas implicadas en procesos de morfogénesis y estrés oxidativo. Estos hallazgos muestran la existencia de potenciales marcadores biológicos para la manipulación de los cultivos de *Capsicum* en la tolerancia de la planta al estrés abiótico y el mejoramiento de la producción agrícola de este cultivo.

Palabras clave: *Capsicum*, radiación UV-B, proteínas G, qPCR, RNA-seq.

ABSTRACT

Ultraviolet B (UV-B) radiation affects the growth, morphology and physiology of plants. The damage observed at the physiological level is related to changes in gene expression induced by UV-B radiation. Plants respond to this type of stimulus early through signal transduction mechanisms that activate signaling pathways such as adaptation of the plant to the caused damage. One of the major signal transduction systems in eukaryotic organisms is the one mediated by G proteins. These molecules are involved in the response to UV-B radiation in plants such as arabidopsis. In this study, bell pepper plants (*Capsicum annuum* L.) cv. Cannon were subjected to UV-B radiation for 1, 2, 3, 6, 12, 18, 25 y 30 h and it was evaluated at each of these times by qPCR, the expression of genes encoding G proteins (*CaGα1*, *CaGβ1*, *CaGγ1* y *CaGγ2*), a regulator of G protein signaling (*CaRGS1*) and a G protein coupled receptor (*CaGPCR1*) of *Capsicum annuum*. Sequencing of transcriptomes (RNA-seq) were performed on plants with and without exposure to UV-B radiation. The evidence of overexpression of *CaGα1* and *CaGβ1* in stem tissue after 18 h of exposure of *Capsicum* plants to UV-B radiation is shown. The gene expression profile in this study was associated with physiological processes such as morphological changes in stems and roots, as well as the synthesis of pigments in plants, which involve the participation of G proteins suggesting their participation in response to UV-B radiation damage. These results showed evidence of the G proteins role in *Capsicum* plants response to UV-B radiation. RNA-seq showed that the differentially expressed genes (DEGs) were related to proteins of stress response, oxidoreductase activity, photosynthesis, regulation of transcription and defense against pathogens. Among the DEGs, we found some transcription factors of the WRKY family, cytochrome P450 and some pathogen-related genes, which have been reported to be regulated by G proteins. This suggests that some of pathways involved in the response of *Capsicum* to UV-B radiation are regulated by G protein mediated signal transduction system, mainly those involved in morphogenesis and oxidative stress processes. These findings show the existence of potential biological

markers for the manipulation of *Capsicum* crops in the tolerance of the plant to abiotic stress and the improvement of the agricultural production of this crop.

Keywords: *Capsicum*, UV-B radiation, G proteins, qPCR, RNA-seq.

SINOPSIS

Las plantas se enfrentan a diversos factores ambientales tanto bióticos como abióticos que pueden tener efecto en su crecimiento y desarrollo. Los factores abióticos, entre ellos los ambientales, pueden impactar fuertemente el crecimiento y la producción de las plantas. El exceso o deficiencia de uno o más de estos factores se consideran un estrés abiótico. Los factores ambientales que pueden ocasionar estrés en las plantas incluyen: las temperaturas extremas, sequía o exceso de agua, salinidad, deficiencia de nutrientes y la radiación ultravioleta B (UV-B). Éste último afecta aspectos de la biología del vegetal como la reducción del área foliar, retraso en el crecimiento de tallos y disminución de la biomasa total de la planta. A nivel celular, ocasiona la inhibición de la fotosíntesis (disrupción de los centros de reacción PSII principalmente), daño a los pigmentos fotosintéticos (clorofila y carotenoides) y función estomática (intercambio de gases). A nivel molecular, daño a la estructura y función de los ácidos nucleicos (ruptura del ADN y formación de dímeros de timina), activación y foto-desactivación de moléculas de señalización, como hormonas y fotoreceptores, que ocasionan un efecto en el crecimiento y desarrollo de las plantas. La UV-B también puede inducir la actividad de enzimas que regulan la síntesis de flavonoides importantes en la tolerancia de las plantas; incluso, puede intensificar los efectos adversos de algunos patógenos, como hongos, sobre las plantas. Estos daños observados a nivel fisiológico se relacionan con cambios en la expresión de genes que son inducidos por la radiación UV-B. Las plantas pueden responder y adaptarse a este tipo de factores ambientales, activando diferentes rutas de señalización. La mayoría de las señales extracelulares se unen a receptores específicos en la superficie de la membrana celular, los cuales actúan como transductores de señales convirtiendo las señales extracelulares en señales intracelulares alterando el comportamiento de la célula. Uno de los principales mecanismos de señalización de las plantas es a través de proteínas G. Este sistema de transducción de señales ha sido ampliamente descrito en animales e inicia cuando una señal extracelular (hormonas, proteínas u otras moléculas señal) se une a un

receptor acoplado a proteínas G (GPCR) en la membrana plasmática de la célula, el cual favorece un intercambio de nucleótidos en $G\alpha$ -GDP por $G\alpha$ -GTP activando al heterotrímero que induce la separación de un monómero de $G\alpha$ y un dímero formado por $G\beta\gamma$, los cuales actúan con diferentes proteínas de señalización intracelulares conocidas como efectores, creando a través de éstas una respuesta específica en la célula. La señal es finalizada por la hidrólisis de GTP en $G\alpha$ (por la actividad GTPasa de $G\alpha$) regresando al heterotrímero a su estado inactivo y en algunas ocasiones la hidrólisis puede ser acelerada por una proteína aceleradora de la actividad GTPasa, como una proteína reguladora de señalización de proteínas G (RGS). Este mecanismo ocurre de manera atípica en las plantas, donde se sugiere que el intercambio de nucleótidos puede ser espontáneo sin un GPCR, y GTP no es fácilmente hidrolizado por $G\alpha$, donde una RGS de siete dominios transmembrana (7TM) promueve esta hidrólisis conduciendo al heterotrímero a su estado inactivo. De esta manera las proteínas G se encuentran involucradas en la regulación del crecimiento, desarrollo y adaptación de las plantas al medio ambiente. Se ha encontrado que la radiación UV-B activa al GPCR y $G\alpha$ en arabisidopsis, y estas moléculas inician rutas de señalización que conducen a la síntesis de pigmentos para la protección de la planta. Además, en arabisidopsis, $G\alpha$ es un regulador positivo de la respuesta de las células guardas a la radiación UV-B.

El pimiento morrón (*Capsicum annuum* L.) es una especie de la familia de las Solanáceas, cuyo fruto presenta una amplia variedad de colores y tamaños. Su destino es principalmente para la alimentación en fresco, como pimentón y conserva, lo cual ha incrementado sus necesidades de producción y mercado que posicionan a esta hortaliza como la tercera solanácea más importante a nivel mundial, después del tomate y la papa. El consumo de pimientos se ha incrementado hasta los 4.3 kg por persona tanto en producto procesado como en fresco debido a la facilidad de adquirir el producto durante todo el año, ya que muchos países han empleado técnicas de cultivos protegidos para su producción. México ocupa el segundo lugar a nivel mundial en producción de pimientos después de China, donde Sinaloa contribuye con alrededor del 80% de la producción nacional. El éxito del cultivo de pimiento no depende de un único factor, por lo cual, las características del suelo,

la fertilización, el clima y la disponibilidad de agua son factores que se deben cuidar para obtener productos de calidad. A pesar del control que se tiene sobre algunos de estos factores, lo cual asegura el éxito de este cultivo, siempre se pueden presentar riesgos como plagas, enfermedades y factores climáticos desfavorables, que pueden afectar la producción de pimiento, siendo uno de los principales, la radiación, la cual ocasiona partiduras en frutos y coloraciones irregulares en la planta y frutos. Se ha demostrado que la radiación UV-B causa daños en las plantas de pimiento. En un estudio previo se identificaron los genes que codifican para las diferentes subunidades de las proteínas G (*CaGal*, *CaGβ1*, *CaGγ1*, *CaGγ2* y *CaGγ3*), así como la proteína reguladora de señalización (*CaRGS1*) en *C. annuum* y además se sugirió su posible participación en la regulación de la tolerancia de la planta al estrés abiótico (Romero-Castillo et al., 2015). Sin embargo, no se ha reportado la participación de estas moléculas en respuesta al estrés ocasionado por la radiación UV-B. En este trabajo, se llevó a cabo un estudio de expresión de los genes (*CaGal*, *CaGβ1*, *CaGγ1* y *CaGγ2*, *CaRGS1* y *CaGPCR1*) en tallos y raíces de plantas de *Capsicum* sometidas a estrés por radiación UV-B, mediante qPCR. El gen *CaGPCR1* se incluyó al análisis debido a que este tipo de receptores se han encontrado asociados a las rutas de señalización en respuesta de las plantas al estrés abiótico en otras plantas, incluyendo la respuesta a la radiación UV-B. Por otro lado, en este trabajo se realizó un estudio del transcriptoma de las plantas de *C. annuum* bajo exposición a la radiación UV-B, ya que esto arrojaría mucha información sobre la respuesta de las plantas a este tipo de estrés y a la fecha no existen reportes al respecto.

El Capítulo I de este trabajo corresponde al análisis de la literatura que se realizó para poner en contexto el tema, en el cual se abordaron aspectos de la estructura de las proteínas G en plantas, su participación en la señalización, los mecanismos de regulación de la activación de las proteínas G, las moléculas que se han propuesto como efectores en la señalización mediada por proteínas G y el papel de las proteínas G en eventos de estrés ambiental. Dicha revisión permitió plantearnos algunas preguntas de investigación, las cuales se abordaron con los objetivos planteados en los trabajos experimentales en los capítulos II y III de esta tesis, ya que existe escasa información acerca de la participación de este sistema de

transducción de señales en cultivos de importancia económica, como lo es el pimiento morrón. Del trabajo correspondiente al capítulo I, se derivó un artículo de revisión publicado en la Revista Fitotecnia Mexicana.

En el capítulo II, se muestra el estudio del perfil de expresión de los genes de las diferentes subunidades de proteínas G, la RGS y el GPCR de plantas de *C. annuum* bajo estrés por radiación UV-B, el cual fue enviado a la revista Environmental and Experimental Botany. Para este estudio, las plantas se expusieron a la radiación UV-B por diferentes intervalos de tiempo y se tomaron muestras de tallos y raíces para evaluar el nivel de expresión de dichos genes y determinar su perfil de expresión y su especificidad en diferentes órganos de la planta. Se encontró que *CaGal* y *CaGβ1* incrementaron su expresión en tallos a las 18 h de exposición a la radiación UV-B, mientras que el resto de los genes no mostraron cambios significativos. Se ha reportado que Gα y Gβ se encuentran altamente expresados en tejido de tallo de plantas de arabidopsis, y que además en tabaco Gβ juega un papel muy importante en el desarrollo y soporte de los mismos, mientras que Gα se encarga de iniciar rutas de la biosíntesis de pigmentos como protección contra la radiación UV-B. Nuestros resultados demostraron que tanto *CaGal* y *CaGβ1* son inducidos en *C. annuum* en respuesta al estrés ocasionado por la radiación UV-B, sugiriendo un posible papel en la mitigación del daño ocasionado por la radiación UV-B. Por otro lado, en las raíces de las plantas sometidas a la radiación UV-B no se encontraron cambios estadísticamente significativos en la expresión de los genes en estudio a las diferentes horas de muestreo, principalmente por la variabilidad en las mediciones de qPCR. Sin embargo, la tendencia de los valores de expresión de *CaGal* y *CaRGS1* parece mostrar perfiles similares, particularmente en el aumento de la expresión a 3, 18 y 25 h. La confirmación estadística de estas observaciones en experimentos posteriores sugeriría que *CaGal* participa en respuesta a la radiación UV-B en raíces y que probablemente está siendo regulada por *CaRGS1*. En tallo, por otro lado, no se observaron cambios en el transcrito de *CaRGS1*. De acuerdo con lo observado en este estudio, las proteínas G no requieren la transcripción de un GPCR en respuesta a la radiación UV-B en *C. annuum*. Aquí se muestra a los genes *CaGal* y *CaGβ1* como posibles candidatos para la manipulación de cultivos de *Capsicum*

en la resistencia al estrés por UV-B. Aunque es necesario trabajos adicionales para entender el papel de estas moléculas en las vías de señalización de la respuesta de la planta a la radiación UV-B.

El capítulo III corresponde a un análisis de transcriptoma diferencial de *C. annuum* sometidas a estrés por radiación UV-B, el cual será enviado a la revista Molecular Biology Reports. En este estudio la clasificación de ontología genética nos permitió encontrar que en la categoría de *procesos biológicos* el mayor número de genes expresados participan en la respuesta molecular al estrés por radiación UV-B incluyen aquellos involucrados en procesos biosintéticos, metabólicos, de modificación de proteínas de respuesta a estrés y transporte. Dentro de la categoría de *componentes celulares*, la subcategoría de núcleo presentó la mayor abundancia de genes expresados. Por otro lado, dentro de la categoría de *funciones moleculares* se encontró abundancia de genes expresados involucrados en la unión a iones, unión a DNA, actividad cinasa y actividad oxidoreductasa. Esto es similar a lo que se ha reportado respecto a la respuesta de otras plantas a la radiación UV-B. Los DEGs identificados en respuesta a la radiación UV-B principalmente se relacionaron a respuestas de defensa, respuesta a estrés, fotosíntesis, actividad oxidoreductasa y regulación de la transcripción. *C. annuum* utiliza una serie de componentes involucrados en la respuesta a estrés abiótico, entre ellas componentes de la señalización hormonal, así como aquellos que participan en la respuesta al estrés oxidativo para contrarrestar el daño ocasionado por la radiación UV-B. La radiación UV-B en *Capsicum* indujo la expresión de genes que codifican para una proteína E3 ubiquitina-proteína ligasa ATL23, una proteína sensible a auxina IAA3, una proteína sensible a auxina SAUR67, estas moléculas se encuentran implicadas en los cambios morfológicos de las plantas para su adaptación; una proteína inducida por estrés ambiental ABA TAS14 y una proteína E3 ubiquitina transferasa tipo anillo (EC 2.3.2.27), las cuales se expresan por la acumulación de ABA durante el estrés ocasionado por factores ambientales. En respuesta al estrés oxidativo se encontró la inducción de la expresión de genes que codifican para una proteína glutatión peroxidasa, que mitiga el efecto de las ROS, así mismo se encontró una represión del gen isoflavona reductasa, la reducción de los niveles de isoflavona reductasa afectan el

crecimiento de las plantas. Se encontró también la expresión de genes relacionados con la defensa contra patógenos, los cuales son expresados por la susceptibilidad de la planta debido al daño por la radiación UV-B como una respuesta de defensa de sufrir ataque por patógenos. Dentro de los DEGs identificados en *C. annuum* en respuesta a la radiación UV-B, encontramos la presencia de algunos factores de transcripción de la familia WRKY, algunos citocromos P450, y algunos relacionados con la respuesta a patógenos. Algunos miembros de estas familias son regulados por proteínas G, lo que sugiere una posible relación de estos con rutas de señalización iniciadas por proteínas G en respuesta al estrés por radiación UV-B en *C. annuum*.

CAPÍTULO I. PROTEÍNAS G HETEROTRIMÉRICAS: SEÑALIZACIÓN DE PLANTAS EN CONDICIONES DE ESTRÉS AMBIENTAL

Talia F. Martínez-Bastidas^{1,2}, Rafael A. Romero-Castillo³, Luis A. Amarillas-Bueno^{1,2}, Melina López-Meyer⁴, Karina Ramírez⁵, J. Adriana Sañudo-Barajas¹, Tomás Osuna-Enciso¹, J. Basilio Heredia¹, Luis A. Lightbourn-Rojas² y Josefina León-Félix^{1*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Carretera a Eldorado km 5.5, Culiacán, Sinaloa, México. ²Instituto de Investigación Lightbourn, Carretera a las Pampas km 2.5 s/n Tierra y Libertad, Chihuahua, México. ³Servicio Nacional de Sanidad Inocuidad y Calidad Agroalimentaria, Boulevard Adolfo Ruiz Cortines No. 5010, Colonia Insurgentes Cuicuilco, Delegación Coyoacán, México D.F. ⁴Centro Interdisciplinario de Investigación para el Desarrollo Integral Regional, Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes #250, Colonia San Joachin, Guasave, Sinaloa. ⁵División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Culiacán, Avenida Juan de Dios Bátiz 310 Pte. Colonia Guadalupe, Culiacán, Sinaloa.

RESUMEN

Las proteínas G perciben el ambiente extracelular a través de receptores en la membrana plasmática transmitiendo señales hacia moléculas de señalización en el interior de las células conocidas como efectores. En las plantas, estos efectores comprenden algunas proteínas reguladoras de la transcripción, enzimas metabólicas, fosfolipasas y proteínas de andamio de la vía MAPK. Las proteínas G en las plantas presentan características parecidas a sus homólogos en el sistema animal: sin embargo, las plantas poseen dos clases de proteínas G γ estructuralmente diferentes, las cuales son específicas de éstas. Por otro lado, este mecanismo por el cual las proteínas G transmiten señales a otras moléculas intracelulares en eventos de desarrollo de las plantas, así como su adaptación a condiciones de estrés ambiental, difiere del mecanismo de señalización de las proteínas G en el modelo animal. En algunas especies de plantas el mecanismo para controlar el estado activo de las

proteínas G es mediante un receptor acoplado a proteínas G y por medio de una proteína reguladora de la señalización de proteínas G. En esta revisión se abordan aspectos en la estructura de las proteínas G en plantas, su participación en la señalización, algunos mecanismos de regulación de la activación de las proteínas G, las moléculas que se han propuesto como efectores y la participación de las proteínas G en eventos de estrés ambiental.

Palabras clave: Estrés, receptor acoplado a proteínas G, proteínas G, plantas, proteína reguladora de señalización de proteínas G.

ABSTRACT

G-proteins perceive the extracellular environment through receptors on the plasma membrane transmitting signals to signaling molecules inside the cells known as effectors. In plants, these effectors comprise some transcription regulatory proteins, metabolic enzymes, phospholipases and scaffold proteins of the MAPK pathway. G proteins in plants have characteristics similar to their counterparts in the animal system: however, plants possess two classes of structurally different G γ proteins, which are specific to these. On the other hand, this mechanism by which G-proteins transmit signals to other intracellular molecules, during plant development, as well as their adaptation to conditions of environmental stress, differs from the signaling mechanism of G proteins in the animal model. In some plant species the mechanism for controlling the active state of G proteins is by a G protein coupled receptor and by means of a G protein signaling regulatory protein. This review addresses aspects in the structure of G proteins in plants, their participation in signalling, some mechanisms of regulation of the activation of the G proteins, the molecules that have been proposed as effectors and the participation of the G proteins in events of environmental stress

INTRODUCCIÓN

Las plantas enfrentan una amplia variedad de factores ambientales (Koyro et al., 2012). Estos factores incluyen intensidad de luz, temperaturas extremas, salinidad, sequía, nutrientes, ozono y estrés anaeróbico, entre otros (Suzuki et al., 2014). Debido a que las plantas son organismos sésiles, éstas responden a las condiciones ambientales a través de sistemas muy eficientes de señalización a nivel de membrana. Dentro de estos sistemas de membrana plasmática, se encuentran caracterizados en plantas los receptores ligados a enzimas y los acoplados a proteínas G (Tuteja y Sopory, 2008). Las proteínas G, son moléculas que físicamente acoplan una señal percibida por un receptor en la membrana plasmática, hacia enzimas efectoras dentro de la célula (Temple y Jones, 2007). La señalización a través de proteínas G está implicada en una amplia variedad de procesos de desarrollo de las plantas, actividad de hormonas y respuesta a estrés biótico y abiótico (Ma et al., 2015). Sin embargo, el papel que juegan las proteínas G en las plantas no ha sido completamente caracterizado (Chakraborty et al., 2015a). En esta revisión se pone en contexto la forma en que las proteínas G transmiten las señales extracelulares hacia el interior de las células vegetales.

Proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas (proteínas G) se encuentran dentro de los principales componentes del sistema de transducción de señales de los organismos eucariotas. Su función es transmitir señales extracelulares a componentes de señalización intracelular y mediar diversas respuestas fisiológicas (Urano et al., 2013; Wolfenstetter et al., 2015). Las proteínas G constan de tres subunidades, α ($G\alpha$), β ($G\beta$) y γ ($G\gamma$). Son proteínas citoplasmáticas y están consideradas entre los principales moderadores metabólicos intracelulares (Ma et al., 1990). De acuerdo con el modelo clásico de señalización de las proteínas G, un receptor transmembránico acoplado a proteínas G (GPCR, G-protein

coupled receptor) permite el intercambio del guanosín difosfato (GDP) por guanosín trifosfato (GTP) sobre la proteína $G\alpha$, en respuesta a un estímulo de una señal extracelular, lo que provoca la disociación de $G\alpha$ -GTP del dímero $G\beta\gamma$. Cada una de estas entidades tiene la capacidad de activar diferentes moléculas de señalización dentro de la célula e iniciar una respuesta celular (Jones et al., 2011; Pandey, 2011). El heterotrímero ($G\alpha\beta\gamma$) se inactiva por la hidrólisis del GTP a GDP, la cual es acelerada por una proteína reguladora de señalización (RGS, regulator of G-protein signaling) (Urano et al., 2015).

En plantas, se sugiere que no todas las proteínas que aceleran la actividad GTPasa (GAPs) pertenecen a la familia de las RGSs (Khalil et al., 2011) y que pueden jugar un papel opuesto al observado en células animales, ya que en *Arabidopsis thaliana*, la activación de las proteínas G depende de la internalización de la RGS (AtRGS1), una GAP que actúa como un regulador negativo que mantiene a $G\alpha$ unida a GDP (Wolfenstetter et al., 2015). Las proteínas G están involucradas en múltiples respuestas fisiológicas en plantas, como las inducidas por ácido abscísico (ABA), giberelinas y brasinoesteroides (Izawa et al., 2010), a la luz azul y a la radiación UV (Warpeha et al., 2007; Warpeha et al., 2008), al estrés biótico y abiótico (Bhardwaj et al., 2012), así como en la regulación de la actividad de canales iónicos (Gao et al., 2010). Los genes de $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ se han identificado, secuenciado y aislado de diferentes especies de plantas, pero a diferencia de los sistemas animales, el número de genes que codifican para los componentes de proteínas G heterotriméricas es menor.

En mamíferos se han descrito alrededor de 16 genes $G\alpha$, cinco genes $G\beta$, y seis genes $G\gamma$ (Gao et al., 2010), mientras que en *Arabidopsis* y arroz (*Oryza sativa*) hay sólo una copia de $G\alpha$ y $G\beta$ (Choudhury et al., 2011; Zhu et al., 2009), y tres copias del gen $G\gamma$ en ambas especies (Trusov et al., 2012; Yadav et al., 2014). La presencia de sólo una copia de $G\alpha$ y $G\beta$ en *Arabidopsis* y arroz sugiere la especificidad de señalización por proteínas G y es proporcionada principalmente por la multiplicidad de $G\gamma$ (Choudhury et al., 2011). Sin embargo, en plantas como chícharo (*Pisum sativum* L.) se han encontrado dos genes $G\alpha$ (Marsh y Kaufman, 1999), en soya (*Glycine max* L.) hasta cuatro genes $G\alpha$ y $G\beta$ y diez $G\gamma$ (Bisht et al., 2011; Choudhury et al., 2011), mientras que en pimiento morrón (*Capsicum*

annuum L.) existen al menos un gen *Gα* y uno *Gβ* y tres genes *Gγ* (Romero-Castillo et al., 2015) (Cuadro 1).

Cuadro 1. Componentes de proteínas G heterotriméricas en plantas.

Planta	Subunidad de proteínas G heterotriméricas			Referencia
	Gα	Gβ	Gγ	
Arabidopsis (<i>Arabidopsis thaliana</i>)	GPA1	AGB1	AGG1 AGG2 AGG3	Ma et al., 1990 Weiss et al., 1994 Thung et al., 2012
Arroz (<i>Oryza sativa</i>)	RGA1	RGB1	RGG1 RGG2 RGG3	Seo et al., 1995 Ishikawa et al., 1996 Yadav et al., 2012
Pimiento (<i>Capsicum annuum</i>)	CaGα	CaGβ	CaGγ1 CaGγ2 CaGγ3	Romero-Castillo et al., 2015
Chícharo (<i>Pisum sativum</i>)	PsGα1 PsGα2	PsGβ	PsGγ1 PsGγ2	Misra et al., 2007
Trigo (<i>Triticum aestivum</i>)	TaGA1 TaGA2	TaGB1	-	Hossain et al., 2003a Hossain et al., 2003b
Tabaco (<i>Nicotiana tabacum</i>)	NtGPα1	NtGB3	-	Saalbach et al., 1999 Ando et al., 2000
Tomate (<i>Solanum lycopersicum</i>)	TGA1	SIGB1	SIGGA1 SIGGB1 SIGGB2 SIGGC1	Ma et al., 1991 Subramaniam et al., 2016
Papa (<i>Solanum tuberosum</i>)	STGA2	STGB2	-	Kang et al., 2001
Maíz (<i>Zea mays</i>)	ZGA1	ZGB1	-	Weiss et al., 1994 Bommert et al., 2013
Soya (<i>Glycine max</i>)	GmGα1 GmGα2 GmGα3 GmGα4	GmGβ1 GmGβ2 GmGβ3 GmGβ4	GmGγ1 GmGγ2 GmGγ3 GmGγ4 GmGγ5 GmGγ6 GmGγ7 GmGγ8 GmGγ9 GmGγ10	Bisht et al., 2011 Choudhury et al., 2011

La subunidad α

La $G\alpha$ descrita en plantas, presenta un peso molecular aproximado entre 39 y 52 kDa (Hossain et al., 2003a; Kang et al., 2001; Marsh y Kaufman, 1999; Saalbach et al., 1999; Seo et al., 1995). En su extremo amino, $G\alpha$ contiene sitios de interacción con el dímero $G\beta\gamma$ y sufre modificaciones postraduccionales de miristilación/palmitilación en su extremo amino, que le confieren afinidad con las membranas (Tuteja y Sopory, 2008). En este sentido, la presencia de sólo un tipo de modificación, ya sea miristilación o palmitilación es insuficiente para dirigir a $G\alpha$ a la membrana plasmática (Temple y Jones, 2007). Estructuralmente, $G\alpha$ contiene cinco regiones conocidas como cajas G (G1-G5) que están conservadas en las proteínas G y se encuentran involucradas con el enlace a GTP y su hidrólisis (Tuteja y Sopory, 2008; Urano et al., 2013). La G1, puede unirse a grupos fosfato en los residuos de purina de las moléculas de GTP. La G2 es un sitio que permite la unión de $G\alpha$ con moléculas efectoras. La G3 participa en la unión a un ion Mg^{+2} asociado a un nucleótido.

Los residuos de la G4 hacen contacto con la guanina mediante puentes de hidrógeno, lo que exhibe alta afinidad a GTP sobre moléculas de ATP. Por su parte, en G5, existen aminoácidos que confieren especificidad con nucleótidos de guanina (Colicelli, 2004). En el extremo carboxilo de $G\alpha$ se ubican regiones interruptoras conocidas como Switch I, II y III (Figura 1). Estas regiones interruptoras interactúan con RGS cuando $G\alpha$ se encuentra en su estado de transición para la hidrólisis de GTP y tienen la función de terminar con la señalización y así inactivar a la proteína G (Soundararajan et al., 2008). En el extremo carboxilo de $G\alpha$ se identificaron sitios GoLoco que evitan la liberación de GDP y el re-ensamble de $G\alpha$ con $G\beta\gamma$, lo que permite que $G\alpha$ permanezca unida al receptor y que $G\beta\gamma$ continúe interactuando con moléculas efectoras. Las moléculas reguladoras con sitios GoLoco actúan como inhibidores de la disociación de guanina (GDI, guanine nucleotide dissociation inhibitor) sobre $G\alpha$ (Kimple et al., 2002).

El dímero $\beta\gamma$

La $G\beta$ tiene una masa molecular de alrededor de 35-36 kDa y pertenece a la familia de proteínas WD40 que presentan un dominio de 40 aminoácidos, el cual a menudo termina en un dipéptido de triptófano (W)- ácido aspártico (D). Este dominio está relacionado con interacciones proteína-proteína (Tuteja y Sopory, 2008). El dominio WD40 se encuentra en el extremo carboxilo de $G\beta$ y contiene los sitios de unión con moléculas efectoras y con $G\alpha$. La interacción con $G\alpha$ ocurre en su estado inactivo unida a GDP, mientras que la interacción con efectores puede ocurrir después de la disociación con $G\alpha$ (Urano et al., 2013). En el extremo amino de $G\beta$ se encuentra una estructura helicoidal que permite la interacción con $G\gamma$, que es esencialmente irreversible bajo condiciones no desnaturizantes (Temple y Jones, 2007) (Figura 1). Por su parte, $G\gamma$ es la subunidad más pequeña (de 6 a 10 kDa) y diversa desde un punto de vista estructural (Trusov et al., 2012; Tuteja y Sopory, 2008). En su extremo amino forma una estructura en espiral con $G\beta$ (Pellegrino et al., 1997). La subunidad $G\gamma$ es esencial en el heterotrímero, no sólo por su estrecha unión a $G\beta$, sino por mantener al dímero $G\beta\gamma$ unido a la membrana plasmática (Trusov et al., 2012). Algunas $G\gamma$ contienen en su extremo carboxilo una región factible de ser modificada postraduccionalmente por prenilación, crucial para su anclaje a la membrana plasmática (Temple y Jones, 2007; Urano et al., 2013; Wolfenstetter et al., 2015). Aunque varias $G\gamma$ en plantas no presentan esta región de prenilación en su extremo carboxilo, se ha propuesto una clasificación con base en su estructura (Urano et al., 2013). La clase A incluye $G\gamma$ pequeñas que contienen el sitio de prenilación CaaX (CaaX significa Cisteína, dos residuos con cadenas laterales alifáticas y X es cualquier residuo). La clase B está conformada por subunidades parecidas a la clase A, pero no contienen el sitio CaaX, por lo cual se presume que los dímeros $G\beta\gamma$ formados con esta clase de subunidad γ , podrían no localizarse en la membrana plasmática. La clase C, corresponde a las subunidades que contienen un dominio amino terminal similar a las clásicas $G\gamma$, un dominio transmembranal y un dominio carboxilo terminal rico en cisteínas, lo cual podría conferirles una localización extracelular (Urano et al., 2013; Botella, 2012) y, por lo tanto, capaces de percibir y transmitir señales extracelulares (Wolfenstetter et al., 2015) (Figura 1).

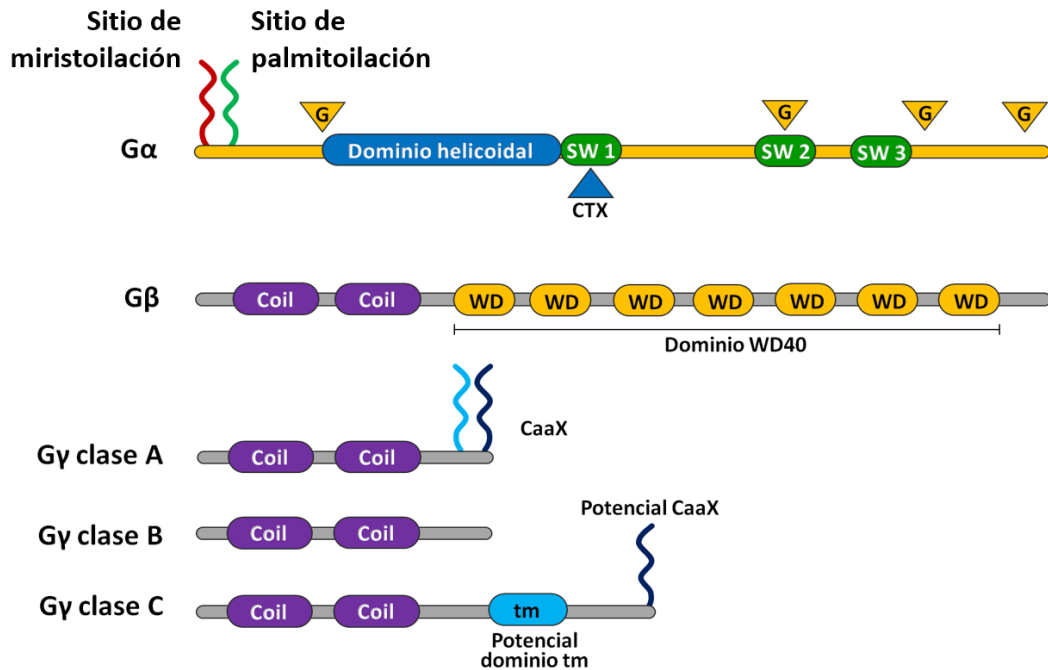


Figura 1. Estructura de las subunidades $G\alpha$, $G\beta$ y $G\gamma$ de las proteínas G en plantas. $G\alpha$ contiene cinco regiones conocidas como Cajas G (∇^G) relacionadas con la interacción de $G\alpha$ con GTP y efectores. En el extremo carboxilo de $G\alpha$ se encuentran regiones interruptoras conocidas como Switch I, II y III (SW 3) relacionadas con la interacción con RGS. $G\beta$ contiene un dominio WD40 (WD) en su extremo carboxilo, el cual contiene los sitios de unión con $G\alpha$, y una estructura helicoidal (Coil) en su extremo amino que permite la interacción con $G\gamma$. Las subunidades $G\gamma$ se clasifican en tres tipos: A, B y C, y presentan en su extremo amino una estructura en espiral (Coil) que le confiere afinidad con $G\beta$. Las $G\gamma$ tipo C, son dos veces más grandes que el resto de las $G\gamma$, presentan una región transmembrana () y un dominio carboxilo terminal rico en cisteínas extracelular (Modificada de Urano et al., 2013).

Caracterización de proteínas G en plantas

Los genes de las subunidades α , β y γ de las proteínas G, se han aislado y caracterizado en diferentes especies de plantas. En 1990 se aisló el gen que codifica para la subunidad $G\alpha$ de *Arabidopsis*, llamado *GPA1*, el cual codifica una proteína de 383 aminoácidos (44.5 kDa).

Esta proteína tiene 36% de identidad con otras $G\alpha$ de mamíferos (Ma et al., 1990). Posteriormente, se identificó el gen $G\alpha$ de tomate (*Solanum lycopersicum*), *TGA1*, que codifica una proteína de 384 aminoácidos (44.9 kDa) y tiene una identidad de 84.6% con *GPA1* (Ma et al., 1991). Seo et al. (1995) aislaron el gen para $G\alpha$ de arroz, *RGAI*, que codifica un polipéptido de 380 aminoácidos (44.5 kDa) y presenta una identidad de 74.5 % con *TGA1* y 73.9 % con *GPA1*. Weiss et al. (1994) aislaron de *Arabidopsis* y maíz (*Zea mays* L.) el gen de la subunidad β de proteínas G, denominados *AGBI* y *ZGB1*, respectivamente. Los genes de *AGBI* y *ZGB1* codifican una proteína de 377 aminoácidos (40.9 kDa) y 380 aminoácidos (41.6 kDa), respectivamente, y presentan una identidad del 76 % entre ellos y una homología de 41 % con otras $G\beta$ de humanos. El gen $G\beta$ de arroz, *RGB1*, que codifica una proteína de 380 aminoácidos (41.7 kDa) fue identificado por Ishikawa et al. (1996). Por otro lado, en *Arabidopsis* se aisló el gen $G\gamma$ (*AGGI*) que codifica una proteína de 98 aminoácidos (10.8 kDa) con regiones altamente conservadas con las $G\gamma$ de mamíferos (Mason y Botella, 2000). Se caracterizaron dos genes $G\alpha$ en trigo (*Triticum* spp.), *TaGA1* y *TaGA2*, que codifican proteínas de 383 aminoácidos (51.3 kDa) y 390 aminoácidos (52.5 kDa), respectivamente (Hossain et al., 2003a). Además de *Arabidopsis* y arroz, los componentes de proteínas G también han sido caracterizados completamente en algunas especies de plantas con importancia económica en la agricultura (Cuadro 1). La caracterización de los componentes de proteínas G heterotriméricas ha permitido entender su participación en la germinación, crecimiento de la raíz y en la respuesta de la planta a estrés biótico y abiótico (Perfus-Barbeoch et al., 2004).

Efectores en plantas

Cuando las proteínas G son activadas, $G\alpha$ -GTP y $G\beta\gamma$ se separan y cada una de estas moléculas puede interactuar con diferentes proteínas conocidas como efectores, para continuar una cascada de señalización en la célula (Cabrera-Vera et al., 2003). Estos efectores de proteínas G en mamíferos se encuentran bien caracterizados, entre ellos

algunas fosfolipasas, fosfodiesterasas, adenilil y guanilil ciclasas, y cinasas (Lapik y Kaufman, 2003). En plantas, la manera que las proteínas G transmiten las señales a otras moléculas es poco conocida (Lapik y Kaufman, 2003; Tuteja y Sopory, 2008). En *Arabidopsis* se identificó la proteína PRN1 que interactúa con GPA1 en la germinación y en la floración de la planta. PRN1 es un homólogo de la proteína Pirin en mamíferos, que interactúa físicamente con factores de transcripción de unión a la caja CAAT, lo que regula la actividad de un gran número de factores de transcripción. Es así, como la unión de GPA1 y PRN1 representa una forma de regulación transcripcional en plantas (Lapik y Kaufman, 2003).

