



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA

# **IDENTIFICACIÓN DE UN PÉPTIDO ANTIMICROBIANO A PARTIR DE MANZANILLA ROMANA**

**Diana Daniela Portela Dussán**

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad de Ciencias, Instituto de Biotecnología  
Bogotá D.C., Colombia

2016



# **IDENTIFICACIÓN DE PÉPTIDO ANTIMICROBIANO A PARTIR DE MANZANILLA ROMANA**

**Diana Daniela Portela Dussán**

Tesis o trabajo de investigación presentada(o) como requisito parcial para optar al título  
de:

**Magister en Ciencias-Microbiología**

Director (a):

Ph.D., Silvio Alejandro López Pazos director(a)  
Facultad de Ciencias Universidad Antonio Nariño

Codirector (a):

Ph.D., Alejandro Chaparro Giraldo  
Departamento de Biología  
Universidad Nacional de Colombia

Universidad Nacional de Colombia  
Facultad Ciencias, Instituto de Biotecnología  
Bogotá D.C., Colombia

2016



*A Dios por ser mi mentor que guía cada paso de mi existencia; a mi padre que desde el cielo me cuida y no me desampara; A mi mamá por todo el amor, paciencia, esfuerzo, dedicación y apoyo y a mis hermanas por el amor y apoyo incondicional que me han brindado.*



## **Agradecimientos**

Mis más sinceros agradecimientos a la Universidad Nacional de Colombia y a la Maestría en Ciencias – Microbiología por la formación recibida.

Al doctor Silvio Alejandro López Pazos docente de la facultad de Ciencias de la Universidad Antonio Nariño por brindarme la oportunidad de realizar este proyecto bajo su orientación, agradezco su paciencia, constancia, enseñanza, apoyo, orientación y acompañamiento durante todo el proceso investigativo.

Al doctor Alejandro Chaparro Giraldo director del grupo de investigación Ingeniería Genética de Plantas por la confianza otorgada para la realización del proyecto en su grupo de investigación, así mismo por su apoyo, enseñanzas y orientación.

Al doctor Juan Daniel Valderrama Rincón docente de la facultad de Ingeniería Ambiental y Civil de la Universidad Antonio Nariño, por su colaboración, enseñanzas y orientación durante este proceso.

A mis compañeras y amigas Elizabeth Méndez y Luz Adriana Pedraza por sus consejos y apoyo incondicional

A Jessica Liliana Palacio por sus aportes y acompañamiento en este proyecto.

A Socorro Prieto por su inmensa colaboración durante mi proceso de formación.

A mis compañeros del grupo Ingeniería Genética de Plantas Ivan Dario Barbosa Cepeda, Diana Constanza Gomez Gutierrez, Lizeth Yazmin Tabima, Jenny Jimenez y Adriana Carolina Rojas por su colaboración, consejos y amabilidad



## Resumen

La manzanilla romana (*Chamaemelum nobile*), es una de las plantas medicinales más usadas por la presencia de flavonoides, sesquiterpenos y azulenos en sus tejidos, que le confieren propiedades antiinflamatorias, anticancerígenas y antimicrobianas. La capacidad inhibitoria de fitopatógenos de la manzanilla romana aumenta la posibilidad de identificar genes asociados con resistencia a enfermedades en plantas. Los péptidos antimicrobianos (AMPs) actúan en la inmunidad innata de plantas aumentando su presencia en tejidos susceptibles a la invasión de fitopatógenos. El objetivo de este trabajo fue identificar un posible gen relacionado a un péptido antimicrobiano a partir de *Chamaemelum nobile*. Se realizaron reacciones de PCR sobre ADN genómico para la identificación de genes AMPs, y se usó herramientas de Bioinformática para su caracterización bioquímica, como predicción de la secuencia de aminoácidos, punto isoelectrico, índice alifático, hidropaticidad y modelamiento teórico de la estructura tridimensional. Luego se procedió a estandarizar el método de clonación por recombinación homóloga en levadura para AMPs, y se llevaron a cabo pruebas de sensibilidad sobre el fitopatógeno *Rhizoctonia solani*. Finalmente, se caracterizaron cepas para transformación genética de plantas. Se realizó la identificación de un gen AMP denominado Proteína de Transferencia de Lípidos (LTP), que posee 94 aminoácidos, a partir de material genético de *C. nobile*. La secuencia de aminoácidos putativa identificada en *C. nobile* fue caracterizada *in silico* con herramientas bioinformáticas en donde se evidenció que esta secuencia de aminoácidos es similar a la familia de Proteínas de Transferencia de Lípidos tipo 1 destacadas por presentar actividad antimicrobiana sobre fitopatógenos. Posteriormente, se evaluó el método de clonación por recombinación homóloga en levadura, y se encontró que su eficacia depende del nivel de homología vector-genoma de levadura. Adicionalmente se determinó la actividad inhibitoria de fluido apoplástico de *C. nobile* a 1 µg/mL sobre *R. solani*. Por último, se realizó la caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* que pueden ser útiles en transformación genética de plantas de interés industrial. Este estudio aporta en la

descripción de un nuevo miembro de la familia de LTPs en plantas de la familia Asteraceae.

**Palabras clave:** *Chamaemelum nobile*; péptidos antimicrobianos; proteínas de transferencia de lípidos; recombinación homóloga en levadura; *Rhizoctonia solani*; *Agrobacterium tumefaciens*

## Abstract

Roman chamomile (*Chamaemelum nobile*) is one of the medicinal plants most used for the presence of flavonoids, sesquiterpenes and azulenes in their tissues, which give it anti-inflammatory, anticancer and antimicrobial properties. The phytopathogenic inhibitory capacity of Roman chamomile increases the possibility of identifying genes associated with disease resistance in plants. Antimicrobial peptides (AMPs) act on the innate immunity of plants by increasing their presence in tissues susceptible to phytopathogen invasion. The objective of this work was to identify a possible gene related to an antimicrobial peptide from *Chamaemelum nobile*. PCR reactions were performed on genomic DNA for identification of AMP genes, and Bioinformatics tools were used for biochemical characterization, such as amino acid sequence prediction, isoelectric point, aliphatic index, hydrophobicity and theoretical modeling of the three-dimensional structure. Then the homologous recombination cloning method in yeast for AMPs was standardized, and sensitivity tests were performed on the phytopathogen *Rhizoctonia solani*. Finally, strains for genetic transformation of plants were characterized. Identification of an AMP gene called Lipid Transfer Protein (LTP), which has 94 amino acids, was made from genetic material of *C. nobile*. The putative amino acid sequence identified in *C. nobile* was characterized in silico with bioinformatic tools where it was shown that this amino acid sequence is similar to the family of Type 1 Lipid Transfer Proteins highlighted by their antimicrobial activity on phytopathogens. Subsequently, the cloning method was evaluated by homologous recombination in yeast, and it was found that its efficacy depends on the level of yeast vector-genome homology. In addition, the apoplastic fluid inhibitory activity of *C. nobile* at 1 µg / mL was determined on *R. solani*. Finally, the phenotypic and molecular characterization of *Agrobacterium tumefaciens* strains that may be useful in the genetic transformation of plants of industrial interest was carried out. This study contributes in the description of a new member of the family of LTPs in plants of the family Asteraceae.

**Keywords:** *Chamaemelum nobile*; antimicrobial peptides; lipid transfer proteins; homologous recombination in yeast; *Rhizoctonia solani*; *Agrobacterium tumefaciens*



# Contenido

|   | Pág.      |
|---|-----------|
| Resumen .....   | IX        |
| Lista de figuras.....   | XV        |
| Lista de tablas .....   | XVI       |
| Lista de Símbolos y abreviaturas.....   | XVII      |
| Introducción .....  | 1         |
| <b>1 MARCO TEÓRICO .....</b>  | <b>3</b>  |
| 1.1 Manzanilla romana .....   | 3         |
| 1.1.1 Péptidos antimicrobianos .....  | 4         |
| 1.1.2 Mecanismo de acción de los AMPs.....  | 6         |
| 1.2 Familias de AMPs.....   | 9         |
| 1.2.1 Heveínas.....   | 9         |
| 1.2.2 Defensinas .....  | 10        |
| 1.2.3 Tioninas .....  | 11        |
| 1.2.4 Snakin.....   | 12        |
| 1.2.5 Proteínas de transferencia de lípidos .....   | 13        |
| 1.3 Recombinación homóloga .....  | 15        |
| 1.4 <i>Rhizoctonia solani</i> .....   | 19        |
| 1.5 Biotecnología vegetal .....   | 20        |
| <b>2 OBJETIVOS.....</b>   | <b>25</b> |
| 2.1 Objetivo general.....   | 25        |
| 2.2 Objetivos específicos .....   | 25        |
| <b>3 METODOLOGÍA .....</b>  | <b>26</b> |
| 3.1 Material vegetal .....  | 26        |
| 3.2 Extracción de ADN, reacción en cadena de polimerasa (PCR) y<br>secuenciación .....                    | 26        |
| 3.3 Caracterización <i>in silico</i> .....  | 27        |
| 3.4 Recombinación homóloga .....  | 29        |
| 3.5 Prueba de sensibilidad de <i>R. solani</i> .....  | 31        |
| 3.6 Caracterización fenotípica y molecular de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....                      | 32        |
| <b>4 RESULTADOS Y DISCUSION.....</b>  | <b>37</b> |
| 4.1 Identificación de una secuencia de ADN codificante de un LTP desde<br><i>Chamaemelum nobile</i> ..... | 38        |

|           |  |           |
|-----------|--|-----------|
| 4.2       | Caracterización <i>in silico</i> de una secuencia de ADN codificante de un LTP en <i>Chamaemelum nobile</i> .....    | 40        |
| 4.3       | Estandarización de la clonación por recombinación homóloga, usando un LTP de <i>Chamaemelum nobile</i> .....         | 49        |
| 4.4       | Evaluación biológica de péptidos en el fluido apoplástico de manzanilla romana sobre <i>Rhizoctonia solani</i> ..... | 55        |
| 4.5       | Caracterización fenotípica y molecular de cepas de <i>Agrobacterium tumefaciens</i> .....                            | 58        |
| <b>5</b>  | <b>Conclusiones y recomendaciones</b> .....  | <b>63</b> |
| 5.1       | Conclusiones.....  | 63        |
| 5.2       | Recomendaciones.....   | 64        |
| <b>A.</b> | <b>Anexo 1: Curva de calibración de proteínas</b> .....  | <b>65</b> |
| <b>B.</b> | <b>Anexo 2: Productos</b> .....  | <b>66</b> |
|           | <b>Bibliografía</b> .....  | <b>73</b> |

## Lista de figuras

|  | Pág. |
|--|------|
| <b>Figura 1.</b> Modelos propuestos mecanismo de acción AMPs .....   | 8    |
| <b>Figura 2.</b> Diagrama de recombinación homóloga.....   | 17   |
| <b>Figura 3.</b> Propagación in vitro de <i>C. nobile</i> .....  | 38   |
| <b>Figura 4.</b> Amplificación de AMPs a partir de ADN genómica de <i>C. nobile</i> .....  | 39   |
| <b>Figura 5.</b> Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del LTP de <i>C. nobile</i> identificada....   | 40   |
| <b>Figura 6.</b> Comparación del LTP de <i>C. nobile</i> (recuadro rojo) con LTPs en diferentes especies de plantas.....   | 41   |
| <b>Figura 7.</b> Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LTPs de manzanilla germánica y <i>C. nobile</i> . Los recuadros rojos indican los residuos de cisteína conservados. .... | 42   |
| <b>Figura 8.</b> Estructura teórica de la proteína 3D de LTP de <i>C. nobile</i> . ....  | 45   |
| <b>Figura 9.</b> Estructura de la distribución de residuos de aminoácidos del LTP de <i>C. nobile</i> .....  | 46   |
| <b>Figura 10.</b> Comparación entre estructuras 3D del LTP de <i>C. nobile</i> y los modelos 3D de Ace-AMP de cebolla y Lc-LTP2 de lenteja.....  | 47   |
| <b>Figura 11.</b> Evaluación de la calidad de la estructura 3D de LTP de <i>C. nobile</i> . ....   | 48   |
| <b>Figura 12.</b> Proceso de recombinación homóloga en <i>S. cerevisiae</i> (FY834). ....  | 50   |
| <b>Figura 13.</b> Amplificación LTP de <i>C. nobile</i> . ....   | 51   |
| <b>Figura 14.</b> Resultado de la transformación del gen LTP de <i>C. nobile</i> en <i>S. cerevisiae</i> ...   | 52   |
| <b>Figura 15.</b> Amplificación del LTP de <i>C. nobile</i> a partir de ADN plasmídico de <i>S. cerevisiae</i> .....   | 52   |
| <b>Figura 16.</b> Secuencia de ADN obtenida del proceso de clonación mediante recombinación homóloga en levadura usando el vector pMW07. ....  | 53   |
| <b>Figura 17.</b> Resultados del análisis de BLASTn con el oligonucleótido reverso.....  | 54   |
| <b>Figura 18.</b> Perfil electroforético SDS PAGE Tricina.....   | 56   |
| <b>Figura 19.</b> Ensayo de antagonismo de extracto del fluido apoplástico de <i>C. nobile</i> sobre <i>R. solani</i> .....  | 57   |
| <b>Figura 20.</b> Caracterización molecular de las cepas C58, EHA101 y LBA4404 (portadora del vector pCambia 2301) de <i>A. tumefaciens</i> .. ....                                    | 60   |
| <b>Figura 21.</b> Caracterización molecular de las cepas C58, EHA105 de <i>A. tumefaciens</i> . Carril M: Marcador de 1 Kb (Invitrogen TM).....  | 60   |

## Lista de tablas

**Pág.**

|  |    |
|--|----|
| <b>Tabla 1</b> Principales componentes presentes en los tejidos de la Manzanilla romana.....                               | 3  |
| <b>Tabla 2</b> Principales propiedades de las familias PRs. Modificado de Sels et al, 2008.....                            | 5  |
| <b>Tabla 3</b> Grupos Anastomosis de <i>R. solani</i> y enfermedades causadas en plantas. Tomado de Sneh et al., 1991..... | 19 |
| <b>Tabla 4</b> Oligonucleótidos empleados para identificar AMPs en manzanilla romana.....                                  | 27 |
| <b>Tabla 5</b> Características de los oligonucleótidos para la recombinación homóloga .....                                | 29 |
| <b>Tabla 6</b> Secuencias de oligonucleótidos de <i>A. tumefaciens</i> (Deeba et al., 2014).....                           | 34 |
| <b>Tabla 7</b> Susceptibilidad a antibióticos de cepas de <i>A. tumefaciens</i> .....                                      | 59 |

# Lista de Símbolos y abreviaturas

## Abreviaturas

| <b>Abreviatura</b> | <b>Término</b>                                   |
|--------------------|--|
| Å                  | Amstrong   |
| AMP                | Péptido antimicrobiano (Antimicrobial Peptide)   |
| ETI                | Inmunidad mediada por efectores                  |
| IC50               | Concentración inhibitoria 50                     |
| kDa                | Kilodaltons                                      |
| LC50               | concentración letal 50                           |
| LTP                | Proteína de transferencia de lípidos             |
| mL                 | mililitros                                       |
| MIC                | Concentración mínima inhibitoria                 |
| NB-LRR             | Nucleótidos ricos en leucinas                    |
| mM                 | Micromolar                                       |
| ng                 | nanogramos                                       |
| PAMPS              | Patrones moleculares asociados a microorganismos |
| Pb                 | Pares de bases                                   |
| PR                 | relacionado con patogénesis                      |
| µg                 | Microgramos                                      |
| µL                 | Microlitros                                      |
| µM                 | Micromolar                                       |
| u                  | Unidades   |



# Introducción

Las propiedades antimicrobianas que poseen algunas plantas han popularizado su uso, tomando cada vez mayor fuerza el estudio de componentes presentes en sus tejidos, con el fin de desarrollar nuevos productos de interés humano. Una de estas plantas es la manzanilla romana (*Chamaemelum nobile*), una hierba perenne, aromática, caracterizada por presentar compuestos aromáticos con actividades antiinflamatorias o antimicrobianas. El potencial antimicrobiano es una de las propiedades más destacada de esta planta, los aceites extraídos de sus tejidos han presentado actividad biológica sobre patógenos como *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *Cándida albicans* o *Penicillium sp.* (Dezfoil *et al.*, 2012; Kazemian *et al.*, 2015; Ghaedi *et al.*, 2015)

La capacidad que presentan las plantas para inhibir el crecimiento de agentes patógenos presentes en algunas especies de plantas pueden estar relacionadas con la capacidad de desarrollar estrategias de defensa efectivas contra los mecanismos de invasión de fitopatógenos, a través de la inducción de moléculas endógenas como los péptidos antimicrobianos (AMPs), caracterizados por expresarse de forma constitutiva o inducible principalmente en tejidos susceptibles a la invasión de fitopatógenos como primordios foliares, estomas y epidermis (Marlow *et al.*, 2009; Maróti *et al.*, 2011 ). Los AMPs pertenecen a la familia de proteínas relacionadas con la patogénesis (PR), clasificados de acuerdo a su conformación estructural (alfa hélices, láminas beta antiparalelas) y carga aniónica o catiónica (Ganz y Lehrer, 1999; Dobson *et al.*, 2013; Nawrot *et al.*, 2014). Aunque la actividad biológica de los AMPs aún no es clara, se ha evidenciado que interactúan con la membrana citoplasmática de los microorganismos a través de las cabezas hidrofílicas de fosfolípidos de la membrana citoplasmática, que desestabiliza la membrana con el fin de generar la lisis celular (Thomma *et al.*, 2002). Estos compuestos biológicos poseen una amplia diversidad en cuanto a su actividad biológica. Hacen parte de este grupo tioninas, proteínas de transferencia de lípidos (LTP), heveínas, knottin, ciclótidos y defensinas entre otros (Sels *et al.*, 2008).

Dentro de los péptidos antimicrobianos más estudiados y evaluados sobre fitopatógenos se encuentran las LTPs tipo 1 caracterizados por presentar un tamaño de 9-10 kDa, contienen un péptido señal que puede tener una longitud promedio de 21-35 aminoácidos y un péptido maduro que puede tener una longitud promedio de 35–74 aminoácidos. Los LTPs participan en la formación de la cutícula, modulación del crecimiento, desarrollo de las plantas, la inducción de la señalización de defensa contra patógenos transferencia de lípidos entre fracciones microsomales y mitocondrias. Además, por su capacidad de interactuar con lípidos es capaz de inhibir el crecimiento de bacterias y de hongos (Yeast, 2008). La actividad antimicrobiana de los AMPs, aislados de diferentes estructuras vegetales en diversas especies monocotiledóneas y dicotiledóneas, demuestran que estos péptidos endógenos representan una alternativa para el control biológico en cultivos comerciales (Zhao *et al.*, 2011; Weerden *et al.*, 2008; Asano *et al.*, 2013; Gizatullina *et al.*, 2013).

Aunque la manzanilla romana ha sido popularizada por las propiedades medicinales presentes en los extractos de sus tejidos, principalmente por el potencial antimicrobiano en bacterias patógenas de humanos, la evidencia que determina su actividad antimicrobiana sobre fitopatógenos, aumenta la probabilidad de identificar en sus tejidos genes asociados a AMPs similares a los presentes en otras especies de plantas. En este sentido, el presente trabajo busca identificar un posible gen relacionada a un AMP y realizar la caracterización bioquímica de la correspondiente secuencia de aminoácidos y la aproximación a su clonación por recombinación homóloga en levadura, con perspectivas en control de fitopatógenos y desarrollo de cultivos transgénicos.

# 1 MARCO TEÓRICO.

## 1.1 Manzanilla romana

La manzanilla romana *Chamaemelum nobile* (L.), pertenece a la familia Asteraceae, es una hierba perenne aromática con un tallo ramificado y alargado de 20 a 30 cm de largo, el cual soporta una cabezuela amarilla formada por hojas blancas tipo lígulas segmentadas de 2,5 cm de diámetro con foliolos lineares. Esta planta es originaria del Reino Unido, migró hacia Roma en el siglo XVI, y actualmente se cultiva en la zona mediterránea, norte de África, Estados Unidos, Argentina, Brasil, Venezuela y Colombia entre otros. Crece en zonas templadas con suelos no áridos y ácidos. Contiene entre 0,24 a 1,9% de aceites volátiles, y aproximadamente 120 metabolitos secundarios incluyendo 28 terpenoides y 36 flavonoides. Los flavonoides (quercetina, luteolina, apigenina, patuletina), alfa- bisabolol y bisabolol oxidos A y B, azulenos (camazuleno), monoterpenos (alfa-pineno), sesquiterpenos (farneseno), cumarinas (herniarina y umbeliferona) le confieren propiedades terapéuticas, por lo cual es una de las hierbas medicinales más empleadas a nivel mundial (Tabla1) (Srivastava *et al.*, 2010; Sharafzadeh *et al.*, 2011).

**Tabla 1** Principales componentes presentes en los tejidos de la Manzanilla romana.

| Compuestos            |  | Concentración |
|-----------------------|--|---------------|
| Flavonoides           | Heterosidos de la apigenina<br>Luteolina | 0,5 %         |
| Tocoferol             | $\alpha$ -tocoferol                      | 1,64 g/100g   |
|                       | $\gamma$ -tocoferol                      | 0,19 g/100g   |
| Pigmentos             | $\beta$ -caroteno                        | 0,95mg/100g   |
|                       | Licopeno                                 | 0,02mg/100g   |
| Ácidos orgánicos      | Oxálico                                  | 2,02 g/100g   |
|                       | Málico                                   | 3,02 g/100g   |
|                       | Cítrico                                  | 1,33 g/100g   |
|                       | Fumárico                                 | 0,02g/100g    |
| Componentes orgánicos | Isobutilisobutanoato                     | 4,4%          |
|                       | Metil-butilisobutanoato                  | 4,3 %         |

|                |                        |        |
|----------------|------------------------|--------|
|                | Isobutilangelato       | 24,5 % |
|                | 2 –butenilangelato     | 7,3%   |
|                | 2-metil-butil angelato | 17,4%  |
|                | Trans- pinocarveol     | 4,5%   |
|                | Isoamilangelato        | 7,6%   |
|                | Estragol               | 5,0 %  |
| Sesquiterpenos | $\alpha$ -Bisabolol    | 29,9%  |
|                | A Bisabolol – óxidos   | 21,6%  |
|                | B Bisabolol- óxidos    | 1,2%   |
|                | B- farneseno           | 3,1%   |
| Monoterpenos   | $\beta$ - felandreno   | 0,8%   |
|                | Limoneno               | 0,8%   |
|                | $\beta$ -ocimeno       | 0,4%   |
|                | $\gamma$ - terpinenol  | 0,2%   |
| Azulenos       | Camazuleno             | 19,9%  |

Se estima que la producción mundial de manzanilla es de 1000 tons en la agricultura a gran escala; cerca de 800 kg de tallo floral/ha se emplean para producir 0,8-1,5% de aceites esenciales (Dezfoil *et al.*, 2012). Se puede obtener compuestos fenólicos y alcanos a partir de semilla, fruto, o raíces. La manzanilla romana es antiinflamatoria, espasmolítica, sedante, antioxidante, anticoagulante, antihiperlipidémica, antitumoral, repelente y antimicrobiana (Srivastava *et al.*, 2010). Los aceites extraídos de flores secas han presentado actividad sobre cepas de bacterias ATCC patógenas de humanos como *Staphylococcus aureus* (extractos activos a concentración de 0,1 mg/ml), *Escherichia coli* (extractos activos a concentración de 0,1 mg/mL) y *Bacillus subtilis* (extractos activos a concentración de 0,05 mg/mL), cepas de *Pseudomonas aeruginosa* aisladas en pacientes con distintos procesos infecciosos (concentración inhibitoria mínima de 12,5 y 25 mg/mL), *P. tolaasii* aislada en centros de producción de setas (extractos activos a concentración de 300 mg/mL), sobre cepas ATCC de levaduras como *Cándida albicans* (extractos activos a concentración de 0,1 mg/mL) y hongos miceliales patógenos de humanos, como *Aspergillus candidus*, y fitopatógenos como *Penicillium sp.*, *Fusarium culmorum* y *A. niger*, con una concentración mínima inhibitoria de 900 mg/mL (Saderi *et al.*, 2005; Dezfoil *et al.*, 2012; Kazemian *et al.*, 2015; Ghaedi *et al.*, 2015).

### 1.1.1 Péptidos antimicrobianos

El término de proteínas relacionadas con patogénesis (PR) en plantas hace alusión a aquellas que pueden detectarse a nivel basal en tejidos sanos, pero que aumentan su presencia bajo el ataque de patógenos. Los PRs hacen parte de los mecanismos inducibles

químicos de resistencia de las plantas junto con las especies reactivas de oxígeno, acumulación de fitoalexinas y taninos. La activación de estos mecanismos inducibles se inicia después de una fase de interacción planta-patógeno a partir del reconocimiento de patrones moleculares asociados a microorganismos (PAMPs) por medio de receptores de reconocimiento de estos patrones (PRR) presentes en la superficie de la membrana de las células vegetales denominada inmunidad mediada por PAMPs (PTI) o a partir del reconocimiento de elicitores, a través de dominios de unión a nucleótidos ricos en leucinas (NB-LRR) de la planta, estrategia conocida como inmunidad mediada por efectores (ETI) (Jones y Dangl, 2006, Zipfel *et al.*, 2010). La concentración de PRs aumenta con la transducción de señales químicas como el ácido salicílico, etileno y ácido jasmónico durante la primera etapa de activación de los mecanismos de defensa (Johnson *et al.*, 2005; Boyd *et al.*, 2013).

La clasificación de las PR se basa en serología, análisis de secuencia de aminoácidos, punto isoeléctrico y peso molecular. Se han identificado 17 grupos (Tabla 2), que presentan peso variable (5-75 kDa), sin embargo algunas de estos péptidos no se les conoce su actividad antimicrobiana *in vitro* (Sels *et al.*, 2008).

