



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

**IDENTIFICACIÓN DE GENES TIPO PÉPTIDO ANTIMICROBIANO  
PROVENIENTES DE *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme***

**TESIS PRESENTADA POR:  
ADRIANA CAROLINA ROJAS ARIAS**

**Código: 1188114**

**CC: 1.032.360.429**

**Como requisito parcial para optar por el título de Maestría en Ciencias  
– Bioquímica**

**DIRECTOR: HUMBERTO MIGUEL ZAMORA ESPITIA**  
**Director del grupo de investigación en Bioquímica Fitopatológica y**  
**Evolución Molecular**  
**Departamento de Química**

**UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA – SEDE BOGOTÁ**  
**FACULTAD DE CIENCIAS**  
**DEPARTAMENTO DE QUÍMICA**  
**BOGOTÁ D.C**  
**2010**

*“El muchacho no sabía qué era eso de la leyenda personal*

*- Es aquello que siempre deseaste hacer. Todas las personas, al comienzo de su juventud, saben cuál es su Leyenda Personal. En ese momento de la vida todo se ve claro, todo es posible, y ellas no tienen miedo de soñar y desear todo aquello que les gustaría hacer en sus vidas.(...)Cumplir su Leyenda Personal es la única obligación de los hombres. Todo es una sola cosa. Y cuando quieres algo, todo el Universo conspira para que realices tu deseo.”*

Paulo Coelho, El Alquimista.

## **AGRADECIMIENTOS**

- Al Dr. Humberto Zamora por su dirección y amable colaboración.
- A Ibonne García, Jorge Cortázar, Herlinda Amaris y Yolanda del Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional de Colombia, porque me colaboraron cuando necesité hacer ensayos de mi tesis, y por su amistad.
- A Katherine León por su amistad y colaboración.
- A mi Familia: Isabel Arias, Bernardo Rojas, Andrés Rojas y a Alejandro López por su amor y por apoyarme en este proyecto.

## RESUMEN

ANTECEDENTES. El tomate (*Solanum lycopersicum*) es un cultivo importante a nivel mundial con una producción que supera los 120 millones de toneladas, además de tener un alto valor nutricional por su cantidad de vitaminas y minerales que actúan para mantener la salud. El problema biológico más importante de este cultivo es el oomicete *Phytophthora infestans*, el cual produce la enfermedad conocida como tizón tardío. *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* es una variedad silvestre de tomate originaria de Ecuador y Perú, y distribuida por todo el mundo, con una resistencia natural al tizón tardío. Los péptidos antimicrobianos (AMP) son parte de la primera línea de defensa del huésped ante infecciones. Estos AMPs han sido agrupados en familias de acuerdo a su estructura y a su mecanismo de acción: tioninas, proteínas de transferencia de lípidos inespecíficas (LTP), heveinas, *knottin*, ciclótidos y defensinas (DEF). Las DEF y LTP de plantas son péptidos ricos en cisteína, básicos, caracterizados por tener un amplio espectro de actividades biológicas incluyendo la inhibición de patógenos (hongos y bacterias) y muchos estudios sugieren que estos péptidos actúan en la defensa contra enfermedades. OBJETIVO: Identificar AMPs (DEF y LTP) en una variedad resistente de tomate (*cerasiforme*). RESULTADOS: Se aislaron genes correspondientes a DEF y LTP a partir de hojas de *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* infectadas con *P. infestans*, determinando que estos péptidos tienen expresión constitutiva, aunque la transcripción de DEF se eleva 2.6 veces post inoculación con el fitopatógeno. Se determinaron las estructuras proteicas secundaria y terciaria de la DEF y LTP codificadas y muestran las conformaciones características de estos péptidos. Al identificar secuencias homólogas en tomate se encontraron 9 de DEF y 12 de LTP, con expresión diferencial y cercanas relaciones evolutivas. DISCUSIÓN: Las DEF y LTP pueden ser un factor importante en el control biológico de *P. infestans*, soportado por evidencias teóricas y experimentales, particularmente el aislamiento de una probable DEF de la misma variedad de tomate con actividad sobre este fitopatógeno y la similitud de la LTP aislada con Ace-AMP1, un importante péptido antimicrobiano. CONCLUSIÓN: Este trabajo reporta el aislamiento de dos péptidos antimicrobianos en un modelo de infección con *P. infestans* desde una variedad de tomate resistente al tizón tardío.

## ABSTRACT

**BACKGROUND:** *Solanum lycopersicum* (tomato) is important crop with a worldwide production of over 120 million metric tons. The plant is known as a powerhouse of nutrition. It contains a large number of vitamins and minerals that act to maintain health. Their most important biological problem is oomycete *Phytophthora infestans*, this pathogen produces the destructive disease named late blight. *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* is a wild native tomato of Ecuador and Peru, distributed around the world, with a natural resistance to late blight. Antimicrobial peptides are the first line of host defense against pathogenic infections. These peptides have been grouped into families in accordance with their structures and the mechanisms of action: thionins, non-specific lipid-transfer proteins, hevein- and knottin-type proteins, cyclotides and defensins. Plant defensins and lipid-transfer proteins are cysteine-rich peptides, basic and characterized by a broad spectrum of biological activities including inhibition against pathogens (bacteria and fungi). Several studies have suggested that this peptides act in the defense in opposition to diseases. **OBJECTIVE:** To identify antimicrobial peptides (defensin and lipid-transfer proteins) in a resistant variety of tomato (*cerasiforme*). **RESULTS:** Defensin and lipid-transfer protein like-genes were isolated from *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* leaf infected with *P. infestans*. It was determined that antimicrobial peptides have constitutive expression, but transcription defensin improves 2.6 levels of intensity with *P. infestans* inoculation. The secondary and tertiary structures of defensins and lipid-transfer protein were determined and show the characteristic arrangements of these peptides. Tomato homologues identification found 9 and 12 types of defensins and lipid-transfer proteins respectively with constitutively differential expression and close evolutionary relationship. **DISCUSSION:** Defensin and lipid-transfer protein could be an important factor in biological control of *P. infestans*, because experimental and theoretical evidence support this supposition, particularly a probable defensin was isolated previously in *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* showing activity on *P. infestans*. Also, lipid-transfer protein is similar to Ace-AMP1, an important antimicrobial peptide. **CONCLUSION:** This work reports isolation of two antimicrobial peptides in a *P. infestans* infection model from a late blight resistant tomato

## CONTENIDO

RESUMEN.....	4
ABSTRACT.....	5
1. INTRODUCCIÓN .....	10
2. MARCO TEÓRICO .....	14
2.1. Tomate. ....	14
2.1.1 <i>S. lycopersicum var. cerasiforme</i> (SLC). ....	15
2.2. Tizón tardío. ....	16
2.3 Mecanismos de defensa en las plantas .....	19
2.3.1 Péptidos antimicrobianos (AMPs). ....	20
3. JUSTIFICACIÓN .....	27
4. OBJETIVOS .....	28
5. MATERIALES Y MÉTODOS .....	29
5.1. Lugar de trabajo. ....	29
5.2. Material Biológico. ....	29
5.3. Diseño de oligonucleótidos. ....	32
5.4. Aislamiento de ácidos nucleicos y síntesis de cDNA. ....	35
5.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación de productos. ....	35
5.6. Análisis de las secuencias. ....	36
5.7. Búsqueda de homólogos en ESTdb y análisis de expresión diferencial. ....	37
6. RESULTADOS .....	39
6.1. Evaluación de la expresión de genes DEF y LTP en SLC. ....	39
6.2. Análisis de las secuencias .....	42
6.3. Búsqueda de homólogos en ESTdb y análisis de expresión diferencial. ....	52
7. DISCUSIÓN .....	59
8. CONCLUSIONES .....	66
9. PERSPECTIVAS.....	67
10. BIBLIOGRAFÍA .....	68
11. ANEXOS.....	72
12. PRODUCTOS DE LA TESIS .....	74
12.1 Artículo de revisión .....	75
12.2 Ponencia en congreso nacional .....	76
12.3 Curso de extensión .....	79

## ÍNDICE DE FIGURAS

Figura 1. Ciclo de la enfermedad tizón tardío causada por <i>Phytophthora infestans</i> sobre papa y tomate.....	18
Figura 2. Esquema del flujo de trabajo utilizado en esta tesis.....	30
Figura 3. Propagación del material vegetal.....	31
Figura 4. Aislamiento M49 de <i>P. infestans</i> cultivado en placa de agar arveja verde .....	31
Figura 5. Alineamiento de secuencias codificantes de DEFs descritas en tomate y oligonucleótidos para su identificación .....	33
Figura 6. Alineamiento de secuencias de DNA codificantes de LTP descritas en tomate y oligonucleótidos para su identificación .....	34
Figura 7. Determinación de la presencia de AMPs en el genoma de SLC.....	40
Figura 8. Control de calidad del RNA a utilizar en la evaluación de la expresión de AMPs .....	41
Figura 9. Amplificación de genes DEF y LTP a partir de planta sana e infectada de SLC .....	43
Figura 10. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de DEFs en diferentes especies del género <i>Solanum</i> .....	45
Figura 11. Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de LTP en diferentes especies del género <i>Solanum</i> .....	45
Figura 12. Comparación entre secuencias de LTP de SLC y SL.cv.Microtom1 .....	47
Figura 13. Topología de la estructura secundaria de DEF de SLC .....	47
Figura 14. Topología de la estructura secundaria para LTP. ....	47
Figura 15. Resultados del análisis de calidad del modelo DEF obtenido mediante comparación por homología .....	49
Figura 16. Evaluación de la calidad de la estructura teórica 3D de LTP .....	50
Figura 17. Visualización en estéreo del péptido DEF de SLC. ....	51
Figura 18. La molécula DEF tiene una gran región catiónica (azul) que puede interactuar con membranas celulares de patógenos.....	51
Figura 19. Estructura teórica 3D de LTP .....	53
Figura 20. Representación de la hidrofobicidad de LTP .....	53

Figura 21. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de DEF homólogos a DEF de SLC reportada.....	56
Figura 22. Árbol filogenético de DEFs de tomate y perfiles de expresión .....	56
Figura 23. Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LTP homólogos a LTP de SLC reportada aquí .....	58
Figura 24. Dendrograma de LTPs de tomate y perfiles de expresión .....	58
Figura 25. Comparación de DEF de este trabajo y la DEF de maca .....	62
Figura 26. Comparación de los esqueletos 3D de la DEF de este trabajo y la DEF de maca con base en el carbono $\alpha$ .....	62
Figura 27. Cotejo de la LTP de este trabajo y la Ace-AMP1 .....	63
Figura 28. Superposición de los esqueletos (carbono $\alpha$ ) de la LTP de SLC y Ace-AMP1 .....	63

## ÍNDICE DE TABLAS

Tabla 1. Información de las secuencias utilizadas en el diseño de oligonucleótidos para amplificación de genes tipo AMP en SLC. ....	33
Tabla 2. Características de los oligonucleótidos utilizados en este trabajo. ....	34
Tabla 3. Cuantificación de la extracción de RNA total por fluorometría. ....	40
Tabla 4. Estimación semicuantitativa de la concentración de los productos de PCR para cada gen de este estudio .....	43
Tabla 5. Clasificación de DEFs homologas a la reportada para SLC .....	54
Tabla 6. Clasificación de LTPs homologas a la reportada para SLC .....	57

## LISTA DE ABREVIATURAS

Å	Amstrong
AMP	Péptido Antimicrobiano ( <i>Anti Microbial Peptide</i> )
DEF	Defensina
dNTPs	Deoxinucleótidos trifosfato
DNA	Ácido desoxirribonucleico ( <i>Deoxyribonucleic acid</i> )
kDa	Kilodaltons
LTP	Proteína de transferencia de lípidos ( <i>Lipid Transfer Protein</i> )
µg	Microgramos
µl	Microlitros
ml	Mililitros
µM	Micromolar
mM	Milimolar
msnm	metros sobre el nivel del mar
ng	Nanogramos
pb	Pares de bases
PCR	Reacción en cadena de la polimerasa ( <i>Polymerase Chain Reaction</i> )
PR	Relacionado con patogénesis ( <i>Pathogenesis Related</i> )
RNA	Ácido ribonucleico ( <i>Ribonucleic acid</i> )
SL	<i>Solanum lycopersicum</i>
SLC	<i>Solanum lycopersicum var. cerasiforme</i>
U	Unidades

## 1. INTRODUCCIÓN

Las plantas son organismos vivos autosuficientes, que fabrican su propio alimento por medio de la fotosíntesis, y pueden habitar en la tierra o en el agua. Estos organismos producen oxígeno, necesario para la supervivencia de los seres vivos aeróbicos. Debido a su función vital, las enfermedades de las plantas afectan al hombre, ya que compiten con él por esta fuente de alimento, causando perjuicios económicos a la agricultura mundial. Una determinada planta es susceptible si, siendo incapaz de reconocer al patógeno, puede servir de hospedero permitiendo su penetración y con esto, la aparición de síntomas característicos. En contraste, la resistencia está constituida por todos aquellos mecanismos de la planta para reconocer al patógeno y oponerse a la infección, los cuales pueden ser constitutivos o inducidos, dependiendo de la genética o el medio ambiente. (López, 2007).

El tomate, taxonómicamente denominado como *Solanum lycopersicum* (SL) es una fuente rica en vitaminas A, B1, B2, B6, C y E, y de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio. Tiene un importante valor nutricional ya que incluye proteínas, carbohidratos, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico (Jaramillo et al, 2007). Este cultivo es altamente generador de empleo. En Colombia se calcula que una hectárea requiere alrededor de 160 jornales por ciclo de producción, lo cual representa alrededor de 2.309.440 jornales utilizados en el país anualmente en este cultivo (Jaramillo et al, 2007).

*Phytophthora infestans*, es el agente causal de la enfermedad de tizón tardío, la cual causa pérdidas considerables en cultivos de papa y tomate en todo el mundo, y es probablemente el patógeno más devastador en ambos cultivos. Hoy en día, las pérdidas anuales y los costos en fungicidas suman un total de \$4 billones de dólares en todo el mundo, lo que ha hecho destinar grandes esfuerzos a la investigación en fitomejoramiento e ingeniería genética como fuentes de resistencia al tizón tardío (Solis et al, 2007; Fry, 2008). Las grandes pérdidas de cultivos causados por microorganismos fitopatógenos estimulan a la búsqueda de nuevos genes que puedan estar involucrados

en la resistencia a los patógenos para crear nuevas estrategias de control que sean amigables con el medio ambiente. Una variedad silvestre de tomate, llamada *cerasiforme* (SLC) posee resistencia natural al tizón tardío lo que la hace bastante atractiva en la búsqueda de genes que confieran tal resistencia y que pudieran ser transferidos a variedades susceptibles comercialmente importantes (Vallejo, 1999).

Dentro de los sistemas de defensa de organismos tales como insectos, anfibios, mamíferos y plantas se pueden destacar los péptidos antimicrobianos (AMPs). Han sido identificados en una amplia variedad de organismos incluyendo arqueas y bacterias, lo que deja entrever su presencia temprana en la evolución (Zhu, 2007). Los AMPs hacen parte de la inmunidad no-específica e innata de los hospederos, los cuales pueden ser considerados antibióticos endógenos y moléculas efectoras. Se ha postulado que su principal papel se constituye en la desestabilización de la membrana celular. Estos compuestos biológicos poseen una amplia diversidad en cuanto a su actividad biológica, puesto que son activos contra patógenos que incluyen bacterias, hongos, virus y protozoarios. Su espectro de actividad es medianamente específico para cada péptido, de tal manera que la sola sustitución en un residuo podría alterar su funcionalidad. Su carga neta es positiva y por ello se les llama AMPs catiónicos. Su carácter es anfipático, lo cual está implicado en su acción biológica (Sels et al, 2008).

Las defensinas (DEF) de plantas son unos AMPs ampliamente distribuidos, con similitud en su estructura terciaria, pero que difieren significativamente en sus funciones biológicas. Se consideran como posibles terapéuticos antifúngicos y antibacteriales y excelentes candidatos para la transformación de plantas y producción de cultivos resistentes a patógenos (Odintsova et al, 2008). La expresión de DEFs ha sido usada en ingeniería genética para la resistencia a enfermedades en plantas como tabaco, sorgo, maíz, trigo, cebada, geranio o arroz, lo que incrementa su resistencia a infecciones y ha conducido a una reducción del uso y con esto la dependencia a pesticidas químicos (Jha et al, 2009; Odintsova et al, 2008). Las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs) son péptidos catiónicos involucrados en una gran variedad de funciones metabólicas y además se ha descrito actividad antimicrobiana, lo

que lleva a suponer que se encuentran implicados en la respuesta de defensa ante la presencia de microorganismos, aunque su modo de acción aun no se comprende bien. En la actualidad se consideran como candidatos para desarrollar cultivos tolerantes a enfermedades y como transportadores de medicamentos (de Oliveira y Moreira, 2007; Cheng et al, 2004)

Teniendo en cuenta que las estrategias de control del tizón tardío dependen de productos químicos, sumado a un control cultural con baja efectividad, y las opciones biológicas son aún incipientes, es necesario proponer nuevas estrategias de control de la enfermedad (Vargas et al, 2009). La búsqueda de estas ha constituido un objetivo fundamental de investigación del grupo de Bioquímica Fitopatológica y Evolución Molecular, del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia – Sede Bogotá, en el cual, a través de técnicas que incluyen diversas cromatografías, electroforesis y ensayos de actividad enzimática y antifúngica entre otras, se ha descrito el aislamiento y evaluación de proteínas como la  $\beta$ -1,3 glucanasa (Salas y Zamora, 2009) y posibles defensinas (Riaño y Zamora, 2005) a partir de SLC como respuesta ante la infección con *P. infestans*. De esta manera, se pretende avanzar en tales investigaciones, ahora desde un enfoque molecular que complementaría los resultados logrados en trabajos anteriores. Así, es necesario identificar la presencia de genes que codifiquen para DEFs y LTPs en plantas de SLC que presentan resistencia natural al tizón tardío, característica que puede ser útil en la comprensión de este fenómeno con la prospección futura de lograr una estrategia biotecnológica efectiva, aplicable a tomate u otras plantas solanáceas, que permita controlar esta enfermedad o generar resistencia en plantas susceptibles, mejorando su productividad.

En este orden de ideas, la actual iniciativa estudia las DEFs y LTPs de una variedad resistente de tomate (SLC) a *P. infestans*, aplicando aproximaciones moleculares y bioinformáticas, lo cual constituye un aporte para la comprensión de los mecanismos de resistencia de este modelo en particular, y acercando el conocimiento al posible logro de aplicar los péptidos antimicrobianos para este importante problema fitosanitario.

## 2. MARCO TEÓRICO

### 2.1. Tomate.

El tomate, *Solanum lycopersicum* (SL), es una hortaliza perteneciente a la familia solanaceae, originaria de la región andina que hoy comparten Colombia, Ecuador, Perú, Bolivia y Chile, de gran importancia socioeconómica en muchos países y su popularidad aumenta constantemente (Nuez, 2001). Es una rica fuente de vitaminas A, B1, B2, B6, C y E, y de minerales como fósforo, potasio, magnesio, manganeso, zinc, cobre, sodio, hierro y calcio. Tiene un importante valor nutricional ya que incluye proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico (Jaramillo et al, 2007; Nuez, 2001)

La producción global de tomate se ha incrementado cerca de un 300% en las últimas cuatro décadas. La producción anual de tomates en el mundo en 2003 se estimó en 110 millones de toneladas con un área total de producción de 4.2 millones ha, sin tener en cuenta a los pequeños productores en los trópicos y subtropicos. El comercio mundial de tomates alcanza cifras de 4.2 billones de dólares al año, siendo los mayores productores China, Estados Unidos y Turquía (Heuvelink, 2005).

En Colombia está disperso por todo el país, se cultiva en 19 departamentos; sin embargo, más del 80% de la producción está concentrada en los departamentos de Cundinamarca, Norte de Santander, Huila, Valle, Santander, Tolima, Antioquia, Boyacá, Cesar, Nariño, Atlántico y Guajira. Para el año 2005 se sembraron 14.435 hectáreas, lo cual representó el 15,98% del área hortícola del país, con un volumen de producción de 363.928 toneladas (Jaramillo et al, 2007; REDPRODEPAZ, 2006). El rendimiento promedio por hectárea a nivel nacional es de 25 ton/ha. Se cultiva en regiones de climas cálidos a frío moderado (0 a 2100 m.s.n.m.). Sin embargo, las condiciones climáticas de estas regiones, principalmente en las épocas de sequía o lluvia, afectan la productividad de los cultivos por los cambios extremos de temperatura y humedad relativa, que favorecen el ataque de plagas y enfermedades. Esto ha generado la

utilización indiscriminada de plaguicidas y fertilizantes químicos para lograr mayor productividad, con esto se incrementan los costos de producción, disminuye la rentabilidad, y causa graves daños de contaminación al medio ambiente; estos factores han causado disminución del área sembrada en un 17,5% (Jaramillo et al, 2007).