Otro candidato como efector en plantas es la proteína RACK (receptor para cinasa C activada), regulada por $G\alpha$ durante el desarrollo embrionario y germinación de semillas en arroz (Komatsu et al., 2005). THF1 (proteína de formación de tilacoide) es otro efector en plantas. En *Arabidopsis* se ha demostrado que THF1 interactúa con GPA1 en respuesta a altos niveles de azúcar. Las mutantes con pérdida de función de THF1 (*thf1*) en *Arabidopsis*, presentaron hipersensibilidad a D-glucosa exógena. THF1 es una proteína localizada en la membrana externa de los plastos e interactúa con GPA1 cuando la membrana del plasto está en contacto con la membrana plasmática, para mediar señales en procesos como la síntesis de almidón en plastos de la raíz (Huang et al., 2006). Las fosfolipasas C (PLC) y D (PLD) son otro tipo de efectores regulados por proteínas G en plantas (Perfus-Barbeoch et al., 2004). Durante la regulación de la apertura de estomas, PLC y PLD actúan como efectores en la respuesta a ABA (Jacob et al., 1999; Wang et al., 2001; Zhang et al., 2004). En *Arabidopsis* se identificaron dominios críticos para la interacción física entre GPA1 y un tipo de PLD, la PLD α 1 (Zhao y Wang, 2004). Adicionalmente, Gookin y Assmann (2014), demostraron la interacción de GPA1 y AGB1 de *Arabidopsis* con PLD α 1, donde GPA1 y AGB1 pueden regular de manera diferencial a PLD α 1, una vez disociadas del heterotrímero ($G\alpha$ y $G\beta\gamma$). Misra et al. (2007), documentan que un tipo de PLC, la PLC δ , es otro efector de $G\alpha$ que estimula la actividad GTPasa de la misma. Por otro lado, una proteína citosólica identificada en *Arabidopsis*, llamada pefenato deshidratasa (PD1) que tiene interacción con GPA1, juega un papel en la síntesis

de fenilpiruvato y subsecuente producción de fenilalanina, mediada por luz azul. Ante la exposición a esta luz se induce la activación de GCR1 (receptor acoplado a proteínas G) y GPA1 y se activa a PD1 y se produce fenilalanina (precursor de fenilpropanoides) como protección de la planta ante el estrés (Warpeha et al., 2006). PD1 es un efector de GPA1 en la cascada de señalización para desencadenar la resistencia a la radiación UV en *Arabidopsis*. La síntesis de fenilpropanoides como material de protección de la planta ante la radiación UV, sigue la ruta GCR1-GPA1-PD1 (Warpeha et al., 2008). En este sentido, He et al. (2013) encontraron que la radiación UV-B provoca un incremento en la producción de H₂O₂ y subsecuente acumulación de óxido nítrico (NO) que induce el cierre estomático en *Arabidopsis*, respuesta mediada por GPA1.

Mecanismos de regulación de las proteínas G heterotriméricas

Las proteínas G heterotriméricas son mediadoras de estímulos extracelulares hacia el interior celular a través de receptores y efectores (Choudhury y Pandey, 2015; Offermanns, 2003; Schappi et al., 2014). Este sistema de transducción de señales, incluye además otros factores que intervienen en el proceso de la señalización, como las proteínas aceleradoras de la actividad GTPasa (GAPs) y las proteínas inhibidoras de la disociación del nucleótido guanina (GDIs), que regulan negativa y positivamente a G α , respectivamente (Temple et al., 2010). Entonces la subunidad G α puede ser activada por factores de intercambio del nucleótido guanina (GEFs) y su activación puede ser inhibida por GDIs, mientras que su desactivación puede ser acelerada por una RGS que se unen a G α y aceleran su actividad GTPasa (Offermanns, 2003; Sprang, 1997; Siderovski y Willard, 2005; Temple et al., 2010). Aunado a lo anterior, existen estimuladores extracelulares, conocidos como ligandos, que se unen a los receptores y que provocan cambios en su conformación, lo que estimula el intercambio de nucleótidos en G α (GDP→GTP). La unión de G α -GTP ocasiona la disociación del heterotrímero en G α -GTP y G $\beta\gamma$, cada entidad interactúa con los efectores y la señal es finalizada mediante la hidrólisis de GTP que puede ser acelerada por

una proteína RGS, lo que regresa a la proteína G a su estado inactivo (Pandey y Assmann, 2004).

Mecanismos mediados por un receptor acoplado a proteínas G y por una proteína reguladora de señalización

Los receptores acoplados a proteínas G o GPCRs son factores de intercambio del nucleótido guanina (GEF, guanine nucleotide exchange factor). Su principal característica es presentar un dominio que contiene siete regiones transmembranales (7TM) altamente conservadas (Urano y Jones, 2013). En *Arabidopsis* se encontró el gen *GCR1* que codifica una proteína con una alta similitud en su secuencia de aminoácidos a un GPCR de mamíferos, además de una estructura clásica 7TM con su extremo amino fuera y su extremo carboxilo dentro de la membrana plasmática, característica de los GPCRs (Josefsson y Rask, 1997). Así mismo, se demostró que GCR1 interactúa físicamente con GPA1 y actúa como regulador negativo en la respuesta a ABA en *Arabidopsis* (Pandey y Assmann, 2004). En otros trabajos, se reporta que GCR1 participa junto con GPA1 en una ruta de señalización responsable de la síntesis de fenilpropanoides mediada por luz azul (Warpeha et al., 2006). Chicharo y arroz contienen un único gen que codifica para GPCR, denominados *PsGPCR* y *OsGPCR*, respectivamente; los cuales generan en su secuencia de aminoácidos una región 7TM (Misra et al., 2007; Yadav y Tuteja, 2011). Otros candidatos a receptores tipo GPCR han sido propuestos en plantas, tales como GTG1, GTG2 (Pandey et al., 2009) y las proteínas MLO (Urano y Jones, 2013); sin embargo, las plantas utilizan un sistema de regulación de señales diferente al reportado en mamíferos.

En este mecanismo de señalización en plantas la proteína RGS juega un papel muy importante (Urano et al., 2013). La proteína RGS en *Arabidopsis*, AtRGS1, tiene una topología parecida a un GPCR con un dominio 7TM, un extremo amino extracelular y un extremo carboxilo intracelular. El extremo carboxilo contiene una caja RGS que se caracteriza por unirse y acelerar la actividad GTPasa de GPA1 (Chen et al., 2003). Se han reportado genes que codifican para estas proteínas transmembránicas de 7TM-RGS en

plantas vasculares, pero hasta el momento no se han reportado en plantas no vasculares y gramíneas (Phan et al., 2013), donde aún se desconoce el mecanismo de regulación del estado activo de las proteínas G (Urano y Jones, 2014). En *Arabidopsis*, GPA1 no requiere de un GEF para su activación, porque se disocia de manera espontánea de GDP y establece un fuerte enlace con GTP, donde AtRGS1 actúa como una GAP regulada por glucosa (Johnston et al., 2007). Con una D-glucosa u otro tratamiento como ligando, AtRGS1 es fosforilada en su extremo C-terminal por una proteína quinasa de la familia de las WNK (AtWNK8), que promueve la endocitosis de AtRGS1. La endocitosis de AtRGS1 interrumpe su actividad de GAP y es probablemente el mecanismo utilizado para mantener activa la señalización por proteínas G en la membrana plasmática (Urano et al., 2012; Urano et al., 2013).

Debido a que GPA1 no requiere un GEF para su activación, la existencia de un receptor acoplado a proteínas G (GPCR) ha sido una interrogante en el reino de las plantas. La utilización de diferentes servidores para predecir el plegamiento de una proteína (I-TASSER, LOMETS, HHpred, FUGUE y Phyre) indican que GCR1 es el único candidato en plantas como posible GPCR (Taddese et al., 2014). GCR2 fue reportado como un homólogo humano de la lantionina sintetasa bacteriana (Gao et al., 2007). GTG1 y GTG2 son homólogos de la proteína GPR89a, la cual es una proteína reguladora del pH del aparato de Golgi (Urano et al., 2013). Por otro lado, las proteínas MLO presentan un dominio 7TM, pero no se ha podido confirmar su acoplamiento con proteínas G (Urano y Jones, 2013). En apoyo a la hipótesis de que GCR1 es un GPCR en plantas, Chakraborty et al. (2015b) realizaron un análisis del transcriptoma bajo las mismas condiciones para GPA1 y GCR1 en el cual compararon los genes de respuesta identificados para GPA1 y GCR1, en el que encontraron 104 genes en común, que corresponden a 26 y 30 % del total de los genes de respuesta identificados, respectivamente. Es decir, que GCR1 y GPA1 además de regular algunos genes en común, juegan un papel totalmente independiente entre sí.

Otros mecanismos de regulación de señales

La regulación de la señalización por proteínas G involucra dos familias de proteínas, la familia de las proteínas RGS y la familia de las proteínas que contienen el motivo *GoLoco* (Mendoza et al., 2014). Como se mencionó anteriormente, las proteínas RGS tienen una actividad GAP, que acelera el cambio de GTP a GDP, lo que inactiva al heterotrímero (Jones et al., 2011). Las plantas inferiores y las gramíneas no presentan RGS, por lo que se asume que tienen otro mecanismo de regulación del estado activo de $G\alpha$ (Urano y Jones, 2014). No obstante, aunque se ha descrito que proteínas que contienen el motivo *GoLoco*, pueden unirse a $G\alpha$ -GDP e inhibir la disociación del heterotrímero, en plantas estas proteínas no han sido estudiadas (Kimple et al., 2002). En arroz, la subunidad $G\alpha$ presenta en el extremo amino de su secuencia de aminoácidos un motivo *GoLoco* lo cual indica que podría actuar como GDI (Yadav et al., 2013). Por otro lado, la presencia de un dominio rico en cisteína en el extremo carboxilo de AGG3 ($G\gamma 3$ de *Arabidopsis*) la convierte en una subunidad atípica dentro de las $G\gamma$ (Chakravorty et al., 2011). El dominio CaaX rico en cisteína en el extremo carboxilo de AGG3 posee una región extracelular que podría estar involucrada en la percepción de estímulos extracelulares (Wolfenstetter et al., 2015).

Respuesta a estrés abiótico mediada por proteínas G heterotriméricas

El estrés abiótico en las plantas puede ser ocasionado por factores ambientales como las temperaturas extremas, la baja o alta radiación, condiciones de sequía, escases de nutrientes en el suelo, o elevada salinidad en el suelo (Koyro et al., 2012). Las plantas responden e incluso se adaptan a condiciones de estrés ambiental de una manera compleja e integrada (Öktem et al., 2008). Algunas formas en que las plantas se adaptan y toleran el estrés incluyen cambios fisiológicos como reducción del área foliar, abscisión y marchitez de hojas, estimulación del crecimiento radicular, alteración en el contenido de agua, producción de especies reactivas de oxígeno, entre otras. Por otro lado, las respuestas moleculares de la planta al estrés abiótico incluyen la percepción y transducción de señales,

expresión de genes y cambios metabólicos (Lata et al., 2011). Este sistema de comunicación celular permite que las células coordinen estímulos ambientales e intracelulares, lo que integra las señales extracelulares a una respuesta intracelular mediante moléculas efectoras a través de las proteínas G, donde éstas llegan a regular alrededor del 80 % de las señales extracelulares a través de las membranas en las plantas (Yadav et al., 2014). Las proteínas G están asociadas con la respuesta de la planta al estrés abiótico (Cuadro 2).

Radiación

La radiación ultravioleta (UV) comprende alrededor del 8 % de la radiación solar total y se divide en tres tipos: UV-C, UV-B y UV-A, debido a su rango de longitud de onda. La radiación UV-B es de particular interés porque puede causar una variedad de daños en las plantas como inducción del cierre estomático que puede afectar la eficiencia del intercambio de gases, cambios en la anatomía y grosor de la hoja que pueden afectar el entorno de luz de la hoja, cambios en la morfología del dosel que pueden afectar la morfología de la planta (Hollósy, 2002). Las plantas responden a la radiación UV-B lo que estimula mecanismos de protección, el más común es la biosíntesis de compuestos fenólicos y flavonoides que absorben este tipo de radiación (Frohnmeier y Staiger, 2003). Warpeha et al. (2006) demostraron que la luz azul induce la acumulación de fenilpiruvato y subsecuente fenilalanina (Phe) en plántulas etioladas de *Arabidopsis* mediante la acción de la pteridato deshidratasa (PD1). GCR1-GPA1-PD1 forman parte de una cadena de señalización, donde GPA1 interactúa con PD1, enzima responsable de la conversión de pteridato a fenilpiruvato. La radiación UV-B también puede estimular la actividad de PD1 mediante la misma ruta GCR1-GPA1-PD1, donde PD1 actúa como efector de GPA1 y son críticos para la síntesis de fenilpropanoides en la resistencia a los daños ocasionados por la radiación UV en *Arabidopsis* (Warpeha et al., 2008). En *Arabidopsis*, el mecanismo de señalización a través de GCR1 y GPA1 puede redistribuir las señales a través de diferentes efectores en los estados de desarrollo de la planta, en diferentes tejidos y en respuesta al

estrés abiótico (Warpeha et al., 2007). Una respuesta de las plantas al efecto de la radiación UV fue observada en mutantes de *Arabidopsis*, donde GPA1 transmitió señales por radiación UV-B, lo cual indujo la síntesis de H₂O₂ que es esencial para la producción de NO que regula el cierre de los estomas en las hojas por el efecto de la radiación UV-B (He et al., 2013).

Temperatura

El estrés ocasionado por las temperaturas extremas puede afectar el crecimiento y producción de las plantas (Zhang et al., 2015). La temperatura puede detonar mecanismos de tolerancia en la planta para adaptarse al estrés ambiental. Estos mecanismos incluyen la activación de elementos que regulan la transcripción de genes y se ha reportado que a través del GPCR, las proteínas G heterotriméricas participan en la tolerancia al estrés abiótico en células vegetales (Yadav y Tuteja, 2011). Por otro lado, ABA interviene en el desarrollo de las plantas, así como en su adaptación al estrés abiótico provocado por bajas temperaturas, salinidad y sequía, además de ser un regulador de las vías de señalización mediadas por proteínas G (Alvarez et al., 2011). En arroz se ha reportado que el gen *Gα* (*RGAI*) es sobre-regulado por el estrés ocasionado por el frío, mientras que el calor ocasiona una regulación baja de *RGAI*. La proteína RGA1 participa en la respuesta al estrés ocasionado por la temperatura en rutas dependientes de ABA, lo que regula la transcripción de genes a través de elementos de respuesta a estrés presentes en la región promotora del gen (Yadav et al., 2013).

Yadav et al. (2012) señalan que las subunidades G γ 1 y G γ 2 de arroz (*RGG1* y *RGG2*) pueden mostrar alta actividad en respuesta al estrés ocasionado por bajas temperaturas en la planta, mediante la activación de elementos de respuesta a estrés por temperaturas bajas (LTRs) presentes en la región promotora de los genes *RGGs*. *RGG1* y *RGG2*, al igual que *RGAI* siguen una ruta dependiente de ABA en la respuesta al estrés por temperatura en arroz. Por su parte, la señalización por el estrés ocasionado por calor en arroz, es

independiente de RGA1, RGG1 y RGG2 (Yadav et al., 2012; Yadav et al., 2013). Por el contrario, las subunidades G α y G β de chícharo (PsG α y PsG β , respectivamente), confieren a la planta resistencia a temperaturas altas (Misra et al., 2007). En arroz, la subunidad G β de arroz, RGB1, participa en la señalización del estrés ocasionado por frío a través de LTRs mediante vías independientes de ABA.

La localización de RGB1 en el núcleo revela que puede jugar un papel más amplio y regular la expresión de ciertos genes (Yadav et al., 2014). Al igual que RGB1, la subunidad G β de *Arabidopsis* (AGB1) ha sido localizada en el núcleo y la interacción de AGB1 con factores de transcripción ha sido reportada (Klopfleisch et al., 2011), lo cual sugiere otra forma de regular la tolerancia al estrés abiótico en las plantas (Yadav et al., 2014). Por otro lado, Chakraborty et al., (2015c) encontraron que en *Arabidopsis* tanto GCR1 como GPA1 regulan el incremento de los niveles de enzimas como la superóxido dismutasa, ascorbato peroxidasa y catalasa, las cuales mantienen niveles bajos de ROS como respuesta de la planta al estrés ocasionado principalmente por la temperatura baja seguido del estrés que ocasiona la temperatura alta.

Salinidad

La salinidad impone un efecto de escasez hídrica y de toxicidad iónica que altera los procesos primarios de transporte a través de desórdenes nutricionales, metabólicos, de crecimiento, de desarrollo y en la homeostasis (Khatri y Mudgil, 2015). Para atender los problemas que se presentan en los cultivos por efecto de la salinidad, es necesario un mejor entendimiento de las bases moleculares y fisiológicas que faciliten la ingeniería de los cultivos en la tolerancia al estrés salino (Colaneri et al., 2014). En chícharo, se observó que PsG α confiere tolerancia a este tipo de estrés, mientras que PsG β no participa. Donde, PLC aparece como una molécula efectora en la señalización mediada por G α en respuesta a la salinidad en chícharo (Misra et al., 2007). En *Arabidopsis*, GCR1 y GPA1 responden a altas concentraciones de Na⁺, que regulan enzimas a nivel post-traducciona que mantienen

los niveles bajos de especies reactivas de oxígeno (ROS) durante la tolerancia de la planta al estrés por salinidad. Por otro lado, *AGB1* regula de manera positiva la expresión de genes involucrados en la síntesis de prolina para la regulación de la presión osmótica en respuesta al estrés por salinidad. Además *AGB1* parece estar involucrado en rutas dependientes de ABA en la respuesta al estrés por salinidad, debido a la presencia de elementos de respuesta a ABA (ABRE) en la región promotora del gen (Ma et al., 2015). Sin embargo, en arroz *RGA1*, *RGB1*, *RGG1* y *RGG2* presentan elementos de respuesta a ABA en la región promotora de sus genes y un elemento de respuesta inducida por salinidad (GT-1 motif). La exposición a condiciones de salinidad y ABA causa la expresión de *RGA1*, *RGG1* y *RGG2*. Esto sugiere la participación de *RGA1*, *RGG1* y *RGG2* en la tolerancia al estrés por salinidad en arroz y la posible función específica en vías de señalización reguladas por ABA en la respuesta a este tipo de estrés (Yadav et al., 2012; Yadav et al., 2013; Yadav et al., 2014). Aunque el perfil de transcripción de *RGB1* no mostró cambios significativos en la exposición a ABA, el estrés por salinidad causó la expresión de *RGB1*, lo cual sugiere que *RGB1* transduce señales extracelulares por sí sola o mediante la interacción con factores de transcripción en el núcleo (Yadav et al., 2014).