**Tabla 2** Principales propiedades de las familias PRs. Modificado de Sels *et al.*, 2008

| Familia | Peso (kDa) | Propiedades                          | Estructura microbiana |
|---------|------------|--------------------------------------|-----------------------|
| PR-1    | 15         | Antifungal                           | Desconocido           |
| PR-2    | 30         | B-1-3 gluconasa                      | B 1-3 glucano         |
| PR-3    | 25-30      | Quitinasa (I-VI)                     | Quitina               |
| PR-4    | 15-20      | Quitinasa (I,II)                     | Quitina               |
| PR-5    | 25         | Taumatina                            | Membrana              |
| PR-6    | 8          | Inhibidor proteinasa                 |                       |
| PR-7    | 75         | Endoproteinasa                       |                       |
| PR-8    | 28         | Quitinasa III                        | Quitina               |
| PR-9    | 35         | Peroxidasa                           |                       |
| PR-10   | 17         | Ribonucleasa                         |                       |
| PR-11   | 40         | Quitinasa clase I                    | Quitina               |
| PR-12   | 5          | Defensina                            | Membrana              |
| PR-13   | 5          | Tionina                              | Membrana              |
| PR-14   | 9          | Proteína de transferencia de lípidos | Membrana              |
| PR-15   | 20         | Oxalato oxidasa                      | Desconocido           |
| PR-16   | 20         | Oxalato oxidasa- like                | Desconocido           |
| PR-17   | 27         | Desconocido                          | Desconocido           |

Las PRs que presentan pesos menores a 10 kDa, y poseen actividad antimicrobiana *in vitro*, se conocen como péptidos antimicrobianos (AMPs, del inglés Antimicrobial peptides) (Thevissen *et al.*, 2003; Sels *et al.*, 2008). Los AMPs son péptidos endógenos, producidos por microorganismos, animales y plantas como mecanismo de defensa frente al ataque de un patógeno, y es una estrategia evolutivamente conservada. Estos AMPs hacen parte de la inmunidad innata, actuando en la primera línea de defensa en plantas contra fitopatógenos (Hassan *et al.*, 2012; Tam *et al.*, 2015). En el caso de los organismos procariontes se relaciona con procesos de competitividad para establecerse en un nicho ecológico (Hassan *et al.*, 2012). Los AMPs están conformados por menos de 200 aminoácidos, y se expresan de manera constitutiva e inducible en tejidos susceptibles al ataque de un patógeno en primordios foliares, estomas y epidermis (Marlow *et al.*, 2009; Maróti *et al.*, 2011), como se ha evidenciado en algunas plantas como *Nicotiana megalosiphon*, que después de la inoculación con *Peronospora hyoscyami .sp. tabacina* sobreexpresó en hojas un gen codificante de defensina, o en coliflor (*Brassica oleracea*) inoculada con *Xanthomonas campestris pv. campestris*, la cual expresa en tallo y hoja genes codificantes de defensinas y otros AMPs, y se observó que en pimiento inoculado con *X. campestris pv. vesicatoria*, específicamente en sus hojas, se transcribe un gen codificante de la denominada AMP de *Capsicum annun* (CaAMP1) (Lee *et al.*, 2008; Portieles *et al.*, 2010; Jiang *et al.*, 2011).

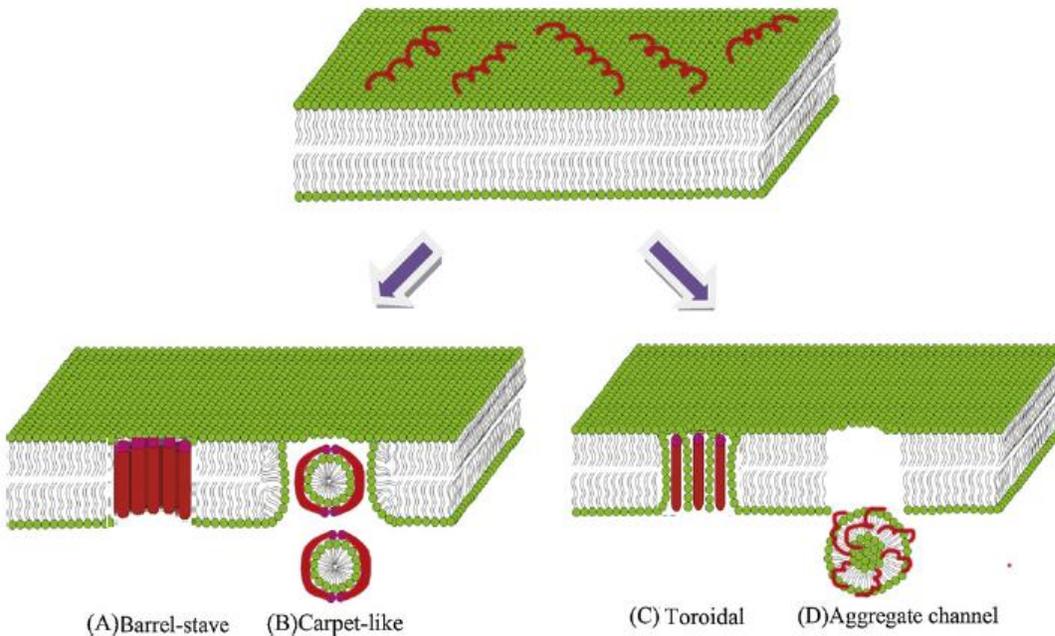
### 1.1.2 Mecanismo de acción de los AMPs

Se ha evidenciado que AMPs catiónicos interactúan con la membrana citoplasmática de microorganismos fitopatógenos, a través de grupos aniónicos presentes en la bicapa fosfolipídica, produciendo la permeabilización de la membrana microbiana, a través de la formación de poros o desorganización de la bicapa lipídica formando micelas, que permiten salida de iones al espacio extracelular, generando una descompensación osmótica, lisis celular y muerte del microorganismo (Thomma *et al.*, 2002). La permeabilización que sufre la membrana citoplasmática al interactuar con los AMPs no es clara, sin embargo se han descrito cuatro posibles mecanismos:

- Modelo de “barril-bastón”, consiste en hélices peptídicas que forman un haz en la membrana con un lumen central, donde las regiones hidrofóbicas del péptido interactúan con la región central hidrofílica de la bicapa, y la región hidrofílica del

péptido forma la región interior del poro y finalmente la formación de los poros transmembranales se da por agregación de péptidos (Figura 1A) (Yan *et al.*, 2001).

- Modelo “tapete”, donde los péptidos se acumulan en la superficie de la bicapa lipídica, e interactúan con las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos en varias partes de la superficie cubriendo la membrana como un tapete, y cuando los péptidos logran acumularse ocasionan una desorganización de la bicapa lipídica formando micelas que finalmente la desintegran (Figura 1B) (Pouny *et al.*, 1992; Brogden *et al.*, 2005; Y Lie *et al.*, 2012).
- Modelo del “toroide” donde el AMP se inserta a la membrana formando un poro, e induciendo el doblamiento continuo de la monocapa lipídica a través del poro lo cual hace que la superficie hidrofóbica de la membrana se oriente hacia el exterior y la superficie hidrofílica se oriente hacia el interior formando un canal acuoso causando una pérdida de polaridad de la membrana citoplasmática (Figura 1C) (Matsuzaki *et al.*, 1996; Brogden *et al.*, 2005).
- Modelo de “canal agregado” donde los AMPs causan un desplazamiento competitivo de cationes divalentes de calcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ) y magnesio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) ocasionando una desestabilización de la membrana donde se forman agregados de péptidos que finalmente producen canales iónicos en la membrana citoplasmática (Figura 1D) (Brogden *et al.*, 2005; Li *et al.*, 2012).



**Figura 1.** Modelos propuestos mecanismo de acción AMPs. A. Barril-bastón, los péptidos agregados se insertan en el núcleo hidrofóbico de la membrana formando un poro. B. modelo tapete, los péptidos rodean la membrana como un tapete causando una desorganización de la membrana formando micelas. C. poro toroidal, los péptidos se agregan, formando un poro en la membrana y doblan la monocapa lipídica a través del poro formando un canal acuoso. D. canal agregado, los péptidos se insertan en la membrana agrupándose en agregados que atraviesan la membrana. (Modificado de Li *et al.*, 2012)

La interacción electrostática de AMPs con fosfolípidos de membrana es fundamental para causar la muerte del patógeno. Fosfolípidos hidroxilados como fosfatidilglicerol, cardiolipina y fosfatidilserina (que presentan carga negativa y abundan en la membrana de patógenos) permiten una interacción electrostática estable con AMPs catiónicos, mientras que lípidos como esfingolípidos, fosfatidilcolina y esteroides (como el ergosterol, que es abundante en hongos) presentan una carga neutra que dificulta la interacción de AMPs con la membrana, sin embargo se ha evidenciado que los AMPs son altamente efectivos sobre hongos, por lo que la interacción electrostática con la bicapa lipídica no sería la única forma de inhibir el crecimiento de microorganismos, por ejemplo, se ha evidenciado que algunas defensinas tienen la capacidad de unirse a receptores de la pared y membrana citoplasmática de hongos como glicosfingolípidos (fosforil-inositol y glucocilceramidas)

(Van der Weerden *et al.*, 2013; Sagaram *et al.*, 2013). La glucocilceramida es abundante en hongos patógenos y se ha demostrado que es un componente importante de la virulencia de *C. albicans*, al interactuar una defensina con este esfingolípido se induce la muerte celular programada de la levadura debido a la internalización de esta defensina en la célula fúngica, interactuando con receptores intracelulares o por inducción de señales para aumentar la acumulación intracelular de especies reactivas de oxígeno (ROS) que inducen apoptosis (Aerts *et al.*, 2006; Aerts *et al.*, 2011; Vriens *et al.*, 2014).

Los AMPs aniónicos interactúan con la membrana citoplasmática de patógenos a través de fuerzas electrostáticas, entre residuos polares del péptido y las cabezas hidrofílicas de los fosfolípidos de la membrana. En péptidos aniónicos, como los ciclótidos, se ha evidenciado que la interacción se da con fosfatidiletanolamina por medio de un reconocimiento de la estructura quiral del glicerol del lípido (Burman *et al.*, 2011; Henriques y Craik, 2012). La fuerza electrostática de esta unión es dada por una interacción iónica entre el grupo amonio de la fosfatidiletanolamina y el grupo carboxilo de un residuo conservado de glutamato, localizado en el bucle 1 del ciclótido. Una vez se da esta interacción inicial aumenta la concentración péptidos en la superficie de la membrana para formar estructuras oligoméricas, ocasionando poros en la bicapa lipídica que promueve una descompensación osmótica en el interior de la célula (Henriques and Craik, 2012). Por otro lado, se han descrito péptidos aniónicos con capacidad de unirse a componentes de la pared celular de hongos, como heveinas que poseen un dominio quitinasa tipo IV de capacidad de unión y degradación en quitina, un componente importante de la pared celular de hongos (Kanokwiroon *et al.*, 2008; Prabhu *et al.*, 2013).

## 1.2 Familias de AMPs

Dentro de los principales péptidos antimicrobianos identificados en plantas se encuentran las defensinas, tioninas, heveinas, snakín y proteínas de transferencia de lípidos (LTPs), entre otras (De Paula *et al.*, 2008; Sels *et al.*, 2008).

### 1.2.1 Heveínas

Los AMPs de esta familia tienen un tamaño de 4.7 kDa, poseen un péptido señal de 34-45 aminoácidos, un péptido maduro de 43 de aminoácidos, y un extremo carboxilo terminal de 34-45 aminoácidos. Estos AMPs son ricos en residuos de glicina, y presentan sitios

conservados con residuos aromáticos. De acuerdo al contenido de residuos de cisteínas se han descrito tres grupos de heveínas:

- Grupo I, contienen seis residuos de cisteína estabilizados por tres puentes disulfuros.
- Grupo II, contienen ocho residuos de cisteína estabilizados por cuatro puentes disulfuros.
- Grupo III, el cual posee 10 residuos de cisteína estabilizados por cinco residuos disulfuros (Huang *et al.*, 2000; Nawot *et al.*, 2014).

La estructura tridimensional de heveínas está conformada por tres estructuras beta-hoja y una estructura alfa- hélice. Su mecanismo de acción se ha asociado con la capacidad de unión a quitina presente en la pared celular fúngica, facilitando la penetración en las hifas, y la interacción con la membrana citoplasmática que es desestabilizada, lo cual se atribuye a la presencia de residuos aromáticos (en los residuos Trp21/23 y Tyr30) que interactúan con grupos hidrofóbicos de carbono e hidrogeno de la quitina (Huang *et al.*, 2000). Sin embargo existen evidencias de actividad sobre oomicetos que carecen de quitina, por lo cual su mecanismo de acción aún no está completamente dilucidado. La actividad antimicrobiana de estos AMPs ha sido evaluada en plantas de tomate, tabaco, maíz y *Arabidopsis thaliana*, específicamente sobre hongos como *Botrytis cinérea* (IC 50 0,0084 mg/mL), *Alternaria alternata* (IC50 de 0,0058 mg/mL), *F. solani* (IC50 0,015 mg/mL) y *Magnaporthe grisea* (IC50 0,080 mg/mL), *Trichoderma viride* (IC50 de 0,001 mg/ $\mu$ L) y *Phytophthora capsici* (IC50 0,6 mg/mL) (Kiba *et al.*, 2003;Zhao *et al.*, 2011).

## 1.2.2 Defensinas

Los péptidos de esta familia poseen un tamaño de 5 kDa, poseen entre 45-54 aminoácidos, con ocho residuos de cisteína unidos por cuatro puentes disulfuros que proporcionan estabilidad a su estructura, la cual está conformada por una cadena alfa-hélice y tres hojas beta-plegadas. Se localizan en la superficie celular, en xilema y en la cavidad subestomatal, se expresan de manera constitutiva en todas las etapas de crecimiento y desarrollo vegetal o son inducibles por estrés biótico o abiótico (Stotz *et al.*, 2009; Pestana *et al.*, 2011; Nawot *et al.*, 2014). Estos AMPs son mediadores de la tolerancia al zinc, y

poseen la capacidad de bloquear canales iónicos, inhibir alfa-amilasas, e inhibir el crecimiento de hongos y levaduras (Carvalho y Gomes, 2009; Mirouze *et al.*, 2009; Nawrot *et al.*, 2014). Su mecanismo de acción en hongos se basa en la unión a esfingolípidos como glucosilceramidas, manosildiinositolfosforil- ceramida (receptores de unión a la membrana celular de hongos), en donde la carga positiva de las defensinas conduce a desestabilización de membrana y salida de iones, principalmente afectando el gradiente de Ca<sup>2+</sup> importante para elongación de las hifas (Aerts *et al.*, 2008).

Se ha evidenciado que existen dos clases de defensinas que tienen efectos diferentes en su actividad sobre hongos: defensinas capaces de generar distorsiones morfológicas de hifas, y aquellas que inhiben el crecimiento de hongos sin generar distorsiones morfológicas (Hegedus, 2013). Estos AMPs han sido aislados en tabaco, alfalfa, rábano, tomate y arvejas, y su actividad ha sido evaluada sobre bacterias como *S. aureus* (MIC 128 µg/mL) *E. coli*, (MIC 60 µg/mL) y *P. syringae* (MIC de 42 µg/mL) (Franco *et al.*, 2006), y sobre hongos como *F. oxysporum* (IC 50 NaD1 1 µM y NaD2 5 µM), *F. graminearum* (IC 50 NaD1 0.5 µM y NaD2 2 µM), *Verticillium dahliae* (IC50 NaD1 0.75 µM y NaD2 > 10µM), *Thielapviopsis basicola* (IC50 de NaD1 1 µM y NaD2 7µM), *A. nidulans* (IC50 de NaD1 0.8 µM y NaD2 5 µM) (Weerden *et al.*, 2008) *Puccinia coronata* (IC50 de 5 µM) y *P. sorghi* (IC50 de 5 µM) (Dracatos, 2014).

### 1.2.3 Tioninas

Estos AMPs tienen un peso molecular de 5 kDa y una longitud de 45 a 47 aminoácidos, con una secuencia señal de aproximadamente 15-20 aminoácidos seguida de un péptido maduro de 30 aminoácidos, y una región C- terminal. Se caracterizan por ser ricos en residuos de arginina y lisina, su estructura contiene de seis a ocho residuos de cisteína unidos por tres a cuatro puentes disulfuros que estabilizan la estructura, la cual está formada por dos alfa-hélices antiparalelas y una estructura lamina beta-plegada (Nawrot *et al.*, 2013). De acuerdo a la conformación estructural se han clasificado en cinco tipos (Stec, 2006):

- Tipo I: tienen 45 aminoácidos, ocho residuos de cisteína estabilizados por cuatro puentes disulfuros y presentan una carga catiónica. (Majewski *et al.*, 2001, Nawrot *et al.*, 2013).

- Tipo II (alfa-hordotionina y beta-hordotionina): tienen una longitud de 46 a 47 aminoácidos, ocho residuos de cisteína estabilizados por cuatro puentes disulfuros, estos péptidos son menos básicos que las tioninas tipo I, con algunos residuos cargados negativamente (Vermon, 1992).
- Tipo III: posee una longitud de 45 aminoácidos y contiene nueve residuos de cisteína estabilizados por tres puentes disulfuros.
- Tipo IV: poseen una longitud de 46 aminoácidos y contiene los mismos tres puentes disulfuros que el tipo III, pero la molécula es neutra con una baja proporción de residuos cargados. El tipo V también es neutro y contiene dos puentes disulfuros (Milbrad et al, 2003, Nawrot *et al.*, 2013).

Las tioninas tienen un papel importante en la regulación redox de enzimas, además que por su naturaleza hidrofóbica se cree que interactúan con la superficie catiónica de la membrana citoplasmática de los microorganismos, permeabilizando su estructura produciendo una descompensación osmótica y lisis celular. Estos AMPs han sido aislados de plantas como *A. thaliana*, tulipán, tomate, crambe y cebada, y su actividad antimicrobiana ha sido evaluada sobre *F. graminearum* (IC50 100 nM) y *Ceratocystis fimbriata* (IC50 de 50 nM) (Muramoto *et al.*, 2012; Asano *et al.*, 2013)

### 1.2.4 Snakin

Estos AMPs poseen un peso de 6.5 kDa y una longitud de 63 aminoácidos, contienen péptido señal de 18-29 aminoácidos, un péptido maduro de aproximadamente 60 aminoácidos, y un extremo C-terminal. Son catiónicos, contienen 12 residuos de cisteína conservados unidos por seis puentes disulfuros que le dan estabilidad a su estructura conformada por dos alfa-hélices (Porto *et al.*, 2013). Existen dos tipos de Snakin: las Snakin-1 tienen una longitud de 63 aminoácidos expresados constitutivamente en diferentes tejidos durante el desarrollo y crecimiento de las plantas; las Snakin-2 poseen 66 aminoácidos, localmente es inducida por heridas y muestra una respuesta diferencial al ataque de fitopatógenos (Segura *et al.*, 1999; Berrocal-lobo *et al.*, 2002).

El mecanismo de acción de las Snakin se desconoce, y a diferencia de otros AMPs de naturaleza catiónica, estos péptidos no interactúan con la membrana fosfolipídica de microorganismos (Tam *et al.*, 2015). Estos AMPs han sido aislados en papa, frijol y jujube,

y su actividad antimicrobiana se ha evaluado sobre bacterias como *S. aureus* (MIC 0,028 mg/ml), *Rhizobium meliloti* (IC50 8  $\mu$ M) y sobre hongos como *Phomopsis azadirachtae* (MIC 0,007 mg/mL), *A. flavus* (IC50 20  $\mu$ M), *Colletotrichum graminicola* (IC50 10  $\mu$ M) (Berrocal-Lobo *et al.*, 2002; Daneshmand *et al.*, 2013).

## 1.2.5 Proteínas de transferencia de lípidos

Las proteínas de transferencia de lípidos (LTPs del inglés Lipid Transfer Protein) presentan pesos moleculares de 9-10 kDa, contienen un péptido señal de 21 - 35 aminoácidos, y un péptido maduro con una longitud aproximada de 35-74 aminoácidos. Estos péptidos poseen cargas catiónicas cuando se encuentran en un pH neutro, contienen ocho residuos de cisteína estabilizados por cuatro puentes disulfuros y presentan puntos isoeléctricos entre 9 - 10 (Yeast, 2008). Los LTPs participan en la formación de la cutícula, modulación del crecimiento, desarrollo de las plantas, la inducción de la señalización de defensa contra patógenos y en transferencia de lípidos entre fracciones microsomales y mitocondrias, por esta última actividad se denominaron LTPs (Yeast, 2008). Existen dos tipos de LTPs: LTPs1 y LTPs2. Los LTPs1 presentan un peso molecular de 10 kDa, y 90-95 aminoácidos, poseen un péptido señal de 21-27 aminoácidos, el péptido señal dirige la proteína hacia una vía secretoria donde se elimina liberando el péptido maduro hacia el espacio apoplástico, como se ha demostrado en LTPs1 aislados de *A. thaliana*, *Brassica oleracea* var. *italica*, *Unguiculata comunnis* donde se localizan en pared celular (Pyee *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 2004; Carvalho y Gomes-Moreira, 2007). La conformación de LTPs1 ha sido determinada en arroz, trigo, maíz, tabaco, cebolla y lentejas, su estructura está constituida por cuatro alfa-hélices, unidas por tres bucles y un extremo carboxilo sin una estructura secundaria definida. La primera hélice comprende los residuos Cys4-ALA18, la segunda hélice está formada por los residuos Ala26-Ala37, la tercera contiene los residuos Thr41-Ala57, y la cuarta comprende los residuos Ala63-Cys73. El primer bucle (L1) localizado entre las hélices 1 y 2, está conformado por los residuos 19-25, el bucle L2 está ubicado entre las hélices 2 y 3, contiene los residuos 38-40, y el bucle L3 se encuentra entre las hélices 3 y 4, y está compuesto por los residuos 58-62. El extremo carboxilo contiene los residuos 64-73 (Lee *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2005; Finkina *et al.*, 2013). La estructura es estabilizada por cuatro puentes disulfuro, formados por los residuos Cys5-Cys51, Cys14-Cys28, Cys29-Cys74 y Cys49-Cys88. Otra característica importante de la familia LTPs1 es la formación de una cavidad hidrófoba flexible, rodeada por tres estructuras alfa-hélices,

está cavidad está revestida por cadenas laterales de aminoácidos hidrofóbicos (Ala, Arg, Ile, Leu, Lys, Pro, Ser, Thr, Tyr y Val), el túnel contiene dos entradas, una pequeña y una grande, en la entrada grande existen dos residuos Arg y Lys, y en este sitio se da la interacción de la cavidad con lípidos (Lin *et al.*, 2005; Carvalho *et al.*, 2007; Shin *et al.*, 2016).

El mecanismo de acción de los LTPs, para inhibir el crecimiento microbiano, aun no es claro, sin embargo se ha sugerido una interacción con fosfolípidos de membrana produciendo un cambio en la conformación estructural de la bicapa lipídica, desestabilizándola y permitiendo desequilibrio de iones que generan una descompensación osmótica, lo cual se ha evidenciado experimentalmente en membranas permeabilizadas en levaduras (Regente *et al.*, 2005). Por otro lado, se ha demostrado que los LTPs son capaces de competir con moléculas producidas por *Phytophthora sp.* y *Pythium sp.* (elicinas) por la unión a receptores presentes en plantas, bloqueando la interacción de los patógenos con los esteroides del hospedero (Blein *et al.*, 2016).

El efecto en la inhibición de patógenos se ha evidenciado en plantas como *A. thaliana*, café, espinacas, lentejas, cebolla, arroz, trigo, maíz y cebada sobre bacterias como *B. megaterium* (IC50 0,8 µg/mL) y *Sarcina lutea* (IC50 8 µg/mL) y en hongos como *Alternaria sp.*, *Brassicola* (IC50 2,5 µg/mL), *B. cinérea* (IC50 3 µg/mL), *F. oxysporum sp. pisi* (IC50 3.5 µg/mL), *F. oxysporum sp. lycopersicum* (IC50 3 µg/mL) y *A. niger* (IC50 10 µM) (Gizatullina *et al.*, 2013; Fan *et al.*, 2013; Li *et al.*, 2010; Zottich *et al.*, 2011; Camue *et al.*, 1995).

Los LTPs2 tienen un peso molecular de aproximadamente de 7 kDa y longitud de 70 aminoácidos, contiene un péptido señal en el extremo N-terminal de 27-35 aminoácidos, un péptido maduro de 70 aminoácidos y un extremo C-terminal (Mander *et al.*, 2010). Al igual que el LTP1, el LTP2 está localizado en la pared celular de plantas. Su conformación estructural ha sido determinada en arroz, y está formada por tres alfa-hélices; la primera hélice comprende los residuos Cys3-Ala16, la segunda hélice formada por los residuos Thr22-Ala31 y la tercera hélice contiene los residuos Gln33-Ala40 y una región que contiene dos hélices conformados por Tyr45-Tyr48 y Ala54-Val58 (Douliez *et al.*, 2001). La estructura es estabilizada por cuatro puentes disulfuros formados por los residuos de Cys3-

Cys35, Cys14-Cys28, Cys29-Cys47 y Cys37-Cys68 (Giangrieco *et al.*, 2015). Su estructura se diferencia de su contraparte LTPs1 porque posee una caja hueca triangular en lugar de un túnel hidrofóbico, y está cubierta por residuos de aminoácidos hidrofóbicos como Ala, Cys, Ile, Leu, Phe y Val. La caja triangular es más flexible que el túnel hidrofóbico del LTP1 y tiene la capacidad de unirse a esteroides que no se pueden unir a LTPs1 (Samuel *et al.*, 2002). Su actividad antimicrobiana es desconocida (Cheng *et al.*, 2004).

La identificación de genes codificantes de LTPs ha representado una oportunidad biotecnológica para el desarrollo de antibióticos y de cultivos transgénicos, con aproximaciones exitosas en, tabaco transgénico resistente a *B. cinérea* (Kiba *et al.*, 2011), nabo transgénico resistente a *Sclerotinia sclerotiorum* (Fan *et al.*, 2013), trigo transgénico resistente a *Cochliobolus sativus* y *F. graminearum* (Zhu *et al.*, 2012).