En Colombia los patógenos (hongos, bacterias, virus y nematodos) constituyen uno de los factores más limitantes de la producción a gran escala de tomate, situación que se ve incrementada gracias a la carencia de cultivares comerciales con resistencia genética específica, la poca efectividad de las prácticas de control empleadas por el agricultor y el uso indiscriminado de pesticidas que inducen la mutabilidad de los patógenos hacia razas más virulentas (Vallejo, 1999).

Las principales enfermedades observadas en las zonas productoras de tomate en Colombia son: tizón tardío (*Phytophthora infestans*), tizón temprano (*Alternaria dauci* var. *solanii*), mildew o moho gris (*Fulvia fulva* – *Cladosporium fulvum*), carate (*Phoma andina* var. *crystalliformis*), mancha foliar (*Stemphylium solani*), marchitez (*Fusarium oxysporum* var. *lycopersici*) (*Verticillium dahliae*), mancha bacteriana (*Xanthomonas campestris* var. *vesicatoria*), peca bacteriana (*Pseudomonas syringae* var. *tomato*) y la peste negra o vira cabeza (virus TSWV – *Tomato Spotted Wilt Virus*) (Vallejo, 1999).

### **2.1.1 *S. lycopersicum* var. *cerasiforme* (SLC).**

El tomate perteneciente a la variedad botánica *cerasiforme*, llamado pajarito, de aliño, vagabundo o tipo cereza, considerado como el precursor del tomate de mesa comúnmente cultivado, corresponde a una "maleza" con frutos pequeños, de 1,5 a 3 cm de diámetro, originaria de la costa occidental y áreas montañosas de Perú. De su zona de origen migró a Mesoamérica y a México donde se presume fue domesticado por las poblaciones indígenas, dando origen a variedades de agricultor tipo cereza, mediante un proceso de domesticación y selección, realizado inicialmente por las comunidades aborígenes y posteriormente por las comunidades locales. Los cerasiformes acompañaron al tomate como "maleza" a diversas partes del mundo, y

hoy se encuentran ampliamente difundidos en áreas tropicales y templadas. Éstos han sido colectados en una gama amplia de nichos ecológicos, los cuales abarcan desde regiones áridas hasta zonas húmedas de la parte este de los Andes, y a alturas que van desde los 0 hasta los 2400 msnm (Medina y Lobo, 2001; Nuez, 2001; Vallejo, 1999).

La importancia del tomate pajarito radica en que puede ser utilizado como fuente de genes para los tomates de mesa e industriales y también para el desarrollo de los tomates tipo cereza, de amplia aceptación, cuyos frutos se utilizan enteros en la preparación de ensaladas (Medina y Lobo, 2001). Como características genéticas útiles se destacan su tolerancia a la humedad, resistencia al tizón tardío, nematodos y algunos hongos foliares, y la facilidad para cruzarse con variedades comerciales de SL (Vallejo, 1999).

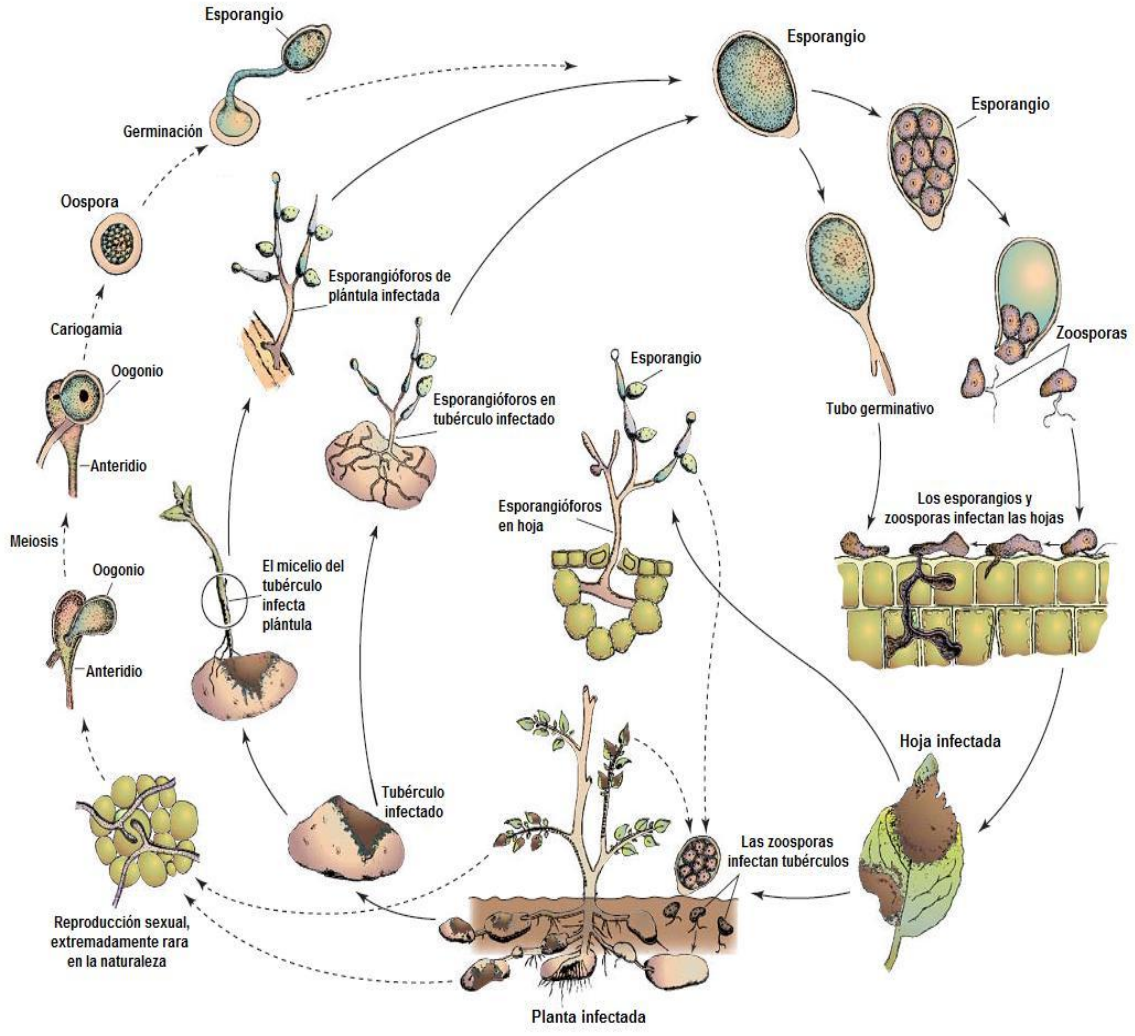
Ya en Colombia se han hecho esfuerzos por producir variedades comerciales de tomate resistentes al tizón tardío utilizando SLC en programas de fitomejoramiento convencional obteniendo variedades parcialmente resistentes, aunque este tipo de mejoramiento presenta problemas como el largo tiempo para producir una variedad mejorada, el grado de incompatibilidad, baja eficiencia de selección y la posible introducción de genes indeseables a la nueva variedad (Vallejo, 1999).

## **2.2. Tizón tardío.**

Una de las enfermedades más comunes (y quizás la más devastadora) que ataca el cultivo de tomate en todo el mundo es la gota o tizón tardío, causado por el oomicete *Phytophthora infestans*, un fitopatógeno de las plantas de la familia solanaceae, cuyo nombre de género "*Phytophthora*" significa "destructor de plantas" (Fry, 2008). La enfermedad es común en zonas con temperaturas entre 15° y 22°C y humedad relativa alta (mayor de 80%). *P. infestans* es un oomicete heterotálico, patógeno hemibiotrófico de plantas de la familia solanaceae en los agroecosistemas. Su ciclo asexual le facilita un crecimiento poblacional dramáticamente alto sobre tejidos de huéspedes susceptibles (Fry, 2008). El oomicete se desarrolla en su hospedero a temperaturas

entre 15° y 22°C y humedad relativa de 80% aproximadamente. Se transmite a través de semillas de tomate, y puede sobrevivir en forma de micelio en otras plantas cultivadas o malezas de la familia de las solanáceas, o en residuos de cosecha que permanecen en el suelo. Cuando la severidad de la gota es alta en las hojas o tallos, sus esporas son fácilmente diseminadas por el viento, las herramientas o por el salpique del agua de riego (Fry, 2008; Jaramillo et al, 2007). Las zoosporas y esporangios asexuales constituyen su forma infectante (Figura 1) (Fry et al, 1993). Esta enfermedad fue la causa de la hambruna irlandesa por falta de papa en 1840 que causó cerca de un millón de muertes y la emigración de alrededor de 1.5 millones de personas a diferentes países del mundo, principalmente a Estados Unidos (Fry, 2008).

Durante el ciclo de vida de *P. infestans*, el micelio produce esporangióforos ramificados que a su vez generan esporangios con forma de limón en sus extremos. Estos germinan en su mayoría por la liberación de tres a ocho zoosporas a temperaturas de hasta 12 – 15°C, mientras que por encima de 15°C los esporangios pueden germinar directamente produciendo un tubo germinativo. Para que ocurra reproducción sexual es necesaria la existencia de dos “sexos” (*mating type*) que generalmente se denominan A1 y A2, distribuidas por muchos países incluyendo Colombia (Vargas et al, 2009), y como resultado puede producir nuevas cepas mucho más agresivas a través de recombinación genética de sus características patogénicas. Cuando los dos sexos crecen de forma adyacente, la hifa femenina atraviesa al anteridio (hifa masculina) y forma un oogonio globoso sobre él. El anteridio fertiliza al oogonio fusionando sus núcleos y generando así una oospora resistente de paredes gruesas, que puede sobrevivir en el suelo por 3 a 4 años y soportar bajas temperaturas. Las oosporas germinan por medio de un tubo germinativo que puede producir un esporangio o directamente formar un micelio (Figura 1) (Agrios, 2005).



**Figura 1.** Ciclo de la enfermedad tizón tardío causada por *Phytophthora infestans* sobre papa y tomate. Tomado de Agrios 2005.

Al germinar las oosporas y zoosporas en el tejido vegetal, el micelio producido genera decoloración por colapso de las células vegetales. El micelio se desarrolla dentro de hojas y tallos de la planta y a través de los estomas emergen esporangióforos que a su vez producen esporangios, que pueden ser dispersados por el viento, el agua de riego o lluvia, herramientas o la tierra de cultivo, y al entrar en contacto con una planta sana causan una nueva infección. Los tubos germinativos penetran directamente los tejidos vegetales o a través de los estomas y el micelio crece profusamente entre las células, enviando haustorios a su interior. Las primeras células infectadas mueren mientras el micelio se abre paso entre ellas para conseguir tejido fresco (Agrios, 2005).

En Colombia la primera descripción de este patógeno se hizo en 1927 (Vargas et al, 2009). Las pérdidas de cosecha que genera la enfermedad superan los 3 billones de dólares al año en todo el mundo, e incluso ahora *P. infestans* sigue considerándose como el mayor problema en la agricultura de tomate por ser recalcitrante y por la dificultad que presenta su control basado en productos químicos perjudiciales para la salud humana y los entornos naturales (Fry, 2008).

Como estrategias de control se han empleado diversas herramientas. El manejo integrado de cultivo es una de ellas, que incluye el uso de semillas sanas, la eliminación de focos de infección (desechos agrícolas infectados), uso de cultivares resistentes y la aplicación de fungicidas. Desafortunadamente los cultivares más usados y apetecidos en el mercado son los menos resistentes a la enfermedad (Fry, 2008; Agrios, 2005). Esto ha conducido al desarrollo de múltiples investigaciones orientadas hacia el control eficaz de la plaga, entre ellas, la comprensión de la defensas naturales que ciertas variedades exhiben que puedan resultar útiles en programas de ingeniería genética vegetal (Fry, 2008).

### **2.3 Mecanismos de defensa en las plantas**

En su ambiente natural las plantas están continuamente sometidas al contacto con diversos tipos de microorganismos, sin embargo, solo una pequeña parte de ellos

puede llegar a causarles enfermedades. De este modo, las plantas y sus patógenos han coevolucionado, generando en los microorganismos formas más eficientes de colonizar a su huésped y en las plantas estrategias efectivas de resistir el ataque de sus invasores (López, 2007)

Para que una planta sea capaz de responder ante el ataque de un patógeno es necesario que inicialmente sea capaz de reconocerlo. Para ello la planta se sirve de dos diferentes vías de reconocimiento que detectan, por una parte patrones moleculares asociados a microorganismos (MAMPs por sus siglas en inglés), conocida como resistencia basal; y por otra parte efectores del patógeno, denominada resistencia no hospedero. Una vez que se ha reconocido la presencia del organismo invasor la planta puede desplegar su arsenal de defensa y resistir a la enfermedad (López, 2007).

En las plantas, la generación de resistencia a enfermedades se logra gracias a barreras preformadas físicas (pared celular, cutícula, depósitos de lignina) y químicas (fitoanticipinas, compuestos fenólicos, taninos, saponinas) eficientes, y a mecanismos de defensa inducibles, igualmente físicos y químicos, que se activan tras el ataque de un organismo patógeno. Dentro de los mecanismos inducibles químicos de resistencia encontramos la producción de especies oxígeno reactivas (ROS), la respuesta de hipersensibilidad, acumulación de fitoalexinas, taninos y compuestos fenólicos y la producción de las denominadas proteínas relacionadas con patogénesis (PR) (Chehab et al, 2008; De Paula et al, 2008; Odintsova et al, 2008; Sels et al, 2008; Tavares et al, 2008).

### **2.3.1 Péptidos antimicrobianos (AMPs).**

Se ha encontrado que las proteínas PR se expresan en mayor proporción en tejidos vegetales parasitados comparados con los sanos y que sus pesos oscilan entre 5 a 75 kDa, así, las de pesos inferiores a 10 kDa se denominan péptidos PR, también conocidas como péptidos antimicrobianos (AMPs). La producción de AMPs es una estrategia de defensa ampliamente usada, no solo por plantas, sino también por muchos otros organismos. Los AMPs son componentes de la inmunidad innata y

corresponden a un antiguo mecanismo de defensa encontrado en microorganismos, hongos, plantas y animales (de Oliveira y Moreira, 2009; Thevissen et al, 2004; Thomma et al, 2002). Los AMP no reconocen antígenos específicos, pero como ventaja, son producidos simplemente por la transcripción y traducción de un gen, se liberan relativamente rápido luego de la infección con un gasto reducido de energía y biomasa (Thomma et al, 2002). Hacen parte de este grupo de proteínas las  $\beta$ -1,3-glucanasas, quitinasas, endoproteasas, peroxidases, heveinas, *knottins*, oxalato oxidasas, proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), tioninas y defensinas (DEFs), entre otras (De Paula et al, 2008; Sels et al, 2008).

### **2.3.1.1. Defensinas.**

Las DEFs son péptidos que poseen entre 45-54 aminoácidos, los cuales son altamente básicos, ricos en cisteína y estructuralmente relacionados con las DEFs de organismos como insectos y mamíferos, y su expresión puede ser constitutiva o inducida tras un estímulo (Jha et al, 2009; De Paula et al, 2008; Swathi et al, 2008). En vegetales las DEFs están implicadas en la respuesta a estrés biótico y abiótico tales como los que generan los hongos o las bacterias. Su actividad biológica va desde la inhibición de proteasas y amilasas, bloqueo de canales iónicos e inhibición de la síntesis de proteínas, hasta efectos citotóxicos sobre algunas células vegetales y animales (de Oliveira y Moreira, 2009; Odintsova et al, 2008). *In vitro* han demostrado que su actividad biológica más destacada es la de inhibidores del crecimiento de un amplio rango de hongos filamentosos y levaduras (Sels et al, 2008). Su efectividad ha sido ensayada sobre hongos fitopatógenos como *Botrytis cinerea*, *Alternaria brassicicola*, *A. longipes*, *Fusarium culmorum*, *Verticillium dahliae*, *Rhizoctonia solani*, *Neurospora crassa*, *Microdochium oryzae* y levaduras como *Candida albicans* (Jha et al, 2009; Sels et al, 2008). En hongos, se han reportado valores de concentración letal 50 (CL50) de defensinas en rangos muy variados, entre 1.5 a 500  $\mu\text{g/ml}$  (de Oliveira y Moreira, 2009; Aerts et al, 2008; Thomma et al, 2002).

El estudio de las DEFs vegetales se inició hacia el año 1990, desde su aislamiento de plantas de trigo y cebada, y se clasificaron erróneamente como un subgrupo de las tioninas (gamma-tioninas), debido a su similitud en tamaño molecular (5kDa), secuencia de aminoácidos y el número de cisteínas que contienen (8); pero estudios posteriores las reclasificaron dentro del grupo de las DEFs, basados en su conformación estructural, muy similar a DEFs descritas anteriormente en mamíferos e insectos, estabilizada por cuatro puentes disulfuro, nombradas también como familia de proteínas PR-12 (de Oliveira y Moreira, 2009; Odintsova et al, 2008; Sels et al, 2008; Thomma et al, 2002). Pueden inhibir el crecimiento de un amplio rango de microorganismos e insectos fitopatógenos e incluso han mostrado actividad antibiótica sobre patógenos humanos como *C. albicans* y *Aspergillus* sp., lo que las hace buenas candidatas para su uso terapéutico (Swathi et al, 2008). En el caso de microorganismos, su modo de acción involucra la alteración de las membranas de los patógenos por interacciones específicas e inespecíficas con moléculas presentes en su superficie celular, mientras que el efecto que tienen sobre insectos consiste básicamente en la inhibición de enzimas digestivas como amilasas y proteasas (Odintsova et al, 2008).

Se han identificado DEFs vegetales a partir de diferentes tejidos (semillas, tallo, raíces, hojas y flores) de plantas como el rábano (*Raphanus sativus*), Dalia (*Dahlia merckii*), tabaco (*Nicotiana tabacum*), arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), caña de azúcar (*Saccharum officinarum*), maíz (*Zea mays*), sorgo (*Sorghum vulgare*), entre otras (De Paula et al, 2008; Sels et al, 2008; Swathi et al, 2008). Se han identificado más de 300 secuencias tipo DEF en el genoma de *A. thaliana*, considerando necesaria la redundancia para proteger a la planta contra patógenos mutantes con tolerancia elevada a un tipo particular de molécula de DEF (Odintsova et al, 2008).

Existen receptores de DEFs muy específicos en la membrana celular de los patógenos, como en el caso de la interacción de DEFs de planta con la membrana celular de los hongos donde los esfingolípidos actúan como receptores de éstas, uno de los tres tipos de lípidos más abundantes en las membranas eucariotas, junto con los esteroides y fosfoacilgliceroides, que además de su función estructural, son importantes como

moléculas señalizadoras para la regulación del crecimiento y respuestas a estrés en la célula (Jha et al, 2009; Aerts et al, 2008; De Paula et al, 2008; Thevissen et al, 2004). No todas las DEFs reconocen el mismo tipo de esfingolípidos, por ejemplo, DmAMP1 de dalia (*Dahlia merckii*) reconoce la manosildiinositolfosforil-ceramida, en cambio, RsAFP2 de rábano (*R. sativus*) reconoce glucosilceramidas (Aerts et al, 2008). Aquellos hongos que carecen de receptores tipo esfingolípido por deficiencias en alguna de las enzimas involucradas en la vía metabólica de producción del mismo, presentan resistencia a las DEFs (Aerts et al, 2008; Thevissen et al, 2004). Algunas defensinas activas contra *P. infestans* se han aislado de *Echinochloa crusgalli* (Ec-AMP-D1 y Ec-AMP-D2) (Odintsova et al, 2008) y *Lepidium meyenii* (Lm-Def) (Solis et al, 2007).

Morfológicamente, las DEFs de plantas generan dos tipos de distorsiones sobre las hifas, lo que las clasifica en dos grupos: las DEFs morfogénicas, las cuales reducen la tasa de elongación de la hifa y generan distorsiones morfológicas significativas, que incluyen incremento en las ramificaciones, protuberancias; y las DEFs no morfogénicas, que a diferencia de las anteriores, reducen la tasa de elongación de la hifa sin generar distorsiones morfológicas y algunas tienen efecto inhibitorio sobre bacterias (de Oliveira y Moreira, 2009; Aerts et al, 2008; Thomma et al, 2002). La acción de las DEFs sobre hongos produce un incremento en la toma de  $\text{Ca}^{+2}$  y expulsión de  $\text{K}^{+}$ , cambios de potencial de membrana y alcalinización del medio, lo que afecta directamente el gradiente de  $\text{Ca}^{+2}$ , factor fundamental en la elongación de las hifas (de Oliveira y Moreira, 2009; Marquès et al, 2009; Aerts et al, 2008; Tavares et al, 2008).

Aparte de la actividad de las DEFs dentro de la defensa ante microorganismo en las plantas, se ha encontrado también que contribuyen como mediadores de tolerancia al zinc, reducción del dehidroascorbato para producir ácido ascórbico, y bloqueo canales iónicos (de Oliveira y Moreira, 2009; Marquès et al, 2009; Mirouze et al, 2006). También se ha evidenciado la expresión de estos péptidos como respuesta al estrés por frío y por lesiones mecánicas en las plantas (Graham et al, 2008; Carvalho et al, 2006). Incluso, gracias a análisis genómicos, se han encontrado evidencias de que las DEFs

podrían estar involucradas en fenómenos de autoesterilidad, generando que las plantas no reconozcan su propio polen (Graham et al, 2008).