Cuadro 2. Respuesta de las proteínas G a condiciones de estrés ambiental

Proteínas G	Radiación	Temperatura	Salinidad
Subunidad G α	-Síntesis de pigmentos fenilpropanoides en arabidopsis -Producción de H ₂ O ₂ y NO asociados con el cierre de estomas en arabidopsis	-Respuesta a temperatura baja dependiente de ABA en arroz -Tolerancia a temperatura alta en chícharo -Tolerancia a temperatura alta en arabidopsis -Tolerancia a temperatura baja en arabidopsis	-Respuesta a concentraciones altas de Na ⁺ en arroz -Tolerancia a concentraciones altas de Na ⁺ en chícharo -Tolerancia a concentraciones altas de Na ⁺ en arabidopsis
Subunidad G β		-Respuesta a temperatura baja independiente de ABA en arroz -Tolerancia a temperatura alta en chícharo	-Respuesta a concentraciones altas de K ⁺ en arroz -Tolerancia a concentraciones altas de Na ⁺ en arabidopsis -Respuesta a concentraciones altas de Na ⁺ en canola
Subunidad G γ		-Respuesta a temperatura baja dependiente de ABA en arroz	-Respuesta a concentraciones altas de Na ⁺ en arroz

Perspectivas de las proteínas G en la agricultura

Las plantas interactúan con un gran número de factores ambientales y han desarrollado mecanismos que les permite adaptarse a condiciones de estrés. El estrés abiótico es de los más importantes porque ocasiona pérdidas en el rendimiento de los cultivos (Rejeb et al., 2014). Los mecanismos de respuesta de las plantas al estrés como la temperatura alta o baja, salinidad y sequía proveen información acerca de los cambios en las plantas a nivel fisiológico, bioquímico y de expresión de genes. El complejo heterotrimérico de proteínas G y el GPCR en las plantas encienden rutas de señalización como respuesta de las plantas durante la regulación del estrés abiótico (Chakraborty et al., 2015c). Las proteínas G tienen una respuesta directa a la salinidad (Colaneri et al., 2014; Misra et al., 2007), sequía (Xu et

al., 2015), temperatura (Yadav et al., 2012; Yadav et al., 2013; Yadav et al., 2014), radiación (Warpeha et al., 2008), así como la señalización mediada por ABA (Alvarez et al., 2011). Estos hallazgos han colocado a las proteínas G dentro de los blancos moleculares en la manipulación de los cultivos frente al estrés ambiental.

Por otro lado, la participación de otras moléculas dentro de esta compleja red de señalización extiende el abanico de oportunidades en la agricultura, ya que se ha encontrado que la presencia de la subunidad G β en el núcleo permite la transducción de estímulos que interactúan con factores de transcripción lo que regula la expresión de algunos genes (Yadav et al., 2014). En *Arabidopsis*, AGB1 está implicada en la regulación de *AtMPK6* lo que modula la interacción de AtMPK6 con otros componentes en respuesta a ABA y deshidratación (Xu et al., 2015). En respuesta a salinidad, AtRGS1 percibe Na⁺, el NaCl incrementa los niveles de azúcar en las células de hojas y raíz, lo cual ocasiona la internalización de AtRGS1 y la consiguiente activación de las proteínas G que permiten la sobrevivencia de la planta al estrés por salinidad (Colaneri et al., 2014). El análisis y la integración del conocimiento que ha sido generado a partir de la caracterización de las proteínas G y el resto de sus componentes de señalización han permitido identificar a este complejo sistema de transducción de señales como potenciales herramientas genéticas que puedan ser usados en la tolerancia de los cultivos al estrés ambiental.

CONCLUSIONES

El amplio conocimiento adquirido acerca de las proteínas G marca la pauta para individualizar su estudio en plantas. A pesar de las similitudes con sus homólogos en el modelo animal, el mecanismo de señalización a través de proteínas G difiere incluso entre diferentes grupos de plantas, ya que en cereales se desconoce la forma de regulación de la señalización por proteínas G; sin embargo, en casos como el del arroz, la presencia de sitios GoLoco en Ga, puede ser una forma de regulación de la señalización. En las plantas las

proteínas G no dependen totalmente de un GPCR para activar a otras moléculas. La G γ podría jugar un papel importante, tanto de especificidad como de percepción de señales, al poseer una región extracelular. Aunque queda mucho por estudiar acerca de este complejo sistema de señalización, el acercamiento a potenciales blancos en la agricultura para desarrollar la tolerancia de las plantas a múltiples condiciones de estrés ambiental es a través del enfoque a estos estudios.

REFERENCIAS

- Alvarez S., L. M. Hicks and S. Pandey (2011) ABA-dependent and-independent G-protein signaling in Arabidopsis roots revealed through and iTRAQ proteomics approach. *Journal of Proteome Research* 10:3107-3122.
- Ando S., S. Takumi, Y. Ueda, T. Ueda, N. Mori and C. Nakamura (2000) *Nicotiana tabacum* cDNAs encoding α and β subunits of a heterotrimeric GTP-binding protein isolated from hairy root tissues. *Genes & Genetic Systems* 75:211-221.
- Bhardwaj D., S. Lakhanpaul and N. Tuteja (2012) Wide range of interacting partners of pea G β subunit of G-proteins suggests its multiple functions in cell signaling. *Plant Physiology and Biochemistry* 58:1-5.
- Bisht N. C., J. M. Jez and S. Pandey (2011) An elaborate heterotrimeric G-protein family from soybean expands the diversity of plant G-protein networks. *New phytologist* 190:35-48.
- Bommert P., B. I. Je, A. Goldshmidt and D. Jackson (2013) The maize G α gene COMPACT PLANT2 functions in CLAVATA signaling to control shoot meristem size. *Nature* 502:555-558, doi:10.1038/nature12583.
- Botella J. R. (2012) Can heterotrimeric G proteins help to feed the world? *Trends in Plant Science* 17:563-568.

Cabrera-Vera T. M., J. Vanhauwe, T. O. Thomas, M. Medkova, A. Preininger, M. R. Mazzoni and H. E. Hamm (2003) Insights into G protein structure, function, and regulation. *Endocrine Reviews* 24:765-781.

Chakraborty N., P. Sharma, K. Kanyuka, R. R. Pathak, D. Choudhury, R. Hooley and N. Raghuram (2015a) G-protein α -subunit (GPA1) regulates stress, nitrate and phosphate response, flavonoid biosynthesis, fruit/seed development and substantially shares GCR1 regulation in *A. thaliana*. *Plant Molecular Biology* 89:559-576, doi:10.1007/s11103-015-0374-2.

Chakraborty N., P. Sharma, K. Kanyuka, R. R. Pathak, D. Choudhury, R. A. Hooley and N. Raghuram (2015b) Transcriptome analysis of Arabidopsis GCR1 mutant reveals its roles in stress, hormones, secondary metabolism and phosphate starvation. *PLoS One* 10: e0117819, doi: 10.1371/journal.pone.0117819.

Chakraborty D., Y. Trusov, W. Zhang, B. Acharya, M. B. Sheahan, D. W. McCurdy, S. M. Assmann and J. R. Botella, (2011) An atypical heterotrimeric G-protein γ -subunit is involved in guard cell K^+ -channel regulation and morphological development in *Arabidopsis thaliana*. *The Plant Journal* 67:840-851.

Chakraborty N., N. Singh, K. Kaur and N. Raghuram (2015c) G-protein signaling components GCR1 and GPA1 mediate responses to multiple abiotic stresses in Arabidopsis. *Frontiers in Plant Sciences* 6:1000, doi:10.3389/fpls.2015.01000.

Chen J., F. Willard, J. Huang, J. Liang, S. A. Chasse, A. M. Jones and D. P. Siderovski (2003) A Seven-Transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science* 301:1728-1731.

Choudhury S. R. and S. Pandey (2015) Phosphorylation-dependent regulation of G-protein cycle during nodule formation in soybean. *The Plant Cell* 27:3260-3276, doi:10.1105/tpc.15.00517.

Choudhury S. R., N. C. Bisht, R. Thompson, O. Todorov and S. Pandey (2011) Conventional and novel $G\gamma$ protein families constitute the heterotrimeric G-protein signaling network in soybean. *PLoS One* 6:e23361, doi:10.1371/journal.pone.0023361.

- Colaneri A. C., M. Tunc-Ozdemir, J. P. Huang and A. M. Jones (2014) Growth attenuation under saline stress is mediated by the heterotrimeric G protein complex. *BMC Plant Biology* 14:129.
- Colicelli J. (2004) Human RAS superfamily proteins and related GTPases. *Science's STKE* 2004.
- Frohnmeier H. and D. Staiger (2003) Ultraviolet-B radiation-mediated responses in plants. Balancing damage and protection. *Plant Physiology* 133:1420-1428.
- Gao Y., T. Li, Y. Liu, C. Ren, Y. Zhao and M. Wang (2010) Isolation and characterization of gene encoding G protein α subunit protein responsive to plant hormones and abiotic stresses in *Brassica napus*. *Molecular Biology Reports* 37:3957-3965.
- Gao Y., Q. Zeng, J. Guo, J. Cheng, B. E. Ellis and J. G. Chen (2007) Genetic characterization reveals no role for the reported ABA receptor, GCR2, in ABA control of seed germination and early seedling development in Arabidopsis. *The Plant Journal* 52:1001-1013.
- Gookin T. E. and S. M. Assmann (2014) Significant reduction of BiFC non-specific assembly facilitates *in planta* assessment of heterotrimeric G-protein interactors. *The Plant Journal* 80:553-567.
- He J. M., X. G. Ma, Y. Zhang, T. F. Sun, F. F. Xu, Y. P. Chen, X. Liu and M. Yue (2013) Role and interrelationship of G α protein, hydrogen, peroxide, and nitric oxide in ultraviolet B-induced stomatal closure in Arabidopsis leaves. *Plant Physiology* 161:1570-1583.
- Hollósy F. (2002) Effects of ultraviolet radiation on plant cells. *Micron* 33:179-197.
- Hossain S., T. Koba and K. Harada (2003a) Cloning and characterization of two full-length cDNAs, *TaGAI* and *TaGA2*, encoding G-protein α subunits expressed differentially in wheat genome. *Genes and Genetic Systems* 78:127-138.
- Hossain S., T. Koba and K. Harada (2003b) Cloning and characterization of a cDNA (*TaGB1*) encoding β subunit of heterotrimeric G-protein from Common Wheat cv. S615. *Plant Biotechnology* 20:153-158.
- Huang J., J. P. Taylor, J. G. Chen, J. F. Uhrig, D. J. Schnell, T. Nakagawa, K. L. Korth and A. M. Jones (2006) The plastid protein thylakoid formation 1 and the plasma membrane G-

protein GPA1 interact in a novel sugar-signaling mechanism in *Arabidopsis*. *The Plant Cell* 18:1226-1238.

Ishikawa A., Y. Iwasaki and T. Asahi (1996) Molecular cloning and characterization of a cDNA for the β subunit of a G protein from rice. *Plant & Cell Physiology* 37:223-228.

Izawa Y., Y. Takayanagi, N. Inaba, Y. Abe, M. Minami, Y. Fujisawa, H. Kato, S. Ohki, H. Kitano and Y. Iwasaki (2010) Function and expression pattern of the α subunit of the heterotrimeric G protein in rice. *Plant and Cell Physiology* 51:271-281.

Jacob T., S. Ritchie, S. M. Assmann and S. Gilroy (1999) Abscisic acid signal transduction in guard cells is mediated by phospholipase D activity. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 96:12192-12197.

Johnston C. A., J. P. Taylor, Y. Gao, A. J. Kimple, J. C. Grigston, J. G. Chen, D. P. Siderovski, A. M. Jones and F. S. Willard (2007) GTPase acceleration as the rate-limiting step in *Arabidopsis* G protein-coupled sugar signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 104:17317-17322.

Jones J. C., B. R. Temple, A. M. Jones and H. G. Dohlman (2011) Functional reconstitution of an atypical G protein heterotrimer and regulator of G protein signaling protein (RGS1) from *Arabidopsis thaliana*. *The Journal of Biological Chemistry* 286:13143-13150.

Josefsson L. and L. Rask (1997) Cloning of a putative G-protein-coupled receptor from *Arabidopsis thaliana*. *European Journal of Biochemistry* 249:415-420.

Kang S. G., H. J. Lee, E. H. Park and S. G. Suh (2001) Molecular Cloning and characterization of cDNAs encoding heterotrimeric g protein α and β subunits from potato (*Solanum tuberosum* L.). *Molecules and Cells* 13:99-106.

Khalil H. B., Z. Wang, J. A. Wright, A. Ralevski, A. O. Donayo and P. J. Gulick (2011) Heterotrimeric $G\alpha$ subunit wheat (*Triticum aestivum*), GA3, interacts with the calcium-binding protein, Clo3, and the phosphoinositide-specific phospholipase C, PI-PLC1. *Plant Molecular Biology* 77:145-158.

Khatri N. and Y. Mudgil (2015) Hypothesis: NDL proteins function in stress responses by regulating microtubule organization. *Frontiers in Plant Sciences* 6:947.

- Kimple R. J., M. E. Kimple, L. Betts, J. Sondek and D. P. Siderovski (2002) Structural determinants for GoLoco-induced inhibition of nucleotide release by G α subunits. *Nature* 416:878-881.
- Komatsu S., F. Abassi, E. Kobori, Y. Fujisawa, H. Kato and Y. Iwasaki (2005) Proteomic analysis of rice embryo: an approach for investigating G α protein-regulated proteins. *Proteomics* 5:3932-3941.
- Kloppfleisch K., N. Phan, K. Augustin, R. S. Bayne, K. S. Booker, J. R. Botella, N. C. Carpita, T. Carr, J. G. Chen, T. R. Cooke, A. Frick-Cheng, E. J. Friedman, B. Fulk, M. G. Hahn, K. Jiang, L. Jorda, L. Kruppe, C. Liu, J. Lorek, M. C. McCann, A. Molina, E. N. Moriyama, M. S. Muktar, Y. Mudgil, S. Pattathil, J. Schwarz, S. Seta, M. Tan, U. Temp, Y. Trusov, D. Urano, B. Welter, J. Yang, R. Panstruga, J. F. Uhrig and A. M. Jones (2011) Arabidopsis G-protein interactome reveals connections to cell wall carbohydrates and morphogenesis. *Molecular Systems Biology* 7:532, doi:10.1038/msb.2011.66.
- Koyro H. W., P. Ahmad and N. Geissler (2012) Abiotic stress responses in plants: an overview. *In: Environmental Adaptations and Stress Tolerance of Plants in the Era of Climate Change*. P.Ahmad and M. N. V. Prasad (eds). Springer-Verlag. New York. USA.pp:1-28, doi:10.1007/978-1-4614-0815-41.
- Lapik Y. R. and L. S. Kaufman (2003) The Arabidopsis cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein α -subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *The Plant Cell* 15:1578-1590.
- Lata C., A. Yadav and M. Prasad (2011) Role of plant transcription factors in abiotic stress tolerance. *In: Abiotic Stress Response in Plants - Physiological, Biochemical and Genetic Perspectives*. A. K. Shanker and B. Venkateswarlu (eds.) In Tech, Rijeka, Croatia. pp:269-296.
- Ma H., M. F. Yanofsky and H. Huang (1991) Isolation and sequence analysis of *TGA1* cDNAs encoding a tomato G protein α subunit. *Gene* 107:189-195.
- Ma H., M. F. Yanofsky and E. M. Meyerowitz (1990) Molecular cloning and characterization of *GPA1*, a G protein α subunit gene from *Arabidopsis thaliana*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 87:3821-3825.

- Ma Y., M. Chen, D. B. Xu, G. N. Fang, E. H. Wang, S. Q. Gao, Z. S. Xu, L. C. Li, X. H. Zhang, D. H. Min and Y. Z. Ma (2015) G-protein β subunit AGB1 positively regulates salt stress tolerance in *Arabidopsis*. *Journal of Integrative Agriculture* 14:314-325.
- Marsh J. F. and L. S. Kaufman (1999) Cloning and characterization of *PGA1* and *PGA2*: two G-protein α -subunits from pea that promote growth in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *The Plant Journal* 19:237-247.
- Mason M. G. and J. R. Botella (2000) Completing the heterotrimer: isolation and characterization of an *Arabidopsis thaliana* G protein γ -subunit cDNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 97:14784-14788.
- Mendoza A., A. Seb -Pedr s and I. Ruiz-Trillo (2014) The evolution of the GPCR signaling system in eukaryotes: modularity, conservation, and the transition to metazoan multicellularity. *Genome Biology and Evolution* 6:606-619.
- Misra S., Y. Wu, G. Venkataraman, S. K. Sopory and N. Tuteja (2007) Heterotrimeric G-protein complex and G-protein-coupled receptor from a legume (*Pisum sativum*): role in salinity and heat stress and cross-talk with phospholipase C. *The Plant Journal* 51:656-669.
- Offermanns S. (2003) G proteins as transducers in transmembrane signalling. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* 83:101-130.
-  ktem H. A., F. Eyidogan, F. Selcuk, M. T.  z, J. A. Teixeira da Silva and M. Y cel (2008) Revealing response of plants to biotic and abiotic stresses with microarray technology. *Genes, Genomes and Genomics* 2:14-48.
- Pandey S. (2011) More (G-proteins) please! Identification of an elaborate network of G-proteins in soybean. *Plant Signaling and Behavior* 6:780-782.
- Pandey S. and S. M. Assmann (2004) The *Arabidopsis* putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein α subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *The Plant Cell* 16:1616-1632.
- Pandey S., D. C. Nelson and S. M. Assmann (2009) Two novel GPCR-type G proteins are abscisic acid receptors in *Arabidopsis*. *Cell* 136:136-148.
- Pellegrino S., S. Zhang, A. Garritsen and W. F. Simonds (1997) The coiled-coil region of the G protein β subunit. Mutational analysis of $G\gamma$ and effector interactions. *The Journal of Biological Chemistry* 272:25360-25366.