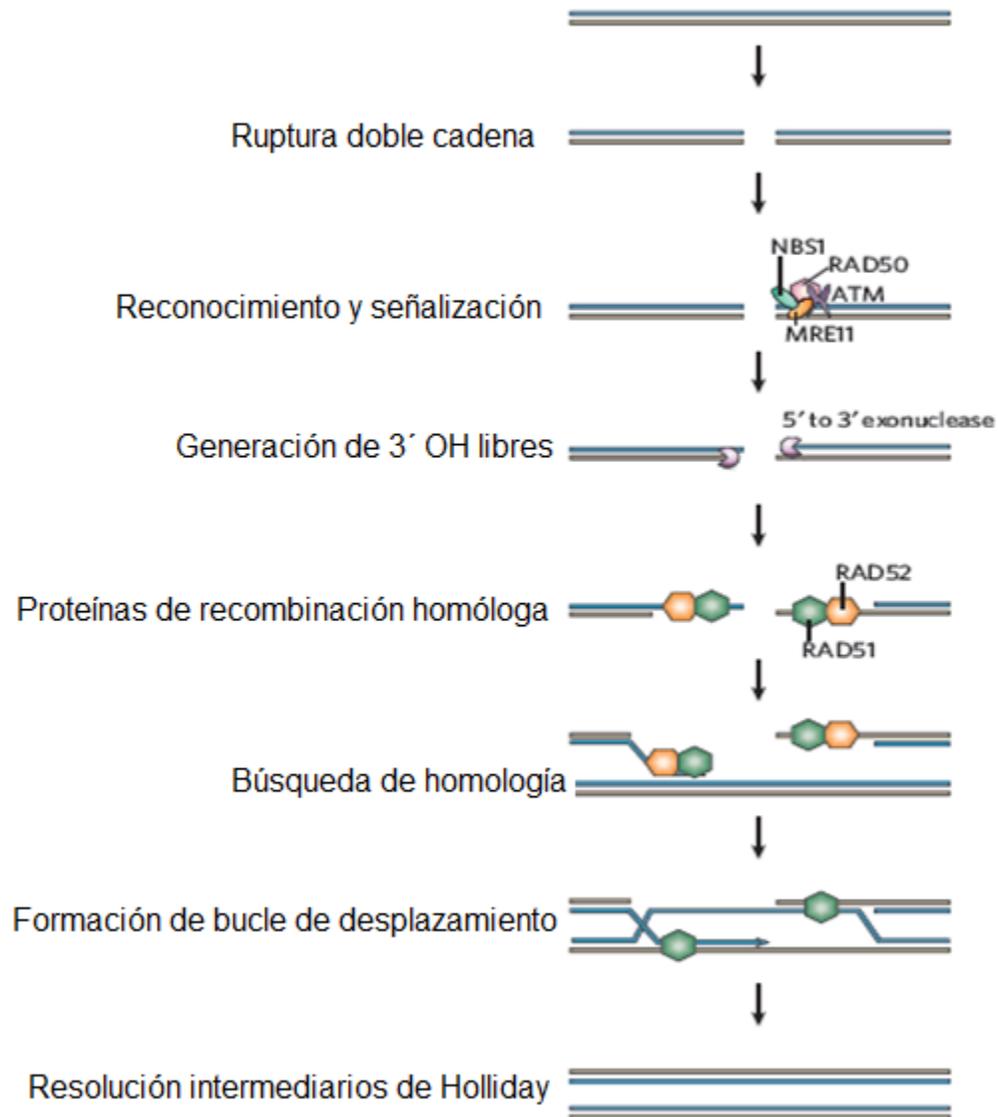
### 1.3 Recombinación homóloga

La capacidad de realizar recombinación homóloga de los organismos eucariotas ha permitido usar este proceso como una herramienta biotecnológica para la síntesis de un genoma artificial, a través del diseño y ensamblaje de genomas sintéticos obtenidos a partir de secuencias depositadas en bases de datos biológicas. Por ejemplo en 2010 Gibson *et al.*, lograron obtener un genoma sintético de *Mycoplasma genitalium* a partir del ensamblaje de cuatro constructos de expresión (6 kb cada constructo), por recombinación homóloga en *Saccharomyces cerevisiae*. El genoma sintético de 1.08 mb fue clonado de forma estable en un vector centromérico en levadura (Ycp), y posteriormente transformado en *Mycoplasma capricolum*. La bacteria presentó características fenotípicas esperadas, y la capacidad de autoreplicarse más rápido que la cepa de *M. genitalium* nativa (Gibson *et al.*, 2010). En este sentido, la recombinación homóloga representa una estrategia clave en la transformación y evolución de la biología sintética, al facilitar la formación de cromosomas sintéticos eficientes para regular el crecimiento y desarrollo de un ser vivo. La recombinación homóloga es un proceso de reorganización genética entre cromosomas que permite garantizar la diversidad genética, la segregación cromosómica y la reparación de ADN (Hunter *et al.*, 2006). Este mecanismo consiste en el intercambio de dos secuencias de ADN altamente similares que han sufrido una ruptura en la doble cadena, sucede en la profase I de la meiosis para generar el entrecruzamiento cromosómico y garantizar la variabilidad genética. De igual forma este mecanismo es usado para la

reparación de cromosomas rotos causado por el ataque de radicales de OH<sup>-</sup> sobre ADN de doble cadena, evitando el desarrollo de mutaciones y posibles errores en la transcripción (Hunter *et al.*, 2006; Jasin y Rothstein, 2013). En este proceso intervienen las enzimas helicasa, endonucleasa (RAD51 y NSB1) y exonucleasa (RAD50, DMC1, MRE11) y una proteína mediadora de la recombinación y reparación (RAD 52). Las proteínas RAD51 y DMC1 son homologas de RecA en *E. coli*, y la proteína RAD52 es homologa a RecOR de *E. coli*, perteneciente a la familia de las proteínas mediadoras de recombinación (Li *et al.*, 2008).

En la levadura *S. cerevisiae*, una vez se produce la ruptura de la doble cadena de ADN, es reclutado el complejo NBS1-RAD50, que a su vez activa las proteínas quinasas ATM y ATR99 dependientes de recombinación meiótica. Las quinasas actúan como señalizadoras de RAD50 que se encarga de degradar parcialmente el extremo 3'-OH, las hebras de cadena sencilla del ADN son protegidas por proteínas de replicación A (PRA), que protegen el ADN de la degradación y evitan la formación de estructuras secundarias (Jasin y Rothstein, 2013). La presencia de extremos 3'-OH libres permite la unión de RAD51, sin embargo esta unión no es posible sin la ayuda de RAD52 encargada de desestabilizar termodinámicamente la unión de la cadena sencilla de ADN con la proteína PRA. RAD52 es estimulada por proteínas de la familia RAD54, RAD55 y RAD57 (Krejci *et al.*, 2012). La proteína RAD51, al unirse a una de las secuencias de ADN de cadena sencilla, invade secuencias de ADN de doble cadena homologas identificando la región de la otra cadena que es complementaria, formando un bucle de desplazamiento en donde una de las hebras de cadena sencilla desplaza a la cadena de su misma polaridad en el ADN de doble cadena y viceversa (Zao *et al.*, 2015). El entrecruzamiento de las dobles cadenas forma el denominado intermediario de Holliday (Holliday, 1964). Estos intermediarios de Holliday pueden aparecer en procesos de reparación y replicación. La migración del punto de cruce de las cadenas genera una región del ADN denominado heterodúplex, conformado por una doble cadena de distinto origen (Mathiasen *et al.*, 2014). La migración de las hebras se da gracias a la intervención de topoisomerasas que se ubican en las cuatro hebras en forma de tetrámero, y la acción de ATPasas localizadas en los extremos opuestos a las cuatro hebras, permitiendo que la estructura gire y de esta forma las hebras de ADN migren. La estructura de Holliday forma una cruz que debe resolverse para permitir la separación de las cromátidas (Krejci *et al.*, 2012). La resolución determina si la recombinación dió lugar

a un sobrecruzamiento que tendría forma de quiasma, como se observa en la meiosis, o si la recombinación no genera sobrecruzamiento (Figura 2).



**Figura 2.** Diagrama de recombinación homóloga. El proceso inicia cuando se produce el reconocimiento de la ruptura de una secuencia de doble cadena, por el complejo NBS1-RAD50, el cual recluta proteínas quinasas ATM y ATR99 encargadas de señalizar a RAD50 para que degrade el extremo 3'-OH. RAD51 se une a los extremos 3'-OH con ayuda de RAD52 encargada de degradar a las proteínas de replicación A (PRA) que se encuentran protegiendo las hebras de cadena sencilla. RAD51 invade una secuencia de

ADN de doble cadena homóloga, e identifica dicha región homóloga donde una vez es reconocida se forma un bucle de desplazamiento y se da el entrecruzamiento de las hebras formando la estructura de Holliday (Tomado de Verdum y Kalseder, 2007).

La recombinación homóloga ha sido usada en la tecnología de ADN recombinante en *S. cerevisiae*, permitiendo insertar fragmentos en el genoma de la levadura, o en un plásmido de clonación, para el desarrollo de proteínas recombinantes, mutagénesis sitio-dirigida, o el etiquetado de epítopes (Zao *et al.*, 2015).

La inserción de fragmentos de ADN en el genoma de la levadura ocurre cuando son transformadas con un plásmido que carece de un origen de replicación (Hinnen *et al.*, 1978). Este proceso es iniciado por la linearización del plásmido cuyos extremos son altamente recombinogénicos, capaces de interactuar con secuencias cromosómicas homólogas, integrándose al genoma por el mecanismo de reparación (Krejci *et al.*, 2012). El extremo 3'-OH del plásmido lineal invade la secuencia cromosomal homóloga facilitada por la digestión exonucleolítica 5'-3', donde la invasión del plásmido lineal resulta en el desplazamiento de las cadenas, y la formación del bucle de desplazamiento sobre el cromosoma donde se encuentra una secuencia de cadena monocatenaria complementaria al extremo desapareado 3'-OH del plásmido lineal, iniciándose en este punto la síntesis de la reparación que es integrado al genoma (Mathiasen *et al.*, 2014). La inserción de fragmentos de ADN en un plásmido por recombinación homóloga en levaduras, permite realizar el ensamblaje de fragmentos de ADN en un solo paso, a través del diseño y síntesis de oligonucleótidos que contienen una secuencia homóloga a los extremos del plásmido lineal (Gay *et al.*, 2014). La recombinación en plásmidos se ha usado para la inserción de genes de selección a través de una inserción simple donde un fragmento de ADN homólogo al plásmido linearizado es usado para reparar el plásmido y generar un producto circular, en este proceso un marcador de selección es insertado entre las secuencias de ADN homólogas, de tal forma que si se llevó a cabo exitosamente la recombinación homóloga, y la levadura crecerá en el medio de selección. Alternativamente, se puede realizar la sustitución de un marcador original de un vector por uno diferente, realizando la digestión del plásmido entre el marcador original para insertar un nuevo gen de selección (Gay *et al.*, 2014).

## 1.4 *Rhizoctonia solani*

*Rhizoctonia solani* Kühn (teleomorfa= *Thanatephorus cucumeris*), es un hongo micelial del suelo que no produce esporas asexuales (conidios). Se caracteriza por presentar hifas multinucleadas de 4-15  $\mu$ m de ancho ramificadas en ángulos rectos, posee un micelio blanco o pardo oscuro. La forma teleomorfa produce basidios y cuatro esterigmas apicales. Crece en climas cálidos y húmedos, puede sobrevivir por muchos años en el suelo en forma de micelio compactado que contiene reservas alimenticias, esta estructura es denominada esclerocio (Woodhall *et al.*, 2013).

*R. solani* se subdivide en grupos de acuerdo a la fusión de hifas entre especies, designados como grupos anastomosis (AG1-AG11). Fue descubierto en 1858 por Julius Kuhn en tubérculos de papa enfermos y desde entonces es considerado como fitopatógeno de plantas herbáceas, donde diferentes subgrupos anastomosis producen enfermedades como: mustia hilachosa en frijol (AG1), podredumbre de la raíz en rábano japonés (AG2-1), roña negra en papa (AG3, AG4 y AG5), podredumbre del fruto en tomate (AG4) y mancha marrón en césped, entre otros (Tabla 3) (Cubeta *et al.*, 2014; Wiberg *et al.*, 2013).

**Tabla 3** Grupos Anastomosis de *R. solani* y enfermedades causadas en plantas. Tomado de Sneh *et al.*, 1991.

| Grupo anastomosis | Enfermedades   | Huésped   |
|-------------------|--|---|
| AG1-IA            | Tizón de la vaina, Tizón de la hoja, Tizón foliar, Tizón de verano, Tizón del sur, Mancha marrón         | Arroz, maíz, sorgo, frijol, soya, trébol encarnado, plántulas de alcanfor, césped             |
| AG1-IB            | Telaraña, "Damping off", podredumbre húmeda y podredumbre de la raíz                                     | Frijol, arroz, soya, higos, leguminosas, hortensia, repollo, Lechuga, zanahoria, , lino, pino |
| AG2-1             | "Damping off", Podredumbre del cogollo, Tizón foliar, Podredumbre raíz                                   | Soya, lino, pino, crucíferas, fresas, tulipán, rábano y trébol mediterráneo                   |
| AG2-2 IIIB        | Falsa tizón de la vaina, tizón de la vaina, caspa negra, mancha marrón, corona y llave de la podredumbre | Arroz, Bardana comestible, césped, maíz, ginger y gladiolos                                   |
| AG1-IC            | Damping off, podredumbre de la raíz, gran parche   | Caña de azúcar, crisantemo, konajack, ñame chino y césped                                     |
| AG3               | caspa negro, tizón foliar, punto marrón,   | Papa, tabaco y tomate   |

|                         |  |   |
|-------------------------|--|---|
| AG4(HG I, HGII y HGIII) | Tizón del fruto, podredumbre del tallo, podredumbre de la raíz, podredumbre de la vaina, Damping off y chancro del tallo | Berenjena, tomate, guisante, papa, soya, cebolla, estevia, habichuela, algodón, nueces y habichuela |
| AG5                     | Caspa negra, mancha marrón, podredumbre de raíz  | Papa, césped, frijol, soya  |
| AG8                     | Parches desnudos   | Cereales  |

Los grupos anastomosis patogénicos solo infectan a la planta hospedera cuando se presentan condiciones de temperaturas optimas (23-35°C), humedad relativa alta (96%), y una alta disponibilidad de nitrógeno (Correa et al., 2001; Ferrero y Nguyen, 2003). El patógeno inicia el proceso infectivo en etapas tempranas de crecimiento o senescencia de su hospedero, principalmente en semillas y raíces, la interacción con la planta se puede realizar a partir de la penetración de las hifas en cutícula o epidermis, o a través de la liberación de enzimas que degradan pared celular de la planta, una vez el hongo coloniza a su huésped forma esclerocios, como nuevos inóculos que esperan infectar otras plantas. El principal síntoma de la infección con *R. solani* es la incapacidad de las semillas para germinar o “damping off”, sin embargo algunas semillas que logran germinar presentan lesiones marrón rojizo y canchros en tallos (Woodhall *et al.*, 2013). La infección producido por *R. solani*, causa enfermedades limitantes para algunos cultivos de importancia agrícola, por ejemplo, la roña negra en papa causada por los grupos anastomosis AG3-AG5 genera pérdidas de 50% en producción, debido a que el hongo infecta los brotes de germinación antes que surjan de la tierra, y este retraso en la emergencia de brotes viene acompañado de una disminución de tallos, úlceras de estolones, y en la producción de tubérculos deformes, y finalmente cuando las plantas empiezan a envejecer aparecen esclerocios en tallos y en la superficie de tubérculos hijos formando un polvo negro (Aliferi y Jabaji, 2012). Las principales estrategias de manejo de la roña negra son principalmente culturales, como rotación de cultivos, siembra en temperaturas cálidas y secas, y tratamiento con fungicidas (ICA, 2014).

## 1.5 Biotecnología vegetal

La transformación genética de plantas consiste en la inserción de genes foráneos en cultivos de importancia agronómica, lo cual confiere nuevas propiedades, o características mejoradas, incrementando el rendimiento. En el proceso de inserción de un gen se debe

tener en cuenta el genotipo de la planta, el tipo y edad del explante que se va a transformar, el marcador de selección para determinar si el explante contiene o no el inserto, el vector, el método de transformación (por biobalística o infección con *Agrobacterium tumefaciens*) y el sistema de regeneración de las plántulas (organogénesis directa/indirecta o embriogénesis somática) (Anami *et al.*, 2016).

Dentro de los factores relevantes para garantizar el éxito del proceso se encuentran los métodos usados. La biobalística implica el uso de partículas de ADN envueltas en microproyectiles de oro o tungsteno, impulsadas con cargas eléctricas o explosivas. Este método permite transformar células de cualquier tejido vegetal, sin embargo se ha evidenciado que la eficiencia de transformación con este método es baja (menor al 5%) debido a la prevalencia de expresión transitoria del transgén, además de una resistencia natural de la cutícula y la pared celular para el ingreso de los microproyectiles (Xia *et al.*, 2011).

En este sentido, la transformación con *A. tumefaciens* es el método más usado, y se basa en la transferencia de ADN de forma natural a partir de la infección del tejido vegetal con la bacteria. *A. tumefaciens* es una bacteria gram negativa que se caracteriza por producir tumores del cuello o agallas en plantas dicotiledóneas, y se ha evidenciado su capacidad para infectar algunas monocotiledóneas de las familias Asparagaceae, Liliaceae y Amaryllidaceae (Graves y Goldman, 1987; Gelvis, 2012).

La infección por *A. tumefaciens* inicia a través de la señalización producida por fenoles secretados de la planta como acetosiringona, vainillina y ácido p-hidroxibenzoico, que hacen que la bacteria sea atraída hacia la pared celular, seguido de la inducción de genes de virulencia conocidos como *vira* y *virG*, este último induce la expresión de otros genes *vir* (*virC1*, *virC2*, *virD1*, *virD2*, *virE1*, *virE2*) (Gelvis, 2012). La liberación de una cadena sencilla de ADN que es transferida desde el microorganismo a la célula vegetal (T-DNA), se genera por la acción de las proteínas *VirD1* y *VirD2*, así el T-DNA es exportado junto con proteínas *Vir* a la célula huésped por el sistema de secreción tipo IV (T4SS), ya que la proteína *VirB* forma un poro en las células bacteriana y vegetal. Cuando ingresa el T-DNA al citoplasma de la célula huésped es recubierto por proteínas *VirE2* para proporcionar una protección al T-DNA durante su desplazamiento hasta el núcleo. Una vez el T-DNA llega al núcleo es importado a través de la interacción de las proteínas *VirD1* y *VirE2* con una

proteína nuclear de la célula huésped (en *Arabidopsis* es una proteína de la familia alfa-carioferina) (Gelvis, 2012). Después de la importación del T-DNA al núcleo este se integra al genoma del huésped por medio de la interacción de las proteínas VirD2 y VirE2 con proteínas de interacción con VirE2 (VIP1), ciclinas dependientes de quinasa (CAK2M) y proteínas de unión a la caja TATA (TBP) de la célula huésped. Aunque no se conoce cómo interactúan CAK2M y TPB, se ha evidenciado que su relación con VIP1 permite la unión con la histona 2A (H2A) de la cromatina, que permitiría la integración del T-DNA al genoma (Gelvin, 2012).

Por otro lado, se ha sugerido que el sistema de roturas de doble cadena del cromosoma genómico (DSB) participa en la integración del T-DNA convirtiéndolo en una molécula de doble cadena (Tzifira y Citovsky et al., 2006). El plásmido inductor de tumores (Ti) contiene la mayoría de los genes que se requieren para la transferencia del T-DNA, este plásmido tiene un peso que oscila entre 200-300 Kb, conformado por 196 genes incluyendo la familia *vir* y el T-DNA flanqueado por bordes derecho e izquierdo (23-25 nucleótidos) (Gelvin,2003).

El T-DNA contiene genes codificantes de hormonas de crecimiento, como auxinas y citoquininas, y aminoácidos especializados como opinas, usadas como fuente de nitrógeno y energía para el crecimiento de la bacteria, que son expresados en el genoma de la planta cuando el T-DNA es integrado en este. La síntesis de auxinas y citoquininas producen un crecimiento celular descontrolado formando tumores en la planta (Hellens *et al.*, 2000).

Teniendo en cuenta la capacidad que posee *A. tumefaciens* de transferir e integrar ADN foráneo en el genoma de plantas, este mecanismo se ha utilizado en transformación genética de plantas, utilizando vectores Ti modificados que no contienen genes codificantes de hormonas de crecimiento y opinas, en su lugar contienen genes de interés agronómico que se desean transferir (conocidos como vectores desarmados) (Philip *et al.*, 2000). Existen dos tipos de vectores desarmados: los cointegrados que contienen un vector pequeño con el gen de interés flanqueado por un borde izquierdo, y una región homologa al borde derecho, y la recombinación entre los dos vectores se da por entrecruzamiento de regiones homologas. Los vectores binarios contienen dos vectores,

---

uno de ellos contiene la región T-DNA con el gen de interés, y otro vector que contiene la región *vir* (Hellens y Mullineaux, 2000).

El éxito de la transformación genética mediada por *A. tumefaciens* es usar cepas específicas para la especie vegetal a transformar (monocotiledónea o dicotiledónea). Por otro lado se han implementado estrategias para mejorar la transferencia del T-DNA a partir del desarrollo de cepas hipervirulentas que contienen vectores binarios y un constructo extra de genes *vir*(B, C y G)(Hellens y Mullineaux, 2000). Dentro de las principales cepas usadas para transformación se encuentran la cepa 58C1 que contiene dos plásmidos con cuatro replicones, dos de ellos son megareplicones (Ashby *et al.*, 1988). Las cepas pEHA101 y pEHA105 son originadas a partir de un entrecruzamiento doble de la cepa hipervirulenta A281 con un clon Pehk2. La cepa pEHA101 contiene un plásmido curado que incluye un gen que le confiere resistencia a kanamicina, mientras que el clon pEHA105 contiene un plásmido curado que contiene un gen de resistencia a gentamicina (Hood *et al.*, 1986). La cepa LBA4404 proviene del clon TiAch5 que presenta una resistencia natural a estreptomycin y espectinomycin (Deblaere *et al.*, 1985).



## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo general

Identificar un posible gen relacionado a un péptido antimicrobiano a partir de *Chamaemelum nobile*

### 2.2 Objetivos específicos

- Obtener la secuencia de ADN de un posible gen asociado a péptidos antimicrobianos, a partir de material genético de *Chamaemelum nobile*
- Caracterizar *in silico* la secuencia codificante de un péptido antimicrobiano, aislado de *Chamaemelum nobile*.
- Realizar una aproximación al proceso de clonación de un posible gen asociado a un péptido antimicrobiano de *Chamaemelum nobile*, por recombinación homóloga en *Saccharomyces cerevisiae*.

### 3 METODOLOGÍA

El presente proyecto se llevó a cabo en los laboratorios de Biotecnología (Facultad de Ciencias, Universidad Antonio Nariño) y de Ingeniería Genética de Plantas del Departamento de Biología (Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia sede Bogotá D.C.).

#### 3.1 Material vegetal

Se emplearon semillas de manzanilla romana (*C. nobile*) en un medio de propagación que contiene: sales Murashige y vitaminas Skoog (MS) suplementado con 20 mg/L de sacarosa, 0,1 mg/L de la citoquinina bencilaminopurina (BAP), 0,5 mg/L de la auxina ácido naftalenacético (ANA) y 0,25 mg/L de ácido giberélico (GA3). Las semillas fueron cultivadas bajo condiciones controladas de temperatura (20°C) y humedad relativa (70%).

#### 3.2 Extracción de ADN, reacción en cadena de polimerasa (PCR) y secuenciación

La extracción de ADN se realizó desde hojas de manzanilla usando buffer de extracción (200 mM Tris HCl pH 7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA, 0.5% SDS), solución de precipitación (con isopropanol) y buffer TE 1X como diluyente (Edwards et al., 1991). Se realizó revisión de publicaciones con el fin de elegir oligonucleótidos que amplificaran genes codificantes de AMPs. El criterio para escoger los oligonucleótidos se basó en la revisión de estudios donde se aislaron genes codificantes de AMPs de plantas, y se evaluaron por ADN recombinante para comprobar su actividad inhibitoria sobre fitopatógenos. Los oligonucleótidos permiten determinar la posible presencia de tres secuencias codificantes de defensinas (NusA-Im-Def, DEF, ATHS), tres heveínas (LrPR4, Wamp1D y Wamp 2 D), dos proteínas de transferencia de lípidos (LTP, PmAMP1), un snakin (Sn1) y una ferredoxina (PTH1) (Tabla 4).

**Tabla 4** Oligonucleótidos empleados para identificar AMPs en manzanilla romana.

| Secuencias oligonucleótidos AMPs | Directo 5'-3'                            | Reverso 5'-3'                                 | Origen               | Evaluación biológica  | Referencia                              |
|----------------------------------|--|---|----------------------|---|---|
| DEF                              | TTGCACTAGGCCATGCTAAATT<br>AAGAG          | CTCTTAATTTAGCATGGCCTAGT<br>GCAA               | Tomate               | Variedad resistente<br><i>Phytophthora infestans</i>  | Rojas, 2011                             |
| LTP                              | GACTGCTCAACGGTTTCAGTAA<br>AGTTGA         | TCAACTTTACTGAACCGTTGAGC<br>A GTC              | Tomate               | Variedad resistente<br><i>Phytophthora infestans</i>  | Rojas, 2011                             |
| PmAMP1                           | TAGAAGACTCGAGATGGAAAC<br>CAAGCGCTTGGC    | AACAAACTCTAGATCAGCACTG<br>GATGAAAACAC         | Pino blanco          | <i>Alternaria brassicae</i> , <i>Leptosphaeria maculans</i> , <i>Sclerotinia sclerotiorum</i>                   | Verma et al., 2012                      |
| PFLP                             | CGGGATCCCAGTGCTAGTGT<br>CTCAGCTACCA      | CGAGCTCGTTAGCCCACGAGTT<br>CTGCTTCT            | Pimenton morron      | <i>Pseudomonas siringae</i>   | Dayakar et al., 2003; Liau et al., 2003 |
| LrPR4                            | GGCATATGGCAATGGAGAGA<br>GTG              | CCCTCGACAATTAACAACTGGT<br>A                   | Lycoris radiata      | <i>Magnaporthe grisea</i>   | Li et al., 2010                         |
| NusA-Lm-Def                      | ACAAAAGCTGTGCGAGCGATC<br>AAG             | CGGAATCTATTAACTGGGAC<br>GTAGCAGATGC           | Maca                 | <i>Phytophthora infestans</i>   | Solis et al., 2007                      |
| Sn1                              | CTTAGCCATGGCTGTTCAAA<br>TTTTTGTG         | TAAGAAGCTTTTATCAAGGGCA<br>TTAGACTTGCCCTT      | Papa                 | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> , <i>Colletotrichum coccoides</i> , <i>Botrytis cinerea</i> | Kovalskaya y Hammond, 2009              |
| PTH1                             | CTTAGCCATGGTTAGACATTG<br>CGAGTCG         | TAAGAAGCTTTTATCAGCATGGC<br>TTAGTCAAAAGCA      | Papa                 | <i>Clavibacter michiganensis subsp. sepedonicus</i> , <i>Colletotrichum coccoides</i> , <i>Botrytis cinerea</i> | Kovalskaya y Hammond, 2009              |
| Wamp-1D                          | AGGAGGCCACCAAGATCATGAA<br>G              | TCAAATGTATATTAATCAAATG<br>TATATTAAGACTGAATTGC | Trigo                | <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus niger</i>  | Andreev et al., 2012                    |
| Wamp- 2D                         | TCATGAAGCCACATGTCC                       | TCTCACTTTATTTACTCACATAA<br>CCA                | Trigo                | <i>Fusarium oxysporum</i> , <i>Aspergillus niger</i>  | Andreev et al., 2012                    |
| Actina                           | GGTAACATTGTGCTCAGTGGT<br>GG              | AACGACCTTAATCTTCATGCTGC                       |                      |   | Rojas, 2011                             |
| AtHs                             | ATGGAGGAAGCAAAGGGACC<br>TGTGAAGCACGTATTG | AAATCAAACACTCTTAATAAACT<br>CATGATCTTTTTAC     | Arabidopsis thaliana | <i>Didymella bryoniae</i> , <i>Trichoderma harzianum</i> , <i>Botrytis cinerea</i>                              | Park et al., 2007                       |

En la reacción de PCR se utilizó 100 ng/μL de ADN de hojas de manzanilla romana. Las condiciones usadas son las siguientes: Buffer de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTPS 0,2 mM, oligonucleótidos 0,4 μM de cada uno, mezcla de polimerasa 0,2 U/μL. Los ciclos de PCR fueron: desnaturalización inicial 95°C por 5 min, 30 ciclos de 95°C por 1 min, 50°C por 1 min, 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 5 min. Los productos de PCR que presentaron una amplificación de tamaño esperado fueron enviados a secuenciar a Macrogen (USA).