### **2.3.1.2. Proteínas de transferencia de lípidos (LTPs).**

Las LTPs comprenden un grupo de péptidos pertenecientes a las proteínas PR, clasificadas como PR-14 (Sels et al, 2008). La primera descripción de este tipo de proteínas se llevó a cabo en 1975 en tubérculos de papa, observando que estaban asociadas al intercambio de fosfolípidos entre fracciones microsomales y mitocondrias (Kader, 1975). En 1996 se denominaron “proteínas de transferencia de lípidos” (*Lipid-Transfer proteins*, LTP por sus siglas en inglés) por su capacidad para mediar la transferencia de lípidos entre membranas donadoras y receptoras *in vitro*, implicadas igualmente en la biogénesis de membranas y regulación de las concentraciones de ácidos grasos intracelulares. Se sugirió funciones extracelulares por la presencia de secuencias péptido señal en su cDNA relacionadas con formación de cutina, embriogénesis, reacciones de defensa ante fitopatógenos, simbiosis y adaptación de la planta a condiciones ambientales adversas (Kader, 1996). Usualmente se suele denominar a estos péptidos LTP inespecíficos (*nonspecific LTP* ó nsLTP) debido a que tienen la capacidad de actuar sobre diferentes tipos de lípidos en las membranas celulares (de Oliveira y Moreira, 2007).

Se han descrito dos familias de LTPs, denominadas LTP1 y LTP2. Las LTP1 tienen pesos moleculares de aproximadamente 10 kDa, una longitud entre 90 a 95 aminoácidos y una estructura secundaria compuesta por cuatro  $\alpha$ -hélices y una larga cola C-terminal (de Oliveira y Moreira, 2007). Las LTP2 tienen pesos moleculares de aproximadamente 7 kDa, una longitud promedio de 70 aminoácidos y una estructura secundaria de tres  $\alpha$ -hélices con una cola larga C-terminal. En común las dos familias tienen 8 cisteínas implicadas en la formación de 4 puentes disulfuro, puntos isoeléctricos entre 9 y 10 y la presencia de un péptido señal en la región amino terminal que puede variar entre 21 a 27 aminoácidos en las LTP1, y entre 27 a 35 aminoácidos en las LTP2 (de Oliveira y Moreira, 2007; Blein et al, 2002).

Basándose en su habilidad transportadora de lípidos y las localizaciones donde se han encontrado se han propuesto diversas funciones de las LTP en la fisiología de las plantas, como la síntesis de cutina,  $\beta$ -oxidación, embriogénesis somática, alérgenos, señalizadores en plantas y defensa contra fitopatógenos, aunque aún no se conoce con profundidad los mecanismos específicos de acción de estas proteínas (Pii et al, 2010; de Oliveira y Moreira, 2007; Blein et al, 2002).

Las LTP tienen como característica estructural fundamental la formación de una cavidad flexible de carácter hidrofóbico, lugar donde sucede la interacción entre la proteína y el lípido, que puede incrementar o contraer su volumen en función de acomodarse de la mejor forma a la molécula hidrofóbica, plasticidad responsable de la falta de especificidad transportadora en la proteína (de Oliveira y Moreira, 2007).

La actividad antimicrobiana de las LTP1 se descubrió inicialmente por análisis de extractos protéicos de plantas de maíz y cebada donde se encontraron relacionadas con la inhibición del crecimiento de hongos y bacterias fitopatógenos *in vitro*, aunque su actividad fue superior contra hongos (Molina et al, 1993). Se han descrito desde entonces LTPs con acción antimicrobiana en diversos tejidos de *A. thaliana*, espinaca (*Spinacia oleracea*), frijol mungo (*Phaseolus mungo*), pandan (*Pandanus amaryllifolius*), cebolla (*Allium cepa*), ají (*Capsicum annuum*), girasol (*Helianthus annuus*), entre otros; con actividad contra los hongos *Fusarium oxysporum*, *F. culmorum*, *Pythium aphanidermathum*, *Sclerotium rolfsii*, *Pyricularia oryzae*, *A. brassicola*, *Ascochyta pisi*, *B. cinerea*, *Colletotrichum lindemuthianum*, *Nectria haematococca*, *Phoma betae*, *Pyrenopeziza tritici-repentis* y *V. dahliae*; y las bacterias *Staphylococcus aureus*, *Bacillus megaterium*, *Sarcina lutea*, *Pseudomonas aeruginosa* y *P. syringae* (de Oliveira y Moreira, 2007; Diz et al, 2006; Ooi et al, 2006; Wang et al, 2004; Ge et al, 2003; Cammue et al, 1995).

Aún no se ha logrado entender a fondo la forma en que interactúan las LTPs con los fitopatógenos para lograr su control. Se ha planteado que gracias a su capacidad de

reconocer lípidos las LTP se fijarían a lípidos de membrana y además se ha demostrado que las LTPs interactúan con membranas biológicas alterando su permeabilidad por ensayos con SYTOX Green; aunque la LTP Ace-AMP1 de cebolla, con potente acción antimicrobiana no es capaz de unirse y transportar a moléculas hidrofóbicas, lo que demostraría que esta actividad va más allá del reconocimiento de lípidos de membrana (de Oliveira y Moreira, 2007).

Se ha encontrado que *Phytophthora* y *Pythium* producen elicinas, moléculas de 10 kDa que atacan los esteroides de la membrana celular del hospedero e inducen respuesta de hipersensibilidad. Las LTPs competirían con el receptor de las elicinas inhibiendo su actividad, aunque el papel específico de este tipo de respuesta en la defensa de la planta no está elucidado (Blein et al, 2002).

### 3. JUSTIFICACIÓN

En trabajos anteriores del grupo de investigación se aislaron y purificaron proteínas como  $\beta(1,3)$  glucanasas, quitinasas, peroxidases y posibles defensinas de los espacios intercelulares de SLC (Salas y Zamora, 2009; Riaño y Zamora, 2005). Particularmente en el estudio de Riaño y Zamora (2005) se destacó una proteína de bajo peso molecular (5.4 kDa), con presencia de puentes disulfuro y actividad biocontroladora sobre *P. infestans*, sugestiva de pertenecer al grupo de las DEFs (Riaño y Zamora, 2005). Además, se desarrolló otro trabajo en el cual, usando el modelo oculto de Markov se detectó la presencia de cinco posibles DEFs en el genoma del tomate (Castellanos y Niño, 2008), lo que soporta la posibilidad de producción de AMPs en la planta. Actualmente se están desarrollando proyectos de Etiquetas de Secuencias Expresadas (del inglés *Expressed Sequence Tags* o ESTs) de SL que se encuentran depositadas en la base de datos correspondiente en el National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>). Estas secuencias corresponden a la expresión en varios tejidos de la planta ante diversos estímulos, y se constituyen en una importante fuente de información genética de la respuesta de SL ante diferentes condiciones bióticas y abióticas.

En este orden de ideas es importante conocer si una variedad de tomate resistente a *P. infestans* expresa genes tipo AMP ante el ataque del fitopatógeno, los cuales puedan analizarse con el propósito de determinar sus posibilidades como agente biocontrolador del tizón tardío. Así mismo, es útil determinar si SL posee homólogos de estos genes y su relación biológica y bioquímica. Para ello es plausible afrontar el problema mediante herramientas moleculares que permitan la identificación de AMPs, con el subsecuente análisis bioinformático que conlleve a prever posibles perspectivas biológicas.

De esta manera cabe preguntarse **¿Es posible que SLC exprese genes tipo AMP, con semejanza a sus contrapartes en otras variedades, en el marco de la infección con *P. infestans*?**

## 4. OBJETIVOS

### Objetivo general

Identificar genes tipo péptido antimicrobiano provenientes de *Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme* en un modelo de patosistema *Phytophthora infestans* - tomate.

### Objetivos específicos

- Detectar la expresión de genes tipo péptido antimicrobiano en una variedad de tomate con resistencia a tizón tardío.
- Determinar y analizar la secuencia de DNA codificante de los péptidos antimicrobianos hallados.
- Buscar homólogos de los péptidos antimicrobianos encontrados, con los descritos en otras variedades de *S. lycopersicum*.

## 5. MATERIALES Y MÉTODOS

En la figura 2 se esquematiza el flujo de trabajo general utilizado en el desarrollo de esta tesis.

### 5.1. Lugar de trabajo.

El presente proyecto se llevo a cabo en el laboratorio de Bioquímica fitopatológica y evolución molecular del Departamento de Química de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá D.C.

### 5.2. Material Biológico.

Las semillas de SLC fueron suministradas por el Banco de Germoplasma Nacional de CORPOICA Estación "La Selva" (Rionegro - Antioquia), registrado con el código de acceso L1568 (Figura 3, D). Las semillas se sembraron sobre semilleros en bandejas con tierra negra de jardín enriquecida con turba, con riego por aspersión diario, en un invernadero con control de temperatura (28°C), humedad relativa (80%), y afectación por agua lluvia, insectos plaga, enfermedades y entrada de animales (Figura 3, A) (Jaramillo et al, 2007). Al momento que las plántulas alcanzaron una altura aproximada de 10 cm fueron trasplantadas a materas plásticas de 20 cm de diámetro para permitir su adecuado crecimiento (Figura 3, B y C). El aporque y fertilización se realizó mensualmente hasta el tercer mes desde la germinación de las plantas, al cabo del cual se realizó la inducción de la expresión de AMPs por infección con *P. infestans*. Para verificar la viabilidad del inoculo utilizado, se sembraron plantas de SL var. *mill* de la manera descrita anteriormente.

Se utilizó el aislamiento del fitopatógeno *P. infestans* M49, perteneciente al laboratorio de Fitopatología de la facultad de Agronomía de la Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá (Figura 4). El mantenimiento *in vitro* de *P. infestans* se llevó a cabo por cultivo en agar arveja verde a temperatura entre 18 a 20 °C hasta saturación superficial

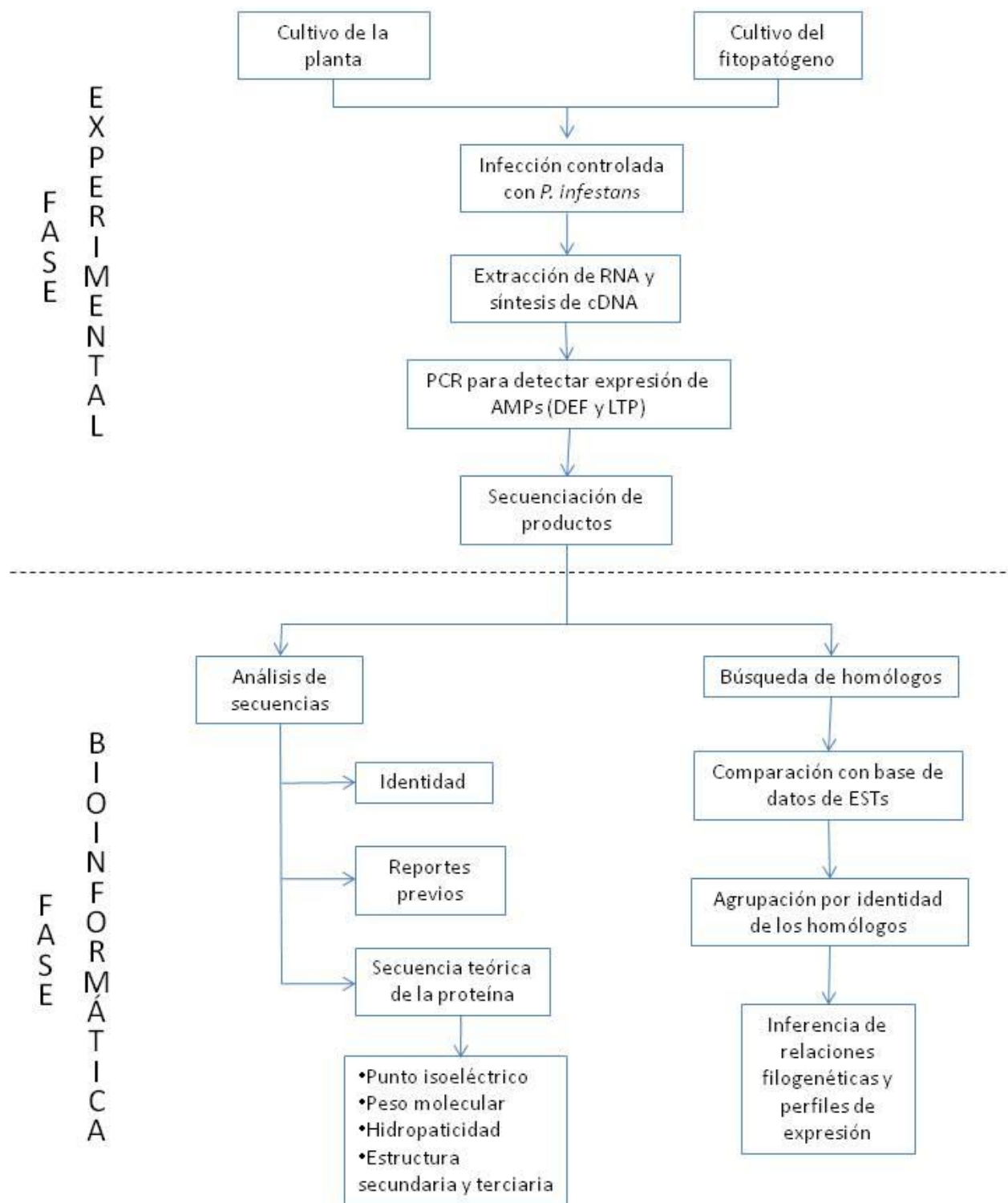


Figura 2. Esquema del flujo de trabajo utilizado en esta tesis.



**Figura 3.** Propagación del material vegetal. A: vista exterior del invernadero en el cual se desarrolló el cultivo. B: semillero con plántulas de 20 días de germinación. C: plantas de 2 meses de germinación instaladas en materas individuales. D: Comparación entre SLC (izquierda) y var. Mill (derecha). Obsérvese la marcada diferencia en tamaños, lo que hace más atractivo comercialmente la producción y distribución de la variedad Mill.



**Figura 4.** Aislamiento M49 de *P. infestans* cultivado en placa de agar arveja verde. Característico patrón de crecimiento de micelio en forma algodonosa de color blanco.

del medio con biomasa (aproximadamente 15 días). Con ayuda de perlas de vidrio se desprendieron los esporangios de 10 cultivos del oomicete y se resuspendieron en agua desionizada estéril hasta alcanzar una concentración de 4000 esporangios/ml, la cual fue determinada mediante recuento en cámara de Neubauer.

### 5.3. Diseño de oligonucleótidos.

Para el diseño de oligonucleótidos (*primers*) se utilizaron cuatro secuencias de DNA tipo DEF y LTP descritas en tomate, obtenidas desde la base de datos de nucleótidos del National Center for Biotechnology Information (NCBI) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) (Tabla 1). Las secuencias de DNA fueron traducidas utilizando la herramienta ORF Finder del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>) y las correspondientes secuencias de aminoácidos se examinaron con la herramienta CD Search del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) para localizar la región codificante del péptido maduro. Con estas regiones se hicieron alineamientos múltiples entre las secuencias tipo péptido maduro de DEF y entre las de LTP, para ubicar secuencias consenso en los extremos que se pudieran usar como oligonucleótidos que flanquearan la región codificante de dicho péptido. Para ello se utilizó el programa ClustalW (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) (Figuras 5 y 6). De esta manera se diseñaron dos juegos de oligonucleótidos de 27 bases de longitud cada uno: un juego para DEF compuesto por un oligonucleótido directo de secuencia 5'-TGAGAATTGTTGAGGCAAGAAGACTTG-3' y un oligonucleótido reverso de secuencia 5'-CTCTTAATTTAGCATGGCCTAGTGCAA-3'; y un juego para LTP compuesto por un oligonucleótido directo de secuencia 5'-GCACCCCATGCAGAGGCACTAAGTTG-3' y un oligonucleótido reverso de secuencia 5'-TCAACTTTACTGAACCGTTGAGCAGTC-3'. Como control se utilizaron oligonucleótidos reportados por Magiri et al (2006) para la detección del gen  $\beta$ -actina de expresión constitutiva. Las características de estos oligonucleótidos se describen en la Tabla 2. Los oligonucleótidos fueron sintetizados por Eurofins MWG Operon (USA).

**Tabla 1.** Información de las secuencias utilizadas en el diseño de oligonucleótidos para amplificación de genes tipo AMP en SLC.

DEF			
Código GenBank	Región analizada**	Ubicación del dominio de péptido maduro	Longitud del dominio (nt)
AJ133601.1	Secuencia completa	88 - 228	141
EF094940.1_1*	40500..40563,41201..41367	88 - 228	141
EF094940.1_2*	54996..55062,56059..56231	97 - 237	141
EF094940.1_3*	67862..67925,68647..68813	88 - 228	141
LTP			
Código GenBank	Ubicación del dominio de péptido maduro		Longitud del dominio (nt)
U81996.1	87 - 347		261
AM051296.1	73 - 333		261
AM051295.1	73 - 333		261
X56040.1	165 - 425		261

\* La secuencia del código GenBank EF094940.1 pertenece a clones en fago lambda por lo cual posee una gran extensión, de la cual solo tres fracciones corresponden a DEFs. Por ello se hace diferenciación de estas fracciones de interés empleando una línea baja seguida de un número (1,2 ó 3).

\*\* Corresponde a la ubicación de los nucleótidos específicos de la secuencia codificante (CDS).

Consenso: TGAGAATTGTTGAGGCAAGAACTTGTG

Primer directo: TGAGAATTGTTGAGGCAAGAACTTGTG



Consenso: TTGCACTAGGCCATGCTAAATTAAGAG

Primer reverso: CTCTTAATTTAGCATGGCCTAGTGCAA

**Figura 5.** Alineamiento de secuencias codificantes de DEFs descritas en tomate y oligonucleótidos para su identificación. Se señala mediante cuadros en los extremos la región utilizada para el diseño de oligonucleótidos y en la parte superior e inferior de cada cuadro se encuentra citada la secuencia consenso y el primer diseñado sobre la misma en dirección 5'-3'. La línea roja indica la posición correspondiente al péptido maduro.



#### **5.4. Aislamiento de ácidos nucleicos y síntesis de cDNA.**

La extracción de DNA genómico se realizó utilizando el kit REDEExtract-N-Amp (Sigma) a partir de hojas de SLC, siguiendo las instrucciones del fabricante. Partiendo de la solución esporangial de *P. infestans*, se inocularon plantas sanas de SLC por aspersión y se mantuvieron tres días en oscuridad con una humedad relativa entre 80-90% (Riaño y Zamora, 2005). Al finalizar este periodo las plantas se sometieron nuevamente a las condiciones normales del invernadero hasta el momento de la extracción de RNA total. Para evaluar la viabilidad de la suspensión utilizada se inocularon tres plantas susceptibles de tomate (SL var. mill) de la misma forma. Para la extracción de RNA total se utilizó tejido foliar de plantas de SLC antes y después de 7 días de infección por haberse descrito anteriormente este como el tiempo de aparición de los primeros síntomas (Faino et al, 2010).

La extracción de RNA total se realizó utilizando el Kit SV Total RNA Isolation System (Promega) y se almacenó a -80°C hasta el momento de su uso. Se realizó la cuantificación de RNA obtenido por fluorimetría usando el equipo Qubit fluorometer (Invitrogen). Una vez extraído el RNA total se sintetizó la primera cadena de cDNA utilizando el kit SuperScript III First – Strand Synthesis System (Invitrogen) utilizando como primer oligo dT, en las siguientes concentraciones: Buffer de reacción (200 mM Tris-HCl (pH 8.4), 500 mM KCl) 1X, RNA 1.5 µg, primer oligo dT 2.5 µM, dNTPs 0.5 mM, MgCl<sub>2</sub> 5mM, DTT 10mM, inhibidor de ribonucleasas 2 U/µl, transcriptasa reversa 10 U/µl y RNAsa H 0.1 U/µl. Esta reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 µl.

#### **5.5. Reacción en Cadena de la Polimerasa (PCR) y secuenciación de productos.**

Después de la transcripción reversa se utilizaron 100 ng de DNA o del producto de cDNA para desarrollar la reacción de PCR usando el kit High Fidelity PCR Enzyme Mix (Fermentas), el cual contiene una mezcla de polimerasas *Taq* y *Pfu* para garantizar una alta fidelidad en la replicación *in vitro* de las cadenas. Los componentes utilizados en la

reacción y sus respectivas concentraciones fueron los siguientes: Buffer de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 1.5 mM, mezcla de dNTPs 0.2 mM, primers 0.5 uM de cada uno (directo y reverso) según el AMP a detectar, mezcla de polimerasas 0.03 U/μl. Esta reacción se llevó a cabo en un volumen total de 20 μl. Los ciclos de temperaturas fueron: desnaturalización inicial a 94 °C por 3 min, 35 ciclos de 94 °C por 45 s, 50 °C por 45 s, 72 °C por 90 s y una extensión final a 72 °C durante 5 min. Los productos de PCR se visualizaron en gel de agarosa 2.5 % en búfer TBE 1x (Sambrook et al., 2001).