- Perfus-Barbeoch L., A. M. Jones and S. M. Assmann (2004) Plant heterotrimeric G protein function: insights from Arabidopsis and rice mutants. *Current Opinion in Plant Biology* 7:719-731.
- Phan N., D. Urano, M. Srba, L. Fischer and A. M. Jones (2013) Sugar-induced endocytosis of plant 7TM-RGS proteins. *Plant Signaling and Behavior* 8:e22814. doi:10.4161/psb.22814.
- Rejeb I. B., V. Pastor and B. Mauch-Mani (2014) Plant responses to simultaneous biotic and abiotic stress: molecular mechanisms. *Plants* 3:458-475.
- Romero-Castillo R. A., R. Choudhury, J. León-Félix and S. Pandey (2015) Characterization of the heterotrimeric G-protein family and its transmembrane regulator from capsicum (*Capsicum annuum* L.). *Plant Science* 234:97-109.
- Saalbach G., G. Natura, W. Lein, P. Buschmann, I. Dahse, M. Rohrbeck and F. Nagy (1999) The α -subunit of a heterotrimeric G-protein from Tobacco, NtGP α 1, functions in K⁺ channel regulation in mesophyll cells. *Journal of Experimental Botany* 50:53-61.
- Schappi J. M., A. Krbanjevic and M. M. Rasenick (2014) Tubulin, actin and heterotrimeric G proteins: Coordination of signaling and structure. *Biochimica et Biophysica Acta* 1838, doi:10.1016/j.bbamem.2013.08.026.
- Seo H. S., H. Y. Kim, J. Y. Jeong, S. Y. Lee, M. J. Cho and J. D. Bahk (1995) Molecular cloning and characterization of *RGAI* encoding a G protein α subunit from rice (*Oryza sativa* L. IR-36). *Plant Molecular Biology* 27:1119-1131.
- Siderovski D. P. and F. S. Willard (2005) The GAPs, GEFs and GDIs of heterotrimeric G-protein alpha subunits. *International Journal of Biological Sciences* 1:51-66.
- Soundararajan M., F. S. Willard, A. J. Kimple, A. P. Turnbull, L. J. Ball, G. A. Schoch, C. Gileadi, O. Y. Fedorov, E. F. Dowler, V. A. Higman, S. Q. Hutsell, M. Sundström, D. A. Doyle and D. P. Siderovski (2008) Structural diversity in the RGS domain and its interaction with heterotrimeric G protein α -subunits. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105:6457-6462.
- Sprang S. R. (1997) G protein mechanisms: insights from structural analysis. *Annual Review of Biochemistry* 66:639-78.

- Subramaniam G., Y. Trusov, C. López-Encina, S. Hayashi, J. Batley and J. R. Botella (2016) Type B heterotrimeric G protein γ -subunit regulates auxin and ABA signaling in tomato. *Plant Physiology* 170:1117-1134.
- Suzuki N., R. M. Rivero, V. Shulaev, E. Blumwald and R. Mittler (2014) Biotic and abiotic stress combination. *The New Phytologist* 203:32-43.
- Taddese B., G. J. G. Upton, G. R. Bailey, S. R. D. Jordan, N. Y. Abdulla, P. J. Reeves and C. A. Reynolds (2014) Do plants contain G protein-coupled receptors? *Plant Physiology* 164:287-307.
- Temple B. R. and A. Jones (2007) The plant heterotrimeric G-protein complex. *Annual Review of Plant Biology* 58:249-66.
- Temple B. R., C. D. Jones and A. M. Jones (2010) Evolution of a signaling nexus constrained by protein interfaces and conformational states. *PLoS Computational Biology* 6:e1000962, doi:10.1371/journal.pcbi.1000962.
- Thung L., Y. Trusov, D. Chakravorty and J. R. Botella (2012) $G\gamma_1 + G\gamma_2 + G\gamma_3 = G\beta$: the search for heterotrimeric G protein γ subunits in Arabidopsis is over. *Journal of Plant Physiology* 169:542-545.
- Trusov Y., D. Chakravorty and J. R. Botella (2012) Diversity of heterotrimeric G-protein γ subunits in plants. *BMC Research Notes* 5:608, doi:10.1186/1756-0500-5-608.
- Tuteja N. and S. Sopory (2008) Plant signaling in stress: G-protein coupled receptors, heterotrimeric G-proteins and signal coupling via phospholipases. *Plant Signaling and Behavior* 3:79-86.
- Urano D. and A. M. Jones (2013) “Round up the usual suspects”: a comment on nonexistent plant G protein-coupled receptors. *Plant Physiology* 161:1097-1102.
- Urano D. and A. M. Jones (2014) Heterotrimeric G protein-coupled signaling in plants. *Annual Review of Plant Biology* 65:365-384.
- Urano D., J. Chen, J. R. Botella and A. M. Jones (2013) Heterotrimeric G protein signalling in the plant kingdom. *Open Biology* 3:120186, doi:10.1098/rsob.120186.
- Urano D., T. Dong, J. L. Bennetzen and A. M. Jones (2015) Adaptive evolution of signaling partners. *Molecular Biology and Evolution* 32:998-1007.

Urano D., N. Phan, J. C. Jones, J. Yang, J. Huang, J. Grigston, J. P. Taylor and A. M. Jones (2012) Endocytosis of seven-transmembrane RGS protein activates G protein coupled signaling in Arabidopsis. *Nature Cell Biology* 14:1079-1088.

Wang X. O., H. Ullah, A. M. Jones and S. M. Assmann (2001) G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science* 292:2070-2072.

Warpeha K. M., J. Gibbons, A. Carol, J. Slusser, R. Tree, W. Durham and L. S. Kaufman (2008) Adequate phenylalanine synthesis mediated by G protein is critical for protection from UV radiation damage in young etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant, Cell and Environment* 31:1756-1770.

Warpeha K. M., S. S. Lateef, Y. Lapik, M. Anderson, B. S. Lee and L. S. Kaufman (2006) G-protein-coupled receptor 1, G-protein $G\alpha$ -subunit 1, and prephenate dehydratase 1 are required for blue light-induced production of phenylalanine in etiolated Arabidopsis. *Plant physiology* 140:844-855.

Warpeha K. M., S. Upadhyay, J. Yeh, J. Adamiak, S. I. Hawkins, Y. R. Lapik, M. B. Anderson and L. S. Kaufman (2007) The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in Arabidopsis. *Plant Physiology* 143:1590-1600.

Weiss C. A., C. W. Garnaat, K. Mukai, Y. Hu and H. Ma (1994) Isolation of cDNAs encoding guanine nucleotide-binding protein β subunit homologues from maize (ZGB1) and *Arabidopsis* (AGB1). *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:9554-9558.

Wolfenstetter S., D. Chakravorty, R. Kula, D. Urano, Y. Trusov, M. B. Sheahan, D. W. McCurdy, S. M. Assmann, A. M. Jones and J. R. Botella (2015) Evidence for an unusual transmembrane configuration of AGG3, a class C $G\gamma$ subunit of Arabidopsis. *The Plant Journal* 81:388-398.

Xu D. B., M. Chen, Y. N. Ma, Z. S. Xu, L. C. Li, Y. F. Chen and Y. Z. Ma (2015) A G-protein β subunit, AGB1, negatively regulates the ABA response and drought tolerance by down-regulating AtMPK6-related pathway in Arabidopsis. *PLoS one* 10:e0116385, doi:10.1371/journal.pone.0116385.

- Yadav D. K. and N. Tuteja (2011) Rice G-protein coupled receptor (GPCR) In silico analysis and transcription regulation under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* 6:1079-1086.
- Yadav D. K., S. M. Shahinul and N. Tuteja (2012) Rice heterotrimeric G-protein gamma subunits (RGG1 and RGG2) are differentially regulated under abiotic stress. *Plant Signaling and Behavior* 7:733-740.
- Yadav D. K., D. Shukla and N. Tuteja (2013) Rice heterotrimeric G-protein alpha subunit (RGA1): In silico analysis of the gene and promoter and its upregulation under abiotic stress. *Plant Physiology and Biochemistry* 63:262-271.
- Yadav D. K., D. Shukla and N. Tuteja (2014) Isolation, in silico characterization, localization and expression analysis of abiotic stress-responsive rice G-protein β subunit (RGB1). *Plant Signaling and Behavior* 9:e28890, doi:10.4161/psb.28890.
- Zhang W., C. Qin, J. Zhao and X. Wang (2004) Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1, phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101:9508-9513.
- Zhang Z., J. Li, H. Liu, K. Chong and Y. Xu (2015) Roles of ubiquitination-mediated protein degradation in plant responses to abiotic stresses. *Environmental and Experimental Botany* 114:92-103.
- Zhao J. and X. Wang (2004) Arabidopsis phospholipase D α 1 interacts with the heterotrimeric G-protein α -subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *The Journal of Biological Chemistry* 279:1794-1800.
- Zhu H., G. J. Li, L. Ding, X. Cui, H. Berg, S. M. Assmann and Y. Xia (2009) Arabidopsis extra large G-protein 2 (XLG2) interacts with the G β subunit of heterotrimeric G protein and functions in disease resistance. *Molecular Plant* 2:513-525.

CAPÍTULO II. EXPRESSION PROFILE OF HETEROTRIMERIC G PROTEINS, RGS AND GPCR GENES FROM CAPSICUM (*Capsicum annuum* L.) PLANTS IN RESPONSE TO UV-B RADIATION

Talia F. Martínez-Bastidas^{1,2}, Melina López-Meyer³, Karina Ramírez⁴, J. Adriana Sañudo-Barajas¹, Tomás Osuna-Enciso¹, J. Basilio Heredia¹, José B. Valdez-Torres¹, Luis A. Amarillas Bueno², Rubén G. León-Chan², Luis A. Lightbourn-Rojas² and Josefina León-Félix^{1*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Carretera a Eldorado km 5.5, Culiacán, Sinaloa, México. ²Instituto de Investigación Lightbourn, Carretera a las Pampas km 2.5 s/n Tierra y Libertad, Chihuahua, México. ³Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-SINALOA, Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes #250, Colonia San Joachin, Guasave, Sinaloa. ⁴División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Culiacán, Avenida Juan de Dios Bátiz 310 Pte. Colonia Guadalupe, Culiacán, Sinaloa.

ABSTRACT

Heterotrimeric G-proteins (G proteins) constitute a classical signal transduction system which can operate together with G-protein coupled receptors (GPCRs) and regulators of G-protein signaling (RGS) in environmental stress-related pathways. The environmental factors that can cause stress in plants include extreme temperatures, salinity, drought, nutrient deficiency and ultraviolet B (UV-B) radiation, which affect many aspects of plant physiology and activating diverse signaling pathways. Signaling response of *Capsicum* plants to UV-B radiation has not been studied. In this study, we report the expression profile of G proteins, GPCR and RGS genes from *Capsicum* plants subjected to stress with UV-B radiation. *CaGal* and *CaGβ1* genes exhibited an increased expression after 18 h of UV-B radiation treatment in stems, while *CaGγ1*, *CaGγ2*, *CaRGS1* and

CaGPCR genes showed no significant changes in expression. In roots, *CaGal* and *CaRGS1* genes showed an increasing expression profile after 3, 18 and 25 h after UV-B radiation but its expression was not statistically significant. Signaling response to UV-B-radiation in *Capsicum* was mediated by G proteins in a specific-tissue manner where *CaGal* and *CaGβ1* has an active role in stems. The expression profiles found in this study were associated with UV-B induced responses in plants, however, the specific roles of G protein members induced by UV-B radiation in *Capsicum* remains to be elucidated. These results provide evidence of the role of G protein signaling system in response to UV-B radiation in *Capsicum*, which could be important to contribute with new genes to be used as molecular markers for manipulation to enhance a abiotic stress tolerance in crop plants.

Keywords: *Capsicum*, UV-B radiation, heterotrimeric G proteins, G-protein coupled receptor, regulator of G-protein signaling protein, qPCR.

INTRODUCTION

Heterotrimeric G proteins (G proteins) are composed of $G\alpha$, $G\beta$ and $G\gamma$ subunits and constitute a membrane signal transduction mechanism in animals and plants (Stateczny et al., 2016). G proteins can couple external signals through cell surface receptors to appropriate intracellular molecules that mediate cell responses (Xu et al., 2016). A G-protein coupled receptor (GPCR) perceives external stimuli and facilitate the GDP→GTP bound on $G\alpha$. This allows dissociation of the heterotrimer into $G\alpha$ -GTP and $G\beta\gamma$. $G\alpha$ -GTP and $G\beta\gamma$ can independently modulate different downstream effectors. Intrinsic GTPase activity of $G\alpha$ hydrolyzes GTP and return the heterotrimer to its inactive state. But in some cases, GTPase activating proteins (GAPs) can accelerate GTP hydrolysis to regulate G protein activation-deactivation cycle (Subramaniam et al., 2016). Some GPCR-like proteins have been reported in plants, but the GTP exchange factor (GEF) activity has not been

proven (Roy Choudhury and Pandey, 2016). Moreover, in arabidopsis, G proteins can self-activate, because the G α subunit (AtGPA1) can be joined to GTP the most of the time, this suggests that signaling in plants is mostly performed by a GAP like the regulator of G protein signaling (RGS) proteins, speeding up the deactivation (Urano and Jones, 2014).

Plant G proteins and some other components of this signaling system have been implicated in cell division (Chen et al., 2006), morphological development (Anderson and Botella, 2007; Izawa et al., 2010; Lease et al., 2001; Romero-Castillo et al., 2015), response to light stimuli (Warpeha et al., 2006), and abiotic stress (Misra et al., 2007; Yadav et al., 2012; Yadav et al., 2013; Yadav et al., 2014; Yadav and Tuteja, 2011). Abiotic stress is the most important environmental factor that impacts on plant growth (Rejeb et al., 2014). Ultraviolet radiation B (UV-B, 280-320 nm) is a natural stressful factor for plants. UV-B, can drive to severe damage on plants and crops, usually with anato-morphological, metabolic and molecular effects (Carrasco-Ríos, 2009; Fina et al., 2017; Khudyakova et al., 2017). Being sessile organisms, plants respond and adapt to UV-B radiation effects through defense mechanisms (Carrasco-Ríos, 2009).

G proteins have been implicated in the plant response to damage caused by UV-B radiation. In arabidopsis, GPA1 (G α subunit) activation is UV-B induced and promotes stomatal movement through H₂O₂ and NO production (He et al., 2013). The production of UV-B absorbing compounds, such as phenolic compounds and flavonoids, is another, and well studied UV-B radiation protective mechanism in plants (Zlatev et al., 2012). Warpeha et al. (2008) found that in arabidopsis, GCR1 (G protein coupled receptor) and GPA1 initiates a signaling pathway that confer UV radiation protection to the plant, activating prephenate dehydratase1 (PD1), a precursor of a wide variety of secondary metabolites produced by the penylpropanoid pathway. León-Chan et al. (2017) reported that UV-B radiation induces an increase in content of flavonoids in plants of *Capsicum* for protection. However, the signal transduction systems that initiate this defense response in *Capsicum* plant tissues are little explored. Recently, Romero-Castillo et al. (2015) identified the G protein complex and their RGS genes in bell pepper plants. They found in the promoter region of *Capsicum*

G protein and RGS genes, the presence of elements related to stress response and development. In the present study, we described the gene expression profile of G proteins, RGS and GPCR genes in *Capsicum* plants under the exposure to UV-B radiation.

MATERIALS AND METHODS

Plant material and stress treatment

The bell pepper (*Capsicum annuum* L.) Cv. Cannon plants were produced as described by León-Chan et al. (2017). Twenty-eight DAS (days after sowing) bell pepper plants were put in a plant growth chamber (GC-300TLH, JEIO TECH; South Korea) for three days under the following conditions: 12 h photoperiod (from 6:00 to 18:00 h) of PAR (photosynthetically active radiation) ($972 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 25/20 °C (day/night) temperature and relative humidity of 65 %. After that, treatments of UV-B radiation (UV-B) were applied; briefly, plants were irradiated for 6 h with PAR (from 06:00 to 10:00 and 16:00 to 18:00 h) and for 6 h of UV-B irradiation ($72 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$, from 10:00 to 16:00 h). The UV-B radiation was applied using three Phillips TL 100W/01 lamps (Germany) with a narrow waveband between 305 to 315 nm and peaks at 311 nm; the distance between plant leaves and UV-B lamps was 50 cm, and the UV-B irradiance was measured by a UV A/B light meter (SPER SCIENTIFIC, model 850009; Scottsdale, AZ, USA). The UV-B radiation treatment was initiated at day 31 and sampling started at 10:00 h just before turn the radiation UV-B lamps on; therefore, 10:00 h at day 31 was considered as time 0 h. Then, the next samples were collected after 1, 2, 3, 6, 12, 18, 25 and 30 h of exposure. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C in an ultra-low temperature freezer (Revco UxF40086A, Thermo Scientific; USA) until analysis.

Primer design

For the bell pepper G-protein coupled receptor identification, the known sequence of Rice GPCR gene (*OsGPCR*) (accession number HQ676132.1) was aligned with the BLAST (Basic Local Alignment Search Tool) program. The predicted sequence for a *Capsicum annuum* GPCR with 70% identity with *OsGPCR*, was used to design primers. A *Capsicum annuum* G-protein coupled receptor (*CaGPCR*) DNA fragment of 491 pb was amplified by PCR using forward primer (5'-GGTCATGTAGGGATCCTTCC-3') and reverse primer (5'-TTGCCTTTCCTGTGTGTC-3') and first strand cDNA from bell pepper cv Cannon as a template. The PCR amplicon was sequenced by the Sanger method with AB3730 DNA Analyzer (Applied Biosystems, Japan). The sequence was aligned with BLAST in the GenBank database and the analysis showed about 98 % identity with predicted *Capsicum annuum GPCR*. The *CaGPCR* sequence from bell pepper cv Cannon was used for the qPCR primer design of forward primer (5'- GGCTCCAAATCCTCTACATCAG-3') and reverse primer (5'- GGTTCTTCTGTTATGCTCAGGG-3'). Specific primers for G proteins and *RGS* genes of *Capsicum* were reported by Romero-Castillo et al. (2015).

Isolation and cDNA synthesis

Total RNA was isolated from 100 mg of stress treated and non-treated stems and roots of plants, using TRIzol[®] reagent (Invitrogen Life Technologies, USA). Genomic DNA contamination was removed by DNase treatment with TURBO DNA-free[™] Kit (Thermo Fisher Scientific, USA). The total RNA obtained was used as template for cDNA synthesis. The first strand cDNA was synthesized from 2 µg of total RNA using SuperScript[®] III First-Strand (Invitrogen Life Technologies, USA) using oligo (dT)₂₀ according to the manufacturer's instructions.

Quantitative real-time PCR (qPCR)

The transcript profiles of *CaGα1*, *CaGβ1*, *CaGγ1*, *CaGγ2*, *CaRGS1* and *CaGPCR1* were determined by qPCR in stems and roots of plants treated with UV-B radiation. qPCR reactions were performed using specific primers for G proteins and *RGS* genes of *Capsicum* previously reported by Romero-Castillo et al. (2015). *Capsicum* ubiquitin-conjugating protein (UBI-3) (AY486137.1) was used as a normalization control. The qPCR experiment was repeated twice independently and each experiment included three technical replicates for each sampling time. Relative gene expression was calculated using $2^{-(\Delta\Delta Cq)}$ according with Livak's method. To calculate the relative expression level of genes, the 0 h time point was considered as the calibrator condition. Statistical analysis was performed using analysis of variance (ANOVA) with Fisher's pairwise comparison test.