### 3.3 Caracterización *in silico*

Para determinar la identidad de las secuencias de nucleótidos estas fueron sometidas a una búsqueda de secuencias similares por medio del programa (BLAST) del Centro

Nacional para la Información Biotecnológica NCBI (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/Blast.cgi>), en este programa se usó el algoritmo Megablast contra la base de datos Nucleotide collection (nr/nt); de las anotaciones arrojadas por el programa, se escogieron aquellas secuencias que presentaron los valores de error estimado ( Valor E) más bajos, el porcentaje de identidad más alta y el mayor porcentaje de cobertura, una vez se determinó la identidad de las secuencias se procedió a realizar un alineamiento con las secuencias anotadas en el Blastn que presentaron un alto porcentaje de identidad con la(s) secuencia(s) obtenida(s) en este estudio usando el programa Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) del Laboratorio Europeo de Biología Molecular EMBL con el fin de identificar las diferencias y sitios conservados, los alineamientos se realizaron con las secuencias de nucleótidos y de aminoácidos.

La secuencia de aminoácidos putativa se obtuvo a partir de la traducción de la secuencia de ADN usando la herramienta TRANSLATE del portal de recursos bioinformáticos SIB (EXPASY) (<http://web.expasy.org/translate/>), a partir de la secuencia teórica de la proteína se realizó la predicción de parámetros bioquímicos como el punto isoeléctrico, peso molecular (herramienta pI/Mwy), la hidropaticidad y residuos cargados positivamente (herramienta ProtParam); Las herramientas empleadas para determinar los parámetros bioquímicos son del portal ExPASy.

La estructura 3D de la secuencia de aminoácidos se llevó a cabo con el método de modelamiento por homología usando el programa Deep View (<http://spdbv.vital-it.ch/>), para esto se tomaron en cuenta modelos tridimensionales de proteínas homologas obtenidas por cristalografía de rayos X y espectroscopia de resonancia magnética nuclear, anotadas en la base de datos Protein Data Bank, la búsqueda de estos modelos se realizó con el buscador de Swiss model Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/workspace/>) y se calculó la estructura 3D usando como molde la proteína experimental con la que presentaba un mayor porcentaje de identidad. Una vez se obtuvo el modelo se realizó una minimización de energía con el fin de mejorar el posicionamiento geométrico de algunos residuos a través de la herramienta GROMOS 43B1 del programa Deep View (Van Gunsteren et al, 1996). Con QMEAN se realizó estimación de los ángulos de torsión, distancia e interacción entre átomos y la solventación de los residuos como parámetros de calidad.

### 3.4 Recombinación homóloga

De acuerdo a los resultados obtenidos a partir de la secuenciación de los productos de PCR, se realizó la clonación de los genes en un vector de clonación y expresión pMW07 (donado por el Doctor Juan Daniel Valderrama del Laboratorio de Ingeniería ambiental, Universidad Antonio Nariño). Este vector contiene un origen de transferencia conjugativo (*oriT*), un origen de replicación para *E. coli* (*ColE1*), un gen de resistencia a cloranfenicol, y un gen que codifica para una enzima implicada en síntesis de Uracilo (*ura3*) que actúa como el gen de selección de células transformadas. Para llevar a cabo este procedimiento se colocaron secuencias homologas para este vector en los productos de PCR, haciendo extensiones del producto con dos juegos de oligonucleótidos para lograr homología (Tabla 5) y permitir la ligación a través de recombinación homóloga en *S. cerevisiae*, usando el sitio de restricción SmaI.

**Tabla 5** Características de los oligonucleótidos para la recombinación homóloga

| Oligonucleótido   | Dirección 5'-3' | Secuencia 5'-3'   | Hibridación | % GC | Longitud esperada del producto |
|-------------------|-----------------|---|-------------|------|--------------------------------|
| Primera extensión | Directo         | CCCGGGAG<br>GAGGAACG<br>ATGGCACC<br>CCATGCAG<br>AGGCACTA<br>ACTTGT                      | 77°C        | 68   | 287                            |
|                   | Reverso         | GATTAATTA<br>ATGGTGGT<br>GGTGGTGG<br>TGCAACTT<br>TACTGAAC<br>CGTTGAGC<br>AGTC           | 71°C        | 45   |                                |
| Segunda extensión | Reverso         | CAGCCAAG<br>CTTGCATG<br>CCTGCAGG<br>TCGACTCT<br>AGATTAATT<br>AATGGTGT<br>GGTGGTGG<br>TG | 76°C        | 52   | 313                            |

Posteriormente se realizó PCR touchdown, con un rango de temperatura para hibridación

de oligonucleótidos entre 72 a 61°C. Las condiciones de reacción fueron: Buffer de reacción 1X con MgCl<sub>2</sub> 2,5 mM, dNTPs 0,2 mM, oligonucleótidos 0,2 μM, mezcla de polimerasa 0,2 U/μL y ciclos de temperatura: desnaturalización inicial 98°C por 10 min, 10 ciclos de 98°C por 20 seg, 72°C por 30 seg, 72°C por 1 min, 30 ciclos de 98°C por 20 seg, 62°C por 30 seg y 72°C por 1 min, y una extensión final a 72°C por 9 min.

La clonación se llevó a cabo en *S. cerevisiae* FY834 (*MATα his3Δ200 ura3-52 leu2Δ1 lys2Δ202 trp1Δ63*) (donada por el Doctor Juan Daniel Valderrama del Laboratorio de Ingeniería ambiental, Universidad Antonio Nariño). Esta cepa contiene una mutación del gen *ura3* codificante de la enzima orotidina 5 fosfato descarboxilasa, importante en la vía metabólica para la síntesis de uracilo, impidiendo que la levadura crezca en medios que carecen de este elemento. De igual forma *S. cerevisiae* tiene la capacidad de realizar de manera eficiente el intercambio cruzado de cadenas o unión de Holliday (Sambrook et al., 2001) para reparación del ADN (principio de la recombinación homóloga). En este proceso se inoculó una colonia de FY834 en 5 mL de medio YPD y se incubó a 30°C por 12 h. El vector pMW07 fue sometido a digestión con la enzima SmaI por 12 h a temperatura ambiente. El proceso de transformación se llevó a cabo por choque térmico usando 500 μL de solución de Lazy Bones (4 mL polietilenglicol al 50%, 0,5 mL acetato de Litio 1 M, 55 μL Tris-HCl 0,92 M, 10 μL EDTA 0,5 M, 435 μL H<sub>2</sub>O) y 20 ng/μL de ADN de salmón hervida, 30 ng/μL del vector pMQ70 digerido, y 100 ng/μL del producto de PCR, con incubación por 24 h a temperatura ambiente. Al siguiente día se sometieron las células a choque térmico por 12 min a 42°C, y se centrifugó a 13000 rpm, y se lavó dos veces con 300 μL de buffer TE. Finalmente, se sembró en medio sólido deficiente de uracilo (URA (-)) a 30°C y se incubó por cuatro días.

Una vez obtenidas las colonias en el medio de selección URA (-) se realizó la extracción del ADN plasmídico (Sambrook et al., 1989). Se partió de un cultivo inicial de 5 mL de *S. cerevisiae* incubado a 30°C por 48 h en medio URA (-). Se centrifugó por 30 seg, a 13000 rpm, y se resuspendió el pellet en 250 μL de solución I (glucosa 50 mM, Tris-HCl 25mM a pH 8.0 y EDTA 10mM) y 250 μL de solución II (NaOH 0.2 N y SDS 1%). Luego se adicionó perlas de policarbonato y se mezcló en vortex por 2 min, con posterior incubación en hielo por 5 min. Posteriormente se agregó 350 μL de buffer N3 (acetato potásico 3 M con 29,5 mL de ácido acético glacial), se agitó e incubó en hielo por 5 min, y se procedió a centrifugar por 10 min a 13000 rpm. El sobrenadante se transfirió a una columna de Epoch y se

realizaron dos lavados para eliminar el remanente de sales del buffer N3 y precipitar el ADN en la columna agregando 500  $\mu$ L de un buffer de lavado PB (5 M de Guanidina- HCl y 30% de isopropanol) y nuevamente se centrifugó durante 30 seg a 13000 rpm, a continuación se adicionó buffer de elución (Tris-HCl 10 mM pH 7,5 y de etanol 80%) y se centrifugó por 30 seg. Finalmente se resuspendió el ADN plasmídico en 50  $\mu$ L de buffer TE. Se comprobó la presencia de la secuencia asociada a AMPs través de PCR con oligonucleótidos que hibridan en el vector, flanqueando el producto de PCR, mediante secuenciación (Macrogen, USA).

### 3.5 Prueba de sensibilidad de *R. solani*

Para la extracción del fluido apoplástico de *C. nobile* se usó un gramo de hojas maduras las cuales fueron previamente lavadas con agua destilada estéril para eliminar contaminantes citoplasmáticos exudados por algunas células que sufren daños cuando se cortan las hojas y posteriormente estas hojas fueron secadas con papel absorbente. las hoja fueron pesadas e infiltradas en un frasco que contenía 250 ml de agua destilada estéril a 4°C al que se le aplicó presión al vacío de 20 kPa, la presión al vacío permite la salida de aire y entrada de agua en el espacio intercelular (fluido apoplástico) permitiendo el lavado de las moléculas presentes en este fluido. Una vez se aplicó la presión se agitó levemente el frasco para liberar burbujas de aire de las hojas y se liberó lentamente el vacío para evitar la lisis celular y la contaminación citoplasmática. La presión al vacío se repitió hasta que las hojas eran completamente infiltradas (zonas infiltradas cambio de color con presencia de zonas oscuras). Para recuperar el fluido apoplástico las hojas se secaron con papel absorbente y se envolvieron en parafilm con ayuda de una punta de micropipeta de 1000  $\mu$ L, una vez enrolladas en parafilm se insertaron en un tubo de policarbonato de 50 mL y se centrifugó a 10000 rpm durante 10 min en una temperatura de 4°C.

Para la cuantificación de proteínas presentes en el fluido apoplástico se usó el método de Bradford (Zor et al., 1996), a partir de la interacción del colorante Azul Brillante de Coomassie G-250 con estructuras proteicas, está unión hace que el colorante cambie de color y se mide el incremento de la absorción a 595 nm. La curva patrón de la cuantificación se realizó con diluciones estándar de albúmina con PBS, a concentraciones de 0,125-0,500 mg/ $\mu$ L (anexo 1).

El perfil electroforético de las proteínas presentes en el fluido apoplástico se visualizó con SDS- tricina PAGE, usando un gel discontinuo conformado por un gel separador, espaciador y un gel concentrador. El gel separador se preparó a una concentración de 16% de bisacrilamida, el gel espaciador a una concentración de 10% de bisacrilamida. Los dos geles se prepararon utilizando como amortiguador Tris- glicina 1,5 M a pH 6,8 y el gel concentrador se preparó a una concentración de 4% de bisacrilamida, empleando amortiguador Tris-glicina 1 M a pH 8,8, la polimerización de los geles de poliacrilamida se realizó con ayuda de TEMED y persulfato de amonio a 10%. El gel discontinuo se cargó con 5  $\mu$ L de marcador peso molecular (100kDa) y 5  $\mu$ L de fluido apoplástico, se usó como colorante de frente de corrido azul de bromofenol a 0,1% y se corrieron las muestras con un amortiguador de corrido Tris- tricina 0,5 M pH 6.8 (Tris 25mM, tricina (190 mM) y SDS (0,1%) y un voltaje de 100 V en el gel concentrador y 200 V en el gel separador.

Para la visualización del perfil electroforético el gel se coloreó con Azul de Coomassie R-250 durante 45 min y se decoloró con una mezcla de ácido acético glacial 10%, etanol 5% durante 2 h y después de este tiempo se realizó un lavado con la mezcla descrita y agua.

Para la evaluación preliminar de la actividad biológica del fluido apoplástico sobre *R. solani* se cultivó un cm de micelio del hongo en cajas de Petri que contienen medio PDA y se adicionó a 10 cm del micelio en cada extremo de la caja de Petri extracto proteico del fluido apoplástico (concentraciones de 0,1, 0,35, 0,58, 1  $\mu$ g/mL), agua en el caso del control negativo y una suspensión de *Pseudomonas aeruginosa* cepa PAO como referente para determinar el efecto inhibitorio sobre *R. solani* (control positivo), aunque es necesario emplear como control positivo un extracto proteico con actividad antimicrobiana conocida sobre *R. solani*. El hongo se dejó incubando a 30° C durante 5 días y se realizó la lectura de la actividad inhibitoria de las cuatro concentraciones del fluido apoplástico observando el desplazamiento del micelio de forma longitudinal en la caja de Petri. La evaluación de actividad inhibitoria del fluido apoplástico sobre *R. solani* se realizó por duplicado.

### **3.6 Caracterización fenotípica y molecular de *Agrobacterium tumefaciens***

Se caracterizaron las cepas C58C1- Mp90, EHA101, EHA105y LBA4404 (conteniendo el vector binario pCambia 2301) de *A. tumefaciens* que se encontraban conservadas a - 80°C en el laboratorio del grupo Ingeniería Genética de Plantas del Departamento de Biología

de la Universidad Nacional de Colombia. De cada vial criopreservado de las cepas se tomaron 25  $\mu$ L y se sembraron por agotamiento en medio sólido Luria Bertani (LB) (triptona 1%, extracto de levadura 0.5%, NaCl 1%) a 30°C por 24 h. Para reactivar las cepas se cultivaron en medio líquido LB y se incubaron a 30°C por 24 h y en agitación constante de 200 rpm, la turbidez del medio indicaría el crecimiento y la actividad metabólica se determinó a partir de la medición de la absorbancia en una longitud de 590 nm.

Con el fin de confirmar la identidad de las cepas se llevaron a cabo pruebas bioquímicas con el sistema BBL Crystal BD que identifica patógenos entéricos/no fermentadores a través de la detección de la hidrólisis, degradación y reducción de sustratos fluorogénicos y cromogénicos. El panel BBL Crystal BD contiene 29 sustratos deshidratados los cuales fueron rehidratados con una suspensión de cada una de las cepas evaluadas en una solución de inóculo proporcionada por el Kit (2,3  $\pm$  0,15 mL de fluido de inóculo que contiene KCl 7,5 g, CaCl<sub>2</sub> 0,5 g, Tricina N-[2-hidroxi-1, 1-bis (hidroximetil)metil] glicina 0,895 g, agua purificada a 1000 mL). Para determinar la concentración de inóculo adecuado de bacteria que se requiere en el panel, se comparó la turbidez de la suspensión bacteriana con la escala de McFarland No. 0,5 Posteriormente se agregó la suspensión bacteriana ajustada en una base proporcionada por el Kit y esta base fue balanceada suavemente hasta que los pozos fueron cubiertos por el inóculo y luego se alineó el panel con la base aplicando presión hacia abajo hasta que el panel se ajustó con la base. El panel usado para cada cepa fue incubado a 30°C por 24 h y al siguiente día se realizó la lectura de cada panel usando un lector automático BBL Crystal.

Para la caracterización bioquímica de las cepas adicionalmente se realizaron pruebas de catalasa y oxidasa para complementar el sistema BBL Crystal. La prueba de catalasa se realizó colocando en un portaobjeto una gota de peróxido de hidrógeno H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> y la suspensión de una colonia de bacteria en la gota de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, el desprendimiento de burbujas por la degradación del H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> a O<sub>2</sub> y H<sub>2</sub>O indicaba que la prueba era positiva. La prueba de oxidasa se realizó agregando oxidasa 1% (P/V) sobre un papel filtro de 3 x 1 cm, y sobre el reactivo se adicionó una colonia de bacteria, la presencia de un color azul después de 10 seg, indicaba que la prueba era positiva y la bacteria contenía citocromo C.

Por otro lado se realizaron ensayos de resistencia a los antibióticos carbenicilina, kanamicina y rifampicina para confirmar si las cepas presentaban la resistencia natural o

la presencia de plásmidos con marcador de selección para resistencia a antibióticos. Para ello se realizaron los ensayos través del método de dilución en agar usando una concentración de 50 µg/mL. La concentración de los antibióticos se determinó a partir de la revisión de artículos y escogiendo a través de la moda el número que más se repetía en los ensayos descritos en los artículos. En tubos se preparó la concentración del antibiótico y se le agregó a cada tubo 20 ml de medio LB, homogenizando suavemente el antibiótico con el medio y agregando el contenido de cada tubo en cajas de Petri vacías previamente esterilizadas. Las cajas de Petri se sembraron por agotamiento y se incubaron a 30°C por 24 h, al siguiente día se observa la presencia o ausencia de colonias en el medio de cultivo. Los ensayos se realizaron por duplicado para cada antibiótico y cada cepa.

Se realizó la caracterización molecular de las cepas usando oligonucleótidos para marcadores característicos (Deeba et al., 2014) (Tabla 6).

**Tabla 6** Secuencias de oligonucleótidos de *A. tumefaciens* (Deeba et al., 2014)

| Cepas de <i>A. tumefaciens</i> | Gen      | Sentido | Secuencia 5'-3'             | Longitud esperada del fragmento (pb) |
|--------------------------------|----------|---------|-----------------------------|--------------------------------------|
| C58                            | C58 GlyA | Directo | CCACCACCACGACGCAC<br>AAGTCT | 423                                  |
|                                |          | Reverso | TGCCGAGACGGACACCC<br>GAC    |                                      |
| EHA101 y<br>EHA105             | pTiBo542 | Directo | CCCGCTGAGAATGACGC<br>CAA    | 766                                  |
|                                |          | Reverso | CCTGCGACACATCGTTG<br>CTGA   |                                      |
| EHA101                         | nptI     | Directo | CTGCGATTCCGACTCGT<br>CCA    | 572                                  |
|                                |          | Reverso | CGGGCAATCAGGTGCGA<br>CA     |                                      |
| LBA4404                        | Ach5FtsZ | Directo | GAACTTACAGGCGGGCT           | 369                                  |
|                                |          | Reverso | CGCCGTCTTCA<br>GGGCACTTTCA  |                                      |

Las concentraciones de los reactivos para PCR fueron las siguientes: Buffer de reacción 1X, MgCl<sub>2</sub> 1,5 mM, mezcla de dNTPs 0,2 mM, oligonucleótidos 0,5 µM de cada uno y polimerasa 0,025 U/µL y las condiciones de temperaturas fueron: desnaturalización inicial a 94°C durante 7 min, 30 ciclos de desnaturalización a 94° C durante 20 seg, hibridación

a 61°C durante 20 seg, extensión a 72°C durante 40 seg, y una extensión final a 72°C durante 30 min. Los productos de PCR se sometieron a electroforesis en gel de agarosa al 1,0% en buffer TAE 0.5X (40 mM Tris-acetato, 1 mM EDTA pH 8,1) y teñidos con bromuro de etidio para su visualización. Se tomó en cuenta una muestra para control absoluto con agua molecular estéril.



## 4 RESULTADOS Y DISCUSION

Los resultados asociados a los objetivos de este trabajo se presentan en las siguientes secciones:

1. Identificación de una secuencia de ADN codificante de un posible LTP a partir de *Chamamelum nobile*.
2. Caracterización in silico de una secuencia de aminoácidos putativa de un LTP a partir de *Chamamelum nobile*
3. Aproximación al proceso de clonación de una secuencia de ADN codificante de un posible LTP a partir de *Chamamelum nobile* por recombinación homóloga en levadura.

Además de estos resultados, se logró evidencia que lleva a pensar en la posibilidad de aplicación de AMPs en control de *R. solani*, y sus perspectivas en transformación genética de plantas de interés en la industria, descritos en las secciones:

4. Evaluación biológica de fluido apoplástico, que posiblemente contiene AMPs, de *C. nobile* sobre *R. solani*.
5. Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Agrobacterium tumefaciens* para transformación genética de cultivos de interés industrial con genes LTP.

En el desarrollo de este trabajo se lograron los siguientes productos, que se adjuntan en el anexo 2:

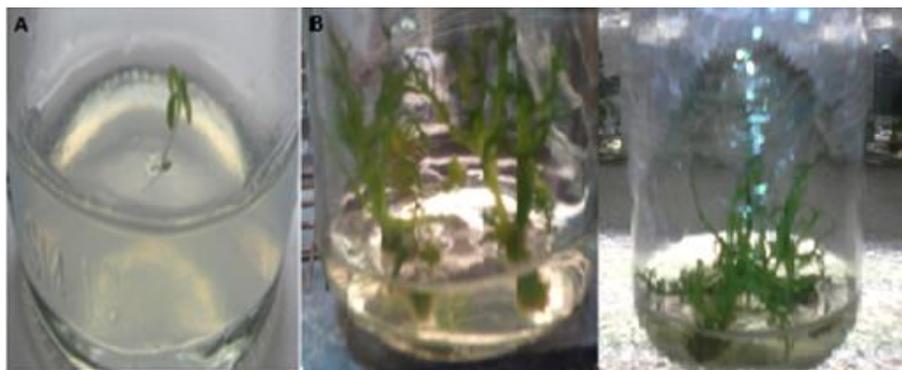
- a. Acta de premiación en el 13 Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología donde se obtuvo el primer puesto.
- b. Ponencia en Bogotá Microbial Meeting 2015.

c. Publicación. López-Pazos, S. A., Portela, D. D., Rojas, A., & CQhapparro-Giraldo, A. (2014). Los péptidos antimicrobianos de origen vegetal con un breve enfoque en las proteínas de transferencia de lípidos: minirevisión. *Mutis*, 4(1), 11.

d. Obtención de una beca de Joven Investigador de Colciencias (RAG 1207).

#### 4.1 Identificación de una ADN codificante de un LTP desde *Chamaemelum nobile*

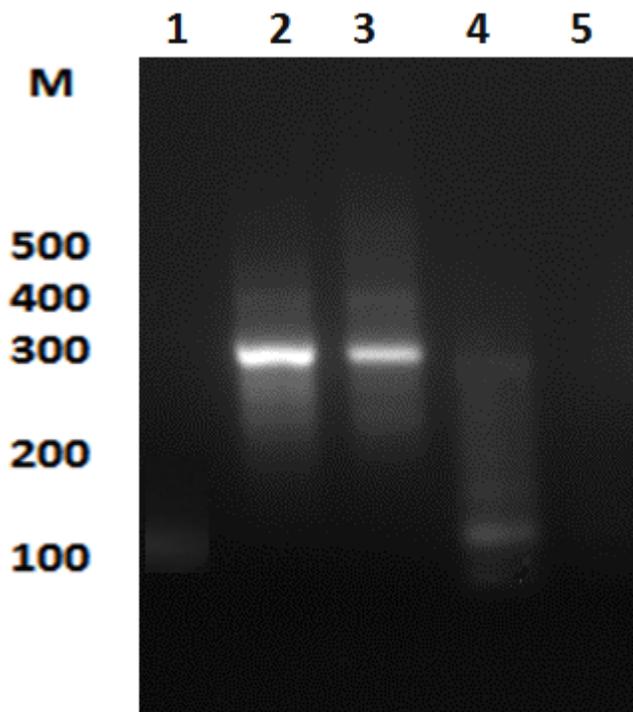
El cultivo *in vitro* de las semillas de manzanilla romana en medio MS suplementado con hormonas de crecimiento BAP (0,1mg/L), ANA (0,5 mg/L) y GA3 (0,25 mg/L) (Figura 3) permitió la germinación y crecimiento de plántulas adecuadas para extracción de ADN genómico.



**Figura 3.** Propagación *in vitro* de *C. nobile*. A. Germinación semilla de *C. nobile* B. Plántulas de *C. nobile*.

Posteriormente, se evaluaron 10 juegos de oligonucleótidos seleccionados de la revisión bibliográfica (Tabla 4), con los cuales se lograron obtener dos amplificados que corresponderían a una proteína de transferencia de lípidos (LTP) (~300 pb) y a una defensina (NusA-Im-Def) (~156 pb) (Figura 4). Las secuencias obtenidas de estos productos de PCR fueron comparadas con las depositadas en la base de datos de nucleótidos del NCBI, usando el programa BLASTn, con el fin de confirmar su identidad. La secuencia correspondiente al producto obtenido con los oligonucleótidos para el AMP NusA-Im-Def no dio correspondencia y se descartó del estudio, mientras que la secuencia obtenida para el producto de PCR amplificado con los oligonucleótidos LTP presentó la mejor correspondencia (identidad 98%,  $E=3e-137$ , cobertura 94%) con un LTP de tomate

(*Solanum lycopersicum* var. *cerasiforme*) (accesión en NCBI HM367634), seguido por otras dos secuencias asociadas a LTPs de tomate, la primera de la variedad mill (accesión en NCBI AK224707.2) y la segunda cepa Heinz (accesión en NCBI AC254745.4) con identidad de 97% en ambos casos, valores E de  $6e-135$  y  $4e-131$  respectivamente, y coberturas de 97 y 94% en orden para cada uno. El tamaño de la secuencia de ADN aislada es de 299 pb, que codificaría un putativo LTP de 94 aminoácidos. La secuencia obtenida no contiene secuencia de poliadenilación, ni la secuencia codificante del péptido señal, por lo tanto codifica para el péptido maduro del LTP de *C. nobile* (Figura 5). Esta familia de péptidos se caracteriza por presentar una secuencia señal y un péptido maduro. La secuencia señal se encarga de dirigir al péptido hacia la membrana citoplasmática en donde es clivada en el extremo N-terminal por una aminopeptidasa y el péptido maduro es exportado hacia el espacio intercelular donde ejerce su actividad biológica (Pagnussat *et al.*, 2012).



**Figura 4.** Amplificación de AMPs a partir de ADN genómica de *C. nobile*. M: Marcador 500 pb (Thermo Scientific). Carril 1: amplificado gen de actina en *C. nobile*. Carril 2: Control positivo primers amplificado gen codificante de LTP en tomate (*Solanum lycopersicum* var

cerasiforme) como control positivo para el LTP. Carril 3: amplificado que correspondería con LTP en *C. nobile*. Carril 4: amplificado que correspondería con Nus A Def en *C. nobile*. Carril 5: control absoluto.

```

1 atggcaccatggatccgcactaacttgtggccaggttgaatct
M A P H G S A L T C G Q V E S
46 gggtagctccatgcctcccttatcttcagggaaaaggccctcta
G L A P C L P Y L Q G K G P L
91 ggaggggtgttgtcgtggagttaagggtctattgggcgcagccaag
G G C C R G V K G L L G A A K
136 acccccgcggatcgaaagacagcatgcacttgcctcaaatcagct
T P A D R K T A C T C L K S A
181 gctaatgctattaaaggccttaatttaggcaaagccgctggtata
A N A I K G L N L G K A A G I
226 cctagtgttggcgtaaacattccttacaagatcagccctttt
P S A C G V N I P Y K I S P F
271 actgactgctctaagggttcagaaagctttg 300
T D C S K V Q K A L

```

**Figura 5.** Secuencia de nucleótidos y aminoácidos del LTP de *C. nobile* identificada.

## 4.2 Caracterización *in silico* de una secuencia de ADN codificante de un LTP en *Chamaemelum nobile*

La comparación de la secuencia de aminoácidos putativa del LTP de *C. nobile*, con otros LTPs de plantas, indica que la secuencia de aminoácidos aislada de *C. nobile* posee ocho residuos de cisteína conservados estabilizados por cuatro puentes disulfuros característicos de la familia de LTPs (Figura 6) (Shin et al., 2016).