Los productos de PCR que evidenciaron productos de amplificación con el tamaño esperado fueron enviados a secuenciar a MacroGen Inc. (USA) utilizando el método *single primer extension* con los oligonucleótidos directo y reverso correspondientes al gen detectado para obtener la secuencia tanto de la cadena líder como de la complementaria, con el fin de corroborar su correspondencia. Posteriormente fueron depositadas en la base de datos de nucleótidos del NCBI.

## **5.6. Análisis de las secuencias.**

Para determinar la identidad de las secuencias generadas estas fueron sometidas a una búsqueda de secuencias similares por medio del programa Basic Local Alignment Search Tool (BLAST) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>) del NCBI. Se usó el algoritmo Megablast contra la base de datos “Nucleotide collection (nr/nt)” y se tuvo en cuenta la anotación de aquellas secuencias que tuvieran los valores E más bajos y la identidad máxima más alta.

Para realizar una comparación entre las secuencias de SLC generadas en este trabajo y otras descritas en el género *Solanum* se buscó, en la base de datos de nucleótidos del NCBI, secuencias de DEFs y LTP reportadas en otras especies del género y se desarrollaron alineamientos múltiples para cada grupo de péptidos con el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>), utilizando tanto las secuencias de DNA como las de aminoácidos y teniendo en cuenta únicamente la porción correspondiente a péptido maduro. Las secuencias de aminoácidos de la DEF y LTP

identificadas en SLC fueron obtenidas traduciendo las secuencias de DNA con ayuda de la herramienta "Translate" de ExPASy, y fueron empleadas en la herramienta "Compute pI/Mw" de ExPASy ([http://www.expasy.ch/tools/pi\\_tool.html](http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)) para identificar teóricamente su punto isoeléctrico y peso molecular. Hidropaticidad y residuos cargados positivamente se llevo a cabo con ProtParam tool (<http://expasy.org/tools/protparam.html>).

La predicción de estructura secundaria se llevó a cabo por identificación de posiciones en secuencias equivalentes a las reportadas en este trabajo, de estructuras de DEF y LTP depositadas en la base de datos Protein Data Bank (PDB) (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) las cuales han sido generadas experimentalmente y corresponden a los códigos PDB 1GPS, 1MR4 y 1N4N para DEF, y 1T12, 1BE2 y 1AFH en el caso de LTP. Para realizar la búsqueda de estos moldes se empleó el buscador de Swiss Model Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) (Arnold et al., 2006). Las estructuras terciarias (3D) de los AMP detectados en SLC se construyeron con el método de modelamiento por homología usando las estructuras tridimensionales descritas experimentalmente 1GPS (para DEF) y 1T12 (para LTP) depositadas en la base de datos PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/home.do>) como moldes. Los alineamientos estructurales entre las proteínas molde y las secuencias problema de SLC y las figuras se generaron usando el programa DeepView-Swiss-PdbViewer 3.7 (<http://spdbv.vital-it.ch/>) (Guex y Peitsch, 1997). La minimización de energía se llevo a cabo con GROMOS 43B1 (van Gunsteren et al., 1996) (<http://www.igc.ethz.ch/GROMOS/>). Los modelos se validaron mediante el gráfico de Ramachandran y Qmean server (Benkert et al., 2003) (<http://swissmodel.expasy.org/qmean/cgi/index.cgi>).

## **5.7. Búsqueda de homólogos en ESTdb y análisis de expresión diferencial.**

Utilizando las secuencias de aminoácidos de la DEF y LTP descritas en SLC, se desarrolló una búsqueda de secuencias homólogas utilizando la variante de BLAST `tblastn` del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), la cual, emplea una

secuencia de aminoácidos como criterio de búsqueda para encontrar posibles secuencias de DNA codificantes de la misma proteína, en bases de datos de nucleótidos en los 6 marcos de lectura (Baxevanis y Ouellette, 2001). En el espacio "Database" se seleccionó la base de datos de ESTs del NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest>) y en la opción "organism" se seleccionó "*Solanum lycopersicum*" para desarrollar la búsqueda específicamente de ESTs descritos en tomate que tuvieran homología con las secuencias generadas en este trabajo, con un valor E límite de 0.001.

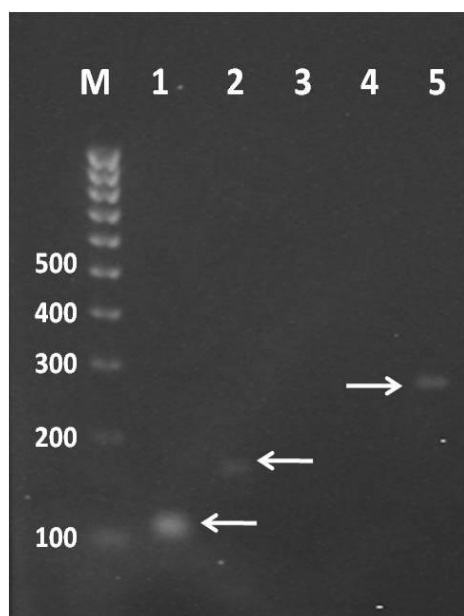
Una vez obtenidos los resultados de la búsqueda se clasificaron de acuerdo a su secuencia de aminoácidos agrupándolos por secuencias repetidas o redundantes. Se verificó la presencia de residuos claves para cada AMP por alineamiento con ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>) y se procedió a generar un árbol filogenético que evidenciara posibles relaciones evolutivas entre las secuencias analizadas utilizando el portal de Phylogeny.fr ([http://www.phylogeny.fr/version2\\_cgi/index.cgi](http://www.phylogeny.fr/version2_cgi/index.cgi)), con un flujo de trabajo compuesto por alineamiento con MUSCLE, filogenia por distancias con el algoritmo BioNJ con 1000 bootstraps, modelo de sustitución de matriz Jones-Taylor-Thornton y visualización del árbol por TreeDyn. Para realizar el perfil de expresión de las proteínas analizadas se tuvo en cuenta el tejido en el cual fue aislado el RNA del que se obtuvo el cDNA que dio origen al EST, información que se encuentra disponible en cada accesión.

## 6. RESULTADOS

### 6.1. Evaluación de la expresión de genes DEF y LTP en SLC.

Como interés particular de identificación de AMPs se seleccionó la región codificante de péptido maduro, ya que la secuencia péptido señal se limita exclusivamente al direccionamiento del transporte de la proteína, mientras que el péptido maduro es el que realmente ejerce la acción antimicrobiana, objetivo de estudio de este trabajo (de Oliveira y Moreira, 2009). Además se conoce que las secuencias de DNA codificantes de DEF y LTP tienen intrones (de Oliveira y Moreira, 2009). Por estas razones se descartó igualmente la amplificación de secuencias de reconocimiento de ribosoma y colas poliA.

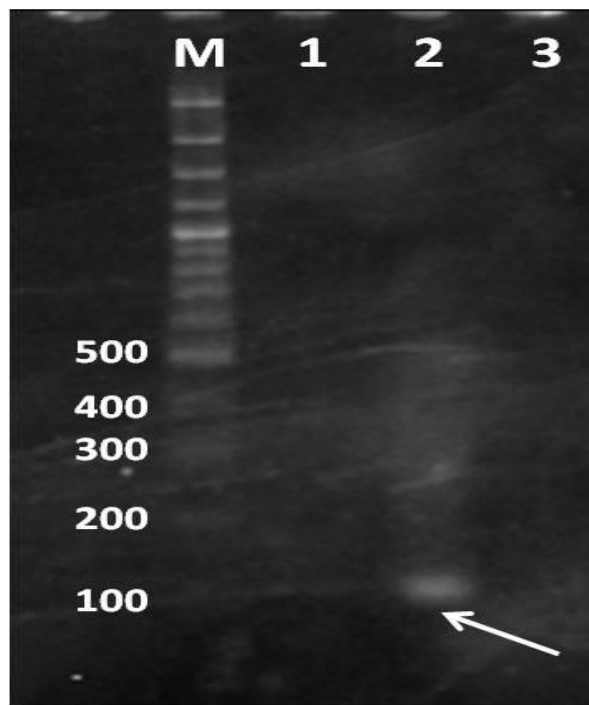
En primer lugar se trato de identificar la presencia de genes AMP en SLC, para ello se realizo amplificación de estos genes utilizando DNA genómico. Se pudo establecer que los oligonucleótidos fueron capaces de evidenciar la presencia de ambos tipos de AMPs, cuyos productos de amplificación tenían los tamaños esperados indicando la ausencia de intrones en estos (Figura 7). Se decidió extraer RNA total de SLC pre y post-infección con el fitopatógeno causante del tizón tardío, afín de analizar la respuesta correspondiente a los genes de este estudio. Para evaluar la eficacia de la extracción de RNA, este cuantifico por fluorometría (Tabla 3). La calidad del RNA se verificó mediante reacción de PCR donde se utilizaron los oligonucleótidos para el gen constitutivo de actina, con un molde de RNA total, un molde de DNA genómico y un control con agua estéril (Figura 8). Así se pudo constatar que no existía contaminación del RNA con DNA. Una vez se consiguió RNA total de buena calidad se paso a desarrollar PCR con cDNA sintetizado a partir del RNA extraído de hojas sanas e infectadas (1.5 µg) de SLC. El objetivo era evaluar de manera aproximada el nivel de expresión de los genes en estudio antes y después de la infección con esporas de *P. infestans*, para lo cual se partió de una concentración conocida de cDNA (100 ng) utilizando los oligonucleótidos para los genes DEF y LTP, con un control del gen actina.



**Figura 7.** Determinación de la presencia de AMPs en el genoma de SLC. Gel de agarosa 2,5% teñido con bromuro de etidio. Carril M: Marcador (pb) HyperLadder IV (Bioline); Carriles 1: control actina; Carril 2: Gen DEF; Carriles 3 y 4: control agua; Carril 5: gen LTP. Las flechas indican los amplicones.

**Tabla 3.** Cuantificación de la extracción de RNA total por fluorometría.

CUANTIFICACIÓN RNA	
Espécimen	Concentración RNA total
Planta sana	160 ng/ $\mu$ l
Planta infectada	428 ng/ $\mu$ l

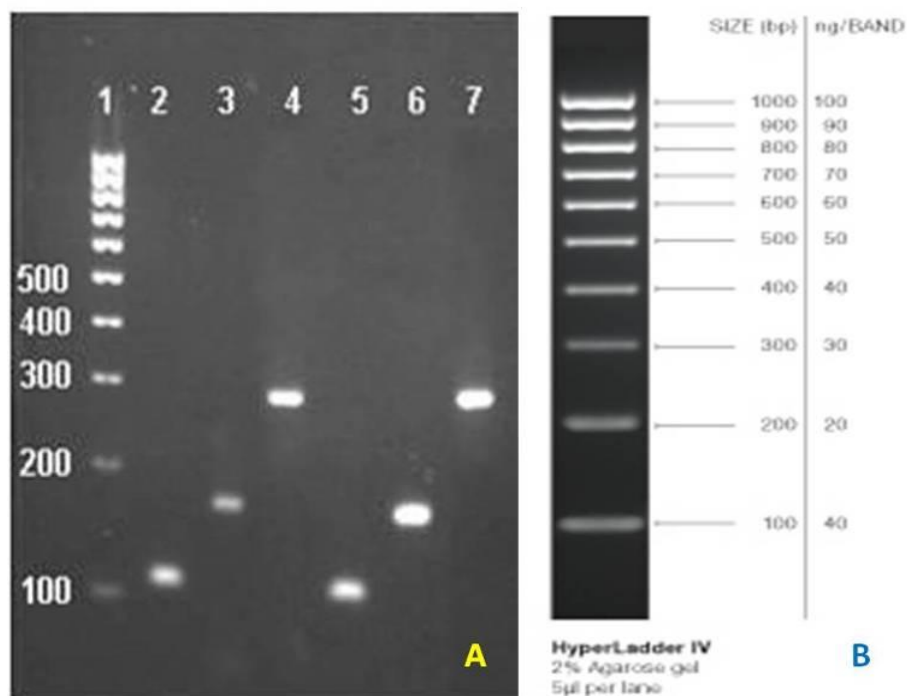


**Figura 8.** Control de calidad del RNA a utilizar en la evaluación de la expresión de AMPs. Gel de agarosa 2,5% teñido con bromuro de etidio. Carril M: Marcador (pb) GeneRuler 100 bp (Fermentas); Carril 1: RNA total; Carril 2: DNA; Carril: control agua. La flecha señala el uno producto para la reacción con DNA genómico.

Se produjo amplificación tanto del gen DEF como del gen LTP en la planta sana como en la infectada (Figura 9, A), desarrollando bandas de los tamaños esperados (Tabla 2), indicando que ambos genes son de expresión constitutiva. Al analizar las bandas resultantes del corrido electroforético de los productos de PCR resalta el aumento en la concentración del producto correspondiente al gen DEF de la planta infectada con *P. infestans*, respecto al presentado en planta sana para el mismo gen (Figura 9, carriles 3 y 6), situación que no ocurre con los amplificadores de LTP ni con los del gen control b actina (Figura 9, carriles 2 y 5 para actina, 4 y 7 para LTP). En este orden de ideas, se llevo a cabo una valoración semicuantitativa de los productos de PCR, utilizando el marcador de tamaño Hyperladder IV (Bioline) según las instrucciones del fabricante (Figura 9, B; Tabla 4). Esto permitió constatar que el gen DEF se expresa aproximadamente 2.6 veces más ante la infección con *P. infestans*, en cambio LTP se expresa 1.25 veces más aproximadamente.

## 6.2. Análisis de las secuencias

Se obtuvieron las secuencias para DEF y LTP de SLC que fueron depositadas en la base de datos de nucleótidos del NCBI con los códigos de acceso HM367633 para el gen DEF y HM367634 para el gen LTP, y sus tamaños fueron de 158 y 284 bases respectivamente. La confirmación de sus identidades se realizó mediante análisis con BLAST. En el caso del gen DEF sus resultados corresponden a las mismas secuencias sobre las que se diseñaron los oligonucleótidos, con valores E de  $1e-70$  e identidad máxima de 100% para dos accesos (AJ133601.1 y EF094940.1). En cuanto al gen LTP, BLAST arroja como resultado una de las secuencias sobre las que se diseñaron los oligonucleótidos (código X56040.1) con valor E de  $6e-56$  e identidad máxima de 81% y dos secuencias de LTPs descritas en papa (*Solanum tuberosum*), AF525362.1 y AF525363.1 con valores E de  $4e-77$  y  $2e-75$  respectivamente, e identidad máxima de 87% en ambas.



**Figura 9.** Amplificación de genes DEF y LTP a partir de planta sana e infectada de SLC. Gel de agarosa 2% teñido con bromuro de etidio. A. Carril 1: Marcador (pb) HyperLadder IV (Bioline); Carriles 2 – 4: planta sana; Carriles 5 – 7: planta infectada. Carriles 2 y 5: control Actina; Carriles 3 y 6: DEF; Carriles 4 y 7: LTP. B. Marcador Hyperladder IV (Bioline) con las concentraciones para cada banda utilizando 5  $\mu$ l en un gel de agarosa al 2%.

**Tabla 4.** Estimación semicuantitativa de la concentración de los productos de PCR para cada gen de este estudio.

ESPECIMEN	Gen actina		Gen DEF		Gen LTP	
	ng/Banda	ng/ $\mu$ l	ng/Banda	ng/ $\mu$ l	ng/Banda	ng/ $\mu$ l
Planta sana	30	10	30	10	40	13.3
Planta infectada	35	11.6	80	26.6	50	16.6

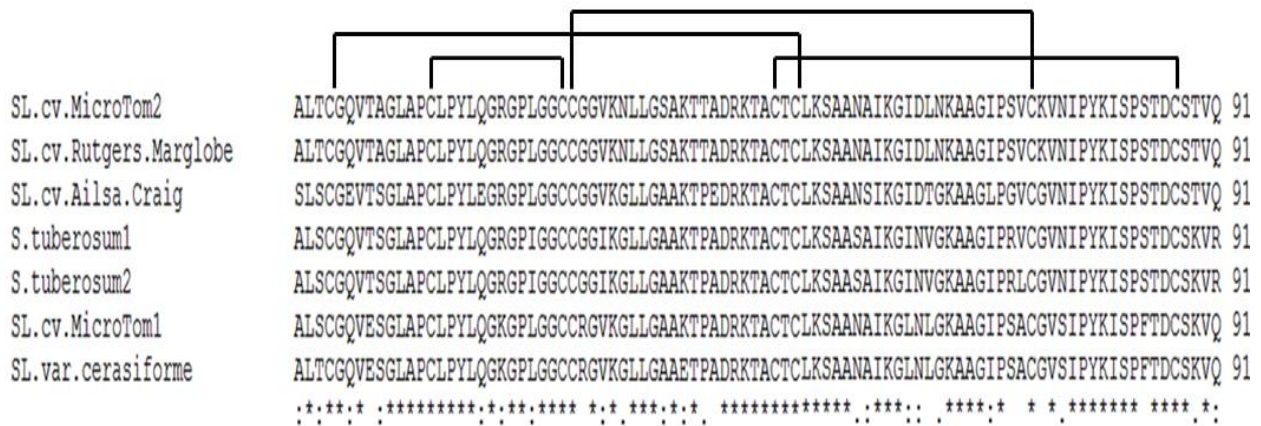
Seguidamente se hizo una comparación de las secuencias generadas con otras reportadas previamente para otras especies del género *Solanum*. Al desarrollar la búsqueda de secuencias en GenBank se obtuvieron los siguientes resultados para ser comparados: Para DEFs las secuencias de *S. pimpinellifolium* (EF094941), SL cultivares Sun1642 (EF094940), Microtom (AK246434) y Moneymaker (AJ133601), y *S. chacoense* (EU526018.1). Para LTP, secuencias de SL cultivares Microtom (AK224707 (1) y AK325142 (2)), Rutgers Marglobe (X56040) y Ailsa Craig (U81996), y *S. tuberosum* (AF525362 (1) y AF525363 (2)).

En la comparación realizada con base a la estructura primaria en las DEFs se encuentra que la secuencia generada en este trabajo tiene una identidad de 100% con otras reportadas anteriormente para otros cultivares de SL, tanto en la secuencia de nucleótidos (Anexo 1), como en la de aminoácidos, donde se aprecia la conservación de las ocho cisteínas que forman los 4 puentes disulfuro en el patrón característico de estas proteínas (Figura 10). Siendo esta la primera vez que se reporta su presencia en la variedad *cerasiforme*, en tejido foliar pre y post inoculación con *P. infestans*.

En cuanto a la comparación realizada para LTP, la situación es diferente. El alineamiento de nucleótidos (Anexo 2) revela una identidad entre las secuencias de un 69.2%, inferior a la identidad presentada por las secuencias de DEFs analizadas (94.5%). Esto indica una mayor variabilidad en este tipo de secuencias entre especies. Por supuesto, el alineamiento de secuencias de aminoácidos refleja variabilidad, aunque conservando aminoácidos claves, tales como las 8 cisteínas implicadas en la formación de 4 puentes disulfuro en las posiciones propias de una proteína tipo LTP (Figura 11). Así esta LTP se reporta por primera vez.



**Figura 10.** Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de DEFs en diferentes especies del género *Solanum*. Los asteriscos en la parte inferior del alineamiento indican coincidencia de aminoácido en todas las secuencias analizadas. Los dos puntos (:) en la posición 38 indican la presencia de una sustitución conservativa en la secuencia de *S. chacoense*. Las líneas negras en la parte superior señalan el patrón característico de formación de puentes disulfuro en estos péptidos indicando las cisteínas involucradas en los mismos.



**Figura 11.** Alineamiento múltiple de secuencias de aminoácidos de LTP en diferentes especies del género *Solanum*. Los asteriscos en la parte inferior del alineamiento indican coincidencia de aminoácido en todas las secuencias analizadas. Los dos puntos (:) indican la presencia de sustituciones conservativas y un punto (.) indica la presencia de sustituciones semiconservativas. Las líneas negras en la parte superior señalan el patrón característico de formación de puentes disulfuro en estos péptidos indicando las cisteínas involucradas en los mismos.

Este análisis permite observar que existe una mayor similitud con la LTP reportada previamente para SL. cv MicroTom con código GenBank AK224707, por lo que se hace una comparación más detallada solo con esta secuencia. Al contrastar la secuencia de SLC con la de SL. cv. Microtom1 se encuentra una identidad de nucleótidos del 97%, presentando variación en 8 posiciones (Figura 12, A). La variación de los nucleótidos 8 y 115 a su vez genera en la secuencia de aminoácidos dos sustituciones conservativas de serina por treonina y de lisina por ácido glutámico respectivamente (Figura 12, B).

Tras emplear las secuencias de aminoácidos en la herramienta “Compute pI/Mw” de ExPASy, el programa predice puntos isoeléctricos de 8.77 y 9.02, y pesos moleculares de 5351.04 y 9038.62 Da para DEF y LTP respectivamente. El péptido DEF es de carácter hidrofílico (promedio de hidropaticidad = -0.731) mientras que LTP es hidrofóbica (promedio de hidropaticidad = 0.185).