RESULTS AND DISCUSSION

Gene expression of G proteins, *RGS* and *GPCR* in stems of *Capsicum* plants

The stems, in particular, its vascular tissue, is involved in the movement of resources to different plant organs, it also provide mechanical support, and function as a long-distance communication system of abiotic and biotic environmental conditions (Lucas et al., 2013). Signaling pathways through G proteins are key in physiological processes in stems of some species. In arabidopsis, it has been reported that *GPA1* and *AGB1* subunits are expressed abundantly in vascular tissue (Anderson and Botella, 2007). In *Capsicum* stems, we found that *CaGα1* and *CaGβ1* genes showed a significant increase in transcript levels at 18 h after UV-B radiation was started (Fig. 2A and D), while *CaRGS1*, *CaGPCR1*, *CaGγ1* and *CaGγ2* did not show statistically significant differences in their expression (Fig. 2B, C, E and F). UV-B can cause direct and indirect effects on plants. Direct effects are related to

growth, photosynthetic assimilation, cell division and development, whereas indirect effects manifest with synthesis of secondary metabolites (Prado et al., 2016). Singh et al. (2014) indicated that growth and developmental processes were the most sensitive to UV-B radiation in maize, while in tobacco it was observed that antisense-*Gβ* plants exhibited stems reduced in length, which were unable to grow without support (Peskan-Berghofer et al., 2005). In this study, up-regulation of *CaGβ1* gene was UV-B-induced, suggesting a specific role of CaGβ1 in these stress signaling pathways. It is known that arabidopsis Ga subunit (GPA1) is a positive regulator of UV-B radiation initiating the synthesis of phenylalanine, a precursor of a large number of secondary metabolites of protection (Warpeha et al., 2008), which is one of the most basic and studied plant strategy for attenuation of UV-B radiation (Solovchenko and Schmitz-Eiberger, 2003). Herein, gene expression analysis demonstrated that *CaGal* gene was up-regulated by UV-B radiation maybe as a stress-induced plant response to cope with radiation. In classical G protein signaling, Gα and Gβ subunits act as two functional modules (Xu et al., 2016). In *Capsicum*, both *CaGal* and *CaGβ1* genes were strongly UV-B-induced and probably have different roles in signaling response to UV-B. These results suggest that G proteins are involved in early signaling of physiological processes stress-related in *Capsicum*.

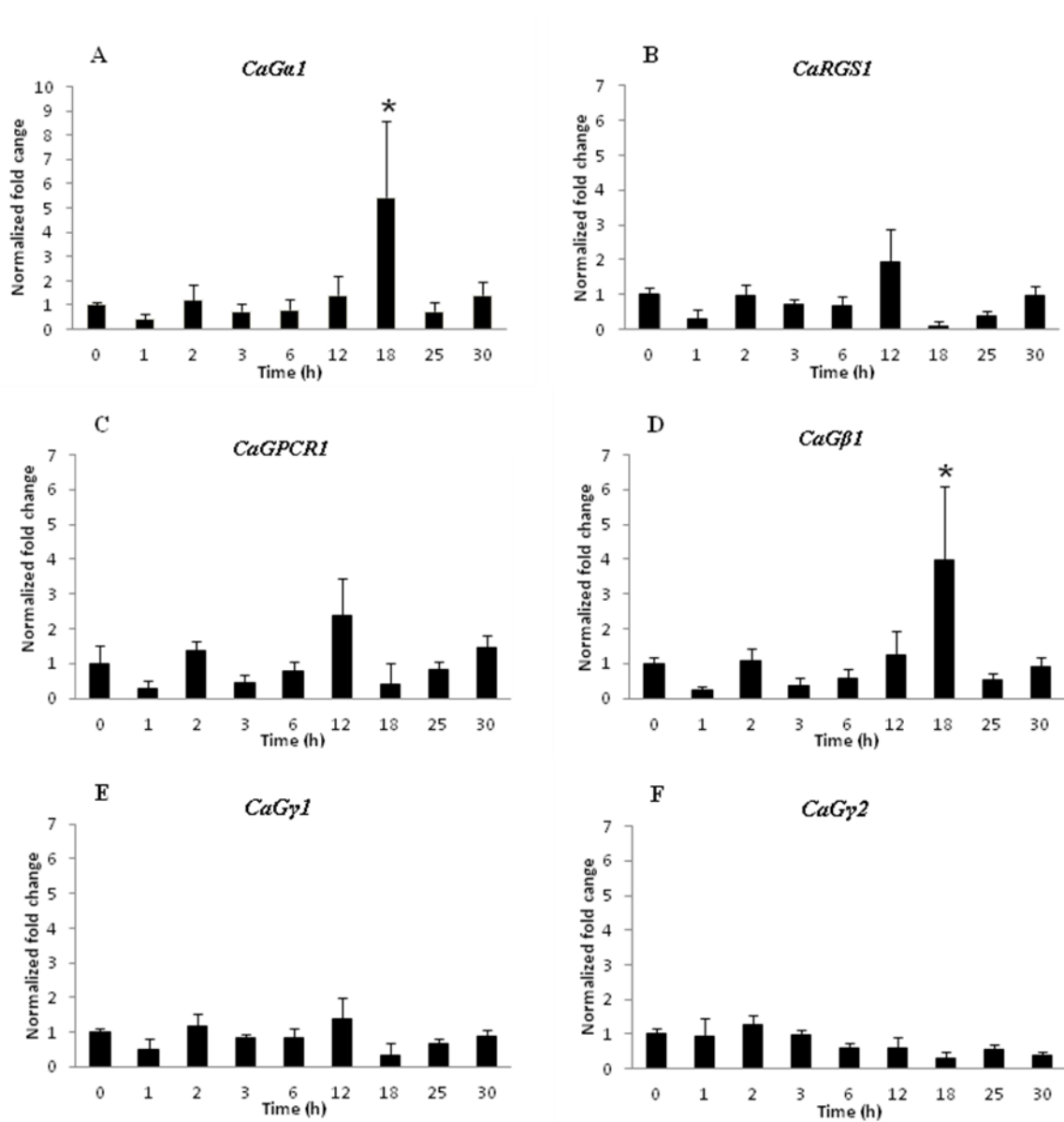


Figure 2. Expression profile of G-protein genes of *Capsicum annuum* determined by qPCR. Total RNA was isolated from 30 days-old plant stem samples collected at different time intervals after UV-B treatment. (A-F) Relative gene expression levels of *CaGa1*, *CaRGS1*, *CaGPCR1*, *CaGβ1*, *CaGγ1* and *CaGγ2* were normalized against UBI-3 gene expression and with respect to control (0 h). Error bars represent the standard error of the mean of two independent experiments, each experiment consisting of three technical replicates. * Indicate values statistically different at $P < 0.05$ according to Fisher's pairwise comparison test.

Gene expression of G proteins, *RGS* and *GPCR* in roots of *Capsicum* plants

Root is the underground organ in terrestrial plants that do not grow in a total darkness environment due to the fact that sunlight can penetrate the soil surface affecting root growth. In addition, light perceived by shoots, especially UV-B radiation, can also affect root architecture (Mo et al., 2015). Root growth and architecture depend on cell division of root apical meristems and subsequent cell elongation (Perfus-Barbeoch et al., 2004). Null mutant of AtRGS (*AtRGS1*) in Arabidopsis increased cell production in primary roots due to lack of GAP activity and subsequent steady-state pool of activated G α , which modulate cell division in apical meristems (Chen et al., 2003). Moreover, null mutants of AGB1 and GPA1 (*agb1* and *gpa1*) in Arabidopsis showed more and fewer lateral roots, respectively. Whereas G α is a positive modulator of cell division in apical meristems, G β plays an opposite role attenuating cell division (Chen et al., 2006). In this study, we evaluated if *Capsicum* plants responded to UV-B radiation through G protein signaling system in a tissue-specific way, since G protein expression was observed induced in stem. In the gene expression analysis of *CaG α 1*, *CaG β 1*, *CaG γ 1*, *CaG γ 2*, *CaRGS1* and *CaGPCR1* in roots, no statistical differences were found in the relative expression of the evaluated genes according to Fisher's pairwise comparison test. Despite no significant differences in gene expression were found, *CaG α 1* and *CaRGS1* expression profiles seem to show certain similarity, particularly in the increase of expression at 3, 18 and 25 h (Fig. 3A and B). Statistical confirmation of these observations in later experiments would suggest that *CaG α 1* participates in the response to UV-B radiation in roots, which could be probably being regulated by *CaRGS1*. According with Choudhury et al. (2012), G α and RGS can display similar expression profiles because these proteins work together in G protein signaling regulation. It is probably that UV-B radiation after 3 h of exposition of *Capsicum* plants could affect roots, where these components of G protein signaling could play a specific role.

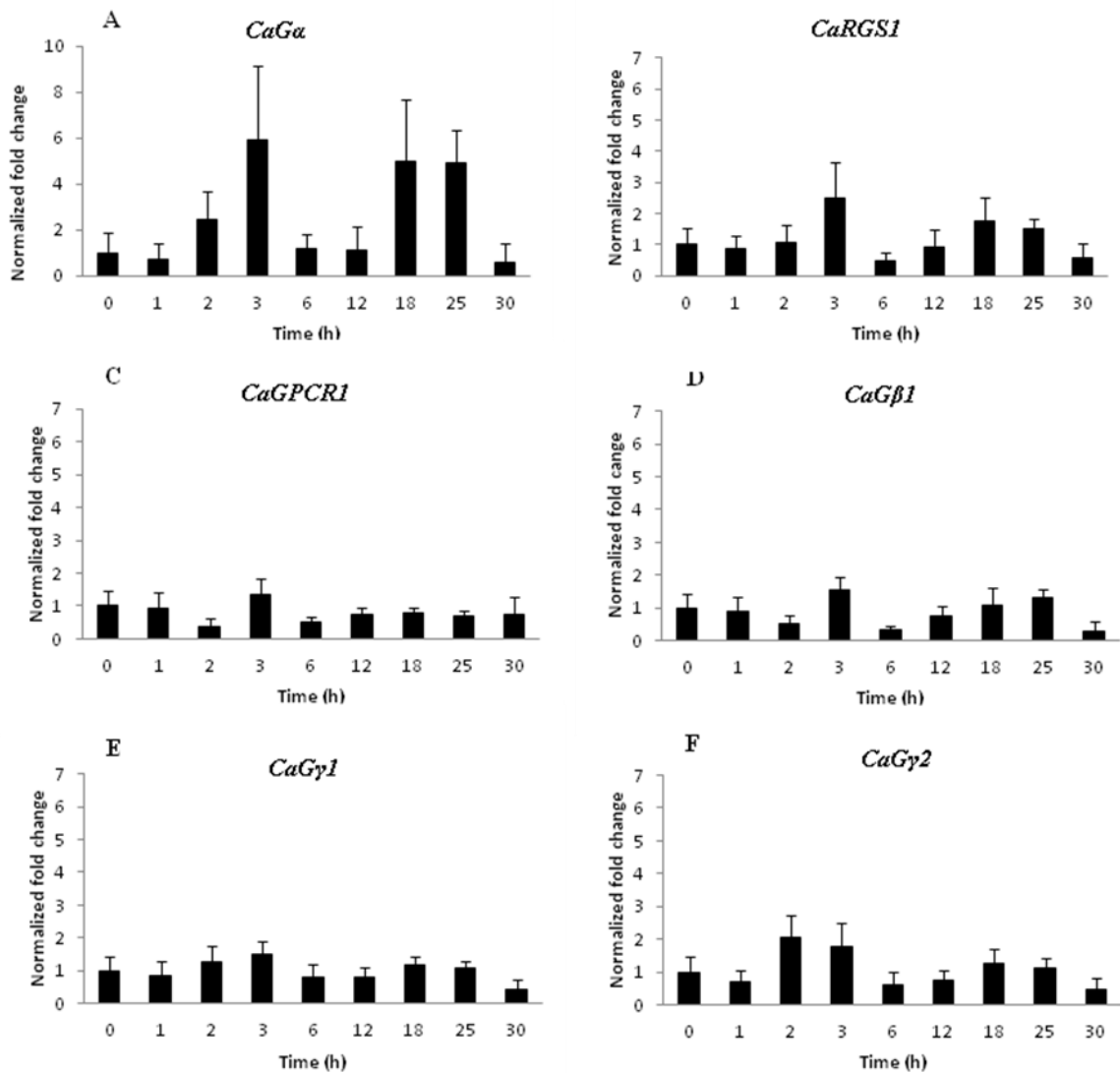


Figure 3. Expression profile of G-protein genes of *Capsicum annuum* determined by qPCR. Total RNA was isolated from 30 days-old plant root samples collected at different time intervals after UV-B treatment. (A-F) Relative gene expression levels of *CaGa1*, *CaRGS1*, *CaGPCR1*, *CaGβ1*, *CaGγ1* and *CaGγ2* were normalized against UBI-3 gene expression and with respect to control (0 h). Error bars represent the standard error of the mean of two independent experiments, each experiment consisting of three technical replicates. * Indicate values statistically different at $P < 0.05$ according to Fisher's pairwise comparison test.

Summary: expression analysis of G proteins, *RGS* and *GPCR* in stems and roots of *Capsicum*

Our results indicate that UV-B radiation up-regulates *CaGα1* and *CaGβ1* genes in stems of *Capsicum* plants, while *CaGα1* and *CaRGS1* genes exhibited a similar expression profile in roots of *Capsicum* plants, although no statistically significant. The veracity of such results will require confirmation in additional experiments. *CaGα1* and *CaGβ1* might participate in *Capsicum* stress responses induced by UV-B radiation. The regulation of the active form of Gα in response to UV-B radiation in *Capsicum* stems seems not to be regulated through a RGS protein.

Plant G proteins are self-activating without a GPCR; in arabidopsis and rice, AtRGS1 and COL1 (an ortholog of arabidopsis GTG proteins), respectively, function like GTPase accelerating proteins which keeps the G protein in its inactive form (Subramaniam et al., 2016; Xu et al., 2016). However, transcriptomic studies indicated that *GCR1* and *GPA1* share a large number of downstream genes (Chakraborty et al., 2015) and both are required for photomorphogenesis mediated by blue light and synthesis of secondary metabolites in response to UV radiation (Warpeha et al., 2008; Warpeha et al., 2006). We suggest that G protein signaling in response to UV-B radiation exposure in *Capsicum* possibly does not require a GPCR. However, it is possible that the G protein complex and GPCR act together in another abiotic stress conditions in *Capsicum*.

Here, we present new candidates for manipulation of *Capsicum* crops in resistance to UV-B stress. Additional studies are needed to elucidate the role of these molecules in abiotic stress signaling pathways, especially UV-B-induced stress.

REFERENCES

- Anderson, D.J., Botella, J.R., 2007. Expression analysis and subcellular localization of the *Arabidopsis thaliana* G-protein beta-subunit AGB1. *Plant Cell Rep* 26, 1469-1480.
- Carrasco-Ríos, L., 2009. EFECTO DE LA RADIACIÓN ULTRAVIOLETA-B EN PLANTAS. *Idesia (Arica)* 27, 59-76.
- Chakraborty, N., Singh, N., Kaur, K., Raghuram, N., 2015. G-protein Signaling Components GCR1 and GPA1 Mediate Responses to Multiple Abiotic Stresses in *Arabidopsis*. *Front Plant Sci* 6, 1000.
- Chen, J.-G., Willard, F.S., Huang, J., Liang, J., Chasse, S.A., Jones, A.M., Siderovski, D.P., 2003. A Seven-Transmembrane RGS Protein That Modulates Plant Cell Proliferation. *Science* 301, 1728-1731.
- Chen, J.G., Gao, Y., Jones, A.M., 2006. Differential roles of *Arabidopsis* heterotrimeric G-protein subunits in modulating cell division in roots. *Plant Physiol* 141, 887-897.
- Choudhury, S.R., Westfall, C.S., Laborde, J.P., Bisht, N.C., Jez, J.M., Pandey, S., 2012. Two chimeric regulators of G-protein signaling (RGS) proteins differentially modulate soybean heterotrimeric G-protein cycle. *J Biol Chem* 287, 17870-17881.
- Fina, J., Casadevall, R., Abdelgawad, H., Prinsen, E., Markakis, M.N., Beemster, G.T.S., Casati, P., 2017. UV-B Inhibits Leaf Growth through Changes in Growth Regulating Factors and Gibberellin Levels. *Plant Physiol* 174, 1110-1126.
- He, J.M., Ma, X.G., Zhang, Y., Sun, T.F., Xu, F.F., Chen, Y.P., Liu, X., Yue, M., 2013. Role and interrelationship of Galpha protein, hydrogen peroxide, and nitric oxide in ultraviolet B-induced stomatal closure in *Arabidopsis* leaves. *Plant Physiol* 161, 1570-1583.
- Izawa, Y., Takayanagi, Y., Inaba, N., Abe, Y., Minami, M., Fujisawa, Y., Kato, H., Ohki, S., Kitano, H., Iwasaki, Y., 2010. Function and expression pattern of the alpha subunit of the heterotrimeric G protein in rice. *Plant Cell Physiol* 51, 271-281.
- Khudyakova, A.Y., Kreslavski, V.D., Shirshikova, G.N., Zharmukhamedov, S.K., Kosobryukhov, A.A., Allakhverdiev, S.I., 2017. Resistance of *Arabidopsis thaliana* L.

photosynthetic apparatus to UV-B is reduced by deficit of phytochromes B and A. *J Photochem Photobiol B* 169, 41-46.

Lease, K.A., Wen, J., Li, J., Doke, J.T., Liscum, E., Walker, J.C., 2001. A Mutant *Arabidopsis* Heterotrimeric G-Protein β Subunit Affects Leaf, Flower, and Fruit Development. *The Plant Cell* 13, 2631-2641.

León-Chan, R.G., López-Meyer, M., Osuna-Enciso, T., Sañudo-Barajas, J.A., Heredia, J.B., León-Félix, J., 2017. Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environmental and Experimental Botany* 139, 143-151.

Lucas, W.J., Groover, A., Lichtenberger, R., Furuta, K., Yadav, S.R., Helariutta, Y., He, X.Q., Fukuda, H., Kang, J., Brady, S.M., Patrick, J.W., Sperry, J., Yoshida, A., Lopez-Millan, A.F., Grusak, M.A., Kachroo, P., 2013. The plant vascular system: evolution, development and functions. *J Integr Plant Biol* 55, 294-388.

Misra, S., Wu, Y., Venkataraman, G., Sopory, S.K., Tuteja, N., 2007. Heterotrimeric G-protein complex and G-protein-coupled receptor from a legume (*Pisum sativum*): role in salinity and heat stress and cross-talk with phospholipase C. *Plant J* 51, 656-669.

Mo, M., Yokawa, K., Wan, Y., Baluska, F., 2015. How and why do root apices sense light under the soil surface? *Front Plant Sci* 6, 775.

Perfus-Barbeoch, L., Jones, A.M., Assmann, S.M., 2004. Plant heterotrimeric G protein function: insights from *Arabidopsis* and rice mutants. *Curr Opin Plant Biol* 7, 719-731.

Peskan-Berghofer, T., Neuwirth, J., Kusnetsov, V., Oelmüller, R., 2005. Suppression of heterotrimeric G-protein beta-subunit affects anther shape, pollen development and inflorescence architecture in tobacco. *Planta* 220, 737-746.