**Figura 6.** Comparación del LTP de *C. nobile* (recuadro rojo) con LTPs en diferentes especies de plantas

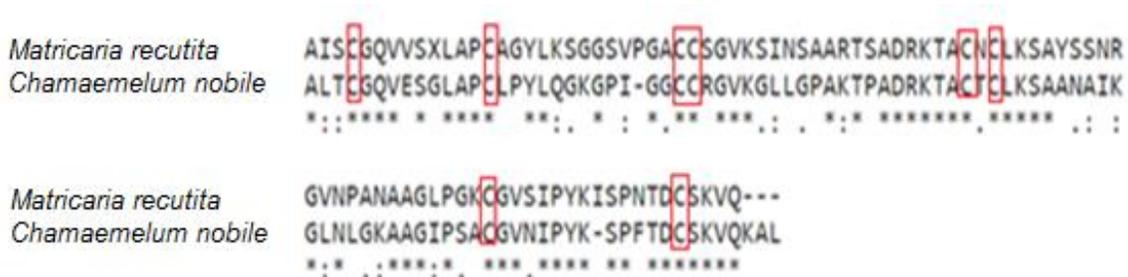
Las líneas negras en la parte superior señala la formación característica de puentes disulfuros. Los recuadros rojos indican los residuos de cisteína conservados. Los asteriscos indican coincidencias de aminoácidos. Un punto indica sustituciones semiconservativas. Los dos puntos indican la presencia de una sustitución conservativa.

Las sustituciones en una secuencia de aminoácidos de un LTP puede impedir la habilidad de unirse y transferir lípidos, que podría afectar la interacción del péptido endógeno con fosfolípidos de membrana del invasor, aunque no se puede asegurar que estas sustituciones afectan la actividad inhibitoria del patógeno, como se ha evidenciado en estudios como el realizado por Camue *et al.*, (1995), quienes aislaron un LTP en cebolla denominado Ace-AMP, el cual presentó una sustitución Asp48Leu que afectó su unión y la transferencia de fosfatidilcolina, sin embargo tuvo actividad antimicrobiana sobre 12 hongos en concentraciones  $\leq 10\mu\text{g/mL}$ . En otro estudio realizado por Ge *et al.*, (2003) indicaron que la actividad antimicrobiana de un LTP aislado de arroz no se afectó cuando se realizó la sustitución de un residuo conservado (Asp45Ala), aunque no se evidenció la unión y transferencia de lípidos, mientras que cuando se realizó la sustitución de un residuo conservado de Tyr17Ala en la hélice H1, está mutación afectó la formación de un puente de hidrogeno con Asn64, con efecto negativo en la estabilidad de la molécula y su actividad

antimicrobiana sobre *Pyricularia oryzae*. El LTP de *C. nobile* posee una sustitución Asp48Cys que podría influenciar su unión a membranas y la transferencia de fosfatidilcolina, de acuerdo a lo expuesto por Cammue *et al.*, (1995). Además se evidencia la presencia de los residuos conservados Asp45 y Tyr17, por lo tanto la proteína no tendría cambios con respecto a su capacidad de unión a lípidos saturados y estabilidad de la estructura proteica, de acuerdo con Ge *et al.*, (2003).

Con el fin de determinar la presencia de LTPs en otras especies de manzanilla, se sometió la secuencia de aminoácidos putativa identificada en *C. nobile* a una búsqueda en la base de datos del NCBI de secuencias de expresión (ESTs) de manzanilla, la cual arrojó la expresión de un LTP en hojas de manzanilla germánica (*Matricaria recutita*) (accesión en NCBI ES7900332.1). La secuencia de aminoácidos identificada en *C. nobile* presenta una identidad del 60%,  $E=3e-13$  y cobertura de 21%, con el LTP expresado en hojas de *M. recutita*.

Por otro lado se realizó la comparación entre las secuencias del LTP putativo de *C. nobile* y el LTP de *M. recutita* para determinar si existen diferencias entre los LTPs; con este análisis se determinó que las secuencias presentaban 11 sustituciones conservativas y nueve sustituciones semiconservativas, aunque las dos secuencias de aminoácidos conservaban los ocho residuos de cisteína característicos de la familia LTP, estas variaciones en las secuencias indican que el LTP de *C. nobile* identificado en este estudio es diferente al LTP de *M. recutita*, el único anteriormente reportado en manzanilla (Figura 7).



**Figura 7.** Alineamiento de secuencias de aminoácidos de LTPs de manzanilla germánica y *C. nobile*. Los recuadros rojos indican los residuos de cisteína conservados. Los asteriscos indican coincidencias de aminoácidos en las secuencias analizadas. Los dos

puntos indican la presencia de una sustitución conservativa. Un punto indica sustituciones semiconservativas.

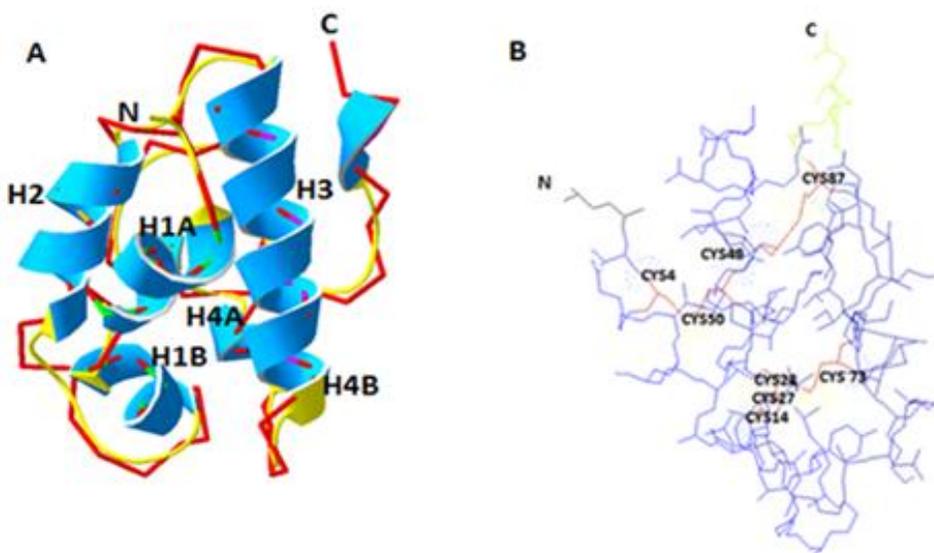
El peso molecular teórico del LTP es de 9,4 kDa, el punto isoeléctrico es de 9,39, además el péptido está conformado por 56 residuos alifáticos (carga neutra), 13 residuos con carga positiva y tres residuos con carga negativa; la presencia de residuos con carga positiva está relacionada con la conformación catiónica que presentan los LTPs en un pH neutro. La hidropaticidad es de 0,150, lo cual señala la presencia de la cavidad hidrofóbica donde se realiza interacción con lípidos. La presencia de la cavidad hidrofóbica es esencial en la familia de LTPs, porque permite la unión y transferencia de lípidos, una de las funciones más importantes de estos péptidos, como se ha evidenciado en experiencias como la de un LTP aislado de trigo, que poseía una cavidad hidrofóbica capaz de embeber completamente protaglandina B2 y posteriormente transferirla entre fracciones microsomales y mitocondria (Tassin-Moidront *et al.*, 2000), o en un LTP aislado de lenteja cuya cavidad hidrofóbica se unía a regiones hidrofílicas de ácidos grasos saturados (ácido palmitoleico, linoleico, linoleneico, oleico y elaidico) (Melnikova *et al.*, 2015). El índice alifático del LTP de *C. nobile* identificado en este estudio es de 87.34, este índice determina el volumen ocupado por las cadenas laterales alifáticas, y está directamente relacionado con la termoestabilidad de las proteínas globulares, entre mayor sea su valor mayor será su termoestabilidad (Shewald y Jakubke, 2009).

En cuanto a la vida media del LTP identificado en este estudio, se estima con respecto a células de mamíferos (eritrocitos humanos) que es de 4,4 h, en levaduras es mayor a 20 h, y en *E. coli* es mayor a 10 h. De acuerdo a estos resultados el tiempo transcurrido entre la síntesis y degradación del 50% de la proteína LTP de *C. nobile* en eucariotas superiores podría ser similar al tiempo transcurrido de los eritrocitos en humanos, los residuos que conforman el extremo N- terminal son esenciales en la degradación de una proteína, si hay presencia de Arg, Lys, Phe y Gln, Tyr, Trp, Leu, Ile o His la vida media es menor de dos horas en mamíferos, mientras que cuando hay presencia de Met, Gly, Pro, Ala, Cys, Gly, Thr, Ser o Val la vida media es igual o mayor a 100 horas (Grisolia *et al.*, 1981). El extremo N-terminal del LTP de este trabajo contiene residuos de Gln, Lys y Pro por lo tanto tiene una vida media relativamente corta. Los péptidos que poseen un tiempo de vida media largo son estables a la digestión con enzimas y este es un criterio importante para determinar la alergenicidad de un péptido (Sampson, 1999). El tiempo de vida media del

LTP de *C. nobile* identificado en este estudio es (mayor a 20 h en levaduras), es similar al demostrado en un LTP identificado en lenteja con una vida media menor a 40 h con respecto a una levadura (Gizatullina *et al.*, 2013). Esta vida media es determinante en la eficiencia de la transferencia de lípidos que es una de las funciones característica de esta familia de lípidos, como se evidenció con la vida media del LTP en lenteja que afectó la estabilidad del péptido, sin embargo se evidenció que la inestabilidad del LTP permitía la transferencia rápida de lípidos con respecto a otros LTPs que presentaban una vida media mayor a 40 h (Gizatullina *et al.*, 2013), lo cual indicaría que el LTP de manzanilla romana podría realizar la transferencia lípidos entre fracciones microsomales y mitocondrias de forma similar al LTP identificado en lenteja.

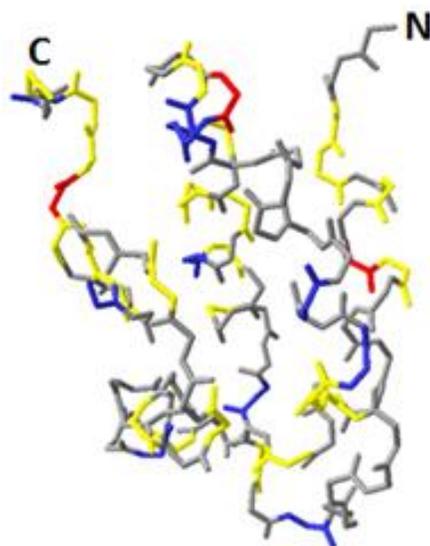
El modelo teórico 3D se calculó utilizando como molde un LTP de *N. tabacum* obtenido de forma experimental con cristalografía de rayos x, depositado en la base de datos de PDB (código de acceso PDB=1T12A). Se escogió como molde el LTP de *N. tabacum* porque la secuencia de aminoácidos putativa identificada en *C. nobile* presentó un mayor porcentaje de identidad y cobertura con este modelo (ID del 73%, E=2e-42 y cobertura de 92%) y es el criterio que se tiene en cuenta cuando se realiza modelamiento teórico de estructuras proteicas por homología con el fin de garantizar una predicción estructural de calidad. La predicción estructural del LTP obtenido en este trabajo está conformado por cuatro alfa-hélices, la primera hélice (residuos Cys4-Ser9) presenta dos estructuras H1A formada por dos plegamientos en los residuos Gln6 y Ser9, y H1B (residuos Pro13-Leu18) formada por tres plegamientos en los residuos Pro13, Leu15, Tyr17, la segunda hélice H2 (residuos Cys27-Leu35) contiene tres plegamientos en los residuos Arg29, Gly30, Leu35, la tercera hélice H3 (residuos Ala42-Ala57) contiene siete plegamientos en los residuos Asp43, Lys45, Ala47, Thr49, Leu51, Lys52, Ala54, Ala55 y la cuarta hélice H4 (residuos Lys63-Asn66) está conformada por dos estructuras, H4A (residuos Pro70-Gly72) contiene un plegamiento en el residuo Gly64 y H4B (residuos Ser96-Lys98) presenta un plegamiento en el residuo Ser71, el extremo C- terminal presenta un giro de hélice con un plegamiento en el residuo Ser96. Las cuatro alfa-hélices están conectadas por tres bucles cortos, L1 (residuos Ile19-Gly26), L2 (residuos Lys36-Lys41) y L3 (residuos Ile58-Cys62). La estructura es estabilizada por cuatro puentes disulfuros formados por los residuos Cys4-Cys50, Cys14-Cys27, Cys28-Cys73 y Cys48-Cys87 (Figura 8).

Los LTPs se dividen en dos grupos de acuerdo a su peso molecular y conformación estructural; los LTPs tipo 1 poseen pesos moleculares entre 9 -10kDa y están conformados por cuatro alfa-hélices, caracterizados por tener actividad inhibitoria sobre fitopatógenos, mientras que los LTPs tipo 2 tienen pesos moleculares de 7kDa y están conformados por tres alfa-hélices, este tipo de péptidos no presentan actividad inhibitoria sobre fitopatógenos (Finkina et al, 2015). Teniendo en cuenta las características de los LTPs, el peso teórico obtenido para la secuencia de aminoácidos identificada en *C.nobile* (9,4 kDa) y la predicción de su estructura 3D (4 alfa-hélices) señalarían que el péptido identificado en este estudio pertenecería a la familia de LTPs tipo 1 a los cuales se les ha evidenciado actividad antimicrobiana sobre bacterias y hongos fitopatógenos como *B. megaterium* (IC50 0,8 µg/mL) y *Sarcina lutea* (IC50 8 µg/mL), *Alternaria. Brassicola* (IC50 2.5 µg/mL), *B. cinérea* (IC50 3 µg/mL), *F. oxysporum sp. pisi* (IC50 3,5 µg/mL), *F. oxysporum sp. lycopersicum* (IC50 3 µg/mL), *A. niger* (IC50 10µM) (Gizatullina (Gizatullina et al., 2013; Fan et al., 2013; Camue et al.,1995)



**Figura 8.** Estructura teórica de la proteína 3D de LTP de *C. nobile*. A. Las estructuras alfa hélices están representadas en color azul, los bucles están representadas en color amarillo. B. Esqueleto de la estructura del LTP y la ubicación de los residuos Cys conservados.

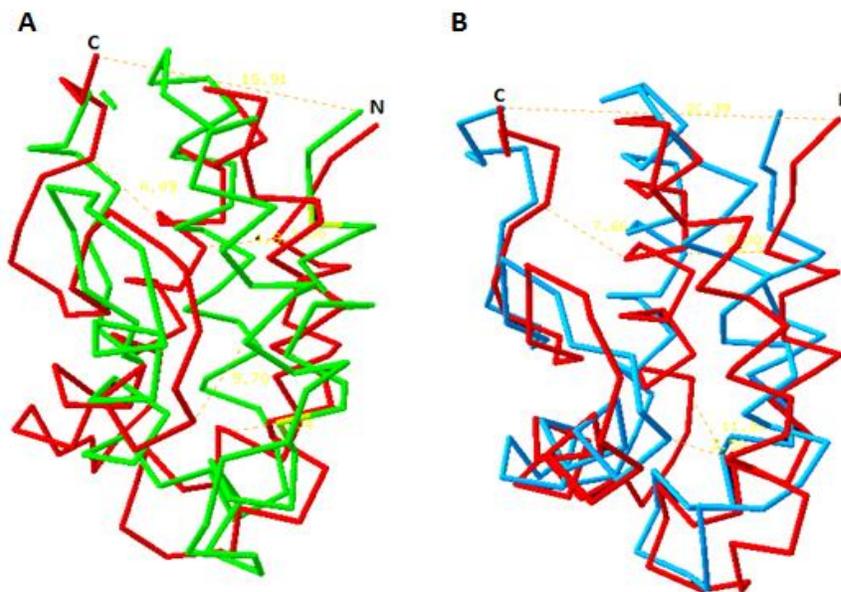
Por otro lado la estructura presenta 52 residuos hidrofóbicos, la mayoría de ellos se encuentran en el interior de la proteína formando una cavidad hidrofóbica característica de esta familia, conformada por los residuos Ala1, Leu2 (N-terminal), Gly5, Val7, Leu11, Ala12, Pro13, Leu15, Pro16, Leu18 (H1), Gly20, Gly22, Pro23, Ile24 (L1), Gly25, Gly26, Gly30, Val31, Gly33, Leu34, Leu35, Gly36, Pro37 (H2), Ala38, Pro41 (L2), Ala42, Ala47, Leu51, Ala54, Ala55 (H3), Ala57, Ile58, Gly60, Leu61 (L3), Leu63, Gly64, Ala66, Ala67, Gly68, Ile69, Pro70, Ala72 (H4), Gly74, Val75, Ile77, Pro78, Ile81, Pro83, Phe84, Val90, Ala93, Leu94 (C-terminal) (Figura 9).



**Figura 9.** Estructura de la distribución de residuos de aminoácidos del LTP de *C. nobile*. Los residuos básicos están representados en azul; los residuos ácidos representados en rojo, residuos polares representados en amarillo y residuos no polares representados en gris.

La estructura del LTP de *C. nobile* es similar a las descritas en otras especies de plantas como arroz, lenteja y cebolla (Lee *et al.*, 1998; Lin *et al.*, 2005; Finkina *et al.*, 2013). Con el fin de determinar semejanzas y diferencias con estructuras de LTPs que poseen actividad antimicrobiana se comparó la predicción teórica de la estructura 3D del LTP de *C. nobile* con la estructura teórica de un LTP de cebolla (Ace-AMP) (Camue *et al.*, 1995), y la estructura experimental de un LTP de semillas de lentejas denominado Lc-LTP2 (Finikina *et al.*, 2007; Gizatullina *et al.*, 2013). La superposición del esqueleto del carbono alfa del modelo 3D del LTP de *C. nobile* con su contraparte de Ace-AMP indicó diferencia para

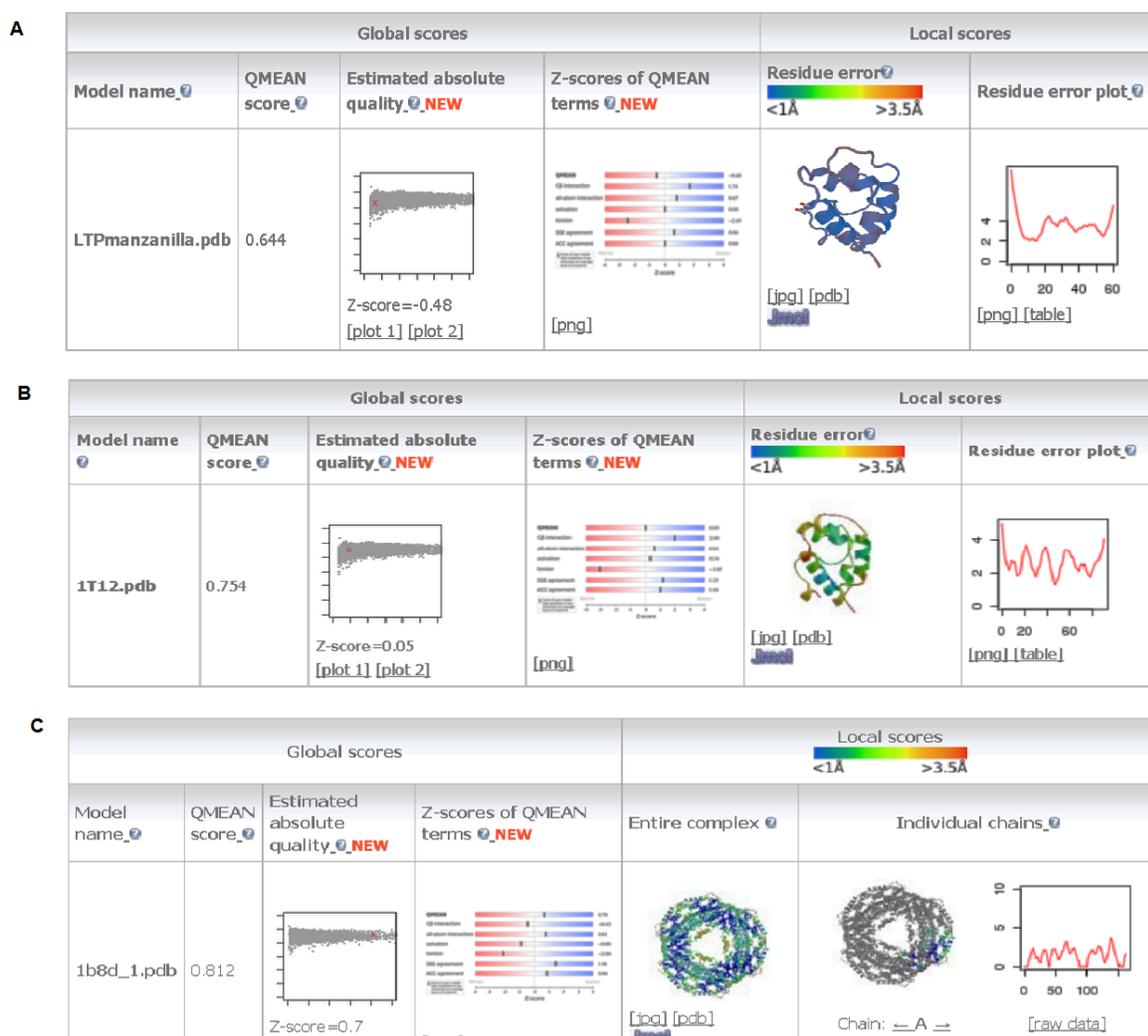
puentes disulfuros de 8,27 Å, y para los 94 residuos de 15,91 Å (Figura 10). La superposición del esqueleto del carbono alfa del modelo 3D del LTP de *C. nobile* con la estructura de Lc-LTP2 presenta una diferencia de 7,52 y 20,39Å para puentes disulfuros y los 94 residuos (Figura 9). Ace-AMP presenta actividad antimicrobiana sobre 12 hongos con concentración letal 50 (CL50)  $\leq 10\mu\text{g/mL}$  (*A. brassicola*, *A. pisi*, *B. cinérea*, *C. lindemuthianum*, *F. culmorum*, *F. oxysporum f sp, pisi*, *F. oxysporum f sp. lycopersici*, *N. haenaticocca*, *P. betae*, *P. tritici-repentis*, *P. oryzae*, *V. dahliae*) y 10 tipos de bacterias (*B. megaterium*, *S. lutea*, *A. tumefaciens*, *A. brasilense*, *E. carotovora*, *E. coli*, *P. solanacearum*, *P. syringae*) con CL50 entre 100-200  $\mu\text{g/mL}$  (Camue *et al.*, 1995), mientras que Lc-LTP2 posee una actividad antimicrobiana sobre *A. tumefaciens* con una CL50 de 40,5  $\mu\text{M}$  (Finikina *et al.*, 2007).



**Figura 10.** Comparación entre estructuras 3D del LTP de *C. nobile* y los modelos 3D de Ace-AMP de cebolla y Lc-LTP2 de lenteja. A. LTPs de manzanilla romana (rojo) y cebolla (verde). B. LTPs de *C. nobile* (rojo) y de lenteja (azul). Las líneas punteadas amarillas señalan las diferencias de resolución teórica en puentes disulfuros.

La evaluación de la calidad del modelo del LTP de *C. nobile*, por el programa QMEAN, arroja un puntaje de 0,647, un Z- score 0,48, una resolución teórica menor a 1Å con una desviación de residuos mayor de 3,5 Å, mientras que la plantilla experimental 1T12 tiene un puntaje de 0,754, un Z score de 0,05, una resolución teórica y desviación de residuos

menor a 1 Å y mayor a 3,5 Å. De igual forma se realizó la validación del modelo con el gráfico de Ramachandran, el cual permite visualizar las combinaciones de ángulos diedros psi contra ángulos diedros phi en los aminoácidos de un polipéptido que contribuyen a la conformación de la estructura de la proteína, determinando los ángulos y torsiones de los enlaces de los aminoácidos permitidos, la estructura del LTP de *C. nobile* tiene un residuo en áreas no permitidas Gly25, el LTP con código de acceso 1T12 usado como molde presenta dos residuos en áreas no permitidas (Gly25 y Thr41), indicando que el modelo obtenido presenta un Z-score y residuos en ángulos y torsiones en niveles aceptados y permitidos validando su calidad (Figura 11).



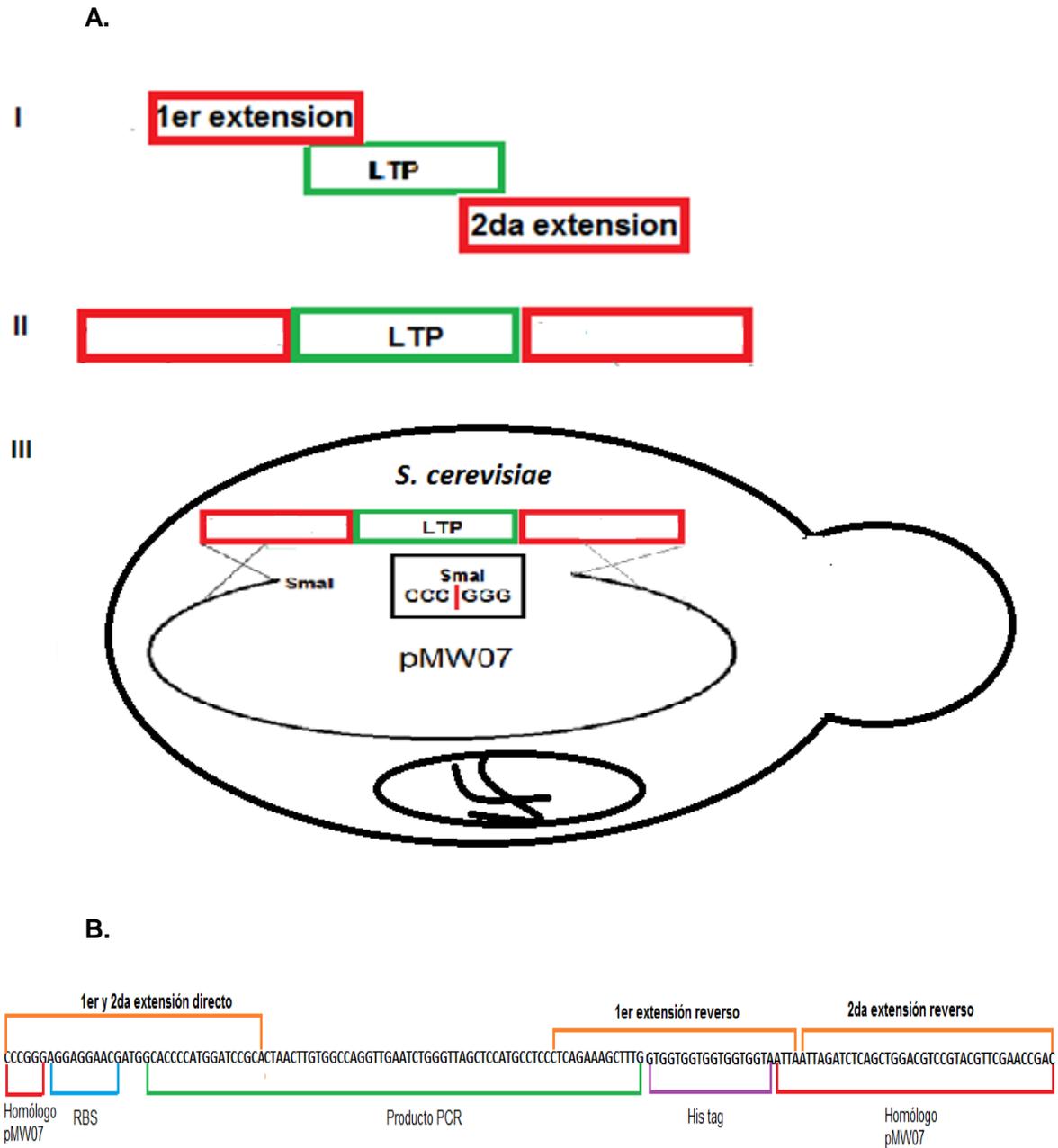
**Figura 11.** Evaluación de la calidad de la estructura 3D de LTP de *C. nobile*. Valor QMEAN, valor Z, resolución de la estructura y cuadro de desviación de los residuos de

LTP de *C. nobile*. B. valor Qmean, valor Z, resolución de la estructura y cuadro de desviación de los residuos de LTP del modelo experimental (PDB=1T12). C. Modelo experimental de alta calidad.