Las secuencias de aminoácidos de DEF y LTP de SLC fueron comparadas contra la base de datos de estructuras PDB. Para la secuencia de DEF se obtuvieron siete resultados, de los cuales los más relacionados fueron las DEFs de trigo (*Triticum aestivum*) (código 1GPS), tabaco (*Nicotiana glauca*) (código 1MR4), y petunia (*Petunia hybrida*) (código 1N4N), con identidades de 55, 40 y 35% respectivamente. Basado en estas estructuras y su alineamiento se asignó la topología más probable de estructura secundaria para la DEF de SLC (Figura 13), que comprendería tres  $\beta$ -láminas entre las posiciones 4 – 8, 32 – 36 y 40 – 47; y una  $\alpha$ -hélice entre las posiciones 17 – 29. De igual forma se hizo para la secuencia de LTP, en la cual se obtuvieron siete resultados, de los cuales se seleccionó las LTP de tabaco (*Nicotiana tabacum*) (código 1T12), cebada (*H. vulgare*) (código 1BE2) y maíz (*Zea mays*) (código 1AFH); con identidades de 72, 53 y 60% respectivamente. La topología más probable para la LTP descrita en SLC comprendería cuatro  $\alpha$ -hélices entre las posiciones 5 – 20, 26 – 37, 41 – 57 y 63 – 74 (Figura 14).

SL.cv.MicroTom1	GCACTAAGTTGCGGCCAGGTTGAATCTGGCTTAGCTCCATGCCTCCCTTATCTTCAGGGA	60
SL.var.cerasiforme	GCACTAAGTTGCGGCCAGGTTGAATCTGGCTTAGCTCCATGCCTCCCTTATCTTCAGGGA	60
	***** ** *****	
SL.cv.MicroTom1	AAAGGCCCTCTAGGAGGGTGTGTGCTGGAGTTAAGGGTCTATTGGGCGCAGCCAAGACC	120
SL.var.cerasiforme	AAAGGCCCTCTCGGAGGGTGTGTGCTGGAGTTAAGGGTCTATTGGGCGCAGCCGAGACC	120
	***** *****	
SL.cv.MicroTom1	CCCGCGGATCGAAAGACAGCATGCCTTGCCTCAAATCAGCTGCTAATGCTATTAAGGC	180
SL.var.cerasiforme	CCCGCGGATCGAAAGACAGCATGCCTTGCCTCAAATCAGCTGCTAATGCTATTAAGGC	180
	***** *****	
SL.cv.MicroTom1	CTTAATCTAGGCAAAGCCGCTGGTATACCTAGTGTGCTTGTGGCGTAGCATTCTTACAG	240
SL.var.cerasiforme	CTTAATCTAGGCAAAGCCGCTGGTATACCTAGTGTGCTTGTGGCGTAGCATTCTTACAG	240
	***** *****	
SL.cv.MicroTom1	ATCAGCCCTTTTACTGACTGCTCGAAGGTTCAAGTAA 276	
SL.var.cerasiforme	ATCAGCCCTTTTACTGACTGCTCGAAGGTTCAAGTAA 276	
	***** ***** **	
		<b>A</b>
SL.cv.MicroTom1	ALSCGQVESGLAPCLPYLQKGKPLGGCCRGVKGLLGAAKTPADRKTACTCLKSAANAIGK	60
SL.var.cerasiforme	ALTCGQVESGLAPCLPYLQKGKPLGGCCRGVKGLLGAETPADRKTACTCLKSAANAIGK	60
	** *****	
SL.cv.MicroTom1	LNLGKAAGIPSACGVSIPYKISPFTDCSKVQ	91
SL.var.cerasiforme	LNLGKAAGIPSACGVSIPYKISPFTDCSKVQ	91
	*****	
		<b>B</b>

**Figura 12.** Comparación entre secuencias de LTP de SLC y SL.cv.Microtom1. A. Alineamiento de nucleótidos. B. Alineamiento de aminoácidos.

SLC	ART <b>CSQSHRFK</b> GPCV <b>SEKNCASVCETEGFS</b> GGDCRGFRRRC <b>FCTR</b> PC
1GPS	- <b>KICRRRS</b> SAGFKGPC <b>MSNKNCAQVCQ</b> QEGWGGNCDGPFRR <b>CKCIR</b> QC
1MR4	- <b>RECKTESN</b> TFPGICIT <b>KPPCRKACI</b> SEKFTDGH <b>CSKILRRCL</b> CTKPC
1N4N	- <b>ATCKAECPT</b> WDSVC <b>INKKPCVACCKAK</b> FS <b>DGHCSKILRRCL</b> CTKEC

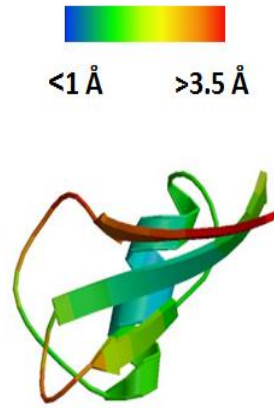
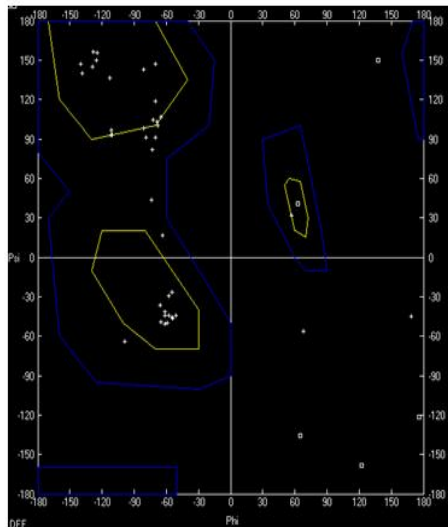
**Figura 13.** Topología de la estructura secundaria de DEF de SLC. Esta estructura fue asignada por homología con las DEF 1GPS (*Triticum aestivum*), 1MR4 (*Nicotiana glauca*) y 1N4N (*Petunia hybrida*). Las porciones resaltadas en amarillo corresponden a  $\beta$ -láminas y las resaltadas en fucsia corresponden a  $\alpha$ -hélices.

SLC	ALTC <b>QVESGLAPCLPYLQ</b> --KGPLGGCCRGVKGLLGAET <b>PADRKTACTCLKSAANA</b> IKGLN <b>L</b> GKAAGIPSACGVSIPYKISPFTDCSKVQ
1T12	AIT <b>CGQVTSN</b> LAPCLAYLRN--TGPLGRCCGGVKALVNSART <b>EDRQ</b> IAC <b>TCLKSAAGAI</b> S <b>GINL</b> GKAAGLPSTCGVNI <b>IPYKISP</b> STDCSKVQ
1BE2	- <b>LNCQVDSK</b> MMK <b>PCLTYVQ</b> G--GPGSGECCNGVRDL <b>HNQAQSSGDRQ</b> TVCN <b>CLKGIARGI</b> HNLN <b>L</b> NNAAS <b>IPSKCN</b> VNVPT <b>ISPD</b> IDCSRIY
1AFH	A <b>ISCGQ</b> VASAI <b>APCISYARGQ</b> SG <b>PSAGCC</b> SGVRS <b>L</b> NNAART <b>TADRR</b> AAC <b>N</b> CL <b>KNAAG</b> VS <b>GLNAG</b> NAAS <b>IPSKCG</b> VSI <b>PYTIST</b> STDCSRVN

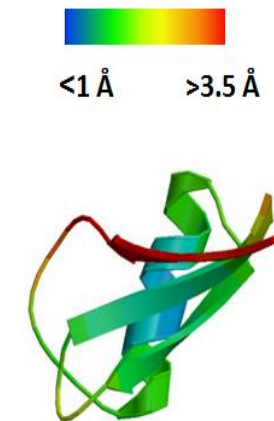
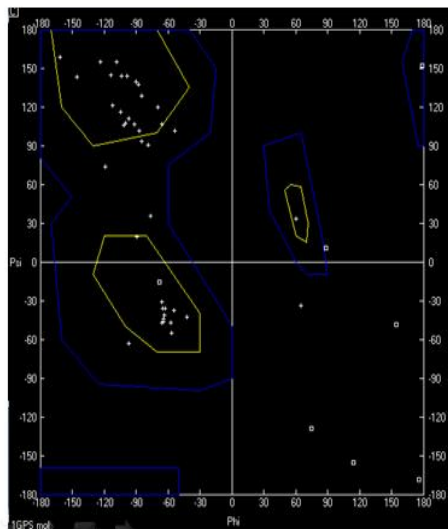
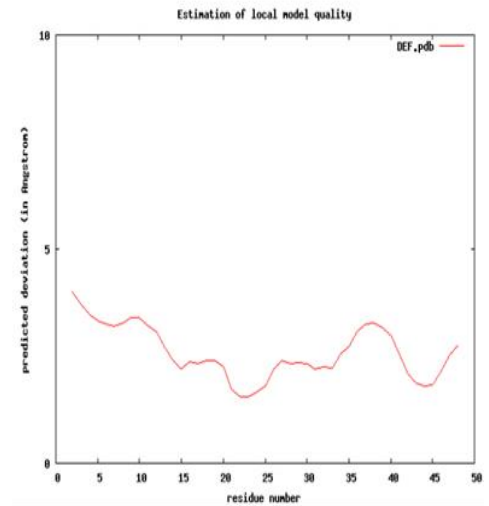
**Figura 14.** Topología de la estructura secundaria para LTP. Esta estructura fue asignada por homología con las LTPs 1T12 (*N. tabacum*), 1BE2 (*H. vulgare*) y 1AFH (*Z. mays*). Las porciones resaltadas en fucsia corresponden a  $\alpha$ -hélices.

La estructura terciaria proveniente del PDB, código 1GPS, fue utilizada para realizar el modelo teórico 3D de la DEF de SLC de este trabajo, al cual se le hicieron 100 minimizaciones de energía hasta que fue posible obtener un modelo aceptable. Con más minimizaciones de energía el modelo tenía tendencia a dañarse. En el gráfico de Ramachandran se observa que solo el 4.16% de los residuos se encuentran en regiones no permitidas (solo un residuo más que en 1GPS) (Figura 15, A-izquierda y B-izquierda). El análisis de calidad de Qmean determino un puntaje de 0.436 (más cerca de 1 significa mejor estructura), con un Z-score de 2.72 (si se acerca a cero es un modelo apropiado), con una estructura de resolución variable entre 1 a 3.5 Å (dependiendo de la región) y un cuadro de error en residuos promedio (desviación menor a 5 Å). Cuando se hace el mismo análisis con las estructura molde (1GPS) se encuentra que el puntaje Qmean es de 0.398, el Z-score de 0.1 y resolución entre 1 a 3.5 Å (similar distribución a las regiones de DEF) y un cuadro de error similar al modelo teórico DEF (por debajo de 5) (Figura 15, A-derecha y B-derecha). La estructura tridimensional de ambas DEF está compuesta por un arreglo consistente en una lámina  $\beta$ , una hélice  $\alpha$  y dos láminas  $\beta$  más, además posee los puentes disulfuro característicos que la estabilizan (Figura 15, A-centro y B-centro; y Figura 17). La DEF de SLC tiene nueve residuos cargados positivamente (Arginina, Lisina e Histidina). El potencial electrostático mapeado en la superficie molecular denota una gran área catiónica, lo que significaría un fuerte potencial positivo en gran parte de la molécula, permitiéndole interactuar fuertemente con la membrana celular de patógenos cargada negativamente (Figura 18).

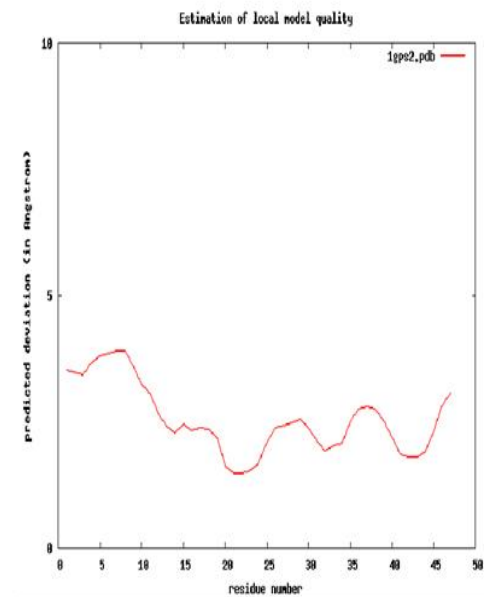
En el caso de la LTP reportada en este trabajo, al modelo 3D se le hicieron 100 minimizaciones de energía, con lo que se logro un modelo que tiene todos los residuos en las regiones permitidas (Figura 19). LTP alcanzo un puntaje Qmean de 0.497, un Z-score de 2.87, con una estructura que primordialmente tiende a 1 Å de resolución y un cuadro de desviación de los residuos inferior a 5Å (Figura 16, A). El molde utilizado para su construcción (1T12) tiene dos residuos en las regiones no permitidas (Figura 16, B-izquierda), un puntaje Qmean de 0.563, un Z-score de 1.34, una estructura con tendencia a 1 Å y desviación



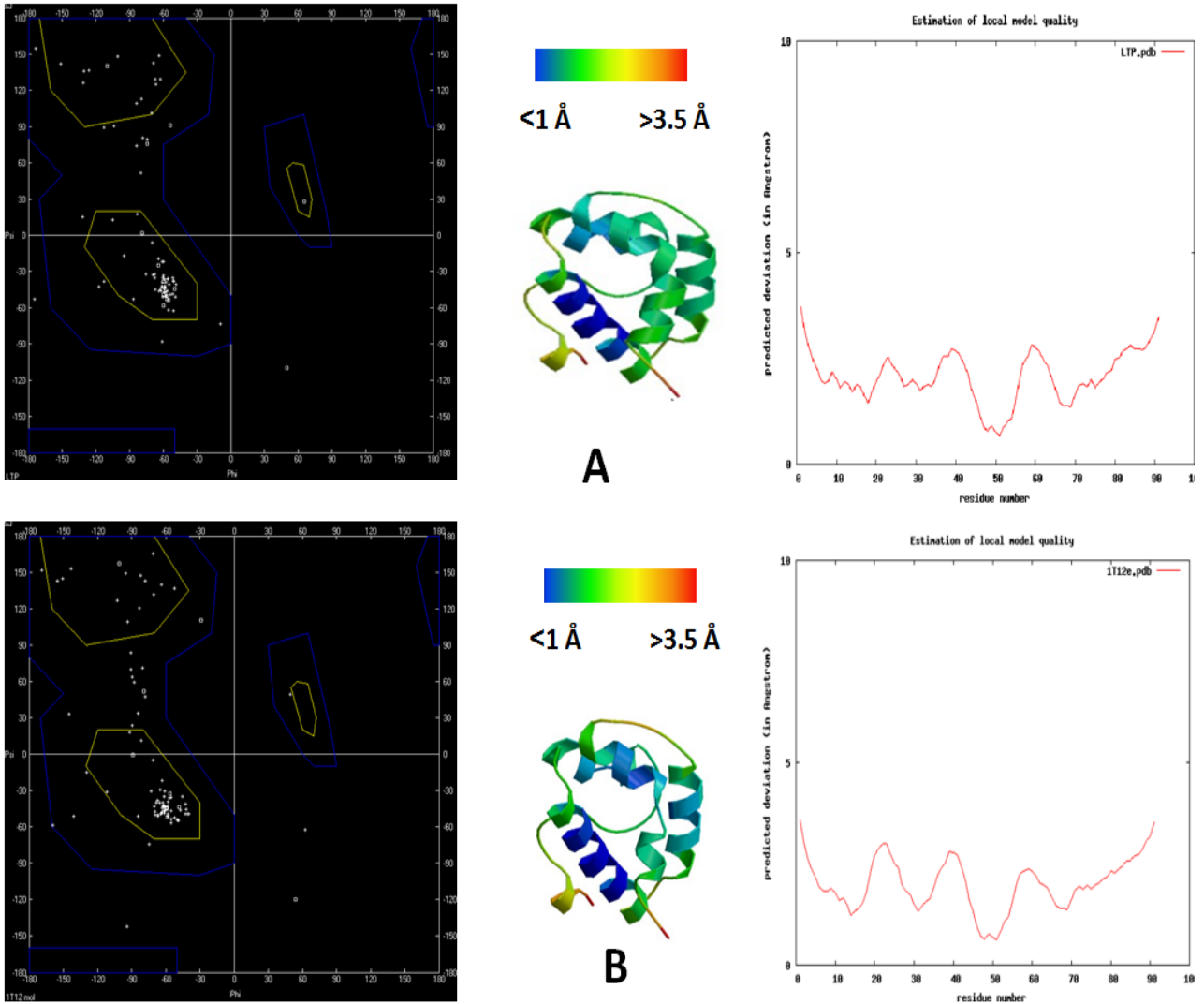
A



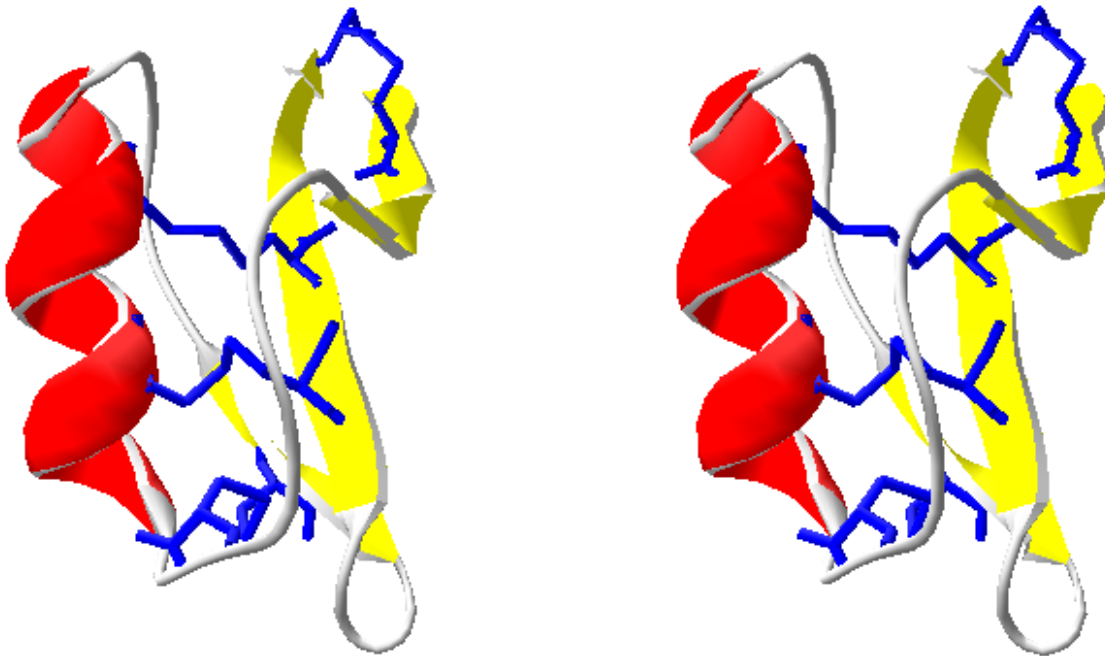
B



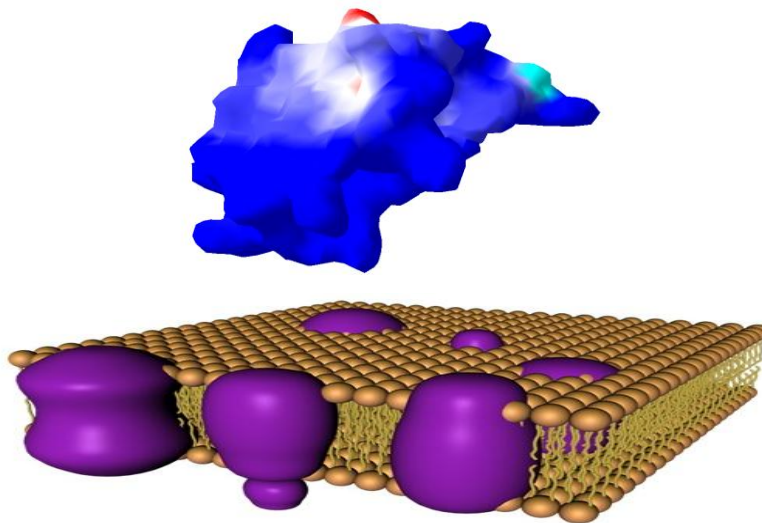
**Figura 15.** Resultados del análisis de calidad del modelo DEF obtenido mediante comparación por homología. A. Gráfico de Ramachandran, resolución de la estructura y cuadro de desviación de los residuos para DEF, de izquierda a derecha respectivamente. B. De izquierda a derecha: gráfico de Ramachandran, resolución de la estructura y cuadro de desviación de los residuos para 1GPS. .



**Figura 16.** Evaluación de la calidad de la estructura teórica 3D de LTP. A. iniciando en la izquierda se observa la gráfica de Ramachandran, resolución de la estructura y cuadro de desviación de los residuos para LTP de SLC. B. Para el modelo 1T12 se observa el gráfico de Ramachandran, resolución de la estructura y cuadro de desviación de los residuos desde la izquierda hasta la derecha.



**Figura 17.** Visualización en estéreo del péptido DEF de SLC. Se observa su arquitectura de una  $\alpha$ -hélice (rojo) y tres  $\beta$ -láminas antiparalelas (amarillo). Los puentes disulfuro estabilizadores están representados en color azul.