Rejeb, I.B., Pastor, V., Mauch-Mani, B., 2014. Plant Responses to Simultaneous Biotic and Abiotic Stress: Molecular Mechanisms. *Plants (Basel)* 3, 458-475.

Romero-Castillo, R.A., Roy Choudhury, S., Leon-Felix, J., Pandey, S., 2015. Characterization of the heterotrimeric G-protein family and its transmembrane regulator from capsicum (*Capsicum annuum* L.). *Plant Sci* 234, 97-109.

Roy Choudhury, S., Pandey, S., 2016. Interaction of Heterotrimeric G-Protein Components with Receptor-like Kinases in Plants: An Alternative to the Established Signaling Paradigm? *Mol Plant* 9, 1093-1095.

Singh, S., Reddy, K., Reddy, V., Gao, W., 2014. Maize growth and developmental responses to temperature and ultraviolet-B radiation interaction. *Photosynthetica* 52, 262-271.

Solovchenko, A., Schmitz-Eiberger, M., 2003. Significance of skin flavonoids for UV-B-protection in apple fruits. *Journal of Experimental Botany* 54, 1977-1984.

Stateczny, D., Oppenheimer, J., Bommert, P., 2016. G protein signaling in plants: minus times minus equals plus. *Curr Opin Plant Biol* 34, 127-135.

Subramaniam, G., Trusov, Y., Lopez-Encina, C., Hayashi, S., Batley, J., Botella, J.R., 2016. Type B Heterotrimeric G Protein gamma-Subunit Regulates Auxin and ABA Signaling in Tomato. *Plant Physiol* 170, 1117-1134.

Urano, D., Jones, A.M., 2014. Heterotrimeric G protein-coupled signaling in plants. *Annu Rev Plant Biol* 65, 365-384.

Warpeha, K.M., Gibbons, J., Carol, A., Slusser, J., Tree, R., Durham, W., Kaufman, L.S., 2008. Adequate phenylalanine synthesis mediated by G protein is critical for protection from UV radiation damage in young etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Environ* 31, 1756-1770.

Warpeha, K.M., Lateef, S.S., Lapik, Y., Anderson, M., Lee, B.S., Kaufman, L.S., 2006. G-protein-coupled receptor 1, G-protein Galpha-subunit 1, and prephenate dehydratase 1 are required for blue light-induced production of phenylalanine in etiolated *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 140, 844-855.

Xu, Q., Zhao, M., Wu, K., Fu, X., Liu, Q., 2016. Emerging insights into heterotrimeric G protein signaling in plants. *J Genet Genomics* 43, 495-502.

Yadav, D.K., Islam, S.M., Tuteja, N., 2012. Rice heterotrimeric G-protein gamma subunits (RGG1 and RGG2) are differentially regulated under abiotic stress. *Plant Signal Behav* 7, 733-740.

Yadav, D.K., Shukla, D., Tuteja, N., 2013. Rice heterotrimeric G-protein alpha subunit (RGA1): in silico analysis of the gene and promoter and its upregulation under abiotic stress. *Plant Physiol Biochem* 63, 262-271.

Yadav, D.K., Shukla, D., Tuteja, N., 2014. Isolation, in silico characterization, localization and expression analysis of abiotic stress-responsive rice G-protein β subunit (RGB1). *Plant Signaling & Behavior* 9, e28890.

Yadav, D.K., Tuteja, N., 2011. Rice G-protein coupled receptor (GPCR): in silico analysis and transcription regulation under abiotic stress. *Plant Signal Behav* 6, 1079-1086.

Zlatev, Z.S., J. C. Lidon, F., Kaimakanova, M., 2012. Plant physiological responses to UV-B radiation. *Emirates Journal of Food and Agriculture* 24.

CAPÍTULO III. TRANSCRIPTOME ANALYSIS OF BELL PEPPER (*Capsicum annuum* L.) IN RESPONSE TO UV-B RADIATION REVEALS STRESS DEFENSE, REGULATION OF TRANSCRIPTION AND RESPONSE TO OXIDATIVE STRESS

Talia F. Martínez-Bastidas^{1,2}, Luis A. Amarillas-Bueno^{1,2}, Melina López-Meyer³, Karina Ramírez⁴, J. Adriana Sañudo-Barajas¹, Tomás Osuna-Enciso¹, J. Basilio Heredia¹, Luis A. Lightbourn-Rojas² y Josefina León-Félix^{1*}

¹Centro de Investigación en Alimentación y Desarrollo, A. C., Carretera a Eldorado km 5.5, Culiacán, Sinaloa, México. ²Instituto de Investigación Lightbourn, Carretera a las Pampas km 2.5 s/n Tierra y Libertad, Chihuahua, México. ³Instituto Politécnico Nacional, CIIDIR-SINALOA, Boulevard Juan de Dios Bátiz Paredes #250, Colonia San Joachin, Guasave, Sinaloa. ⁴División de Estudios de Posgrado e Investigación, Instituto Tecnológico de Culiacán, Avenida Juan de Dios Bátiz 310 Pte. Colonia Guadalupe, Culiacán, Sinaloa.

ABSTRACT

UV-B radiation can affect physiology, growth, development, and yield of plants adversely. Physiological responses to UV-B imply the activation of metabolic changes mediated by the up- and down-regulation of gene expression. Gene expression under UV-B exposition of *Capsicum annuum* plants cv. Cannon was determined by RNA-sequence analysis. Twenty five hours of UV-B radiation (72 kJ·m²) was applied to 31-days-after sowing *Capsicum annuum* plants. Most of the expressed genes in response to UV-B were related to regulation of transcription, kinase activity and oxidative stress response according to Gene Ontology (GO) classification. The differential expression analysis identified a total of 273 genes significantly expressed, among these 111 were up-regulated and 162 were down-regulated. Most of identified differentially expressed genes (DEGs) were mainly related to defense response, stress response, photosynthesis, oxidoreductase

activity and regulation of transcription. In this study, we identified some DEGs encoding WRKY transcription factor family, cytochrome P450s and pathogenesis-related genes. This may suggest that some of pathways implicated in UV-B response in *Capsicum* could be regulated by G protein signal transduction. Here, we present some candidate genes associated to *Capsicum* protection against UV-B, which could be manipulated for improving agricultural productivity of this crop. However, it is important to mention that is necessary a qPCR validation of some of DEGs found in this study.

Keywords: RNA-sequencing, UV-B, *Capsicum*, stress response.

INTRODUCTION

Plants are exposed to environmental factors that can affect their growth and development (Koyro et al., 2012; Suzuki et al., 2014). Abiotic stress is considered the main cause affecting growth in plants and yield losses. Abiotic factors that cause stress in plants included extreme temperatures, drought, nutrients, salinity and radiation (Koyro et al., 2012). Plants are vulnerable to UV-B radiation because sunlight is indispensable to survive (Mackerness, 2000). UV-B affects aspects of plant biology such as leaf area reduction, stalk growth retardation and total plant biomass (Stapleton et al., 1997). This damage at physiological level is related to changes in gene expression induced by UV-B (Chen et al., 2015; Mackerness, 2000). UV-B radiation increases the production of reactive oxygen species (ROS), which can damage photosystems PI and PII, decreasing photosynthesis (León-Chan et al., 2017; Sharma et al., 2012). One of the best-known mechanisms to reduce the effect of UV-B radiation in plants is the accumulation of secondary metabolites, such as flavonoids (Carrasco, 2009; Warpeha et al., 2008). León-Chan et al. (2017) found that UV-B radiation causes an increase in flavonoid concentration in *Capsicum annuum* plants, which are involved in defense mechanisms of the plant to UV-B stress. Flavonoids play a specific role protecting the photosynthetic apparatus from UV-B damage in plants

(Solovchenko and Schmitz-Eiberger, 2003). Some changes in plant growth induced by UV-B radiation are associated with alteration of phytohormone transport and auxin metabolism (Suchar and Robberecht, 2016). It has been found that when a plant is exposed to UV-B radiation, the number of some pathogenesis related proteins are increased, such as protection against attack by pathogens (Mackerness, 2000).

The transcription profile under UV-B exposure has been reported in some plant species such as *Artemisia annua* (Pan et al., 2014), *Lycium ruthenicum* (Chen et al., 2015) and *Glycine max* (Yoon et al., 2016). In these studies, the identification of genes related to the response to UV-B-induced responses, provided knowledge about the molecular mechanisms by which plants can avoid damage triggered by UV-B radiation. Bell pepper (*Capsicum annuum*) is a genus of Solanaceae family of economical importance (Qin et al., 2013). But molecular aspects on *Capsicum* response to UV-B radiation are poorly understood. The objective of this study was to obtain the transcriptome of *Capsicum* plants UV-B-irradiated and not-irradiated, and to identify the differentially expressed genes involved in the UV-B stress response of the plant.

MATERIALS AND METHODS

Plant growth and stress conditions

Bell pepper (*Capsicum annuum* Cv. Cannon) plants were produced as described by León-Chan et al. (2017). Twenty-eight DAS (days after sowing) bell pepper plants were put in a plant growth chamber (GC-300TLH, JEIO TECH; South Korea) for three days at the following conditions: 12 h photoperiod (from 6:00 to 18:00 h) of PAR (photosynthetically active radiation) ($972 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), 25/20 °C (day/night) temperature and relative humidity of 65 %. After that, UV-B radiation (UV-B) treatments were applied; briefly,

plants were irradiated for 6 h with PAR (from 06:00 to 10:00 and 16:00 to 18:00 h) and for 6 h of UV-B irradiation ($72 \text{ kJ}\cdot\text{m}^{-2}$, from 10:00 to 16:00 h). The UV-B radiation was applied using three Phillips TL 100W/01 lamps (Germany) with a narrow waveband between 305 to 315 nm and peaks at 311 nm; the distance between plant leaves and UV-B lamps was 50 cm, and the UV-B irradiance was measured by a UV A/B light meter (SPER SCIENTIFIC, model 850009; Scottsdale, AZ, USA). The UV-B radiation treatment was initiated at day 31 and sampling started at 10:00 h just before turning the radiation UV-B lamps on; therefore, 10:00 h at day 31 (no UV-B treatment) was considered as control condition. Then, the next samples were collected after 25 h. Samples were frozen in liquid nitrogen and stored at -80°C in an ultra-low temperature freezer (Revco UxF40086A, Thermo Scientific; USA) until analysis.

Libraries construction and RNA-seq

For RNA libraries, UV-B irradiated and non-irradiated plant stems were collected with two biological replicates and subjected to RNA isolation. Total RNA was isolated from 100 mg of stem tissue using TRIzol[®] reagent (Invitrogen Life Technologies, USA) following the manufacturer's recommendations. RNA integrity was evaluated through the assay provided in the RNA 6000 Nano system in the Agilent Bioanalyzer team (Agilent). RNA with acceptable purity and integrity ($A_{260}/A_{280} \geq 1.8$; $RIN \geq 8$) was used to prepare cDNA libraries of 150 pb paired readings in the Illumina TruSeq Library System. The concentration of two libraries was determined by fluorometry in the Qubit (Life Technologies). Later, the readings were sequenced on the Illumina NextSeq-500 platform.

Sequence assembly

The readings of genetic sequences obtained on the Illumina platform were filtered according to the quality criterion of a Phred score value ≥ 30 . The contaminant sequences,

oligonucleotides, adapters and low-quality readings were filtered using the tools provided on the Galaxy platform (galaxyproject.org). The resulting readings were mapped to the genome of *Capsicum annuum* cultivar Zunla-1 Ref_v1.0 (GenBank accession number GCA_000710875.1). Using the De Bruijn graphs in the CLC Genomics Workbench 10.1 program, the *k-mer* size and bubble size were repeatedly modified to obtain the optimum assembly according to some parameters as higher N_{50} , generation of the lowest number of contigs and a greater number of mapped readings.

Functional annotation of the transcriptome

The functional annotation of the transcriptome was done through the tool provided for Blast2go version 3.2 and Trinotate (<https://trinotate.github.io/>). The identified genes were compared against the NCBI, Swissprot-Uniprot and KEGG databases. Gene Ontology classification (<http://www.geneontology.org>) was used to determine the functional categories (Cell components, molecular function and biological processes).

Differential expression analysis

To identify the differentially expressed genes (DEGs) between the two experimental conditions, we compared the gene expression profile. For this, the tables with the number of readings per gene were generated and used for the differential expression analysis using the negative binomial model executed in the edgeR package of the statistical program R with a false discovery rate (FDR) ≤ 0.05 and an absolute \log_2 fold change value ± 1 .

RESULTS AND DISCUSSION

Functional annotation of transcriptome in response to UV-B radiation in *Capsicum* plants

In transcriptome analysis, we found that a total of 21,625 genes were shared in UV-B irradiated and control *Capsicum* plants, 1012 genes were expressed only in control condition and 1669 genes were expressed in *Capsicum* under UV-B radiation (Fig. 4). Gene ontology (GO) classification assigns functional categories to identified genes in *Capsicum* transcriptome that includes biological process, cellular components and molecular functions categories (Chen et al., 2015). The thousands of genes expressed were functionally classified into 95 GO terms within these categories. We showed the GO classification of the genes in the UV-B and control conditions and it was observed that in each subcategory the number of genes increases in UV-B treated plants compared to the control condition. We found that a large portion of genes associated with biological process included biosynthetic process, cellular nitrogen compound metabolic process, cellular protein modification process, response to stress and transport (Fig. 5A). Among the cellular components the nucleus was the dominant subcategory (Fig. 5B) and within the molecular functions ion binding, DNA binding, kinase activity and oxidoreductase activity were mainly influenced (Fig. 5C). These findings are consistent with other transcriptomic studies of UV-B stress response in plants such as *Lycium ruthenicum* and *Artemisia annua* (Chen et al., 2015; Pan et al., 2014). Herein, expressed genes are mainly involved in the regulation of transcription, kinase activity and oxidative stress response. The UV-B radiation promotes morphological and physiological responses in plants that are implicated in cell signaling and expression of genes involved in the biosynthesis of secondary metabolites, one of the early responses for plants protection against UV-B radiation (Pan et al., 2014).

Analysis of differentially expressed genes (DEGs) under UV-B radiation exposure

Using edgeR, we identified the DEGs between UV-B irradiated and control *Capsicum* plants. A total of 273 genes were found to be differentially expressed, among these 111 were up-regulated and 162 were down-regulated. A list of top 20 up-regulated and down-regulated genes is shown in Table 3. The gene with the most significant expression difference in samples was “branched-chain-amino-acid aminotransferase (BCAT; EC 2.6.1.42) (Table 3). BCAT is one of the enzymes that catalyze reactions towards the formation of branched chain aminoacids, and it was also found that BCAT gene expression increases in response to various stresses (Binder, 2010). The gene with the most significant down-regulated expression was “fasciclin-like arabinogalactan protein 12 (FLA)” (Table 3), FLA is a subclass of arabinogalactan proteins which function as adhesion molecules that are involved in plant development and in response to abiotic stress (Johnson et al., 2003). Herein, the damage caused by UV-B radiation in the *Capsicum* plants could affect the mechanical support of stems, affecting the expression of genes implied in biomechanical roles such as FLA12 (Seitfer et al., 2015).

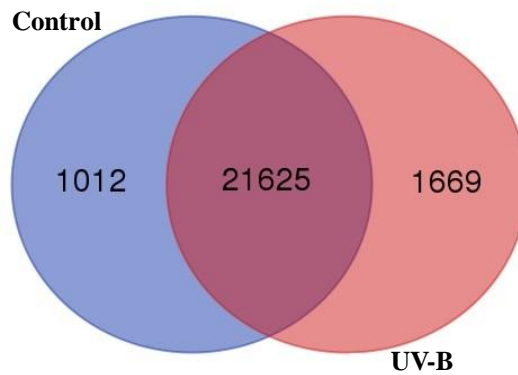


Figure 4. Venn diagram of transcriptome of *Capsicum* plants exposed to UV-B radiation. The Venn diagram shows the overlap of common genes expressed in UV-B irradiated and no-irradiated (control) *Capsicum* plants. Genes expressed under UV-B radiation (red) and genes expressed only in control condition (blue).

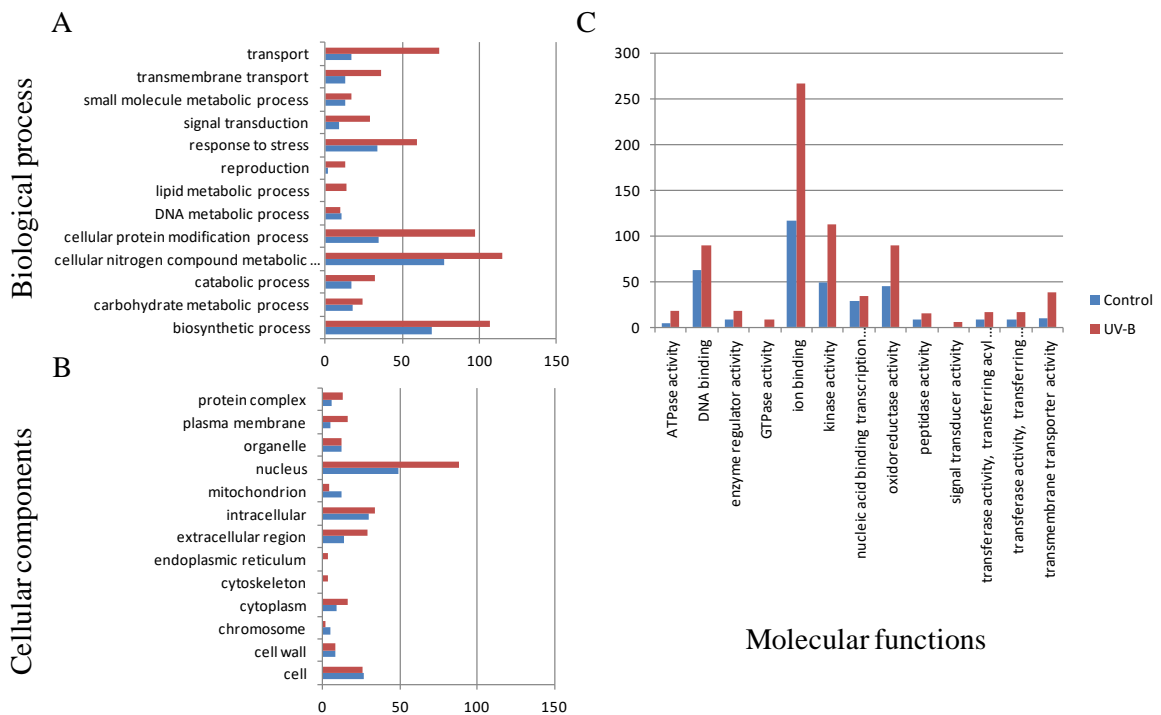


Figure 5. Gene Ontology Classification. Number of genes expressed in stems of irradiated (UV-B) and non-irradiated (control) plants according to Gene Ontology classification in the three main categories: biological processes, cellular components and molecular functions.