### **4.3 Estandarización de la clonación por recombinación homóloga, usando un LTP de *Chamaemelum nobile***

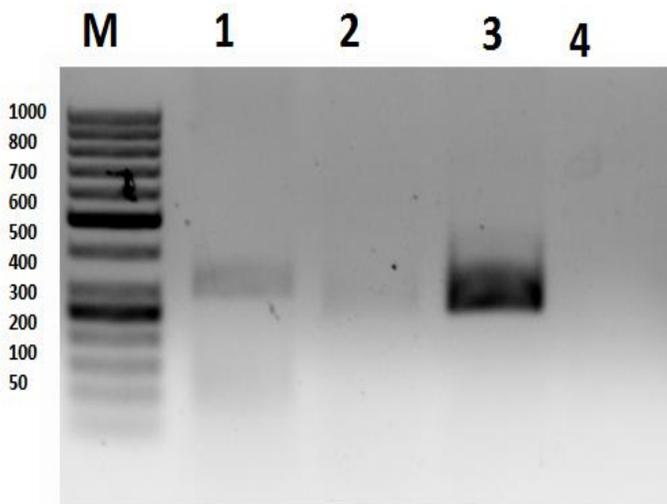
El producto de PCR aislado de *C. nobile* se clonó en el vector pMW07, que contiene un origen de replicación para levadura denominado OriCen, que le permite replicarse y dividirse al mismo tiempo que el ADN genómico de *S. cerevisiae*, además cuenta con un marcador de selección URA3 que permite el crecimiento de colonias transformadas en ausencia de uracilo. El vector cuenta con un origen de replicación de alto número de copias para *E. coli* (ColE1) y un promotor inducible pBAD del gen represor *araC* que induce expresión en *E. coli* y otras especies de bacterias.

Para realizar la clonación inicialmente se procedió a generar la homología del producto de PCR, usando el juego de oligonucleótidos para primera extensión con 17 y 27 nucleótidos homólogos a los extremos del vector digerido con la enzima de restricción SmaI (Figura 12). Esta primera extensión se realizó usando una PCR touchdown que permite cambios de temperatura de alineamiento en los ciclos para proporcionar una mayor especificidad entre las uniones oligonucleótido-molde (Figura 12). Después de esta primera amplificación se procedió a realizar una nueva amplificación del producto de PCR obtenido en la primera extensión con la finalidad de aumentar la homología en 40pb del primer producto, e insertar un sitio de reconocimiento del ribosoma al LTP para que pueda ser posteriormente expresado en *E.coli* (Figura 12 y 13).



**Figura 12.** Proceso de recombinación homóloga en *S. cerevisiae* (FY834)A. Esquema de la recombinación homóloga en el vector pMW07 digerido con SmaI. B. Secuencias

homólogas al vector pMW07 ubicadas en los oligonucleótidos directo y reverso (primera y segunda extensión) y el gen LTP (parcialmente por el espacio disponible).



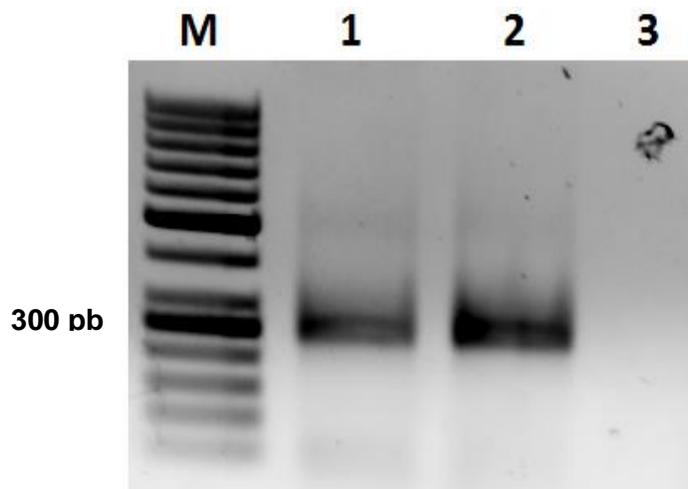
**Figura 13.** Amplificación LTP de *C. nobile*: Marcador de peso GeneRuler 100 pb (Thermo Scientific). Carril 1: LTP genómico. Carril 2: LTP primera extensión. Carril 3: LTP segunda extensión. Carril 4: control absoluto.

La transformación del producto de PCR correspondiente al LTP de *C. nobile* en *S. cerevisiae* FY834, obtenido en la segunda extensión, permitió evidenciar colonias grandes de color blanco con aspecto cremoso y textura semejante a la cera propias de la levadura *S. cerevisiae*, después de tres días de incubación en medio URA (-). En el control negativo no se observa la presencia de colonias en el medio URA (-) debido a que la transformación se realizó solo con el vector digerido, sin el fragmento de ADN que proporciona las secuencias homologas con el vector y permiten su recircularización a través de recombinación homóloga, con transcripción del gen *ura3* necesario para síntesis de uracilo, y por lo tanto la cepa no puede crecer en ausencia de uracilo (Figura 14).



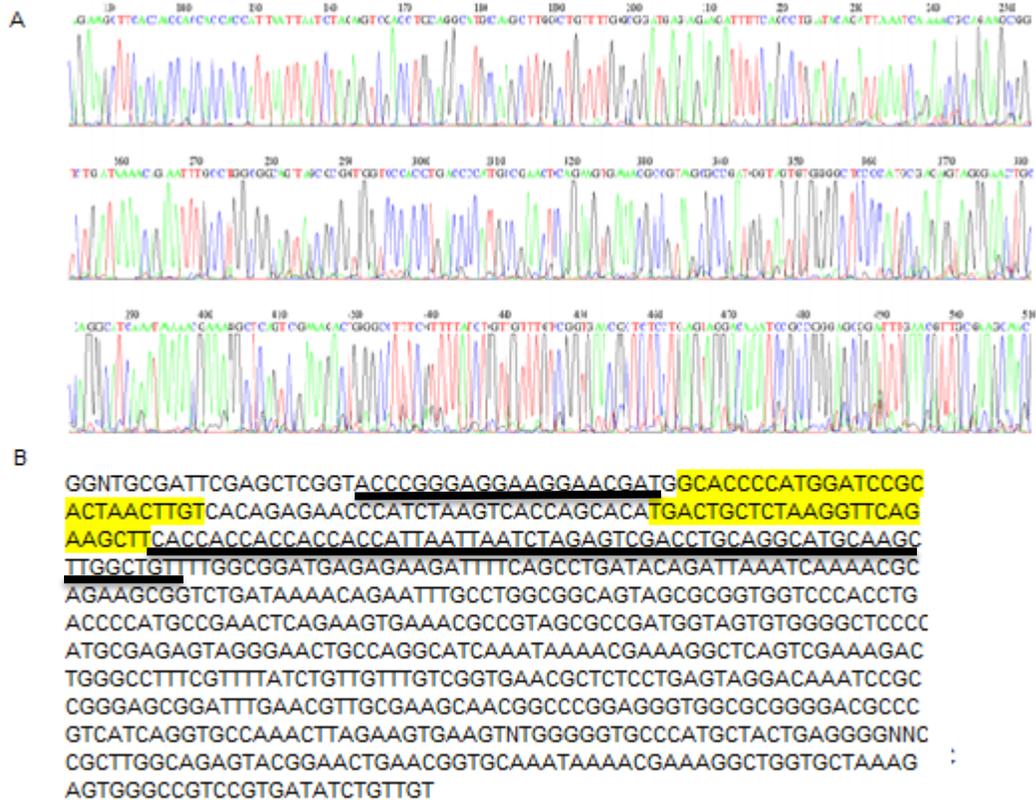
**Figura 14.** Resultado de la transformación del gen LTP de *C. nobile* en *S. cerevisiae*. A. y B: Crecimiento de colonias en medio URA- transformadas con el gen LTP. C: control negativo.

Para determinar que se realizó la correcta inserción del LTP en el vector se realizó la extracción de ADN plasmídico (100 ng/ul) y se realizó una PCR para amplificar el gen LTP, como se describió previamente. Se observó la presencia de un producto que presenta el tamaño esperado (~300 pb) que indicaría de forma preliminar la presencia del posible gen codificante del LTP dentro del vector (Figura 15).



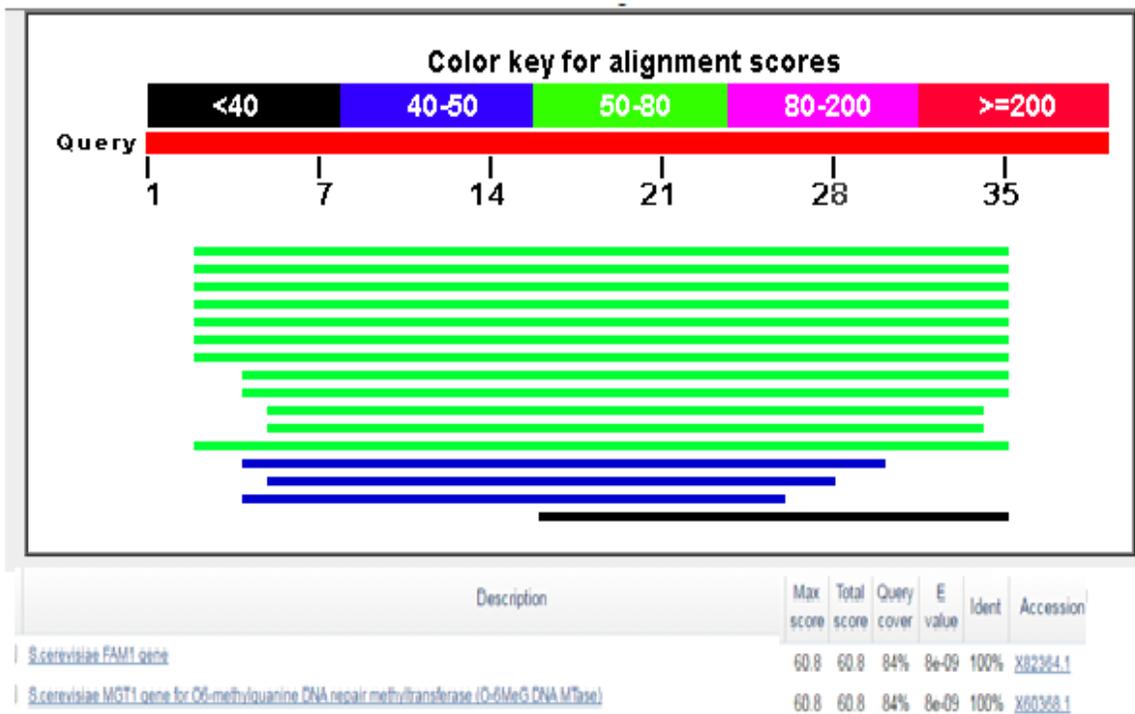
**Figura 15.** Amplificación del LTP de *C. nobile* a partir de ADN plasmídico de *S. cerevisiae*. M: Marcador 100 pb (Thermo Scientific). Carril 1 y 2: Amplificación del posible LTP. Carril 3: Control negativo de la reacción de PCR (H<sub>2</sub>O)

La secuenciación del vector para comprobar la clonación del gen codificante del LTP en manzanilla *C. nobile*, determinó la inserción de las primeras 27 pb y las últimas 29pb de la secuencia del gen en el vector, con una secuencia intermedia que no coincidió con la secuencia del gen codificante del LTP (Figura 16).



**Figura 16.** Secuencia de ADN obtenida del proceso de clonación mediante recombinación homóloga en levadura usando el vector pMW07. A. electroferograma. B. Secuencia directa 5'-3' donde están subrayados los oligonucleótidos directo y reverso, y en amarillo el gen LTP parcial.

Con el fin de analizar este resultado se sometieron las secuencias de los oligonucleótidos, que son homólogos al vector pMW07, a una búsqueda en el genoma de *S. cerevisiae* de secuencias similares por BLASTn (NCBI). Este análisis indicó que los oligonucleótidos reversos poseen una identidad de 100% y un valor E de  $8e-9$  con un gen codificante de CoA ligasa intermediario de la respiración celular en mitocondria de *S. cerevisiae* (FAM1-1), y un gen codificante de una enzima reparadora de ADN (MTG1) (Figura 17).



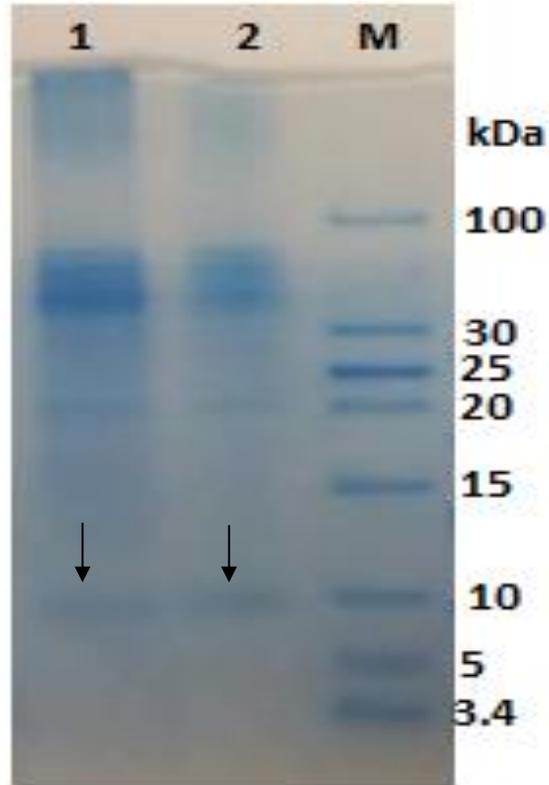
**Figura 17.** Resultados del análisis de BLASTn con el oligonucleótido reverso. El oligonucleótido tiene similitud con secuencias del genoma de la especie de levadura utilizada en este estudio.

De acuerdo a estos datos se puede inferir que el sitio de homología del vector con los oligonucleótidos reversos (primera y segunda extensión) presenta alta similitud con sitios codificantes en el genoma de la levadura. Teniendo en cuenta esto los productos de PCR tenían una menor probabilidad de insertarse dentro del vector, porque podían ser recombinados con secuencias homólogas presentes en el ADN genómico de *S. cerevisiae*. Es importante resaltar que la levadura es transformada durante su fase exponencial, etapa en la que se aumenta su división celular y la recombinación homóloga está activa como mecanismo de reparación de rupturas del ADN, por lo tanto la recombinación de los fragmentos de PCR con el genoma es viable. La presencia de los primeros y últimos nucleótidos del producto de PCR presentes dentro del vector, indicarían que se produjo la recombinación con un fragmento de PCR inespecífico que se originaría en los primeros ciclos de la reacción de PCR. Se ha determinado que el ADN cromosómico de levadura disminuye la eficiencia de transformación y ensamblaje eficiente de los fragmentos de PCR (Gibson *et al.*, 2010). Kujiper *et al.*, (2013) evidenciaron que se producen falsos positivos (10-80%) en la recombinación homóloga de levadura, por la recircularización del vector,

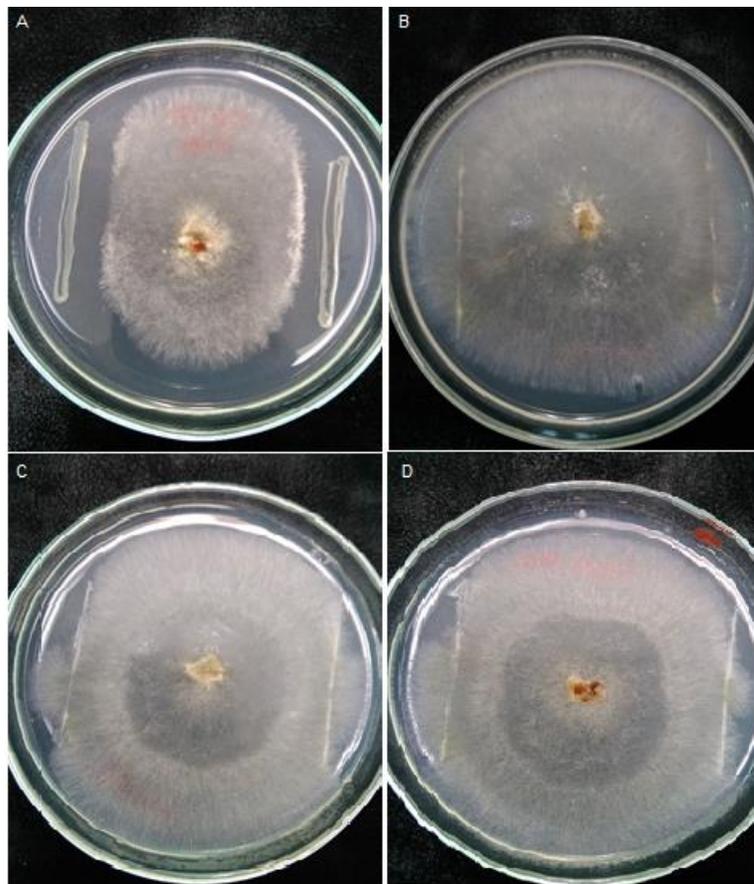
debido a la obtención de regiones homologas cuando es digerido (usando enzimas de restricción que generan cortes cohesivos la probabilidad de recircularización es 2,5 veces mayor que con enzimas de restricción que hacen cortes romos), y este vector puede propagarse y el microorganismo crecería en los medios de selección, por la presencia del episoma de levadura y marcadores correspondientes. Además los autores anotan otro factor que afecta la eficiencia de la recombinación, y es la obtención de secuencias homologas con el genoma de la levadura. Probablemente el producto de PCR asociado a un LTP de manzanilla romana sufrió recombinación con el ADN genómico de *S. cerevisiae*, y por lo tanto es necesario utilizar un vector con una menor similaridad con regiones del genoma de la levadura a transformar.

#### **4.4 Evaluación biológica de péptidos en el fluido apoplástico de manzanilla romana sobre *Rhizoctonia solani***

Se procedió a realizar la evaluación biológica del fluido apoplástico de manzanilla romana sobre *R. solani*, la concentración de proteína en este fluido fue de 2,37 mg/mL. El extracto proteico contiene proteínas de alto peso molecular (desde 100 kDa) y péptidos de bajo peso molecular (10 kDa), la presencia de péptidos de bajo peso molecular de aproximadamente 10 kDa, indicaría que posiblemente corresponden a LTPs, incluyendo péptidos señal y maduro (Figura 18). Las pruebas de antagonismo indicaron un efecto inhibitorio sobre *R. solani*, a una concentración de 1 µg/mL (Figura 19). Esta concentración es menor a la reportada para otros hongos, donde se ha registrado actividad antimicrobiana de aceites esenciales y extractos de *C. nobile* sobre hongos miceliales como *Penicillium sp*, *F. culmorum*, *A. candidus* y *A. niger* (IC50 900000 µg/mL) (Saderi *et al.*, 2005; Dezfoil *et al.*, 2012).



**Figura 18.** Perfil electroforético SDS PAGE Tricina. Carril 1: Fluido apoplástico de manzanilla romana. Carril 2: Fluido apoplástico de manzanilla romana. M. Marcador de proteínas de bajo peso molecular (Thermofisher Scientific).



**Figura 19.** Ensayo de antagonismo de extracto del fluido apoplástico de *C. nobile* sobre *R. solani*. A. Control positivo con la cepa PAO de *P. aeruginosa*. B. Control negativo (agua). C y D. Efecto de *R. solani* con fluido apoplástico de *C. nobile* a una concentración de proteína de 0,6 ug/ml (C) y 1 ug/ml (D).

La localización de los LTPs en la pared celular, y su exteriorización por una secuencia señal al espacio intercelular ha sugerido su presencia en el fluido apoplástico (Pyee *et al.*, 1994; Carvalho *et al.*, 2004, Carvalho y Gómez-Moreira, 2007), como se ha evidenciado en fluido apoplástico de remolacha azucarera, brotes de soya y hojas de *A. thaliana*. En remolacha azucarera se aislaron dos LTPs (IWFI y IWFI2) con un aumento en la expresión cuando se inocula con el patógeno *Erysiphe graminis*. Además estos LTPs aislados presentaron actividad antifúngica sobre *Cercospora beticola* (IC50 0.2-0.4  $\mu$ M) (Nielsen *et al.*, 1996). En soya se identificó un LTP que actúa como señalizador en la autorregulación de nodulación en *Bradyrhizobium japonicum* (Djorjevick *et al.*, 2007), y en fluido *A. thaliana*

se determinó la expresión diferencial de un LTP después de un tratamiento de la planta con radiación UV-B (43% de expresión diferencial) (Masi *et al.*, 2016).

## 4.5 Caracterización fenotípica y molecular de cepas de *Agrobacterium tumefaciens*

De acuerdo a Sampson (1999), la alergenicidad de una proteína está relacionada con características físicas y químicas como la resistencia a su degradación por calor y estabilidad al tratamiento con enzimas digestivas como tripsina. Varios LTPs han sido identificados como alérgenos en manzana, uva, naranja, limón, kiwi, cereza, maíz, nueces, y tomate (Sanchez-Monge *et al.*, 1999, Pastorello *et al.*, 1999, Pastorello *et al.*, 2000; Scheurer *et al.*, 2001; Pastorello *et al.*, 2003; Ahrazem *et al.*, 2005; Lle *et al.*, 2006; Bernardi *et al.*, 2013). La secuencia putativa de aminoácidos del LTP de *C. nobile* fue contrastada con la base de datos Allergen database (<http://www.allergenonline.org/>), donde se determinó que esta proteína presenta identidad de 79%, similitud de 92% y valor E de 4.5e-28, con un LTP aislado de *S. lycopersicum* var. *microtom* (acceso NCBI AAB42069.1) que está incluido en la lista de alérgenos de IUIS Allergen Nomenclature Subcommittee (Le *et al.*, 2006). Debido a que el LTP identificado en este estudio presenta similitud con LTPs alergénicos, es necesario realizar ensayos del LTP aislado in vivo de hipersensibilidad cutánea y de respuesta de inmune humoral en murino porque esta característica de alergenicidad podría ser una limitación para su posible uso en cultivos biotecnológicos con fines de alimentación humana, aunque puede ser una alternativa en biotecnología de plantas con fines industriales, como textiles o madera (Liu *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2012) resistentes a fitopatógenos.

En la perspectiva del desarrollo de resistencia en plantas al ataque de *R. solani*, se procedió a realizar una caracterización de las cepas C58C1-Mp90, EHA101, EHA105 y LBA4404 (conteniendo el vector binario pCambia 2301) de *A. tumefaciens*, promisorias para desarrollar diferentes cultivos transgénicos con el gen LTP de *C. nobile*. Las cuatro cepas, presentaron colonias circulares pequeñas (1-2mm), puntiformes y convexas, de consistencia mucosa, tono brillante a opaco y un color amarillo hueso, y en la prueba de Gram se confirmó la característica microscópica de bacilos gram negativos. Las pruebas bioquímicas del panel cristal indicaron que las cepas poseen la capacidad de hidrolizar urea, esculina, glucósidos como bis-fosfato y xilósido, utilizar carbohidratos como adonitol,

degradar glicina y descomponer el peróxido de hidrogeno en agua y oxigeno por acción de la enzima catalasa. El perfil metabólico señaló que las cepas correspondían a la especie *A. tumefaciens* (0.99%).

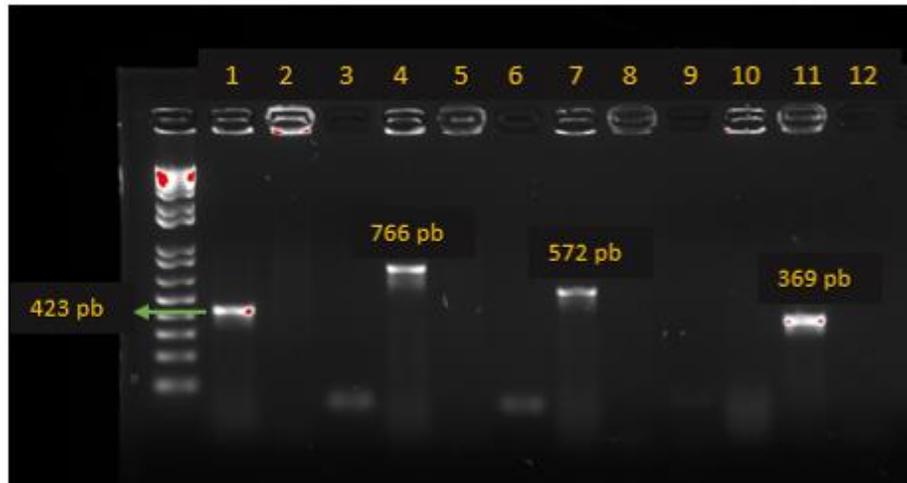
Las cepas presentan una resistencia natural a rifampicina, la cepa LBA4404 que porta el vector pCambia2301 exhibe resistencia adicional a kanamicina, ya que este posee el gen *nptII* codificante de la enzima neomicina transferasa encargada de inactivar la fosforilación del antibiótico kanamicina (Tabla 7).