**Figura 18.** La molécula DEF tiene una gran región catiónica (azul) que puede interactuar con membranas celulares de patógenos. El esquema de la membrana celular fue tomado de <http://www.educared.org>

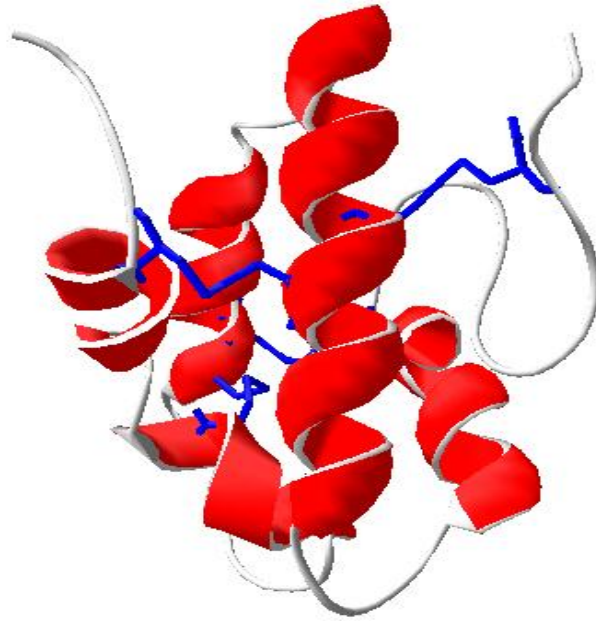
de sus residuos inferior a 5 Å (Figura 16, B-derecha). Esto permite concluir que se tiene un modelo 3D aceptable.

La LTP de SLC tiene 11 residuos cargados positivamente. El modelo 3D tiene la típica arquitectura de una LTP, sugiriendo su plegamiento conservativo, compuesto de cuatro  $\alpha$ -hélices estabilizadas por cuatro puentes disulfuro que se forman entre los residuos de cisteína conservados (Figura 19). LTP formaría una concavidad hidrofóbica que sería la región encargada de interactuar con lípidos u otro tipo de moléculas, la cual estaría definida por Ala y Leu (N-terminal); Val, Leu, Ala, Pro, Leu, Pro y Leu (hélice 1); Pro y Leu (loop 1), Val, Leu y Leu (hélice 2); Ala, Ala y Pro (loop 2); Ala, Ala, Leu, Ala, Ala y Ala (hélice 3); Ile y Leu (loop 3); Leu, Ala, Ala, Ile, Pro y Ala (hélice 4); Val, Ile, Pro, Ile, Pro, Phe y Val en el C-terminal (Figura 20).

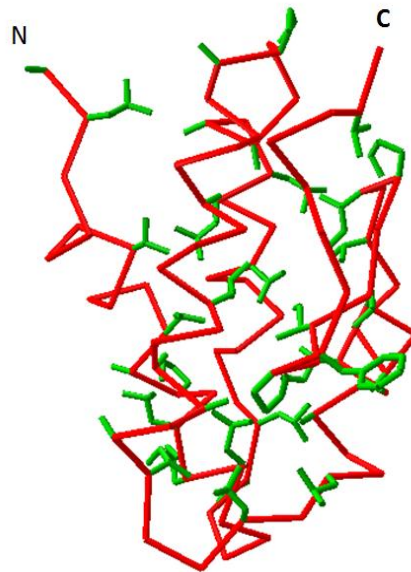
### **6.3. Búsqueda de homólogos en ESTdb y análisis de expresión diferencial.**

Se utilizaron las secuencias de aminoácidos de DEF y LTP de SLC para desarrollar la búsqueda de homólogos utilizando el programa tblastn sobre la base de datos de ESTs de tomate disponible en el NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucest>). Se descartaron aquellos resultados que tuvieran secuencias incompletas, con aminoácidos indeterminados (representados por una letra "X" en el alineamiento) y que carecieran de uno o más aminoácidos claves para catalogarse como DEF o LTP. Los valores E para DEF estuvieron entre  $2 \times 10^{-9}$  y  $6 \times 10^{-5}$  y para LTP entre  $2 \times 10^{-44}$  a  $7 \times 10^{-40}$ .

Para el caso de la DEF el programa arrojó 90 resultados, de las cuales 4 no cumplían con alguno de los criterios de selección establecidos. Al analizar las secuencias válidas de aminoácidos se encontró que hay nueve diferentes secuencias reportadas en diversas variedades de tomate y tejidos, las cuales se organizaron por grupos denominados desde DEF1 hasta DEF9, según lo que se muestra en la Tabla 5. La DEF reportada en este trabajo concuerda con otras reportadas previamente para las variedades *cerasiforme*, MicroTom, TA496 y Pullrex, agrupadas tentativamente en el grupo denominado DEF1 (Tabla 5).



**Figura 19.** Estructura teórica 3D de LTP. Las hélices  $\alpha$  están representadas en color rojo y los puentes disulfuro en azul.



**Figura 20.** Representación de la hidrofobicidad de LTP. Esqueleto de la estructura de LTP (basado en el carbono  $\alpha$ ) en rojo y los residuos hidrofóbicos se presentan en verde. Extremos N-terminal (N) y C-terminal (C) están indicados.

**Tabla 5.** Clasificación de DEFs homologas a la reportada para SLC.

Grupo	Variedad	Tejido	Accesión dbEST
DEF 1	<i>cerasifome</i>	Fruto	AJ831962, AJ785022
		Hoja	<b>HM367633 (este estudio)</b>
	MicroTom	Fruto	DB725651, BW692151, BW691288, BW690307, BW689331, BW688618, BW688484, BW688421, BW688071, BW687222, BP892727, BP892449, BP893353
	TA496	Flor	BI928505, BI928336, BI928334, BI928257, AI486657.
	Pullrex	Flor	GE468430
DEF 2	MicroTom	Fruto	BW691530, BW692735, BW689541, BP890564, BW692160, BW692034, BW688397, BW691484, BP894854, BW689912, BW692311, BW692307, BW692283, BW690532, BW689219, BW687904, BW687614, BW686682, BW685415,
	TA496, E6203	Cultivo en suspensión	BI210257, BI210181, BI209898, BI208493, BI208191, BI205423, BI203344,
	TA496	Brote / meristema	BG643413, BG127217, BG126592, BG123932,
		Agalla (crown gall)	BG134255, BG133736, BG133494, BG133188, BG131365, BG135512,
		Fruto	BE458936,
		Plántula	AW648515
	Rio Grande/ Money Maker	Hoja	AI776614, AI772192, AI772878, AI782168,
	Rio Grande	Hoja	AW091743,
Mill	Tricoma	ES890764	
	Pericarpio	CD002974,	
DEF 3	MicroTom	Hoja	DB694032, DB695005,
		Fruto	BP895021, BP894856, BP894565, BP894346, BP893116, BP892544, BP891726, BP890953
DEF 4	MicroTom	Fruto	BW686797, BW689544, BW689079, BP891892
DEF 5	E6203	Flor	AJ319988, BG734535
DEF 6	MicroTom	Fruto	BW686974
DEF 7	MicroTom	Fruto	BW691296
DEF 8	MicroTom	Fruto	BP890252
DEF 9	MicroTom	Hoja	DB700735

Se realizó un alineamiento de las secuencias de los nueve grupos de DEF encontrados para verificar la conservación de los aminoácidos claves (8 cisteínas), que se ilustra en la Figura 21. Para determinar las relaciones que se presentan entre las diferentes DEFs identificadas se construyó un dendrograma que incluyese a cada uno de los grupos reconocidos mediante esta aproximación metodológica. Este análisis permite observar que las DEFs de los grupos 1, 2, 3, 6, 7, 8 y 9 forman un clado relacionado, en tanto DEF4 y DEF5 conformarían un segundo agrupamiento (Figura 22). Estas DEFs fueron determinadas en varias condiciones: antesis, desarrollo de flor y fruto y respuesta a patógenos entre otros. En hoja se ha identificado la expresión de los grupos DEF1, DEF2, DEF3 y DEF9. Solo a la DEF de este trabajo se le determinó su expresión con relación al estímulo de inoculación con *P. infestans*.

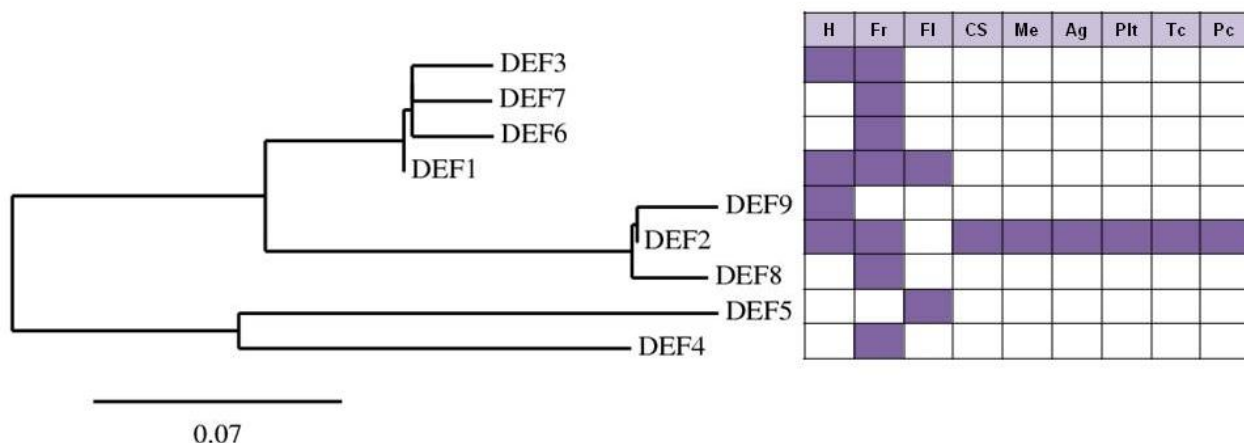
Para el caso de la LTP la herramienta tblastn arrojó 100 resultados con valores E que oscilaron entre  $2 \times 10^{-44}$  a  $7 \times 10^{-40}$ , de las cuales 27 no cumplían con alguno de los criterios de selección establecidos. Al analizar las secuencias válidas de aminoácidos se encontró que hay 12 diferentes secuencias reportadas en diversas variedades de tomate y tejidos, las cuales se organizaron por grupos denominados desde LTP1 hasta LTP12, según lo que se muestra en la Tabla 6. La LTP reportada en este trabajo no concuerda con otras reportadas previamente en tomate, y fue clasificada tentativamente como un grupo denominado LTP1 (Tabla 6). Se realizó un alineamiento de las secuencias de los 12 grupos de LTP encontrados para verificar la conservación de los aminoácidos claves (ocho cisteínas, Val<sub>7</sub>, aromático<sub>17</sub>, Gly<sub>30</sub>, hidrofóbico<sub>34</sub>, Leu/Ile<sub>51</sub>, Lys<sub>52</sub>, Ala<sub>66</sub>, Val<sub>75</sub>, hidrofóbico<sub>77</sub>, aromático<sub>79</sub>, Ile<sub>81</sub> y Ser<sub>82</sub>), que se ilustra en la Figura 23. Paralelamente, se construyó un dendrograma que permitió observar la relación evolutiva de cada grupo de LTP. Así se pudo determinar que estos péptidos se dividen en dos clados, el primero contiene a las LTPs 2, 6, 7, 5, 1, 3, 11, 4 y 10, en tanto el segundo clado está conformado por LTP8, LTP9 y LTP12 (Figura 24). Las diferentes LTPs se aislaron bajo condiciones diversas (susceptibilidad a variados agentes, desarrollo de tejidos, respuesta metabólica, etc.). En hoja se ha identificado la expresión de los grupos LTP1 y 2, siendo LTP1 la primera que se aísla bajo el modelo de inoculación con el agente del tizón tardío.

```

DEF1      ARTCESQSHRFKGPCVSEKNCASVCETEGFSGGDCRGFRRRCFCTRPC 48
DEF2      ARHCESLSHRFKGPCVSDKNCASVCETERFSGGNCRGFRRRCFCTKPC 48
DEF3      ARTCVSQSHRFKGPCVSEKNCASVCETEGFSGGDCRGFRRRCFCTRPC 48
DEF4      ARTCESQSHHFKNCLSDTNCGSVCRTEGFTGGNCRGFRRRCFCTRNC 48
DEF5      ARTCESQSNSFKGTCVSRDNCATVCQTEGFIGNCRGFRRRCFCTRNC 48
DEF6      APTCESQSHRFKGPCVSEKNCASVCETEGFSGGDCRGFRRRCFCTRPC 48
DEF7      ARTCESQSHRFKGPCVSEKNCASVCETEGFSGGDCREFRRRCFCTRPC 48
DEF8      ARHCDSLHRFKGPCVSDKNCASVCETERFSGGNCRGFRRRCFCTKPC 48
DEF9      ARHCESLSHRFKGPCASDKNCASVCETERFSGGNCRGFRRRCFCTKPC 48
* * * * : * * * * : . * * . : * * . * * * * : * * * * * * * * : *

```

**Figura 21.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de DEF homólogos a DEF de SLC reportada. Estas secuencias fueron deducidas a partir de secuencias de ESTs de tomate depositadas en dbEST del NCBI. En azul se señalan las cisteínas conservadas responsables de la formación de puentes disulfuro típica de las DEF. En la parte inferior del alineamiento se indica si hay aminoácidos conservados (\*), sustituciones conservativas (:), y semiconservativas (.). Se utilizó el programa ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>).



**Figura 22.** Árbol filogenético de DEFs de tomate y perfiles de expresión. En la parte izquierda se representa las posibles relaciones evolutivas entre los nueve grupos de DEF analizados, determinado por el algoritmo BioNJ y con análisis de bootstrap (1000 replicas). A la derecha se representa el perfil de expresión de cada grupo de DEF en línea recta horizontal con su respectivo nombre, teniendo en cuenta los tejidos de hoja (H), fruto (Fr), flor (Fl), cultivo en suspensión (CS), meristema (Me), agalla (Ag), plántula (Plt), tricoma (Tc) y pericarpio (Pc).

**Tabla 6.** Clasificación de LTPs homologas a la reportada para SLC.

<b>Grupo</b>	<b>Variedad</b>	<b>Tejido</b>	<b>Accesión ESTdb</b>
LTP 1	<i>cerasiforme</i>	Hoja	<b>HM367634 (este estudio)</b>
LTP 2	MicroTom	Fruto	BP890251, BW692917, BW692827, BW692242, BW692095, BW690657, BW689933, BW689931 BW687521, BW687351, BW687131, BW686364, BW686227, BW686027, BW685863, BP894965, BP894826
		Hoja	BP903530, BP903496
	LA3475	Tricoma tipo VII	GT168649, GT168431, GT168272, GT168098, GT168045, GT167965, GT167864, GT167701, GT167136, GT167045
	Mill	Tricoma de hoja	ES897105, ES895193, ES895163, ES894401, ES894355, ES894159, ES893814, ES893739, ES893680, ES893434, ES893272, ES893223, ES893177, ES893167, ES893104, ES893103, ES892839, ES892057, ES890577, ES890512, ES890442, ES890207, ES890154
	TA496	Brote / meristema	BG643513, BG130363, BG130075, BG128985
	Rio Grande	Hoja	AW443686, AW093519
	Rio Grande / Money Maker	Hoja	AI778365, AI773930
LTP 3	Mill	Tricoma de hoja	ES892255
LTP 4	Mill	Tricoma de hoja	ES893792
LTP 5	LA3475	Tricoma tipo VII	GT168242
LTP 6	Mill	Tricoma de hoja	ES897372, ES895105
LTP 7	Mill	Tricoma de hoja	ES890628, ES890361
LTP 8	LA3475	Tricoma tipo VII	GT167421
LTP 9	Mill	Tricoma de hoja	ES891881
LTP 10	Mill	Tricoma de hoja	ES893697
LTP 11	Mill	Tricoma de hoja	ES897131, ES890805
LTP 12	MicroTom	Fruto	BW689008



## 7. DISCUSIÓN

Los microorganismos fitopatógenos constituyen una de las problemáticas más serias de la producción agrícola a nivel mundial, causando pérdidas devastadoras en cultivos y el uso indiscriminado de sustancias químicas para su control, que a su vez genera un grave impacto ambiental al contaminar la tierra y fuentes acuáticas cercanas y la posible intoxicación de los agricultores y/o animales cercanos al cultivo. Por esto la búsqueda de nuevas herramientas para generar cultivos resistentes a enfermedades o métodos de erradicación efectivos y amigables con la naturaleza se ha convertido en meta principal de un sinnúmero de grupos de investigación a nivel mundial (Pedras, 2008; Agrios, 2005).

Los AMPs se constituyen en una alternativa promisoriosa para el control de enfermedades vegetales comercialmente importantes. Su producción está relacionada con el sistema de reconocimiento de patógenos, las vías de transducción de señales y la inducción de resistencia sistémica. En este trabajo se identificaron dos secuencias codificantes de DNA para los AMPs DEF y LTP activos, y homólogos de estos en otras variedades de tomate. Estos fueron aislados utilizando un modelo basado en infección con el fitopatógeno *P. infestans* sobre una variedad de tomate resistente a este oomicete (SLC).

SLC es una forma ancestral del tomate cultivado que está diseminada en el trópico. Es nativa de la región andina de Ecuador y Perú. Es autógama y de gran variabilidad genética y presenta tolerancia a la humedad, resistencia al tizón tardío, nemátodos y algunos hongos foliares. La resistencia a *P. infestans* fue un parámetro importante para su elección en el marco de este trabajo. La resistencia en el tomate puede ser controlada por uno o más genes, este último sería el caso de la resistencia a *P. infestans*, debido a la existencia de varios biotipos del oomicete (Vallejo, 1999). Se han identificado QTLs de resistencia a este oomicete en variedades silvestres de tomate (Smart et al., 2007). En Colombia se ha utilizado la variedad *cerasiforme* para el mejoramiento convencional de tomate para consumo con el fin de generar resistencia a

este oomicete, con el inconveniente del largo tiempo que conlleva generar nuevas variedades vegetales por esta metodología (Vallejo, 1999).

Los AMPs se han utilizado exitosamente en ensayos de generación de resistencia en plantas susceptibles a enfermedades (utilizando metodologías como la transgénesis) tales como arroz, tabaco, papa y manzana (Montesinos, 2007). Particularmente las DEF tienen demostrada actividad fungicida, usándose exitosamente en la transformación genética de plantas para generar resistencia a patógenos (De Oliveira y Moreira, 2009). A las LTPs se les ha asignado varias funciones “tentativamente” entre las que se cuenta la resistencia a fitopatógenos (De Oliveira y Moreira, 2007). En este trabajo se alcanzó a evidenciar el aumento en la expresión de los genes DEF y LTP. En especial la DEF tuvo un marcado incremento en su transcripción lo que supondría que este péptido en particular tiene una fuerte relación con la respuesta de resistencia a *P. infestans*. Al observar su secuencia de DNA y de aminoácidos se encontró que ya se había descrito en SLC y en otras variedades de tomate, pero es la primera vez que se aísla de hojas en el marco de una infección con *P. infestans*. En el caso de LTP su expresión en contacto con el fitopatógeno aumenta levemente. Aunque es relativamente bajo el aumento no se puede aseverar que no participa en la resistencia al patógeno, debido a que en otras especies estos péptidos son contundentes a muy bajas concentraciones (Cammue et al., 1995). Analizando su secuencia se determinó que es una nueva LTP, ya que posee ocho mutaciones en la secuencia de DNA con respecto a una LTP de la variedad Micro-Tom, pero solo dos se traducen en cambio de aminoácidos, así este péptido se reporta por primera vez, cuya extracción fue a partir de hoja y en el marco de infección de SLC con *P. infestans*.

El mejoramiento convencional de especies vegetales y la ingeniería genética de plantas han conseguido éxitos en el desarrollo de resistencia hacia el tizón tardío, aunque su durabilidad es cuestionada. Pocos componentes antimicrobianos pueden inhibir su crecimiento, entre otros se encuentran la cecropina B, el péptido msdA3 derivado del gen temporin A, y el péptido tipo heveina (Misra et al., 2004; Koo et al., 2002; Owens y Heutte, 1997). Los AMPs pueden ser importantes en este campo debido a su amplia

variabilidad genética y su diversidad biológica ya que se han encontrado en insectos, mamíferos y plantas entre otros. En organismos vegetales su principal papel es la resistencia hacia hongos patógenos. El modo de acción es poco claro, pero la transgénesis ha demostrado su potencial en protección de cultivos.