Table 3. List of top 20 up-regulated genes and 20 down-regulated genes in *Capsicum* plants irradiated with UV-B according to RNA-seq

ID gene	Description	Fold Change (Log ₂)	p value	FDR
Up-regulated				
LOC107867296	Branched-chain-amino-acid aminotransferase (EC 2.6.1.42)	2.78	0.000101053	1.32E-07
LOC107873562	UV-B-induced protein At3g17800, chloroplastic-like	2.65	4.77E-08	8.73E-12
LOC107858765	UPF0301 protein CHU_1773-like	2.61	4.77E-08	9.81E-12
LOC107851278	cationic amino acid transporter 7, chloroplastic-like	2.46	2.04E-06	1.11E-09
LOC107859948	F-box protein At5g49610-like	2.41	0.000121237	1.75E-07
LOC107874799	Uncharacterized protein	2.41	1.46E-06	5.41E-10
LOC107847031	uncharacterized protein LOC107847031	2.37	2.36E-07	6.48E-11
LOC107841037	heat stress transcription factor C-1	2.31	0.000712434	2.15E-06
LOC107877347	uncharacterized protein LOC107877347	2.3	2.74E-06	1.69E-09
LOC107859383	uncharacterized protein LOC107859383	2.24	6.03E-06	4.67E-09
LOC107877541	flower-specific defensin-like	2.19	6.03E-06	4.96E-09
LOC107863266	uncharacterized protein LOC107863266	2.18	0.021633211	0.000222549
LOC107878688	NAC domain-containing protein 72-like	2.13	0.007652271	4.09E-05
LOC107859382	uncharacterized protein LOC107859382	2.11	0.000186148	3.18E-07
LOC107847728	Carboxypeptidase (EC 3.4.16.-)	2.1	0.000428553	1.08E-06
LOC107860510	phosphate transporter PHO1 homolog 9-like	2.04	0.000250137	4.97E-07
LOC107843699	B3 domain-containing protein At2g36080	2.03	0.000400221	9.06E-07
LOC107875882	BTB/POZ and TAZ domain-containing protein 1-like	2.01	0.000591514	1.66E-06
LOC107876027	protein SRG1-like	1.98	0.002236059	8.25E-06
LOC107863273	Glycosyltransferase (EC 2.4.1.-)	1.98	0.000534534	1.47E-06
Down-regulated				
LOC107842225	fasciclin-like arabinogalactan protein 12	-3.43	4.77E-08	4.65E-12
orf132a	hypothetical protein	-3.15	0.031873452	0.0004328
LOC107844750	COBRA-like protein 4	-2.77	0.000186148	3.39E-07
LOC107839853	glucuronoxylan 4-O-methyltransferase 1	-2.69	1.09E-05	1.05E-08
LOC107842819	Laccase (EC 1.10.3.2)	-2.65	3.66E-05	3.77E-08
LOC107870555	classical arabinogalactan protein 9-like	-2.64	5.15E-05	6.01E-08
LOC107849570	aspartic proteinase nepenthesin-1	-2.58	1.02E-05	9.12E-09
LOC107859372	non-classical arabinogalactan protein 31	-2.54	3.84E-06	2.64E-09
ccmC	Cytochrome c maturation protein CcmC	-2.54	0.012599778	9.22E-05
LOC107843049	Glycosyltransferases (EC 2.4.-.-)	-2.42	0.001348897	4.51E-06
LOC107842777	Laccase (EC 1.10.3.2)	-2.41	2.04E-06	1.12E-09
LOC107864935	uncharacterized LOC107864935	-2.34	0.004725587	2.17E-05
LOC107871425	uncharacterized LOC107871425	-2.32	0.009458066	5.38E-05
LOC107849566	uncharacterized protein LOC107849566	-2.27	0.016963881	0.0001535

LOC107867657	uncharacterized LOC107867657	-2.26	0.002236059	8.37E-06
LOC107857303	early nodulin-like protein 3	-2.24	0.031096798	0.0004137
LOC107872137	21 kDa seed protein-like	-2.22	1.46E-06	6.02E-10
LOC107839216	ferric reduction oxidase 2-like	-2.21	0.000296473	6.30E-07
LOC107877213	cytochrome b561 and DOMON domain-containing protein At2g04850	-2.18	0.024907946	0.0002699
LOC107838750	transcription factor bHLH111	-2.16	0.000660008	1.90E-06

UV-B radiation increases the expression of genes related to response to stress and ROS scavenging

Table 4 shows DEGs in *Capsicum* after exposition to UV-B radiation which are consistent with identified genes in other plants in response to UV-B. Among up-regulated DEGs we found the activity of some ligases that are key components to plant responses against UV-B radiation damage such as “E3 ubiquitin-protein ligase ATL23”. E3 ubiquitin ligase is a regulator of plant responses to abiotic stress, photomorphogenesis, hormone signaling among others (Chen et al., 2017). The photomorphogenesis and UV-B-induced stress responses involve E3 ubiquitin ligase activity upstream of some transcription factors as bZIP transcription factor ELONGATED HYPOCOTYLS5 (HY5) that regulates gene expression changes induced by UV-B (Lockhart, 2014). Following the plant responses to UV-B radiation, the presence of some components related to auxin signalling were found such as “auxin-responsive protein” and “auxin-responsive protein SAUR67-like”. Some changes in the morphology for acclimation of plants induced by UV-B are related with specific auxin-regulated processes (Vanhaelewyn et al., 2016). Kant et al. (2009) mentioned that up-regulation of some members of auxin-responsive SAUR family decreases auxin levels producing reduced growth of rice plants. In the present study, we identified genes in stems that participate in plant responses to abiotic stress which often impact in morphological changes in plants for adaptation which is probably occurring in *Capsicum* plants after exposition to UV-B radiation. As mentioned before, hormone signaling and response to environmental stress are close related, some DEGs identified in the present study have been associated to environmental stress-induced responses mediated by abscisic acid (ABA). We found the presence of “ABA and environmental stress-

inducible protein TAS14-like” (Tsa14) and “RING-type E3 ubiquitin transferase (EC 2.3.2.27)”. It has been found that *Tsa14* is up-regulated during wound healing in stem scar tissue and is related with the protective activity against peroxidation of lipid membranes and accumulation in response to ABA or environmental stress (Leide et al., 2012). The RING E3 ubiquitin transferases are also known to participate in response to ABA and environmental stress in plants. This result showed that ABA and environmental stress-inducible protein TAS14-like and RING-type E3 ubiquitin transferase (EC 2.3.2.27) are UV-B-induced in *Capsicum* but their specific role is yet unknown.

Reactive oxygen species (ROS) are subproducts of photo-excitation of some compounds. ROS oxidize biomolecules such as phospholipids, nucleic acids and proteins triggering cell damage (Yokawa et al., 2016). We identified the up-regulation of “glutathione peroxidase” that participates in oxidative stress response. At low levels, ROS can act like second messengers in plant tolerance to environmental stresses. However, UV-B radiation among other environmental stresses can enhance ROS generation becoming an oxidative stress state (Sharma et al., 2012). UV-B can induce the expression of the glutathione peroxidase like oxidative stress defense (Vanhaelewyn et al., 2016). The “isoflavone reductase-like protein” was down-regulated in *Capsicum*, which is part of oxidative stress responses in plants. The isoflavone reductase (IFR) enzyme is involved in isoflavonoid phytoalexin biosynthesis, some IFR-like (IRL) genes found in non-leguminous plants, are part of IFR family and has been implicated in biotic and abiotic stress, as antioxidants in response to ROS (Cheng et al., 2015; Kim et al., 2003). However, the reduction of IFR mRNAs levels affected growth in *Phaseolus vulgaris* plants (Rípodas et al., 2013), isoflavone reductase-like gene in *Capsicum* is still unclear. Here, we reported the up-regulation of some “defense response” genes, the “pathogenesis-related protein P2” and “pathogenesis-related protein STH-21-like”. This is consistent with other UV-B transcriptome study, where was found that some pathogenesis-related genes increased under UV-B exposition of *Lycium ruthenicum*, a flowering plant belonging to Solanaceae family (Chen et al., 2015). UV-B radiation activated components of defense signaling pathways in *Capsicum* that has been found in UV-B-induced responses in other species (Chen et al., 2015; Yoon et al., 2016).

Expression of some defense-related genes under UV-B ensures plant defense against potential pathogen attacks (Mackerness, 2000). Herein, UV-B radiation induced the expression of some genes implicated in pathways of stress response of plants. Some of these genes have also been implicated in pathways related with plants response to biotic stress. *Capsicum* response to UV-B includes components to control hormone levels, signaling and movement, which are implicated in plant growth. Also we found that *Capsicum* responds to UV-B exposure through the expression of genes involved in decreasing ROS levels to avoid oxidative damage.

UV-B reduces photosynthesis due to ROS production, where free radicals cause damage in photosystems I and II (Dehariya et al., 2011; León-Chan et al., 2017). Phosphorylation of some phosphoproteins of the photosystem II (PSII) has been implicated in PSII protection against photoinhibition (Rintamäki et al., 1997). Down-regulation of “photosystem II phosphoprotein” in *Capsicum* could occur a plant protection mechanism against UV-B damage. Yoon et al. (2016) reported that cytochrome P450 family genes were induced by UV-B radiation in soybean, which are related to oxidation-reduction. In *Capsicum*, UV-B radiation caused up-regulation of “cytochrome P450 94C1-like” and “cytochrome P450 CYP72A219-like isoform X2” (Table 4). The P450s can be increased by abiotic stress at transcriptional level to catalyse fatty acid (FA) oxidation, these Fas have specific roles in flowering and reproduction, synthesis of cutin, suberin and sporopollenin which are protective envelopes, also have eliciting properties or are precursors of molecules with eliciting properties (Pinot and Beisson, 2011).

Some transcription factors increased their expression in abundance by exposure of *Capsicum* to UV-B radiation such as “probable WRKY transcription factor 3” and “ethylene-responsive transcription factor ERF010-like”. Pan et al. (2014) reported an increased expression of WRKY transcription factors and ethylene-response transcription factors in UV-B-stressed plants of *Artemisia annua* implicated in the biosynthesis of some secondary metabolites. In plants, heterotrimeric G proteins regulate some aspects of growth and development as well as environmental stress responses (Zhang et al., 2012). In our

transcriptome analysis, “pathogenesis-related protein P2”, “probable WRKY transcription factor 3” and “cytochrome P450 94C1-like” were induced by UV-B radiation in *Capsicum*. Chakraborty et al. (2015) reported that arabidopsis Ga subunit (GPA1) regulates some genes of WRKY family, cytochrome P450s and some genes related with defense response such as pathogenesis-related protein P1. This suggests that components of this signal transduction system could be implicated in UV-B-induced stress in *Capsicum*.

Table 4. DEGs in UV-B irradiated *Capsicum* plants related with UV-B response in other plants

Gene ID	Fold Change (Log ₂)	Function	p value	GO annotation
LOC107863844	1.91	Auxin-responsive protein	0.001348	Response to auxin
LOC107879560	1.35	auxin-responsive protein SAUR67-like	0.044252	Response to auxin
LOC107866851	1.86	E3 ubiquitin-protein ligase ATL23	0.000428	Ligase activity
LOC107840265	1.43	RING-type E3 ubiquitin transferase (EC 2.3.2.27)	0.011019	Ligase activity
LOC107860006	1.7	ABA and environmental stress-inducible protein TAS14-like	0.000079	Stress response
LOC107860501	1.5	probable WRKY transcription factor 3	0.002236	Transcription factor activity
LOC107867171	1.29	ethylene-responsive transcription factor ERF010-like	0.009714	Transcription factor activity
rpl16_1	-1.41	photosystem II phosphoprotein	0.009714	Photosynthesis
LOC107843661	1.45	cytochrome P450 94C1-like	0.013279	Oxidoreductase activity
LOC107878453	1.41	cytochrome P450 CYP72A219-like isoform X2	0.002304	Oxidoreductase activity
LOC107864929	1.21	Glutathione peroxidase	0.024915	Response to oxidative stress
LOC107866986	-1.56	isoflavone reductase-like protein	0.049803	Response to oxidative stress
LOC107879775	1.41	pathogenesis-related protein P2	0.013898	Defense response
LOC107864568	1.28	pathogenesis-related protein STH-21-like	0.012599	Defense response

CONCLUSIONS

We conducted a transcriptome analysis of the effect of UV-B radiation on *Capsicum* plants. Functional annotation of identified genes indicated that most of genes are associated

to stress response, oxidative stress, photosynthesis and transcription regulation. We found that some differentially expressed genes (DEGS) are related to signal transduction molecules such as G proteins. These results provide a better understanding of molecular mechanisms of UV-B stress response in *Capsicum* plants, for further studies of *Capsicum* protection against environment stress and agricultural production improvement of this crop.

REFERENCES

- Binder, S., 2010. Branched-Chain Amino Acid Metabolism in *Arabidopsis thaliana*. *Arabidopsis Book* 8, e0137.
- Chakraborty, N., Sharma, P., Kanyuka, K., Pathak, R.R., Choudhury, D., Hooley, R., Chen, H., Feng, Y., Wang, L., Yonezawa, T., Crabbe, M.J.C., Zhang, X., Zhong, Y., 2015. Transcriptome profiling of the UV-B stress response in the desert shrub *Lycium ruthenicum*. *Molecular Biology Reports* 42, 639-649.
- Chen, S., Zhao, H., Wang, M., Li, J., Wang, Z., Wang, F., Liu, A., Ahammed, G.J., 2017. Overexpression of E3 Ubiquitin Ligase Gene AdBiL Contributes to Resistance against Chilling Stress and Leaf Mold Disease in Tomato. *Front Plant Sci.* 8, 1109.
- Cheng, Q., Li, N., Dong, L., Zhang, D., Fan, S., Jiang, L., Wang, X., Xu, P., Zhang, S., 2015. Overexpression of Soybean Isoflavone Reductase (GmIFR) Enhances Resistance to *Phytophthora sojae* in Soybean. *Front Plant Sci.* 6, 1024.
- Dehariya, P., Kataria, S., Pandey, G.P., Guruprasad, K.N., 2011. Assessment of impact of solar UV components on growth and antioxidant enzyme activity in cotton plant. *Physiol Mol. Biol. Plants* 17, 223-229.
- Johnson, K.L., Jones, B.J., Bacic, A., Schultz, C.J., 2003. The fasciclin-like arabinogalactan proteins of *Arabidopsis*. A multigene family of putative cell adhesion molecules. *Plant Physiol.* 133, 1911-1925.

Kant, S., Bi, Y.M., Zhu, T., Rothstein, S.J., 2009. SAUR39, a small auxin-up RNA gene, acts as a negative regulator of auxin synthesis and transport in rice. *Plant Physiol.* 151, 691-701.

Kim, S.T., Cho, K.S., Kim, S.G., Kang, S., Kang, K.Y., 2003. A rice isoflavone reductase-like gene, OsIRL, is induced by rice blast fungal elicitor. *Molecules and Cells* 16 (2), 224-231.

Leide, J., Hildebrandt, U., Hartung, W., Riederer, M., Vogg, G., 2012. Abscisic acid mediates the formation of a suberized stem scar tissue in tomato fruits. *New Phytologist* 194, 402-415.

León-Chan, R.G., López-Meyer, M., Osuna-Enciso, T., Sañudo-Barajas, J.A., Heredia, J.B., León-Félix, J., 2017. Low temperature and ultraviolet-B radiation affect chlorophyll content and induce the accumulation of UV-B-absorbing and antioxidant compounds in bell pepper (*Capsicum annuum*) plants. *Environmental and Experimental Botany* 139, 143-151.

Lockhart, J., 2014. How ELONGATED HYPOCOTYL5 helps protect plants from UV-B rays. *Plant Cell* 26, 3826.

Pan, W.S., Zheng, L.P., Tian, H., Li, W.Y., Wang, J.W., 2014. Transcriptome responses involved in artemisinin production in *Artemisia annua* L. under UV-B radiation. *J. Photochem Photobiol B* 140, 292-300.

Pinot, F., Beisson, F., 2011. Cytochrome P450 metabolizing fatty acids in plants: characterization and physiological roles. *FEBS Journal* 278, 195-205.

Rintamäki, E., Salonen, M., Suoranta, U.-M., Carlberg, I., Andersson, B., Aro, E.-M., 1997. Phosphorylation of Light-harvesting Complex II and Photosystem II Core Proteins Shows Different Irradiance-dependent Regulation in Vivo : APPLICATION OF PHOSPHOTHREONINE ANTIBODIES TO ANALYSIS OF THYLAKOID PHOSPHOPROTEINS. *Journal of Biological Chemistry* 272, 30476-30482.

Rípodas, C., Via, V. D., Aguilar, O.D., Zanetti, M. E., Blanco, F. A., 2013. Knock-down of a member of the isoflavone reductase gene family impairs plant growth and nodulation in *Phaseolus vulgaris*. *Plant Physiology and Biochemistry* 68, 81-89.

- Sharma, P., Jha, A.B., Dubey, R.S., Pessarakli, M., 2012. Reactive Oxygen Species, Oxidative Damage, and Antioxidative Defense Mechanism in Plants under Stressful Conditions. *Journal of Botany* 2012, 1-26.
- Vanhaelewyn, L., Prinsen, E., Van Der Straeten, D., Vandebussche, F., 2016. Hormone-controlled UV-B responses in plants. *J. Exp. Bot.* 67, 4469-4482.
- Yokawa, K., Kagenishi, T., Baluska, F., 2016. UV-B Induced Generation of Reactive Oxygen Species Promotes Formation of BFA-Induced Compartments in Cells of Arabidopsis Root Apices. *Front Plant Sci* 6, 1162.
- Yoon, M.Y., Kim, M.Y., Shim, S., Kim, K.D., Ha, J., Shin, J.H., Kang, S., Lee, S.H., 2016. Transcriptomic Profiling of Soybean in Response to High-Intensity UV-B Irradiation Reveals Stress Defense Signaling. *Front Plant Sci* 7, 1917.
- Zhang, H., Gao, Z., Zheng, X., Zhang, Z., 2012. The role of G-proteins in plant immunity. *Plant Signal Behav* 7, 1284-1288.

CAPÍTULO IV. CONCLUSIONES GENERALES

La radiación UV-B regula positivamente *CaGal* y *CaGβ1* en tallos de plantas de *Capsicum*, los cuales podrían participar en la respuesta a estrés de *Capsicum* inducidas por la radiación UV-B.

Algunos de los genes expresados diferencialmente están asociados a la respuesta al estrés, el estrés oxidativo, respuesta de defensa, respuesta a auxinas, actividad ligasa, fotosíntesis y la regulación de la transcripción.

Algunos de los genes expresados diferencialmente podrían estar relacionados con algunas rutas de transducción de señales mediadas por proteínas G en la respuesta a la radiación UV-B.