**Tabla 7** Susceptibilidad a antibióticos de cepas de *A. tumefaciens*

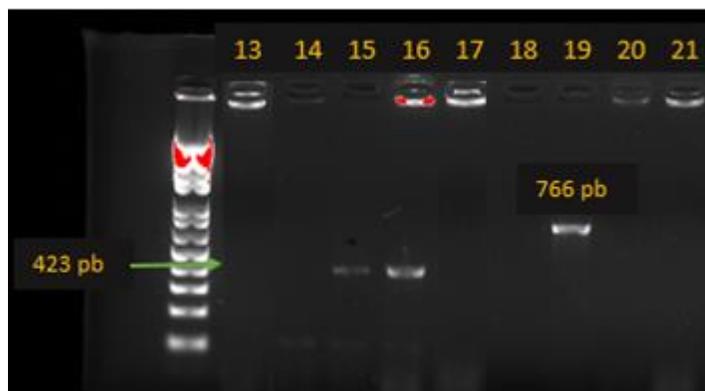
| Cepa  | Antibiótico (50 µg/mL) |            |             |
|---|------------------------|------------|-------------|
|   | Carbenicilina          | Kanamicina | Rifampicina |
| <b>EHA101</b>                               | -                      | +          | +           |
| <b>LBA4404</b>                              | -                      | -          | +           |
| <b>EHA105</b>                               | -                      | -          | +           |
| <b>C58-MP90</b>                             | -                      | -          | +           |
| <b>LBA4404 con el plásmido pCambia 2301</b> | -                      | +          | +           |
| <b>Cepa control</b>                         | NA                     | NA         | -           |

(+) Presenta crecimiento, (-) No presenta crecimiento.

Para confirmar la identidad de las cepas se realizó caracterización mediante PCR con oligonucleótidos específicos para amplificar genes característicos de cada una (Figura 20 y 21).



**Figura 20.** Caracterización molecular de las cepas C58, EHA101 y LBA4404 (portadora del vector pCambia 2301) de *A. tumefaciens*. Carril M: Marcador de 1 Kb (Invitrogen TM). Carril 1: Amplificación positiva del gen GlyA con ADN de la cepa C58-MP90. Carril 2: Amplificación negativa del gen GlyA con ADN de la cepa LBA4404. Carril 3: Control absoluto. Carril 4: Amplificación positiva del gen pTiBo542 con ADN de la cepa EHA101. Carril 6: Amplificación negativa del gen pTiBo542 con ADN de la cepa LBA4404. Carril 7: Control absoluto. Carril 7: Amplificación positiva del gen nptII con ADN de la cepa EHA101. Carril 8: Amplificación negativa del gen nptII con ADN de la cepa LBA4404. Carril 9: Control absoluto. Carril 10: Amplificación negativa del gen Ach5FtsZ con ADN de la cepa EHA101. Carril 11: Amplificación positiva del gen Ach5FtsZ con la cepa LBA4404. Carril 12: Control absoluto.



**Figura 21.** Caracterización molecular de las cepas C58, EHA105 de *A. tumefaciens*. Carril M: Marcador de 1 Kb (Invitrogen TM). Carril 13: Amplificación positiva del gen Ach5FtsZ

con ADN de la cepa C58-MP90. Carril 14: Amplificación negativa del gen *nptII* con ADN de la cepa C58-MP90. Carril 15: Amplificación positiva del gen *GlyA* con ADN de la cepa C58-MP90. Carril 16: Amplificación positiva del gen *GlyA* con ADN de la cepa C58-MP90. Carril 17: Amplificación negativa del gen *Ach5FtsZ* con ADN de la cepa EHA105. Carril 18: Amplificación negativa del gen *nptII* con ADN de la cepa EHA105. Carril 19: Amplificación positiva del gen *pTiBo542* con ADN de la cepa EHA105. Carriles 20 y 21: Controles absolutos.

El desarrollo de líneas transgénicas de plantas que expresen el LTP aislado en este trabajo, proporcionaría una posible protección a hongos fitopatógenos como *R. solani* en cultivos de importancia agronómica. Sin embargo, debido a que el LTP de *C. nobile* aislado es similar a LTPs alergénicos, se sugiere transformar plantas destinadas a la industria textil como lino (*Linum usitatissimum*), cáñamo (*Cannabis*), ramio (*Boehmeria nivea*), jute (*Corchorus capsularis*) o algodón (*Gossypium hirsutum*) usando agroinfección con las cepas de *A. tumefaciens* caracterizadas en este trabajo, las cuales tienen capacidad de infectar plantas dicotiledóneas y monocotiledóneas. La cepa C58C-MP90 puede infectar plantas dicotiledóneas y se ha empleado de manera eficiente para transformar algodón (genes *cry* para resistencia a insectos) y lino (genes *gus* como reportero, y genes *phaA*, *phaB*, *phaC* para producción de polihidroxibutirato) (Kahn *et al.*, 2011; Wrobel *et al.*, 2004). La cepa EHA105 infecta dicotiledóneas, se ha empleado para transformar ramio (gen *nptII*), jute (gen *CcUGPase* codificante de glucosa fosforilasa) y lino (*Tuam1* codificante de alfa-tubulina) (An *et al.*, 2014; Yemets *et al.*, 2009). La cepa LBA4404 posee la capacidad de infectar monocotiledóneas y algunas dicotiledóneas como algodón (con el gen *nptII*) y ramio (gen *gus* y *nptII*) (Jin *et al.*, 2012; Xia *et al.*, 2014). Las cepas LBA4404 y EHA105 se han usado para transformación de especies forestales (Huang *et al.*, 2012). Los genes LTP se han transformado en especies vegetales utilizadas en textiles (para resistencia a fitopatógenos en algodón) y para árboles (para resistencia a fitopatógenos en poplar) (Liu *et al.*, 2000; Huang *et al.*, 2012).



## 5 Conclusiones y recomendaciones

### 5.1 Conclusiones

1. Se logró aislar una secuencia de ADN codificante de un LTP a partir de *C. nobile*. Este LTP no ha sido descrito previamente en manzanilla romana, pero su secuencia está altamente relacionada con la familia LTP1 caracterizada por poseer actividad antimicrobiana.

2. El análisis *in silico* de la secuencia de aminoácidos del LTP de *C. nobile* de este proyecto corresponde con las características estructurales de la familia de LTP1, que incluyen 8 residuos de Cys unidos con cuatro puentes disulfuros, una estructura 3D basada en alfa-hélices que forman una cavidad hidrofóbica de importancia en su actividad biológica de interacción con membranas lipídicas.

3. Para la clonación del LTP por recombinación homóloga en levadura es necesario diseñar oligonucleótidos que generen homología a un vector con sitios de reconocimiento para la enzima RAD5 y enzimas de restricciones que no generen cortes cohesivos.

4. El fluido apoplástico de *C. nobile* posee proteínas de bajo peso molecular asociadas a AMPs, incluyendo LTPs. Este fluido tiene actividad antimicrobiana sobre *R. solani* a una concentración de proteína de 1 ug/ml. Es posible que el LTP descrito en este trabajo contribuya con el efecto biológico.

5. El LTP de *C. nobile* tiene asociación con otros LTPs alergénicos, lo que complica su uso en transformación de especies de plantas para alimentación humana. Es posible que se pueda usar en aproximaciones industriales, como el sector textil o de la madera. Varias cepas de *A. tumefaciens* se pueden utilizar para la generación de cultivos para estos fines, como algodón o especies forestales.

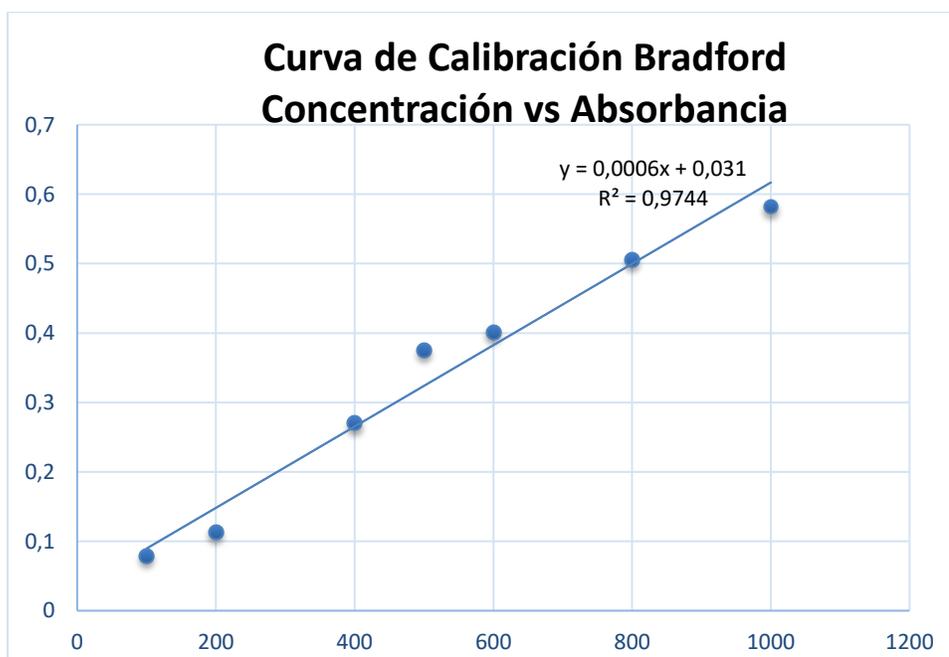
6. En esta iniciativa se aporta a la descripción de una secuencia de ADN codificante de un LTP de manzanilla romana, con perspectivas de desarrollarse recombinantemente para su evaluación en fitopatógenos, y que podría usarse en ingeniería genética de plantas para la industria.

## 5.2 Recomendaciones

Se recomienda desarrollar la recombinación homóloga del LTP de *C. nobile* en *S. cerevisiae*, utilizando un vector que posea una homología menor hacia regiones del genoma de esta levadura, para su correspondiente evaluación de su actividad inhibitoria sobre *R. solani*, que valide su posibilidad de uso en transformación genética de plantas para la industria.

## A. Anexo: Curva de calibración Bradford

| Volumen estándar ul | R. Bradbord | A(595nm) | Concentración de la Albumina (ug/ml) | Concentración de proteína ug/ml |
|---------------------|-------------|----------|--------------------------------------|---------------------------------|
| 20                  | 1ml         | 0,079    | 100                                  | 2                               |
| 20                  | 1ml         | 0,114    | 200                                  | 4                               |
| 20                  | 1ml         | 0,27     | 400                                  | 8                               |
| 20                  | 1ml         | 0,375    | 500                                  | 10                              |
| 20                  | 1ml         | 0,401    | 600                                  | 12                              |
| 20                  | 1ml         | 0,505    | 800                                  | 16                              |
| 20                  | 1ml         | 0,582    | 1000                                 | 20                              |



Curva de Calibración. Eje X concentración de patrones. Eje Y absorbancias

| Muestra | Absorbancia | Concentración (mg/mL) |
|---------|-------------|-----------------------|
|---------|-------------|-----------------------|

|                    |       |      |
|--------------------|-------|------|
| Fluido apoplástico | 1,456 | 2,37 |
|--------------------|-------|------|

## **B. Anexo 2: Productos**

- a. **Acta de premiación de esta experiencia en el 13 Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología donde se obtuvo el primer puesto.**



### ACTA DE PREMIACIÓN DE TRABAJOS DE INVESTIGACIÓN

Siendo las 2:00 p.m. del día 3 de noviembre del 2013, se reunió el Comité Académico del 13er Congreso Internacional del Colegio Nacional de Bacteriología, con el propósito de seleccionar a los ganadores de los trabajos de investigación presentados en el evento. Los ganadores son:

#### Primer puesto:

***IDENTIFICACIÓN PRELIMINAR DE UN PÉPTIDO DE TRANSFERENCIA DE LÍPIDOS A PARTIR DE LA MANZANILLA ROMANA (*Chamaemelum noëbile*)***

**Autores:** Portela D, Chaparro-Giraldo A, López-Pazos S.A.

**Institución:** Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca

**Puntaje:** 96/100

#### Segundo Puesto:

***RESISTENCIA A CIPROFLOXACINA MEDIADA POR MECANISMOS DE RESISTENCIA PLASMIDICOS COMO *mcbG*. y *aac (6')* *Ib-cr* EN AISLAMIENTOS DE *E.coli* CAUSANTE DE INFECCION DE TRACTO URINARIO DE INICIO EN LA COMUNIDAD.***

**Autores:** Castro Betsy, Moncada María Victoria, Corredor Zayda, Márquez Alejandro, Leal Aura L. Vanegas Natasha, Escobar Javier

**Institución:** Universidad El Bosque

**Puntaje:** 94/100

1, 2, 3 y 4 de noviembre de 2013  
 Hotel Tequendama, Bogotá - Colombia  
**CNB - COLOMBIA**  
 Carrera 15 Bis A No. 33 - 03, Bogotá, Colombia - Teléfono: (1) 288 6084 - Telefax: (1) 806 4907  
 Correo electrónico: congreso@cnbcolombia.org - www.cnbcolombia.org

*2.600 metros más allá de la ciencia.*

b. Certificado Ponencia en congreso Bogotá Microbial Meeting 2015.

**El comité organizador del Bogotá Microbial Meeting  
(Edición I) y la Asociación Colombiana de Microbiología**

*certifican que*

**Diana Daniela Portela Dussán**

*con C.C. 1032432887, participó en calidad de PONENTE (Clonación de un péptido de transferencia de lípidos de manzanilla romana mediante recombinación homologa en levadura) en el*



*que se realizó en la Pontificia Universidad Javeriana el día 21 de Agosto de 2015*



Con el apoyo de ASM (American Society of Microbiology) e ISME  
(International Society of Microbial Ecology)



- c. **Publicación. López-Pazos, S. A., Portela, D. D., Rojas, A., & Chaparro-Giraldo, A. (2014). Los péptidos antimicrobianos de origen vegetal con un breve enfoque en las proteínas de transferencia de lípidos: minirevisión. *Mutis*, 4(1), 11.**

## Los péptidos antimicrobianos de origen vegetal con un breve enfoque en las proteínas de transferencia de lípidos: minirevisión

Silvio Alejandro López-Pazos,<sup>1,2\*</sup> Diana-Daniela Portela,<sup>2</sup> Adriana Rojas<sup>2</sup>  
y Alejandro Chaparro-Giraldo<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Universidad Colegio Mayor de Cundinamarca, Facultad de Ciencias de la Salud, calle 28 N° 5B-02, PBX: (57-1) 241 8800, Bogotá D. C., Colombia

<sup>2</sup> Universidad Nacional de Colombia, Departamento de Biología, Grupo de Ingeniería Genética de Plantas, A.A. 14-490, Bogotá D. C., Colombia.

\* Autor para correspondencia: salopez@unicolmayor.edu.co



UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA  
FACULTAD DE CIENCIAS  
DECANATURA

RESOLUCION NÚMERO 1207  
(30 de abril de 2015)

Por la cual se vincula una estudiante beneficiaria de la Beca - Pasantía en la Modalidad tradicional de Joven Investigadora al "CONVENIO ESPECIAL DE COOPERACION No. 0200 DE 2014, SUSCRITO ENTRE LA FIDUCIARIA BOGOTÁ S.A Y LA UNIVERSIDAD NACIONAL DE COLOMBIA - JOVENES INVESTIGADORES - ANUAR ESFUERZOS CON EL OBJETO DE FORTALECER LAS CAPACIDADES DE LOS GRUPOS DE INVESTIGACIÓN DE LAS ENTIDADES DEL SISTEMA NACIONAL DE CIENCIA, TECNOLOGIA E INVESTIGACION - SNCTI - A TRAVÉS DEL APOYO A JÓVENES INVESTIGADORES E INNOVADORES MEDIANTE EL OTORGAMIENTO DE BECAS - PASANTÍAS"

EL DECANO DE LA FACULTAD DE CIENCIAS  
En uso de sus atribuciones legales, y

### CONSIDERANDO:

1. Que para el cumplimiento de las metas previstas en el Convenio Especial de Cooperación N° 0200 de 2014, suscrito entre la Fiduciaria Bogotá S.A y la Universidad Nacional de Colombia, la entidad cooperante se obliga a realizar la selección interna de los jóvenes investigadores que harán uso de las becas-pasantía asignadas a los Grupos de Investigación seleccionados en la Convocatoria 645-2014, teniendo en cuenta los requisitos mínimos establecidos en los términos de referencia y garantizar la dedicación exclusiva de los jóvenes investigadores al desarrollo de la propuesta de investigación.
2. Que la Vicerrectoría de Investigación de la Universidad Nacional de Colombia, mediante Resolución Número 3 del 23 de abril de 2015, publicó la lista de los Jóvenes Investigadores, seleccionados en el marco del Convenio 645-2014, entre los cuales se encuentra la estudiante DIANA DANIELA PORTELA DUSSAN.







## Bibliografía

1. Aerts, A.M.; Francois, I.E.; Meert, E.M.; Li, Q.T.; Cammue, B.P.; Thevissen, K. (2007) The antifungal activity of RsAFP2, a plant defensin from raphanus sativus, involves the induction of reactive oxygen species in *Candida albicans*. *J. Mol. Microbiol. Biotechnol.*, 13, 243–247.
2. Aerts, A.M.; Bammens, L.; Govaert, G.; Carmona-Gutierrez, D.; Madeo, F.; Cammue, B.P.; Thevissen, K. (2011) The Antifungal plant defensin HsAFP1 from *Heuchera sanguinea* induces apoptosis in *Candida albicans*. *Front. Microbiol.*, 2, 47.
3. Aliferis, K. A., & Jabaji, S. (2012). FT-ICR/MS and GC-EI/MS Metabolomics Networking Unravels Global Potato Sprout's Responses to *Rhizoctonia solani* Infection. *PLoS ONE*, 7(8), e42576. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0042576>
4. An, X., Wang, B., Liu, L., Jiang, H., Chen, J., Ye, S., ... Peng, D. (2014). Agrobacterium-mediated genetic transformation and regeneration of transgenic plants using leaf midribs as explants in ramie [*Boehmeria nivea* (L.) Gaud]. *Molecular Biology Reports*, 41(5), 3257–3269. <http://doi.org/10.1007/s11033-014-3188-4>
5. Anami, S., Njuguna, E., Coussens, G., Aesaert, S. and Van Lijsebettens, M. (2016). Higher plant transformation: principles and molecular tools. In: The international Journal Developmental Biology, 1st ed. [online] © UBC Press. Available at: <http://doi:10.1387/ijdb.130232mv> [Accessed 15 May 2016]
6. Andreev, Y. A., Korostyleva, T. V, Slavokhotova, A. A., Rogozhin, E. A., Utkina, L. L., Vassilevski, A. A., ... Odintsova, T. I. (2012). Genes encoding hevein-like defense

- peptides in wheat: distribution, evolution, and role in stress response. *Biochimie*, *94*(4), 1009–1016. <http://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.12.023>
7. Ahrazem, O., Ibáñez, M. D., López-Torrejón, G., Sánchez-Monge, R., Sastre, J., Lombardero, M., ... Salcedo, G. (2005). Lipid Transfer Proteins and Allergy to Oranges. *International Archives of Allergy and Immunology*, *137*(3), 201–210. Retrieved from <http://www.karger.com/DOI/10.1159/000086332>
  8. Asano, T., Miwa, A., Maeda, K., Kimura, M., & Nishiuchi, T. (2013). The Secreted Antifungal Protein Thionin 2.4 in *Arabidopsis thaliana* Suppresses the Toxicity of a Fungal Fruit Body Lectin from *Fusarium graminearum*. *PLoS Pathog*, *9*(8), e1003581. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1003581>
  9. Ashby, A. M., Watson, M. D., Loake, G. J., & Shaw, C. H. (1988). Ti plasmid-specified chemotaxis of *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 toward vir-inducing phenolic compounds and soluble factors from monocotyledonous and dicotyledonous plants. *Journal of Bacteriology*, *170*(9), 4181–4187. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC211426/>
  10. Benkert, P., Tosatto, S. C. E., & Schomburg, D. (2008). QMEAN: A comprehensive scoring function for model quality assessment. *Proteins*, *71*(1), 261–277. <http://doi.org/10.1002/prot.21715>
  11. Bernardi, M. L., Giangrieco, I., Camardella, L., Ferrara, R., Palazzo, P., Panico, M. R., ... Mari, A. (2011). Allergenic Lipid Transfer Proteins from Plant-Derived Foods Do Not Immunologically and Clinically Behave Homogeneously: The Kiwifruit LTP as a Model. *PLoS ONE*, *6*(11), e27856. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0027856>
  12. Berrocal-Lobo, M., Segura, A., Moreno, M., López, G., García-Olmedo, F., & Molina, A. (2002). Snakin-2, an Antimicrobial Peptide from Potato Whose Gene Is Locally Induced by Wounding and Responds to Pathogen Infection. *Plant Physiology*,

- 128(3), 951–961. <http://doi.org/10.1104/pp.010685>
13. Blein, J.-P., Coutos-Thévenot, P., Marion, D., & Ponchet, M. (2016). From elicitors to lipid-transfer proteins: a new insight in cell signalling involved in plant defence mechanisms. *Trends in Plant Science*, 7(7), 293–296. [http://doi.org/10.1016/S1360-1385\(02\)02284-7](http://doi.org/10.1016/S1360-1385(02)02284-7)
  14. Boyd, L. A., Ridout, C., O’Sullivan, D. M., Leach, J. E., & Leung, H. (2013). Plant-pathogen interactions: disease resistance in modern agriculture. *Trends in Genetics : TIG*, 29(4), 233–240. <http://doi.org/10.1016/j.tig.2012.10.011>
  15. Brogden, K. A. (2005). Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? *Nature Reviews. Microbiology*, 3(3), 238–250. <http://doi.org/10.1038/nrmicro1098>
  16. Burman, R., Herrmann, A., Tran, R., Kivela, J. E., Lomize, A., Gullbo, J., and Goransson, U. 2011a. Cytotoxic potency of small macrocyclic knot proteins: Structure-activity and mechanistic studies of native and chemically modified cyclotides. *Org. Biomol. Chem.* 9: 4306–4314.
  17. Cammue, B. P. A., Thevissen, K., Hendriks, M., Eggermont, K., Goderis, I. J., Proost, P., ... Broekaert, W. F. (1995). A Potent Antimicrobial Protein from Onion Seeds Showing Sequence Homology to Plant Lipid Transfer Proteins. *Plant Physiology*, 109 (2), 445–455. <http://doi.org/10.1104/pp.109.2.445>
  18. Carvalho, A. de O., & Gomes, V. M. (2007). Role of plant lipid transfer proteins in plant cell physiology-a concise review. *Peptides*, 28(5), 1144–1153. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2007.03.004>
  19. Carvalho, A. de O., & Gomes, V. M. (2009). Plant defensins--prospects for the biological functions and biotechnological properties. *Peptides*, 30(5), 1007–1020. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2009.01.018>

20. Correa, F.; Meneses, R.; Gutiérrez, A.; García, A.; Antigua, G.; Gómez, J. y Calvert, L. 2001. Guía para el trabajo de campo en el manejo integrado de plagas del arroz. CIAT, IIA, FLAR. Cali, Colombia. 72 p
21. Cubeta, M. A., Thomas, E., Dean, R. A., Jabaji, S., Neate, S. M., Tavantzis, S., ... Nierman, W. C. (2014). Draft Genome Sequence of the Plant-Pathogenic Soil Fungus *Rhizoctonia solani* Anastomosis Group 3 Strain Rhs1AP. *Genome Announcements*, 2(5), e01072–14. <http://doi.org/10.1128/genomeA.01072-14>
22. Cheng, H.-C., Cheng, P.-T., Peng, P., Lyu, P.-C., & Sun, Y.-J. (2004). Lipid binding in rice nonspecific lipid transfer protein-1 complexes from *Oryza sativa*. *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, 13(9), 2304–2315. <http://doi.org/10.1110/ps.04799704>
23. Daneshmand, F., Zare-Zardini, H., & Ebrahimi, L. (2013). Investigation of the antimicrobial activities of Snakin-Z, a new cationic peptide derived from *Zizyphus jujuba* fruits. *Natural Product Research*, 27(24), 2292–2296. <http://doi.org/10.1080/14786419.2013.827192>
24. Dayakar, B. V., Lin, H.-J., Chen, C.-H., Ger, M.-J., Lee, B.-H., Pai, C.-H., ... Feng, T.-Y. (2003). Ferredoxin from sweet pepper (*Capsicum annuum* L.) intensifying harpin(pss)-mediated hypersensitive response shows an enhanced production of active oxygen species (AOS). *Plant Molecular Biology*, 51(6), 913–924.
25. Deblaere, R., Bytebier, B., De Greve, H., Deboeck, F., Schell, J., Van Montagu, M., & Leemans, J. (1985). Efficient octopine Ti plasmid-derived vectors for *Agrobacterium*-mediated gene transfer to plants. *Nucleic Acids Research*, 13(13), 4777–4788. Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC321826/>
26. Dezfooli N, Hasanzadeh N, Rezaee M, Ghasemi A. Antibacterial Activity and Chemical Compositions of *Chamaemelum nobile* Essential Oil/ Extracts against *Pseudomonas tolaasii*, the Causative Agent of Mushroom Brown Blotch. *Annals of Biological Research*; 2012, 3 (6): 2602 – 2608.

27. De-Paula, V. S., Razzera, G., Medeiros, L., Miyamoto, C. A., Almeida, M. S., Kurtenbach, E., ... Valente, A. P. (2008). Evolutionary relationship between defensins in the Poaceae family strengthened by the characterization of new sugarcane defensins. *Plant Molecular Biology*, 68(4-5), 321–335. <http://doi.org/10.1007/s11103-008-9372-y>
28. De O. Carvalho, A., De S. Teodoro, C. E., Da Cunha, M., Okorokova-Façanha, A. L., Okorokov, L. A., Fernandes, K. V. S., & Gomes, V. M. (2004). Intracellular localization of a lipid transfer protein in *Vigna unguiculata* seeds. *Physiologia Plantarum*, 122(3), 328–336. <http://doi.org/10.1111/j.1399-3054.2004.00413.x>
29. Douliez, J. P., Pato, C., Rabesona, H., Molle, D., & Marion, D. (2001). Disulfide bond assignment, lipid transfer activity and secondary structure of a 7-kDa plant lipid transfer protein, LTP2. *European Journal of Biochemistry / FEBS*, 268(5), 1400–1403.
30. Djordjevic, M. A., Oakes, M., Li, D. X., Hwang, C. H., Hocart, C. H., & Gresshoff, P. M. (2007). The glycine max xylem sap and apoplast proteome. *Journal of Proteome Research*, 6(9), 3771–3779. <http://doi.org/10.1021/pr0606833>
31. Dracatos, P. M., van der Weerden, N. L., Carroll, K. T., Johnson, E. D., Plummer, K. M., & Anderson, M. A. (2014). Inhibition of cereal rust fungi by both class I and II defensins derived from the flowers of *Nicotiana glauca*. *Molecular Plant Pathology*, 15(1), 67–79. <http://doi.org/10.1111/mpp.12066>
32. Edwards K., Johnstone C., Thompson C. (1991) A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucl. Acid. Res.* 19: 1349
33. Fan, Y., Du, K., Gao, Y., Kong, Y., Chu, C., Sokolov, V., & Wang, Y. (2013). Transformation of LTP gene into *Brassica napus* to enhance its resistance to *Sclerotinia sclerotiorum*. *Genetika*, 49(4), 439–447.