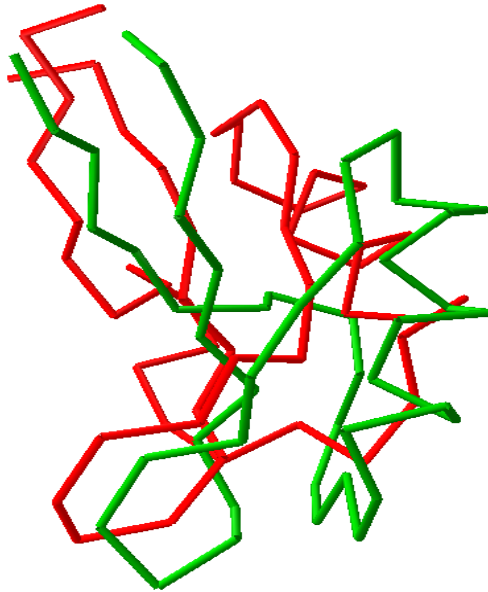
Solis et al (2007) encontraron una DEF proveniente de maca (*Lepidium meyenii*) cuya expresión de forma recombinante en *Escherichia coli* y posteriores ensayos de actividad sobre el agente del tizón tardío, permitió determinar que era capaz de inhibir el 50% de crecimiento de *P. infestans* a una dosis de 96.9 µg/ml. Debido a que la DEF identificada en esta propuesta estaría probablemente asociada con la resistencia al tizón tardío se comparó la secuencia y su estructura tridimensional con la DEF de maca observando que, a nivel de secuencia de aminoácidos, entre las dos hay 17 identidades, siete sustituciones conservativas y ocho semiconservativas (total = 32), en un total de 48 residuos (66.6%) para la DEF de este trabajo y 51 de la DEF de maca (Figura 25). Cuando se superponen sus estructuras 3D (Figura 26) se encuentra que la DEF de maca posee la típica arquitectura tipo DEF, pero posee variaciones en diversas regiones con respecto a la DEF de SLC. Aunque no es concluyente, se podría suponer que la DEF de este trabajo posea actividad biológica específica sobre el biotipo particular de *P. infestans* utilizado, lo cual sería necesario comprobar experimentalmente haciendo la comparación con la actividad de DEF de maca con el mismo tipo de fitopatógeno.

La LTP de cebolla Ace-AMP1 presenta una marcada actividad hacia 12 hongos fitopatógenos, inhibiendo su crecimiento a dosis inferiores a 10 µg/ml (Cammue et al., 1995). Se comparó la LTP encontrada en esta investigación con Ace-AMP1. Al analizarlas se identificaron 27 identidades, 18 sustituciones conservadas y 14 sustituciones semiconservadas (total = 59) en 94 residuos (62.7%) en LTP y 105 para Ace-AMP1 (Figura 27). Es interesante que, al construir su estructura 3D, el servidor Swiss Model Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) arrojara como estructura molde más adecuada a 1T12 (LTP de tabaco), con un puntaje E de 1.1 e-10, que fue el mismo molde para hacer el modelamiento de la LTP de SLC (E = 5 e-25).

Lepidium QKLCERSSGTWSGVCGNNTCKNQCINLEGARHGSCN-YRFPYHRCICYVPC 51  
 DEF.SLC ARTCESQSHRFKGPCVSEKNCASVCET-EGFSGGDCRGFR---RRCFCTRPC 48  
 : \*\* . \* : . \* \* . : . \* . \* . \*\* \* . \* . : \* : \*\* : \* \*\*

AVFPMILW	RED	Small (small+ hydrophobic (incl.aromatic -Y))
DE	BLUE	Acidic
RK	MAGENTA	Basic
STYHCNGQ	GREEN	Hydroxyl + Amine + Basic - Q
Others	Gray	

**Figura 25.** Comparación de DEF de este trabajo y la DEF de maca. En la parte inferior del alineamiento se indica si hay aminoácidos conservados (\*), sustituciones conservativas (:) y semiconservativas (.) según la codificación de colores. El alineamiento se llevo a cabo con ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>).



**Figura 26.** Comparación de los esqueletos 3D de la DEF de este trabajo y la DEF de maca con base en el carbono  $\alpha$ . DEF de maca en rojo y DEF de SLC en verde. Los esquemas se generaron con DeepView-Swiss-PdbViewer 3.7 (<http://spdbv.vital-it.ch/>). El molde para la construcción de la DEF de maca fue 1AYJ (proteína antifúngica de *Raphanus sativus*).

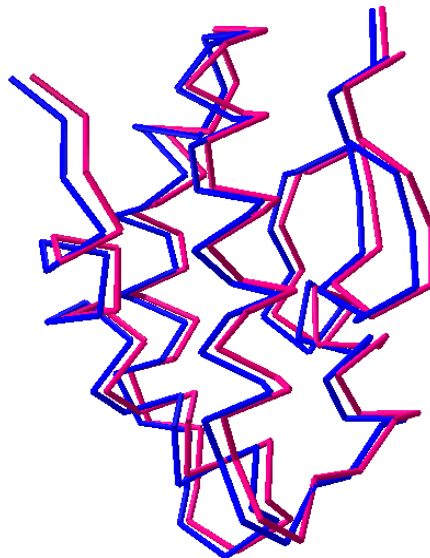
```

Ace-AMP1      QNQICIPRVRNRRIVTPCVVAYGLLGRRAPIAPCCRALNDLR-FVNTRNLRRRAACRCLVGVVNNRNPG 59
LTP.SLC       ALATCGGQVESSGLAPCLPYLQGKPLGGCCRGVKGLLGAAETPADRKTACTCLKSAANAIKG 60
              * :*: :*:*: * * :*: * * * :*: * .:* * :*: * * . . . * *
              * . . : .** * . * : * * :*: *
Ace-AMP1      LRRNPRFQNIPRDCRNTFVRPFWRRPRIQCGRINLTDKLIYLDAEE 105
LTP.SLC       LNLG-KAAGIPSACG--VSIPYKISPFTDCSKVQKTL----- 94
              * . . : .** * . * : * * :*: *

```

AVFPMILW	RED	Small (small+ hydrophobic (incl.aromatic -Y))
DE	BLUE	Acidic
RK	MAGENTA	Basic
STYHCNGQ	GREEN	Hydroxyl + Amine + Basic - Q
Others	Gray	

**Figura 27.** Cotejo de la LTP de este trabajo y la Ace-AMP1. Se indican los aminoácidos conservados (\*), sustituciones conservativas (:) y semiconservativas (.) representados en colores. El alineamiento se realizó con ClustalW2 (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/clustalw2/>).



**Figura 28.** Superposición de los esqueletos (carbono  $\alpha$ ) de la LTP de SLC y Ace-AMP1. LTP de tomate variedad cerasiforme utilizada en este trabajo se presenta en azul y Ace-AMP1 se encuentra en rosado. La gráfica se generó con DeepView-Swiss-PdbViewer 3.7 (<http://spdbv.vital-it.ch/>). El molde para la construcción de la Ace-AMP1 fue 1T12 (*N. tabacum*) de PDB.

Así la estructura 3D de ambas LTP sería virtualmente la misma (Figura 28), por lo que cabría preguntarse si la LTP de SLC es igual de activa contra los mismos hongos patógenos que son susceptibles a la LTP Ace-AMP1.

Una vez analizada la secuencia de DEF y LTP obtenidas a partir de SLC, se realizó una búsqueda de homólogos en las ESTdb de tomate, debido a que estas secuencias son representativas de la expresión del genoma. El análisis de ESTs es una manera útil de identificar nuevos genes que pudiesen estar asociados a procesos biológicos, como las enfermedades (Menossi et al., 2008). Específicamente para tomate se han realizado librerías de ESTs de las variedades Micro-Tom, *cerasiforme*, Money Maker y Mill entre otras, aproximadamente 1215 secuencias BAC (D'Agostino et al., 2009) (<http://biosrv.cab.unina.it/solestdb>).

Para la identificación de homólogos de AMPs en ESTs de tomate se siguió una rutina de trabajo que permitió establecer clasificación, perfil de expresión y análisis filogenético. Las DEFs y LTPs presentan variabilidad en cuanto a su secuencia de aminoácidos, pero pese a ello tienen residuos que se conservan y le dan sus propiedades y estructura. Usando las secuencias experimentales de AMPs determinadas en este trabajo, como una sonda *in silico*, se encontraron 86 DEFs y 73 LTPs homologas que fueron clasificadas en 9 y 12 grupos respectivamente. Teniendo en cuenta la alta similitud entre sus secuencias de DNA y de aminoácidos se puede postular que su divergencia ha sido reciente. En *A. thaliana* se han encontrado más de 300 secuencias tipo DEF y 15 tipo LTP (Sels et al., 2008; Silverstein et al., 2005) por lo que es posible que estos AMPs identificados aquí sean parte de una gran familia multigénica como sucede en *A. thaliana*. Sus perfiles de expresión y los resultados experimentales indicarían su expresión constitutiva y pueden ser responsables de la resistencia a patógenos como se ha observado en otros organismos (Montesinos, 2007). La expresión en fruto de la mayoría de las DEFs y LTPs homologas halladas en este trabajo llevan a pensar que podría ser una estrategia para la prevención del ataque de patógenos a recursos importantes de la planta (Silverstein et al., 2005).

El laboratorio de Bioquímica Fitopatológica y Evolución Molecular de la Universidad Nacional de Colombia identificó la presencia de posibles DEFs a partir de los espacios intercelulares de hojas de SLC, mediante pruebas cromatográficas y bioquímicas. En ellas se evidencia su acumulación sistémica, su efecto protector contra *P. infestans* y su asociación como trímeros y tetrameros (Riaño y Zamora, 2005). Se ha encontrado evidencia de que la dimerización sería una característica clave para la actividad biológica de DEFs ya que esto aumentaría su potencial electrostático (Suresh y Verma, 2006). La gran superficie electrostática de la DEF encontrada en este trabajo podría hacer suponer que, al formar oligómeros, el potencial electrostático sería mucho mayor permitiéndole una mejor interacción con la membrana celular del agente del tizón tardío.

La LTP de este trabajo constituye un nuevo homólogo dentro de las LTPs de tomate. Se ha postulado que las LTPs en plantas tienen varias funciones; síntesis de cutina,  $\beta$ -oxidación, embriogénesis somática, alergenicidad, señalización y resistencia a fitopatógenos, (Pii et al, 2010; de Oliveira y Moreira, 2007; Blein et al, 2002). Aunque la LTP aquí identificada pueda tener una estructura similar a Ace-AMP1 (de alta actividad antifúngica) su bajo incremento en la expresión ante el estímulo de la infección con *P. infestans* haría necesario estudiar a fondo si su papel biológico en la resistencia a esta enfermedad en particular requiere de bajas cantidades de péptido, o si participa en la resistencia a otro tipo de hongos fitopatógenos en SLC.

## 8. CONCLUSIONES

1. Se identifico dos AMPs a partir de hojas de una variedad de tomate resistente a tizón tardío, mediante la infección con el patógeno, uno de los cuales no se había reportado antes (LTP).
2. La expresión de los AMPs identificados es constitutiva, ya que se presenta pre y post-infección con *P. infestans*.
3. La DEF se expresa 2.6 veces ante el estímulo del ataque con el fitopatógeno, por lo que este AMP puede estar relacionado directamente con la resistencia en esta variedad de tomate. La LTP se expresa 1.25 veces ante la infección, lo cual puede indicar la necesidad de una baja concentración del péptido para su efectividad, o bien su participación en la resistencia a otros fitopatógenos.
4. Los AMPs aislados en este trabajo poseen estructuras características de sus respectivas familias (DEF y LTP), lo que estaría relacionado con su función biológica, y al ser comparadas con homólogos de otras especies confirman su probable participación en efectos de resistencia contra patógenos.
5. En el tomate se han reportado diversos homólogos de la DEF y LTP de esta iniciativa, con expresión asociada a varios tejidos y estímulos, pero es la primera vez que se determinan en el modelo de infección con *P. infestans*.

## 9. PERSPECTIVAS

El presente trabajo sienta las bases para la posterior clonación y expresión de estos AMPs y su evaluación biológica sobre *P. infestans*, lo que llevaría a determinar su especificidad para el manejo de esta enfermedad en variedades susceptibles comercialmente importantes de tomate.

## 10. BIBLIOGRAFÍA

AERTS, A. M.; FRANÇOIS, I. E. J. A.; CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K. 2008. The mode of antifungal action of plant, insect and human defensins. *Cellular and Molecular Life Sciences*. 65: 2069 – 2079

AGRIOS, G.N. 2005. *Plant Pathology*. Quinta edición. Elsevier Academic Press. 922p.

ARNOLD, K.; BORDOLI, L.; KOPP, J.; SCHWEDE, T. 2006. The SWISS-MODEL Workspace: A web-based environment for protein structure homology modeling. *Bioinformatics*. 22: 195-201.

BAXEVANIS, A.D; OUELLETTE, B.F.F. 2001. *Bioinformatics: A Practical Guide to the Analysis of Genes and Proteins*. Segunda edición. Ed. John Wiley & Sons.

BENKERT, P ; KÜNZLI, M ; SCHWEDE, T. 2009. "QMEAN Server for Protein Model Quality Estimation." *Nucleic Acids Res*. Jul 1;37(Web Server issue):W510-4.

BLEIN, J.P; COUTOS-THÉVENOT, P; MARION, D; PONCHET, M. 2002. From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defense mechanisms. *Trends in Plant Science* .7: 293-296

CAMMUE, B. P. A.; THEVISSSEN, K ; HENDRIKS, M; EGGERMONT, K; GODERIS, L. J; PROOST, P; VAN DAMME, J; OSBORN, R.W; GUERBETTE, F; KADER, J.C; BROEKAER, W.F. 1995. A Potent Antimicrobial Protein from Onion Seeds Showing Sequence Homology to Plant Lipid Transfer Proteins. *Plant Physiol*. 109: 445-455.

CARVALHO, A.O; FILHO, G.A; FERREIRA, B.S; BRANCO, A.T; OKOROKOVA-FAÇANHA, A.L; GOMES, V.M. 2006. Cloning and characterization of a cDNA encoding a cowpea seed defensin and analysis of its expression. *Protein Pept Lett*. 13(10):1029-36.

CASTELLANOS, I.C; NIÑO, L.F. Identificación de cinco defensinas en el genoma del tomate utilizando el Modelo Oculto de Markov. En: III Congreso Colombiano de Biotecnología, II Seminario Internacional de Bionegocios (29 de julio – 1 de agosto: Bogotá): Memorias en formato digital. Instituto de Biotecnología – Universidad Nacional de Colombia

CHEHAB, E.W.; KASPI, R.; SAVCHENKO, T.; ROWE, H.; NEGRE-ZAKHAROV, F.; KLIEBENSTEIN, D.; DEHESH, K. 2008. Distinct Roles of Jasmonates and Aldehydes in Plant-Defense Responses. *Public Library of Science ONE*. 3(4): e1904.

CHENG, C.S.; CHEN, M.N.; LIU, Y.J.; HUANG, L.Y.; LIN, K.F.; LYU, P.C. 2004. Evaluation of plant non-specific lipid-transfer proteins for potential application in drug delivery. *Enzyme and Microbial Technology* 35: 532–539

D'AGOSTINO, N; TRAINI, A; FRUSCIANTE, L; CHIUSANO, M.L. 2009. SolEST database: a "one-stop shop" approach to the study of Solanaceae transcriptomes. *BMC Plant Biology* 2009, 9:142-

DE OLIVEIRA CARVALHO, A.; MOREIRA GOMES, V. 2007. Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology - A concise review. *Peptides*. 28: 1144-1153.

DE OLIVEIRA CARVALHO, A.; MOREIRA GOMES, V. 2009. Plant defensins - Prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*. 30: 1007–1020

DE PAULA, V.S.; RAZZERA, G.; MEDEIROS, L.; MIYAMOTO, C.A.; ALMEIDA, M.S.; KURTENBACH, E.; ALMEIDA, F.C.L.; VALENTE, A.P. 2008. Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins. *Plant Molecular Biology*. 68:321–335

- DIZ, M.S.S; CARVALHO, A.O; RODRIGUES, R; NEVES-FERREIRA, A.G.C; DA CUNHA, M; ALVES, E.W; et al. 2006. Antimicrobial peptides from chilli pepper seeds causes yeast plasma membrane permeabilization and inhibits the acidification of the medium by yeast cells. *Biochim Biophys Acta*.1760:1323–32.
- FAINO, L; CARLI, P; TESTA, A; CRISTINZIO, G; FRUSCIANTE, L; ERCOLANO, M.R. 2010. Potato R1 resistance gene confers resistance against *Phytophthora infestans* in transgenic tomato plants. *Eur J Plant Patho*. In Press.
- FRY, W.E.; GODWIN, S.B.; DYER, A.T.; MATUSZAK, J.M.; DRENTH, A.; TOOLEY, P.W.; SUJKOWSKI, L.S.; KOH, Y.J.; COHEN, B.A.; SPIELMAN, L.J.; DEAHL, K.L.; INGLIS, D.A.; SANDLAN, K.P. 1993. Historical and Recent Migrations of *Phytophthora infestans*: Chronology, Pathways, and Implications. *Plant Disease* 77 (7): 653-661
- FRY, W. 2008. *Phytophthora infestans*: the plant (and R gene) destroyer. *Molecular Plant Pathology* 9(3): 385–402
- GE, X; CHEN, J; LI, N; LIN, Y; SUN, C; CAO, K. 2003. Resistance function of rice lipid transfer protein LTP110. *J Biochem Mol Biol*. 36:603–7.
- GRAHAM, M.A; SILVERSTEIN, K.A.T; VANDENBOSCH, K.A. 2008. Defensin-like Genes: Genomic Perspectives on a Diverse Superfamily in Plants. *Crop Sci*. 48: S3-S11
- GUEX, N.; PEITSCH, M.C. 1997. Swiss-model and the Swiss-PdbViewer: An environment for comparative protein modeling. *Electrophoresis* 18, 2714-2723.
- VAN GUNSTEREN, W. F., S. R. BILLETER, ET AL. 1996. *Biomolecular Simulations: The GROMOS96 Manual and User Guide*. Zürich, VdF Hochschulverlag ETHZ.
- HEUVELINK, E. 2005. *Tomatoes*. CABI Publishing. 325p.
- JARAMILLO, J.; RODRIGUEZ, V.; GUZMAN, M.; ZAPATA, M.; RENGIFO, T. 2007. *Buenas Prácticas Agrícolas: Producción de Tomate Bajo Condiciones Protegidas*. CORPOICA – MANA – Gobernación de Antioquia – FAO.
- JHA, S.; TANK, H.G.; PRASAD, B.D.; CHATTOO, B.B. 2009. Expression of Dm-AMP1 in rice confers resistance to *Magnaporthe oryzae* and *Rhizoctonia solani*. *Transgenic Resources* 18:59–69.
- KADER, J.C. 1996. Lipid-transfer proteins in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*. 47:627–54.
- KADER, J.C. 1975. Proteins and the intracellular exchange of lipids: stimulation of phospholipid exchange between mitochondria and microsomal fractions by proteins isolated from potato tuber. *Biochim Biophys Acta*. 380:31–44.
- KOO J.C., CHUN H.J., PARK H.C., KIM M.C., KOO Y.D., KOO S.C., et al. 2002. Over-expression of a seed specific hevein-like antimicrobial peptide from *Pharbitis nil* enhances resistance to a fungal pathogen in transgenic tobacco plants. *Plant Mol Biol*.50: 441–452.
- LÓPEZ C. 2007. *Fitopatología molecular*. Editorial Universidad Nacional de Colombia. 145p.
- MAGIRI, E.N.; FARCHI-PISANTY, O.; AVNI, A.; BREIMAN, A. 2006. The expression of the large rice FK506 binding proteins (FKBPs) demonstrate tissue specificity and heat stress responsiveness. *Plant Science* 170: 695–704

- MARQUÈS, L.; OOMEN, R.J.F.J.; AUMELAS, A.; LE JEAN, M.; BERTHOMIEU, P. 2009. Production of an *Arabidopsis halleri* foliar defensin in *Escherichia coli*. *Journal of Applied Microbiology* 106: 1640–1648
- MEDINA C, C.I.; LOBO A, M. 2001. Variabilidad morfológica en el tomate pajarito (*Lycopersicon esculentum* var. *cerasiforme*), precursor del tomate cultivado. *Revista CORPOICA*. 3(2): 39 – 50.
- MENOSSE, M.; SILVA-FILHO, M.C.; VINCENTZ, M.; VAN-SLUYS, M.-A.; SOUZA, G.M. 2008. Sugarcane functional genomics: gene discovery for agronomic trait development. *Int. J. Plant Genomics*. ID 458732.
- MIROUZE, M.; SELS, J.; RICHARD, O.; CZERNIC, P.; LOUBET, S.; JACQUIER, A.; FRANÇOIS, I.E.J.A.; CAMMUE, B.P.A.; LEBRUN, M.; BERTHOMIEU, P.; MARQUÈS, L. 2006. A putative novel role for plant defensins: a defensin from the zinc hyper-accumulating plant, *Arabidopsis halleri*, confers zinc tolerance. *The Plant Journal*. 47: 329–342.
- MISRA S, OSUSKY M, OSUSKA L, HANCOCK RE, KAY WW. 2004. Transgenic potatoes expressing a novel cationic peptide are resistant to late blight and pink rot. *Transgenic Res*. 13: 181–190.
- MOLINA, A.; SEGURA, A.; GARCÍA-OLMEDO, F. 1993. Lipid transfer proteins (nsLTPs) from barley and maize leaves are potent inhibitors of bacterial and fungal plant pathogens. *FEBS*. 316:119–22.
- MONTESINOS. 2007. Antimicrobial peptides and plant disease control. *FEMS Microbiol Lett* 270: 1–11.
- NUEZ, F. 2001. *El Cultivo del Tomate*. Publicado por Mundi-Prensa Libros. España.
- ODINTSOVA, T.I.; ROGOZHIN, E.A.; BARANOV, Y.; MUSOLYAMOV, A.K.; YALPANI, N.; EGOROV, T.A.; GRISHIN, E.V. 2008. Seed defensins of barnyard grass *Echinochloa crusgalli* (L.) Beauv. *Biochimie*. 90: 1667-1673.
- OOI, L.S.M; WONG, E.Y.L; SUN, S.S.M; OOI, V.E.C. 2006. Purification and characterization of non-specific lipid transfer proteins from the leaves of *Pandanus amaryllifolius* (Pandaceae). *Peptides*. 27:626–32.
- OWENS LD, HEUTTE TM. 1997. A single amino acid substitution in the antimicrobial defense protein cecropin B is associated with diminished degradation by leaf intercellular fluid. *Mol Plant Microbe Interact*.10: 525–528.
- PEDRAS, M.S.C. 2008. The Chemical Ecology of Crucifers and Their Fungal Pathogens: Boosting Plant Defenses and Inhibiting Pathogen Invasion. *The Chemical Record*. 8: 109–115
- PIL, Y.; PANDOLFINI, T.; CRIMI, M. 2010. Signaling LTPs: A new plant LTPs sub-family?. *Plant Signaling & Behavior* 5(5): 1-4.
- RED NACIONAL DE PROGRAMAS REGIONALES DE DESARROLLO INTEGRAL Y PAZ (REDPRODEPAZ) 2006. Análisis Comparativo Sistemas Productivos Cultivo de Coca Vs Cultivo de Tomate en Invernadero [en línea]. <http://www.redprodepaz.org/>(Consulta: junio, 2009)
- RIAÑO, L.D.; ZAMORA, H.M. 2005. Proteínas Antifúngicas Contra *P. infestans* en los Espacios Intercelulares de Hojas de Tomate (*Lycopersicon esculentum cerasiforme*) Posibles Defensinas de Plantas. *Revista Colombiana de Química* 34 (1): 7-23
- SALAS, C.; ZAMORA, H.M. 2009.  $\beta$  (1,3) Glucanasas de los Espacios Intercelulares de Hojas de Tomate *Lycopersicon esculentum cerasiforme* Después de Infección con *Phytophthora infestans*. *Revista Colombiana de Química* 38(1): 43-59.
- SAMBROOK, J., RUSSELL, D.W., AND SAMBROOK, J. 2001. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. Tercera edición. Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.