34. Ferrero, A. and Nguyen, N. 2003. The sustainable development of rice – based production systems in the world. FAO, Italy. ARROZ\Proceedings of the FAO Rice Conference.htm.
35. Finkina, E. I., Balandin, S. V, Serebryakova, M. V, Potapenko, N. A., Tagaev, A. A., & Ovchinnikova, T. V. (n.d).(2013) Purification and primary structure of novel lipid transfer proteins from germinated lentil (*Lens culinaris*) seeds. *Biochemistry (Moscow)*, 72(4), 430–438. <http://doi.org/10.1134/S0006297907040104>
36. Gay, G., Wagner, D. T., Keatinge-Clay, A. T., & Gay, D. C. (2014). Rapid modification of the pET-28 expression vector for ligation independent cloning using homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plasmid*, 76C, 66–71. <http://doi.org/10.1016/j.plasmid.2014.09.005>
37. Ge, X., Chen, J., Sun, C., & Cao, K. (2003). Preliminary study on the structural basis of the antifungal activity of a rice lipid transfer protein. *Protein Engineering*, 16(6), 387–390.
38. Gelvin, S. B. (2003). Agrobacterium-Mediated Plant Transformation: the Biology behind the “Gene-Jockeying” Tool. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 67(1), 16–37. <http://doi.org/10.1128/MMBR.67.1.16-37.2003>
39. Gelvin, S. B. (2012). Traversing the Cell: Agrobacterium T-DNA’s Journey to the Host Genome. *Frontiers in Plant Science*, 3, 52. <http://doi.org/10.3389/fpls.2012.00052>
40. Ghaedi, M., Naghiha, R., Jannesar, R., dehghanian, N., Mirtamizdoust, B., & pezeshkpour, V. (2015). Antibacterial and antifungal activity of flower extracts of *Urtica dioica*, *Chamaemelum nobile* and *Salvia officinalis*: Effects of Zn[OH]<sub>2</sub> nanoparticles and Hp-2-minh on their property. *Journal of Industrial and Engineering Chemistry*, 32, 353–359. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.jiec.2015.09.007>
41. Gizatullina, A. K., Finkina, E. I., Mineev, K. S., Melnikova, D. N., Bogdanov, I. V, Telezhinskaya, I. N., ... Ovchinnikova, T. V. (2013). Recombinant production and

- solution structure of lipid transfer protein from lentil *Lens culinaris*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 439(4), 427–432.  
<http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.08.07>
42. Gibson, D. G., Glass, J. I., Lartigue, C., Noskov, V. N., Chuang, R.-Y., Algire, M. A., ... Venter, J. C. (2010). Creation of a bacterial cell controlled by a chemically synthesized genome. *Science (New York, N.Y.)*, 329(5987), 52–56.  
<http://doi.org/10.1126/science.1190719>
43. Graves, A. C., & Goldman, S. L. (1987). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the monocot genus *Gladiolus*: detection of expression of T-DNA-encoded genes. *Journal of Bacteriology*, 169(4), 1745–1746.
44. Grisolíá, S., Knecht, E. y Hernández-Yago, J. (1981) Proteólisis intracelular. *Investigación y Ciencia* 57, 122-137
45. Hassan, M., Kjos, M., Nes, I. F., Diep, D. B., & Lotfipour, F. (2012). Natural antimicrobial peptides from bacteria: characteristics and potential applications to fight against antibiotic resistance. *Journal of Applied Microbiology*, 113(4), 723–736.  
<http://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2012.05338.x>
46. Hegedüs, N., & Marx, F. (2013). Antifungal proteins: More than antimicrobials? *Fungal Biology Reviews*, 26(4), 132–145. <http://doi.org/10.1016/j.fbr.2012.07.002>
47. Hellens, R., Mullineaux, P., & Klee, H. (2000). Technical Focus: a guide to *Agrobacterium* binary Ti vectors. *Trends in Plant Science*, 5(10), 446–451.
48. Henriques, S. T., and Craik, D. J. 2012. Importance of the Cell membrane on the mechanism of action of cyclotides. *ACS Chem. Biol.* 7: 626–636.
49. Hood, E. E., Helmer, G. L., Fraley, R. T., & Chilton, M. D. (1986). The hypervirulence of *Agrobacterium tumefaciens* A281 is encoded in a region of pTiBo542 outside of T-DNA. *Journal of Bacteriology*, 168(3), 1291–1301. Retrieved from

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC213636/>

50. Huang RH, Xiang Y, Liu XZ, Zhang Y, Hu Z, Wang DC. Two novel antifungal peptides distinct with a five-disulfide motif from the bark of *Eucommia ulmoides* Oliv. *FEBS Lett.* 2002;521:87–90.
51. Hunter N (2006) Meiotic recombination. *Molecular Genetics of Recombination*, (Aguilera A & Rothstein R, eds), pp. 381– 442. Springer-Verlag, Heidelberg.
52. Huang, Y., Liu, H., Jia, Z., Fang, Q., & Luo, K. (2012). Combined expression of antimicrobial genes (Bbchit1 and LJAMP2) in transgenic poplar enhances resistance to fungal pathogens. *Tree Physiology*, 32(10), 1313–1320. <http://doi.org/10.1093/treephys/tps079>
53. Instituto Colombiano Agropecuario (ICA). 2014. Registros de venta de plaguicidas quimicos de uso agricola. <http://www.ica.gov.co/Areas/Agricola/Servicios/Regulacion-y-Control-de-Plaguicidas-Quimicos.aspx>
54. Jasin, M., & Rothstein, R. (2013). Repair of Strand Breaks by Homologous Recombination. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*, 5(11), a012740. <http://doi.org/10.1101/cshperspect.a012740>
55. Jiang, H., Song, W., Li, A., Yang, X., & Sun, D. (2011). Identification of genes differentially expressed in cauliflower associated with resistance to *Xanthomonas campestris* pv. *campestris*. *Molecular Biology Reports*, 38(1), 621–629. <http://doi.org/10.1007/s11033-010-0148-5>
56. Jin, S., Zhang, X., liang, S., Nie, Y., Guo, X., & Huang, C. (2005). Factors affecting transformation efficiency of embryogenic callus of Upland cotton (*Gossypium hirsutum*) with *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 81(2), 229–237. <http://doi.org/10.1007/s11240-004-5209-9>

57. Jin, S. X., Liu, G. Z., Zhu, H. G., Yang, X. Y., & Zhang, X. L. (2012). Transformation of upland cotton (*Gossypium hirsutum* L.) with gfp gene as a visual marker. *Journal of Integrative Agriculture*, *11*(6), 910-919.
58. Jones, J. D. G., & Dangl, J. L. (2006). The plant immune system. *Nature*, *444*(7117), 323–329. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/nature05286>
59. Johnson, C. D., Chary, S. N., Chernoff, E. A., Zeng, Q., Running, M. P., & Crowell, D. N. (2005). Protein geranylgeranyltransferase I is involved in specific aspects of abscisic acid and auxin signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiology*, *139*(2), 722–733. <http://doi.org/10.1104/pp.105.06504>
60. Kanokwiroon, K., Teanpaisan, R., Wititsuwannakul, D., Hooper, A. B., and Wititsuwannakul, R. 2008. Antimicrobial activity of a protein purified from the latex of *Hevea brasiliensis* on oral microorganisms. *Mycoses*. **51**: 301–307.
61. Kazemian, H., Ghafourian, S., Heidari, H., Amiri, P., Yamchi, J. K., Shavalipour, A., ... Sadeghifard, N. (2015). Antibacterial, anti-swarming and anti-biofilm formation activities of *Chamaemelum nobile* against *Pseudomonas aeruginosa*. *Revista Da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*, *48*(4), 432–436. <http://doi.org/10.1590/0037-8682-0065-2015>
62. Kiba, A., Saitoh, H., Nishihara, M., Omiya, K., & Yamamura, S. (2003). C-Terminal Domain of a Hevein-Like Protein from *Wasabia japonica* has Potent Antimicrobial Activity. *Plant and Cell Physiology*, *44* (3), 296–303. <http://doi.org/10.1093/pcp/pcg035>
63. Kiba, A., Nakatsuka, T., Yamamura, S., & Nishihara, M. (2012). Gentian lipid transfer protein homolog with antimicrobial properties confers resistance to *Botrytis cinerea* in transgenic tobacco. *Plant Biotechnology*, *29*(1), 95–101. <http://doi.org/10.5511/plantbiotechnology.11.1114a>
64. Khan, G. A. (2013). Development of transgenic cotton lines harboring a pesticidal

- gene (cry1Ab). *Emirates Journal of Food and Agriculture*, 25(6), 434–442. <http://doi.org/10.9755/ejfa.v25i6.13133>
65. Krejci, L., Altmannova, V., Spirek, M., & Zhao, X. (2012). Homologous recombination and its regulation. *Nucleic Acids Research*, 40(13), 5795–5818. <http://doi.org/10.1093/nar/gks270>
66. Kuijpers, N. G. A., Solis-Escalante, D., Bosman, L., van den Broek, M., Pronk, J. T., Daran, J.-M., & Daran-Lapujade, P. (2013). A versatile, efficient strategy for assembly of multi-fragment expression vectors in *Saccharomyces cerevisiae* using 60 bp synthetic recombination sequences. *Microbial Cell Factories*, 12, 47. <http://doi.org/10.1186/1475-2859-12-47>
67. Le, L. Q., Lorenz, Y., Scheurer, S., Fötisch, K., Enrique, E., Bartra, J., ... Sonnewald, U. (2006). Design of tomato fruits with reduced allergenicity by dsRNAi-mediated inhibition of ns-LTP (Lyc e 3) expression. *Plant Biotechnology Journal*, 4(2), 231–42. <http://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2005.00175.x>
68. Lee JY, Min K, Cha H, Shin DH, Hwang KY, Suh SW. 1998. Rice nonspecific lipid transfer protein: the 1.6 Å crystal structure in the unliganded state reveals a small hydrophobic cavity. *Journal of Molecular Biology* 276, 437–448
69. Lee, S. C., Hwang, I. S., Choi, H. W., & Hwang, B. K. (2008). Involvement of the pepper antimicrobial protein CaAMP1 gene in broad spectrum disease resistance. *Plant Physiology*, 148(2), 1004–1020. <http://doi.org/10.1104/pp.108.123836>
70. Li, X., & Heyer, W.-D. (2008). Homologous recombination in DNA repair and DNA damage tolerance. *Cell Research*, 18(1), 99–113. <http://doi.org/10.1038/cr.2008.1>
71. Lin, K.-F., Liu, Y.-N., Hsu, S.-T. D., Samuel, D., Cheng, C.-S., Bonvin, A. M. J. J., & Lyu, P.-C. (2005). Characterization and structural analyses of nonspecific lipid transfer protein 1 from mung bean. *Biochemistry*, 44(15), 5703–5712. <http://doi.org/10.1021/bi047608v>

72. Li, Y., Xiang, Q., Zhang, Q., Huang, Y., & Su, Z. (2012). Overview on the recent study of antimicrobial peptides: origins, functions, relative mechanisms and application. *Peptides*, 37(2), 207–215. <http://doi.org/10.1016/j.peptides.2012.07.001>
73. Liu, H.-C., Creech, R. G., Jenkins, J. N., & Ma, D.-P. (2000). Cloning and promoter analysis of the cotton lipid transfer protein gene Ltp311The nucleotide sequence data reported will appear in the GenBank Nucleotide Sequence Databases under the accession number AF228333. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, 1487(1), 106–111. [http://doi.org/10.1016/S1388-1981\(00\)00072-X](http://doi.org/10.1016/S1388-1981(00)00072-X)
74. Majewski, J., & Stec, B. (2010). X-ray scattering studies of model lipid membrane interacting with purothionin provide support for a previously proposed mechanism of membrane lysis. *European Biophysics Journal: EBJ*, 39(8), 1155–1165. <http://doi.org/10.1007/s00249-009-0568-0>
75. Marlow, V. L., Haag, A. F., Kobayashi, H., Fletcher, V., Scocchi, M., Walker, G. C., & Ferguson, G. P. (2009). Essential Role for the BacA Protein in the Uptake of a Truncated Eukaryotic Peptide in *Sinorhizobium meliloti*. *Journal of Bacteriology*, 191(5), 1519–1527. <http://doi.org/10.1128/JB.01661-08>
76. Maróti, G., Kereszt, A., Kondorosi, É., & Mergaert, P. (2011). Natural roles of antimicrobial peptides in microbes, plants and animals. *Research in Microbiology*, 162(4), 363–374. <http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/j.resmic.2011.02.005>.
77. Masi, A., Trentin, A. R., & Arrigoni, G. (2016). Leaf apoplastic proteome composition in UV-B treated *Arabidopsis thaliana* mutants impaired in extracellular glutathione degradation. *Data in Brief*, 6, 368–377. <http://doi.org/10.1016/j.dib.2015.12.005>
78. Mathiasen, D. P., & Lisby, M. (2014). Cell cycle regulation of homologous recombination in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Reviews*, 38(2), 172–184. <http://doi.org/10.1111/1574-6976.12066>

79. Melnikova, D. N., Mineev, K. S., Finkina, E. I., Arseniev, A. S., & Ovchinnikova, T. V. (2016). A novel lipid transfer protein from the dill *Anethum graveolens* L.: isolation, structure, heterologous expression, and functional characteristics. *Journal of Peptide Science*, 22(1), 59–66. <http://doi.org/10.1002/psc.2840>
80. Milbradt, A. G., Kerek, F., Moroder, L., & Renner, C. (2003). Structural characterization of hellethionins from *Helleborus purpurascens*. *Biochemistry*, 42(8), 2404–2411. <http://doi.org/10.1021/bi020628h>
81. Mirouze, M., Sels, J., Richard, O., Czernic, P., Loubet, S., Jacquier, A., ... Marques, 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: For Cell and Molecular Biology*, 47(3), 329–342. <http://doi.org/10.1111/j.1365-313X.2006.02788.x>
82. Moreira, J. S., Almeida, R. G., Tavares, L. S., Santos, M. O., Viccini, L. F., Vasconcelos, I. M., ... Franco, O. L. (2011). Identification of botryticidal proteins with similarity to NBS-LRR proteins in rosemary pepper (*Lippia sidoides* Cham.) flowers. *The Protein Journal*, 30(1), 32–38. <http://doi.org/10.1007/s10930-010-9299-4>
83. Muramoto, N., Tanaka, T., Shimamura, T., Mitsukawa, N., Hori, E., Koda, K., ... Imaeda, T. (2012). Transgenic sweet potato expressing thionin from barley gives resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in leaves and storage roots. *Plant Cell Reports*, 31(6), 987–997. <http://doi.org/10.1007/s00299-011-1217-5>
84. Nawrot, R., Barylski, J., Nowicki, G., Broniarczyk, J., Buchwald, W., & Goździcka-Józefiak, A. (2014). Plant antimicrobial peptides. *Folia Microbiologica*, 59(3), 181–196. <http://doi.org/10.1007/s12223-013-0280-4>
85. Nielsen, K. K., Nielsen, J. E., Madrid, S. M., & Mikkelsen, J. D. (1996). New antifungal proteins from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) showing homology to non-specific lipid

- transfer proteins. *Plant Molecular Biology*, 31(3), 539–552.
86. Park, S.-C., Lee, J. R., Shin, S.-O., Park, Y., Lee, S. Y., & Hahm, K.-S. (2007). Characterization of a heat-stable protein with antimicrobial activity from *Arabidopsis thaliana*. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 362(3), 562–567. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2007.07.188>
87. Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Fortunato, D., Giuffrida, M. G., ... Conti, A. (2003). Identification of grape and wine allergens as an endochitinase 4, a lipid-transfer protein, and a thaumatin. *The Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 111(2), 350–359. <http://doi.org/10.1067/mai.2003.35>
88. Pastorello, E. A., Farioli, L., Pravettoni, V., Ortolani, C., Ispano, M., Monza, M., ... Conti, A. (1999). The major allergen of peach (*Prunus persica*) is a lipid transfer protein. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(3), 520–526. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70480-X](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70480-X)
89. Pastorello, E. A., & Robino, A. M. (2004). Clinical role of lipid transfer proteins in food allergy. *Molecular Nutrition & Food Research*, 48(5), 356–362. <http://doi.org/10.1002/mnfr.200400047>
90. Pouny, Y., Rapaport, D., Mor, A., Nicolas, P. & Shai, Y. (1992) Interaction of antimicrobial dermaseptin and its fluorescently labeled analogues with phospholipid membranes. *Biochemistry* 31, 12416–12423
91. Portieles, R., Ayra, C., Gonzalez, E., Gallo, A., Rodriguez, R., Chacón, O., ... Borrás-Hidalgo, O. (2010). NmDef02, a novel antimicrobial gene isolated from *Nicotiana megalosiphon* confers high-level pathogen resistance under greenhouse and field conditions. *Plant Biotechnology Journal*, 8(6), 678–90. <http://doi.org/10.1111/j.1467-7652.2010.00501.x>
92. Porto, W. F., & Franco, O. L. (2013). Theoretical structural insights into the snakain/GASA family. *Peptides*, 44, 163–7.

<http://doi.org/10.1016/j.peptides.2013.03.014>

93. Prabhu, S., Dennison, S. R., Lea, B., Snape, T. J., Nicholl, I. D., Radecka, I., & Harris, F. (2013). Anionic Antimicrobial and Anticancer Peptides from Plants. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 32(5), 303–320. <http://doi.org/10.1080/07352689.2013.773238>
94. Pyee, J., Yu, H., & Kolattukudy, P. E. (1994). Identification of a lipid transfer protein as the major protein in the surface wax of broccoli (*Brassica oleracea*) leaves. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 311(2), 460–468.
95. Rojas, A. (2009). Identificación de genes tipo péptido antimicrobiano provenientes de *Solanum lycopersicum* var. Cerasiforme (Tesis de maestría). Universidad Nacional de Colombia, Bogotá
96. Regente, M. C., Giudici, A. M., Villalain, J., & de la Canal, L. (2005). The cytotoxic properties of a plant lipid transfer protein involve membrane permeabilization of target cells. *Letters in Applied Microbiology*, 40(3), 183–189. <http://doi.org/10.1111/j.1472-765X.2004.01647.x>
97. Sagaram, U. S., El-Mounadi, K., Buchko, G. W., Berg, H. R., Kaur, J., Pandurangi, R. S., ... Shah, D. M. (2013). Structural and Functional Studies of a Phosphatidic Acid-Binding Antifungal Plant Defensin MtDef4: Identification of an RGFRRR Motif Governing Fungal Cell Entry. *PLoS ONE*, 8(12), e82485. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0082485>
98. Sampson, H. A. (1999). Food allergy. Part 1: Immunopathogenesis and clinical disorders. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(5), 717–728. [http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749\(99\)70411-2](http://doi.org/http://dx.doi.org/10.1016/S0091-6749(99)70411-2)
99. Saderi H, Owlia P, Hosseini A, Semiyari H. Antimicrobial effects of chamomile extract and essential oil on clinically isolated *Porphyromonas gingivalis* from periodontitis. *Acta Hort* 2005;6:145-6.

100. Samuel D, Liu Y-J, Cheng C-S, Lyu P-C. Solution structure of plant nonspecific lipid transfer protein-2 from rice (*Oryza sativa*). *J Biol Chem* 2002;277:35267–7
101. Sánchez-Monge, R., Lombardero, M., García-Sellés, F. J., Barber, D., & Salcedo, G. (1999). Lipid-transfer proteins are relevant allergens in fruit allergy. *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 103(3), 514–519.
102. Sels, J., Mathys, J., De Coninck, B. M. A., Cammue, B. P. A., & De Bolle, M. F. C. (2008). Plant pathogenesis-related (PR) proteins: a focus on PR peptides. *Plant Physiology and Biochemistry: PPB / Societe Francaise de Physiologie Vegetale*, 46(11), 941–950. <http://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.06.011>
103. Segura, A., Moreno, M., Molina, A., & Garcia-Olmedo, F. (1998). Novel defensin subfamily from spinach (*Spinacia oleracea*). *FEBS Letters*, 435(2-3), 159–166
104. Srivastava, J. K., Shankar, E., & Gupta, S. (2010). Chamomile: A herbal medicine of the past with bright future. *Molecular Medicine Reports*, 3(6), 895–901. <http://doi.org/10.3892/mmr.2010.377>
105. Stec, B. (2006). Plant thionins--the structural perspective. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 63(12), 1370–1385. <http://doi.org/10.1007/s00018-005-5574-5>
106. 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(8), 1071–1082. <http://doi.org/10.1016/j.jplph.2006.06.002>
107. Thevissen, K., Warnecke, D. C., François, I. E. J. A., Leipelt, M., Heinz, E., Ott, C., ... Cammue, B. P. A. (2004). Defensins from Insects and Plants Interact with

- Fungal Glucosylceramides. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (6), 3900–3905.  
<http://doi.org/10.1074/jbc.M311165200>
108. Tam J. P., Wang S., Wong K. H., Tan W. L. (2015). Antimicrobial peptides from plants. *Pharmaceuticals (Basel)* 8 711–757. 10.3390/ph804071
109. Tassin-Moindrot, S., Caille, A., Douliez, J.-P., Marion, D., & Vovelle, F. (2000). The wide binding properties of a wheat nonspecific lipid transfer protein. *European Journal of Biochemistry*, 267(4), 1117–1124.  
<http://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2000.01109.x>
110. Thomma, B.P.H.J.; Cammue, B.P.A.; Thevissen, K. (2002). Plant defensins. *Planta*. 216: 193–202
111. Tzfira, T., & Citovsky, V. (2006). Agrobacterium-mediated genetic transformation of plants: biology and biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 17(2), 147–154. <http://doi.org/10.1016/j.copbio.2006.01.00>
112. van der Weerden, N. L., Bleackley, M. R., & Anderson, M. A. (2013). Properties and mechanisms of action of naturally occurring antifungal peptides. *Cellular and Molecular Life Sciences: CMLS*, 70(19), 3545–3570.  
<http://doi.org/10.1007/s00018-013-1260-1>
113. Verdun, R. E., & Karlseder, J. (2007). Replication and protection of telomeres. *Nature*, 447(7147), 924–931. <http://doi.org/10.1038/nature05976>
114. Verma, S. S., Yajima, W. R., Rahman, M. H., Shah, S., Liu, J.-J., Ekramoddoullah, A. K. M., & Kav, N. N. V. (2012). A cysteine-rich antimicrobial peptide from *Pinus monticola* (PmAMP1) confers resistance to multiple fungal pathogens in canola (*Brassica napus*). *Plant Molecular Biology*, 79(1-2), 61–74.  
<http://doi.org/10.1007/s11103-012-9895-0>
115. Vriens, K., Cammue, B. P. A., & Thevissen, K. (2014). Antifungal plant

- defensins: mechanisms of action and production. *Molecules (Basel, Switzerland)*, *19*(8), 12280–12303. <http://doi.org/10.3390/molecules190812280>
116. Wibberg, D., Rupp, O., Jelonek, L., Krober, M., Verwaaijen, B., Blom, J., ... Schluter, A. (2015). Improved genome sequence of the phytopathogenic fungus *Rhizoctonia solani* AG1-IB 7/3/14 as established by deep mate-pair sequencing on the MiSeq (Illumina) system. *Journal of Biotechnology*, *203*, 19–21. <http://doi.org/10.1016/j.jbiotec.2015.03.005>
117. Woodhall, A. L., Peters, J., Kiezebrink, D., Sparrow, L., & Ophelkeller, K. (2013). Informing Management of Potato Diseases through Epidemiology and Diagnostics *Rhizoctonia solani* Reviews
118. Wrobel, M., Zebrowski, J., & Szopa, J. (2004). Polyhydroxybutyrate synthesis in transgenic flax. *Journal of Biotechnology*, *107*(1), 41–54.
119. Xia, J., Martinez, A., Daniell, H., & Ebert, S. N. (2011). Evaluation of biolistic gene transfer methods in vivo using non-invasive bioluminescent imaging techniques. *BMC Biotechnology*, *11*, 62. <http://doi.org/10.1186/1472-6750-11-62>
120. Yang, L., Weiss, T. M., Harroun, T. A., Heller, W. T. & Huang, H. W. (1999) Supramolecular structures of peptide assemblies in membranes by neutron off-plane scattering: method of analysis. *Biophys. J.* **77**, 2648–2656
121. Yeats, T. H., & Rose, J. K. C. (2008). The biochemistry and biology of extracellular plant lipid-transfer proteins (LTPs). *Protein Science: A Publication of the Protein Society*, *17*(2), 191–8. <http://doi.org/10.1110/ps.073300108>
122. Yemets, A. I., Bayer, O. A., Radchuk, V. V, & Blume, Y. B. (2009). Agrobacterium-mediated transformation of flax with a mutant tubulin gene responsible for resistance to dinitroaniline herbicides. *Russian Journal of Genetics*, *45*(10), 1215–1222. <http://doi.org/10.1134/S1022795409100093>

123. Zhang, G., Qi, J., Xu, J., Niu, X., Zhang, Y., Tao, A., ... Lin, L. (2013). Overexpression of UDP-glucose pyrophosphorylase gene could increase cellulose content in Jute (*Corchorus capsularis* L.). *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 442(3-4), 153–8. <http://doi.org/10.1016/j.bbrc.2013.11.053>
124. Zhao, M., Ma, Y., Pan, Y.-H., Zhang, C.-H., & Yuan, W.-X. (2011). A hevein-like protein and a class I chitinase with antifungal activity from leaves of the paper mulberry. *Biomedical Chromatography: BMC*, 25(8), 908–912. <http://doi.org/10.1002/bmc.1543>
125. Zhao, W., Vaithiyalingam, S., San Filippo, J., Maranon, D. G., Jimenez-Sainz, J., Fontenay, G. V., ... Sung, P. (2015). Promotion of BRCA2-Dependent Homologous Recombination by DSS1 via RPA Targeting and DNA Mimicry. *Molecular Cell*, 59(2), 176–187. <http://doi.org/10.1016/j.molcel.2015.05.032>
126. Zhu, X., Li, Z., Xu, H., Zhou, M., Du, L., & Zhang, Z. (2012). Overexpression of wheat lipid transfer protein gene TaLTP5 increases resistances to *Cochliobolus sativus* and *Fusarium graminearum* in transgenic wheat. *Functional & Integrative Genomics*, 12(3), 481–488. <http://doi.org/10.1007/s10142-012-0286-z>
127. Zipfel, C., & Robatzek, S. (2010). Pathogen-Associated Molecular Pattern-Triggered Immunity: Veni, Vidi...? *Plant Physiology*, 154(2), 551–554. <http://doi.org/10.1104/pp.110.161547>