- SELS, J.; MATHYS, J.; DE CONINCK, B. ; CAMMUE, B.; DE BOLLE, M. 2008. Plant pathogenesis-related (PR) proteins: A focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry*. 46: 941–950
- SILVERSTEIN, K.A.T.; GRAHAM, M.A.; PAAPE, T.D.; VANDENBOSCH, K.A. 2005. Genome organization of more than 300 defensin-like genes in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*. 138: 600-610.
- SMART C.D., MAYTON H., FRY W. 2007. Resistance to *Phytophthora infestans* in *Lycopersicon pennellii*. *Plant Disease*. 91: 1045-1049.
- SOLIS, J.; MEDRANO, G.; GHISLAIN, M. 2007. Inhibitory effect of a defensin gene from the Andean crop maca (*Lepidium meyenii*) against *Phytophthora infestans*. *Journal of Plant Physiology* 164: 1071—1082
- SURESH A., VERMA C. 2006. Modelling study of dimerization in mammalian defensins. *BMC Bioinformatics*. 7 (Suppl 5): S17.
- SWATHI ANURADHA, T.; DIVYA, K.; JAMI, S.K.; KIRTI, P.B. 2008. Transgenic tobacco and peanut plants expressing a mustard defensin show resistance to fungal pathogens. *Plant Cell Reports*. 27:1777–1786
- TAVARES, L.S.; SANTOS, M.O.; VICCINI, L.F.; MOREIRA, J.S.; MILLER, R.N.G.; FRANCO, O.L. 2008. Biotechnological potential of antimicrobial peptides from flowers. *Peptides* 29: 1842 – 1851.
- THEVISSEN, K.; WARNECKE, D.C.; FRANÇOIS, I.E.J.A.; LEIPELT, M.; HEINZ, E.; OTT, C.; ZÄHRINGER, U.; THOMMA, B.P.H.J.; FERKET, K.K.A.; CAMMUE, B.P.A. 2004. Defensins from Insects and Plants Interact with Fungal Glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*. 279 (6): 3900–3905.
- THOMMA, B.P.H.J.; CAMMUE, B.P.A.; THEVISSEN, K. 2002. Plant defensins. *Planta*. 216: 193–202
- VALLEJO, F. A. 1999. Mejoramiento genético y producción de tomate en Colombia. Editorial Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. P. 216.
- VARGAS, A.M; QUESADA OCAMPO, L.M; CÉSPEDES, M.C; CARREÑO, N.; GONZÁLEZ, A.; ROJAS, A.; ZULUAGA, A.P; MYERS, K.; FRY, W.E; JIMÉNEZ, P; BERNAL, A.J; RESTREPO, S. 2009. Characterization of *Phytophthora infestans* Populations in Colombia: First Report of the A2 Mating Type. *Phytopathology*. 99(1): 82-88
- WANG, S.Y.; WU, J.H; NG, T.B; YE, X.Y; RAO, P.F. 2004. A non-specific lipid transfer protein with antifungal and antibacterial activities from the mung bean. *Peptides*. 25:1235–42.
- ZHU, S. 2007. Evidence for myxobacterial origin of eukaryotic defensins. *Immunogenetics*. 59:949–954

## 11. ANEXOS

**Anexo 1.** Alineamiento múltiple de secuencias de nucleótidos codificantes para DEFs en diferentes especies del género *Solanum*. Los asteriscos en la parte inferior del alineamiento indican coincidencia de base nucleotídica en todas las secuencias analizadas. Obsérvese que los sitios donde no hay coincidencia (sin asterisco) la variación es debida exclusivamente a la secuencia de *S. chacoense* la cual no es una clase de tomate.

```

S.pimpinellifolium   GCAAGAACTTGTGAGTCTCAGAGTCATCGTTTCAAAGGACCATGTGTGAGTGAGAAGAAT 60
SL.cv.Sun1642       GCAAGAACTTGTGAGTCTCAGAGTCATCGTTTCAAAGGACCATGTGTGAGTGAGAAGAAT 60
SL.cv.MicroTom      GCAAGAACTTGTGAGTCTCAGAGTCATCGTTTCAAAGGACCATGTGTGAGTGAGAAGAAT 60
SL.cv.Moneymaker    GCAAGAACTTGTGAGTCTCAGAGTCATCGTTTCAAAGGACCATGTGTGAGTGAGAAGAAT 60
SL.var.cerasiforme  GCAAGAACTTGTGAGTCTCAGAGTCATCGTTTCAAAGGACCATGTGTGAGTGAGAAGAAT 60
S.chacoense         GCAAGAACTTGCAGTTCGAGGCCATCGTTTCAAGGGACCATGTGTGAGCGAGAAGAAT 60
*****          *****          *****          *****          *****          *****

S.pimpinellifolium   TGTGCCTCGGTATGTGAGACCGAAGGATTTTCCGGTGGTGATTGTCGTGGATTCCGTCGC 120
SL.cv.Sun1642       TGTGCCTCGGTATGTGAGACCGAAGGATTTTCCGGTGGTGATTGTCGTGGATTCCGTCGC 120
SL.cv.MicroTom      TGTGCCTCGGTATGTGAGACCGAAGGATTTTCCGGTGGTGATTGTCGTGGATTCCGTCGC 120
SL.cv.Moneymaker    TGTGCCTCGGTATGTGAGACCGAAGGATTTTCCGGTGGTGATTGTCGTGGATTCCGTCGC 120
SL.var.cerasiforme  TGTGCCTCGGTATGTGAGACCGAAGGATTTTCCGGTGGTGATTGTCGTGGATTCCGTCGC 120
S.chacoense         TGTGCCTCGGTCTGTGAGACTGAAGGATTTTCCGGTGGTGATTGTCGTGGACTCCGTCGC 120
*****          *****          *****          *****          *****

S.pimpinellifolium   CGTTGCTTTTGCAGTCTAGGCCATGCTAA 147
SL.cv.Sun1642       CGTTGCTTTTGCAGTCTAGGCCATGCTAA 147
SL.cv.MicroTom      CGTTGCTTTTGCAGTCTAGGCCATGCTAA 147
SL.cv.Moneymaker    CGTTGCTTTTGCAGTCTAGGCCATGCTAA 147
SL.var.cerasiforme  CGTTGCTTTTGCAGTCTAGGCCATGCTAA 147
S.chacoense         CGTTGCTTTTGCAGTCTAGGCCATGCTAA 147
*****          *****

```



## 12. PRODUCTOS DE LA TESIS

Como productos generados por este trabajo se logro el artículo de revisión:

- ROJAS ARIAS AC, ZAMORA ESPITIA HM. 2010. Defensinas de plantas y su uso potencial como controladores de plagas en agricultura. Acta Biológica Colombiana. 15(3): 33-46.

Los resultados de este trabajo se presentaron en un congreso nacional:

- ROJAS ARIAS AC, ZAMORA ESPITIA HM. 2009. Identificación Molecular de Resistencia Asociada a Péptidos Antimicrobianos en Tomate (*Solanum lycopersicum*). Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas 21: 247. Resumen de ponencia en XLIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas, Popayán (Colombia).

La presente tesis genero un curso de extensión:

- ROJAS, Adriana. Manejo de enfermedades del tomate (*Lycopersicon esculentum*) mediante el uso de defensinas en: Escuela Superior Politécnica de Chimborazo (Riobamba – Ecuador). Diciembre de 2008.

## 12.1 Artículo de revisión:

*Acta biol. Colomb., Vol. 15 N.º 3, 2010 33 - 46*

---

### DEFENSINAS DE PLANTAS Y SU USO POTENCIAL COMO CONTROLADORES DE PLAGAS EN LA AGRICULTURA.

#### Plant Defensins and Their Potential Use as Pest Control in Agriculture.

ADRIANA CAROLINA ROJAS ARIAS<sup>1</sup>, HUMBERTO MIGUEL  
ZAMORA ESPITIA<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Grupo de investigación en Bioquímica fitopatológica y evolución molecular, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia - Sede Bogotá. Carera 30 # 45-03, Ciudad Universitaria, edificio 451, laboratorio 318. Bogotá D.C., Colombia.  
acrojasa@unal.edu.co

Presentado 11 de agosto de 2009, aceptado 25 de noviembre de 2009, correcciones 25 de noviembre de 2009.

#### RESUMEN

Las plantas, al igual que todos los organismos de la naturaleza, poseen elaborados sistemas de defensa contra patógenos, que pueden ser físicos y químicos, y producirse de forma constitutiva e inducida. Dentro de las barreras químicas inducidas se encuentra el grupo de proteínas de bajo peso molecular denominadas péptidos antimicrobianos (AMPs), al cual pertenecen las defensinas, péptidos con peso molecular entre 5 a 7 kDa, punto isoeléctrico de 9, y longitud de 45 a 55 aminoácidos; que tienen la capacidad de inhibir efectivamente el crecimiento de microorganismos fitopatógenos, en su mayoría hongos, y además, generan resistencia a condiciones abióticas de estrés en plantas. Este texto pretende realizar una descripción clara y actual de las características e investigaciones recientes con relación a las defensinas de plantas y sus más destacados usos en el control de patógenos en cultivos de importancia económica. Se plantea además la necesidad de profundizar en el conocimiento de dichas proteínas para su uso en estrategias de control tales como la producción de plantas y microorganismos transgénicos.

**Palabras clave:** defensinas de plantas, péptidos antimicrobianos, resistencia a fitopatógenos, transgénicos.

#### ABSTRACT

Plants, as all organisms in nature, have elaborate systems of defense against pathogens; which can be physical or chemical and produced in a constitutive and induced way. Among the induced chemical barriers, there is a group of low molecular weight proteins, known as antimicrobial peptides (AMPs). These peptides include defensins, which are peptides with a molecular weight about 5 to 7 kDa, isoelectric point of 9, and length of about 45 to 55 amino acids. Likewise, they have the ability to avoid the growth of phytopathogenic microorganisms, mainly funguses. Moreover, these peptides create

## 12.2 Ponencia en congreso nacional:

Popayán 6 al 10 de octubre de 2009

XLIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas

# REVISTA DE LA ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

## MEMORIAS XLIV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS Popayán Octubre 6 Al 10 De 2009

Editora  
Patricia Landazuri M.Sc. Ph.D.  
Calle 22N No. 19-68 Mz C casa 5 A. Fax (6) 7460158  
E-mail: anyeloandreygd@yahoo.es editorial.revista@accbcolombia.org  
Armenia Quindío Colombia

La Revista de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas (ISSN 0120-4173) es el órgano de divulgación de esta asociación científica. Es una publicación periódica de circulación nacional e internacional que aparece anualmente en formato de 240mm x 17mm con una tirada de 1.000 ejemplares por edición.

Todos los derechos por la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas (ACCB). La revista no asume responsabilidad alguna por la información contenida en los artículos publicados, responsabilidad imputable solo a los autores.

rev. asoc. col. cienc. biol.	Popayán, Cauca (Colombia)	No. 21, suplemento 1	p.p. 1-360	2009	ISSN 0120-4173.
------------------------------------	------------------------------	-------------------------	------------	------	--------------------

sobreproductora de  $\beta$ -caroteno, uno de los obstáculos en la producción a gran escala de esta microalga es la preparación de un cultivo química y económicamente apropiado (Almanza et al, 2007), por ello se han utilizado sustancias que puedan de alguna manera acelerar su crecimiento o Carotenogénesis, no siendo todavía testado con la adición del extracto de *C.sativa*. Este trabajo tiene como objetivo determinar la influencia que tiene la adición de una parte del extracto seco de *C.sativa* sobre el crecimiento y producción de carotenoides en cultivos de laboratorio de *D.salina*. Cultivo de *D.salina* en medio Johnson modificado (Borotwizka & Borotwizka, 1988), proveniente de las piscinas de Tasajea-Magdalena fueron testados en un pre-ensayo que adiciones en concentraciones menores 10 ppm de extracto de *C.sativa* las algas eran viables, por que se utilizaron en los experimentos concentraciones de *C.sativa* de (0.5, 1, 3, 5, 8 ppm) en un volumen de 200 ml. Los ensayos se realizaron por triplicado y en condiciones optimas de crecimiento (pH: 8.2; 1 M de NaCl; 6000 lux; fotoperiodo 12 diurno- 12 nocturno con aireación constante en 21 días de cultivo). La máxima densidad celular ( $1.05 \times 10^6$  cel/ml y  $1.03 \times 10^6$  cel/ml); velocidad de crecimiento (0,27 y 0,28 div/día), tiempo de duplicación (3,74 y 3,54 días), se observó en los cultivos con adiciones de 1 y 3 ppm de extracto de *C.sativa* a los seis días de cultivo, respectivamente. La mayor concentración de Carotenoides ( $1.6 \pm 0.2 \mu\text{g/ml}$ ) se observó en el cultivo con adición de 3 ppm de extracto. Estos resultados sugieren que la adición de extracto seco de *C.sativa* a altas concentraciones pueden inhibir el crecimiento celular y provocar la muerte de la microalga en cambio, a bajas concentraciones estimula su crecimiento y producción de carotenoides posiblemente por la presencia de componentes en *C. sativa* promotores de estos parámetros de cultivo en *Dunaliella salina*.

**Palabras claves:** *Dunaliella salina*, *Cannabis sativa*, carotenogénesis, cultivo, crecimiento.

**GB 49. IDENTIFICACIÓN MOLECULAR DE RESISTENCIA ASOCIADA A PEPTIDOS ANTIMICROBIANOS EN TOMATE (*Solanum lycopersicum*).**

Adriana Carolina Rojas Arias<sup>1</sup> & Humberto Miguel Zamora Espitia<sup>2</sup>. <sup>1</sup> Estudiante-investigador. <sup>2</sup> Líder. Grupo de Bioquímica fitopatológica y Evolución molecular, Departamento de Química, Universidad Nacional de Colombia Bogotá D.C.

El tomate (*Solanum lycopersicum*) es un cultivo de vital importancia en la dieta mundial gracias a su

gran riqueza nutritiva, ya que es fuente de vitaminas, minerales, proteínas, hidratos de carbono, fibra, ácido fólico, ácido tartárico, ácido succínico y ácido salicílico. Este cultivo es altamente generador de empleo. En nuestro país se calcula que una hectárea requiere alrededor de 160 jornales por ciclo de producción, lo cual representa alrededor de 2.309.440 jornales.

*Phytophthora infestans* es el agente causal de la enfermedad de tizón tardío, que causa pérdidas considerables en el cultivo de tomate. Hoy en día, las pérdidas anuales y los costos en fungicidas suman un total de 4 billones de dólares en todo el mundo. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) son componentes de la inmunidad innata de las plantas y se encuentran ampliamente distribuidos en la naturaleza, con similitud en su estructura terciaria, propiedades antifúngicas y antibacteriales y excelentes candidatos para la transformación de plantas con el fin de generar resistencia a patógenos. En esta iniciativa se identificó un gen tipo AMP, a partir de una variedad de *S. lycopersicum* colombiana resistente a la infección por *P. infestans*, por medio de la inoculación del vegetal con una suspensión de zoosporas del hongo y posterior extracción de RNA mensajero a partir del cual se aplicó la RT-PCR utilizando primers diseñados sobre la región activa del péptido. El hallazgo se presenta como una opción para el control del tizón tardío en nuestro país.

**Palabras claves:** *Solanum lycopersicum*, péptido antimicrobiano, *Phytophthora infestans*, RT-PCR.

**GB50. EVALUACIÓN DE LA PATOGENICIDAD Y VIRULENCIA DE *Beauveria bassiana* EN EL COMPLEJO *Cosmopolites-Metamasius* (COLEOPTERA: DRYOPHTHORIDAE: RHYNCHOPHORINAE) EN LABORATORIO.**

José Rubén Muñoz<sup>1</sup>, Diego Fernando Marmolejo<sup>2</sup>, Nancy Cardozo<sup>3</sup>, Ana Milena Caicedo<sup>4</sup> & Jaime Eduardo Muñoz<sup>5</sup>.

<sup>1</sup> Estudiante Ingeniería Agronómica, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira,

<sup>2</sup> Estudiante Maestría en Ciencias Agrarias énfasis Fitomejoramiento, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, <sup>3</sup> Tecnólogo, Bioecológicos, <sup>4</sup> Candidata a Ph.D Ciencias Biológicas, Universidad del Valle, <sup>5</sup> Profesor Asociado Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira.

El complejo de picudos *Cosmopolites-Metamasius*, afecta cultivos de plátano y banano al disminuir el tamaño, calidad del racimo y vida útil de las

**XLIV**  
Congreso Nacional  
*de Ciencias  
Biológicas*



Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas (ACCB)  
Universidad del Cauca

CERTIFICA QUE:

**Adriana Carolina Rojas Arias**

C.C. 1032360429

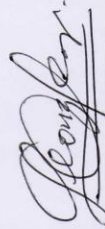
Participó en calidad de:

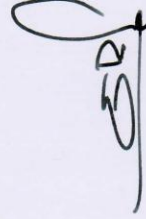
**Ponente**

en el XLIV Congreso Nacional de Ciencias Biológicas.

Realizado en Popayán del 6 al 10 de Octubre

  
LEONARDO LAREO  
Presidente JDN-ACCB

  
LEONIDAS ZAMBRANO POLANCO  
Presidente Capítulo Popayán ACCB



EDUARDO ROJAS PINEDA.  
Vicerrector de Investigaciones  
Universidad del Cauca



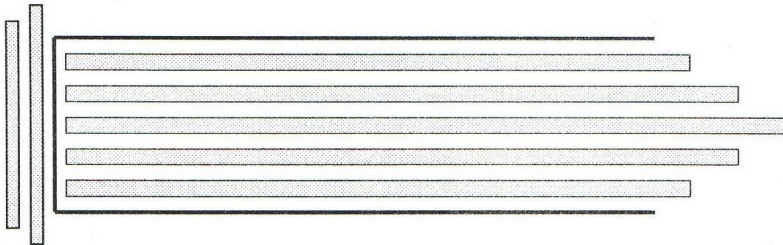
**ESCUELA SUPERIOR POLITÉCNICA DE  
CHIMBORAZO  
FACULTAD DE CIENCIAS  
ESCUELA DE BIOQUÍMICA Y FARMACIA**

Confieren el presente

Certificado

**A: Adriana Carolina Rojas**

Por haber participado en calidad de Expositor del Curso "Manejo de enfermedades del tomate *Lycopersicon esculentum*" mediante el uso de defensinas", realizado en Riobamba entre los días 24 de noviembre al 1 de diciembre.



*[Signature]*  
Dr. Zabala Caluña  
DECANO FACULTAD  
CIENCIAS

Riobamba, diciembre 1, 2008



*[Signature]*  
Dr. Carlos Deroso F.  
DIRECTOR ESCUELA  
BIOQUÍMICA Y FARMACIA